รายงานการวิจัย

การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดตีนแรดจากธรรมชาติเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตดอกเห็ด

Selection and Genetic Improvement of Naturally *Tricholoma crassum* for Increasing Yield

ร ศ. มาลินี ตันติยาภรณ์
พรทิพย์ ภูมิแกดำ
ณัฐภรณ์ เวียนงาม
นุสรา เพิงใหญ่

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทกำหนดเรื่อง
ประจำปี 2546
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

มิถุนายน 2547

RCH
OK
629
.T73
TA51
เลขหมู่ 67996
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 17 ม.ค. 2550
b 11419313
i
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RESEARCH REPORT

Selection and Genetic Improvement of Naturally *Tricholoma crassum* for Increasing Yield

Assoc. Prof. Malinee Tantiyaporn
Miss Porntip Poomkaedum
Miss Natthaporn Veanngam
Miss Nutsara Pangyai

This research has been supported by the
National Research Council of Thailand(NRCT)
For the fiscal budget year 2003

June 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทกำหนดเรื่องประจำปี 2546 ในกลุ่มวิชาการการวิจัยประยุกต์สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ประจำปีงบประมาณ 2546

ขอขอบพระคุณคุณธานี ศรีวงศ์ชัย นักวิจัยของหน่วยปฏิบัติงานวิจัยแล็ปไบโอเทค มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ช่วยแนะนำการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยตลอดระยะเวลาการวิจัย

ร ศ. มาลินี ตันติยาภรณ์
พรทิพย์ ภูมิแกดำ
ณัฐภรณ์ เวียนงาม
นุสรา เพิงใหญ่

มิถุนายน 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดตีนแรดจากธรรมชาติเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตดอกเห็ด

ชื่อผู้วิจัย ร ศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ นางสาวพรทิพย์ ภูมิแกดำ นางสาวณัฐภรณ์ เวียนงาม และ นางสาวนุสรา เพิงใหญ่

ได้รับทุนอุดหนุนประเภทกำหนดเรื่อง ประจำปี 2546

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2545 - ตุลาคม 2546

.....

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดตีนแรด (*Tricholoma crassum*) 138 ตัวอย่าง จากจังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม อุบลราชธานี สกลนคร และ ศรีษะเกษ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยคือ สูตรอาหาร PDYB ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 21 วัน เมื่อนำเส้นใยทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแตกต่างของไอโซไซม์ 11 ชนิด บนพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอริซิส คือ ไอโซซิตริกดีไฮโดรจีเนส ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส แอซิดฟอสฟาเทส ฟอสโฟกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส กลูโคส-6-ฟอสเฟสดีไฮโดรจีเนส แลคเทตดีไฮโดรจีเนส มาเลตดีไฮโดรจีเนส แลคเคส และ เอสเทอเรส ผลปรากฏว่ามีเอนไซม์เพียง 8 ชนิด ที่สามารถนำผลไซโมแกรมมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.00 และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มเส้นใยเป็น 2 กลุ่ม ที่มีสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของลักษณะพันธุกรรมประมาณ 0.67 โดยกลุ่มที่ 1 เป็นเส้นใยจากจังหวัดมหาสารคาม นครราชสีมา และ อุบลราชธานี 8 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 เป็นเส้นใยจากจังหวัดสกลนคร ศรีษะเกษ และ อุบลราชธานี 30 ตัวอย่าง

ในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแรด 9 ตัวอย่างโดยเพิ่มเติมตัวอย่างจากจังหวัดร้อยเอ็ด บุรีรัมย์ ปทุมธานี และฟาร์มเห็ดอรัญญิกในกรุงเทพฯ ด้วยเทคนิค PCR – RFLP พบว่า การใช้ไพรเมอร์ 2 คู่คือ ITS1 - ITS4 เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS (internal transcibed spacer) และ 01 - LR12R เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS (intergenic spacer) ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 741 และ 933 คู่เบสตามลำดับ ภายหลังการตัดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *Hind*III, *Dde*I, *Hae*III, *Eco*RI และ *Hin*fI ได้ชิ้นย่อยของดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย เมื่อนำมาหาค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มเห็ดตีนแรดโดยวิธี UPGMA ในโปรแกรม WinBoot สามารถจัดกลุ่มเห็ดตีนแรดออกเป็น 3 กลุ่มตามสภาพภูมิศาสตร์ ยกเว้นเห็ดตีนแรดในกลุ่มที่สามจากจังหวัดบุรีรัมย์ที่แสดงความผันแปรทางพันธุกรรมแตกต่างจากเห็ดตีนแรดในภูมิภาคเดียวกันด้วยสัมประสิทธิ์ของความคล้ายคลึงกันที่ 0.8 .

ในการศึกษาระบบการผสมพันธุ์และมัลทิเพิลอัลลีลของเห็ดตีนแรด ได้นำเส้นใยโมโนคาริออนที่คัดเลือกไว้จาก 6 จังหวัดคือ จังหวัดปทุมธานี นครปฐม อุบลราชธานี สกลนคร มหาสารคาม และ ศรีสะเกษ และคัดเลือกเฉพาะเส้นใยโมโนคาริออนที่มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดอย่างน้อย 12 ไอโซเลทจากดอกเห็ดแต่ละจังหวัดเพื่อการผสมพันธุ์ภายในดอกเดียวกันที่ละคู่แบบพบกันหมด ภายหลังการผสมพันธุ์ตรวจการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น พบว่ามีอัตราส่วนของจำนวนคู่ผสมพันธุ์กันได้ต่อจำนวนคู่ผสมพันธุ์กันทั้งหมดเท่ากับ 1 : 4 แสดงว่าเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมได้มีระบบการผสมพันธุ์ชนิดผสมข้ามแบบเททระโพลาร์ เมื่อตรวจสอบ มัลทิเพิลอัลลีลของเห็ดตีนแรด โดยนำเส้นใยโมโนคาริออนที่คัดเลือกไว้ผสมข้ามดอกทีละคู่แบบพบกันหมด ผลการศึกษาพบว่าดอกเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมได้มีการกระจายตัวของอัลลีล โดยยีนควบคุมคู่ผสมพันธุ์ที่โลกัส A และโลกัส B มีจำนวน 16 อัลลีลที่แตกต่างกัน

ผลการศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรมด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโตรฟอริซิส และเทคนิค PCR -RFLP สามารถคัดเลือกเส้นใยที่มีความหลากหลายและความแตกต่างของลักษณะพันธุกรรมจากจังหวัดอุบลราชธานี และ จังหวัดบุรีรัมย์ นอกจากนี้การศึกษาระบบการผสมพันธุ์สามารถเก็บรวบรวมเส้นใยที่มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีและทราบยีโนไทป์ของยีนคู่ผสมพันธุ์ การตรวจสอบจำนวนมัลทิเพิลอัลลีลที่แตกต่างกันของตัวอย่างเห็ดที่สนใจและนำมาผสมพันธุ์ ก่อให้เกิดความหลากหลายของลักษณะพันธุกรรมในด้านสันฐานวิทยา คุณภาพ และ ผลผลิต ที่จะนำไปสู่การคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ในการผลิตดอกเห็ดในโรงเรือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Selection and Genetic Improvement of Naturally *Tricholoma crassum* for Increasing Yield

Researcher Assoc. Prof. Malinee Tantiyaporn , Miss Porntip Poomkaedum
Miss Natthaporn Veanngam and Miss Nutsara Pangyai

Duration 1 Year (August , 2002 - December , 2003)

ABSTRACT

One hundred and thirty-eight monokaryon isolates *Tricholoma crassum* from Nakornratchsima, Mahasalakham , Ubonratchathani and Srisaket were cultured on growth media. The suitable condition for the mycelial growth were PDYB medium at 25 °C for 21 days. All samples were analysed for isozyme variability on polyacrylamide gel electrophoresis with 11 enzymes system: isocitrate dehydrogenase, leucine aminopeptidase, acid phosphatase, phosphogluconate dehydrogenase, alkaline phosphatase, alcohol dehydrogenase, glucose - 6- phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, laccase and esterase. Eight of all systems showed polymorphism. Cluster analysis based on isozyme variability using the NTSYSpc 2.00 and UPGMA method revealed two clusters at similarity coefficient of 0.67. The first cluster consisted of monokaryon isolates from Nakornratchasima, Mahasalakham and 8 samples of Ubonratchathani. The second cluste r consisted of the isolates from Sakonnakhorn, Srisaket and 30 samples of Ubonratchathani.

The genetic variation of 9 samples of *Tricholoma crassum* adding from Roiyed , Burerum, Patumthani and Aranyig Farm in Bangkok was studied by technique of RFLP-PCR . The two primers pairs ITS1- ITS4 and O1-LR12R were used for PCR amplification on ITS (internal transcribed spacer) and IGS (intergenic spacer) regions of the nuclear ribosomal gene, and following by cutting with *Hind*III, *Dde*I, *Hae*III, *Eco*RI and *Hin*fI. Data analysis of the PCR -RFLP product based on similarity index and UPGMA method in WinBoot program revealed three clusters which were relaled to their geographic origin except Burirum sample that showed genetic variation from the same areas at similarity coefficient of 0.8 and were grouped into the thrid cluster.

Mating system and multiple alleles of *Tricholoma crassum* were studied. The monokaryon isolates were selected from ten sporocarp collections of Patumthani, Nakhonphatom, Ubonratchathani, Sakonnakorn, Mahasarakham and Srisaket . The best growth rate of 12 monokaryotic mycelia were used for mating. Mating system were determined by pairing the monokaryotic mycelia for each collection in all pairwise combinations. The presence of clamp connections after mating indicated sexual compatibility. The rates of compatible to all combination crosses were 1 : 4 which indicated tetrapolar heterothallism in *T. crassum* . In addition, multiple alleles among the monokaryons for each sporocarp of six provinces were examined on the basis of their mating interactions. The distribution of alleles from 6 areas possessed 16 different A and 16 different B factors.

The result of genetic variation of *Tricholoma crassum* by isozyme electrophoresis and RFLP - PCR technique could be selected the monokaryon isolates from Ubonratchathani and Burirum provinces that showed a higher level of variability than those obtained from another provinces. Mating system result could be collected the best growth rates of mycelia and known their mating genotypes for mating . The observation of different alleles for traits of interest could be transferred either by traditional crosses or by genetic transformation, resulting in improved desired strains for cultivation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของวิทยานิพนธ์	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.2.1. การเพาะเลี้ยงเห็ดตีนแรดในประเทศไทย	3
1.2.2 เทคนิคไอโซไซม์	4
1.2.3 เทคนิค PCR-RFLP	8
1.2.4 การเพาะเลี้ยงสปอร์ ระบบผสมพันธุ์และมัลทิเพิลอัลลีล	14
1.3 วัตถุประสงค์	19
1.4 ขอบเขตการ	19
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	19
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด	21
2.1.1 การจัดจำแนก	21
2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	21
2.1.3 การเจริญเติบโต	22
2.1.4 วงจรชีวิตของเห็ด	23
2.1.5 การสืบพันธุ์ของเห็ดรา	24
2.1.6 มัลทิเพิลอัลลีล	28
2.2 เทคนิคอิเล็คโทรโพรีซิส (Electrophoresis)	30
2.2.1 หลักการและเทคนิคอิเล็คโทรโฟรีซิส	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำอิเล็คโทรโฟรีซิส	30
2.2.3 อิเล็คโทรโฟรีซิสที่ใช้สำหรับการแยกโปรตีน	33
2.2.4 อิเล็คโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคลิลาไมด์เจล	33
2.2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพอลิอะคลิลาไมด์เจล.	34
2.3 เทคนิคไอโซไซม์ (Isozyme technique)	36
2.4 การวิเคราะห์ผลจากไซโมแกรม	37
2.5 การสกัดดีเอ็นเอ	38
2.6 RFLP.	39
2.7 PCR	40
2.8 Ribosomal RNA gene	42
2.9 Primer	42
2.9 เอนไซม์ตัดจำเพาะ	48
2.10 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส	51
2.11 การจัดจำแนก	53
บทที่ 3 การทดลอง	
3.1 จุลินทรีย์	57
3.2 สารเคมี	57
3.3 เครื่องมือ	61
วิธีการทดลอง	
3.4 **ส่วนที่ 1 : การทดลอง** Isozyme electrophoresis	
3.4.1 การศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดตีนแรดจากพื้นที่ต่างๆ	62
3.4.2 การเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคารีออนจากสปอร์เห็ด	62
3.4.3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนในอาหารเหลวเพื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์	62
3.4.3.1 การศึกษาระยะเวลาที่มีการเจริญสูงสุดของเส้นใยโมโนคารีออนในแต่ละจังหวัด	63
3.4.3.2 การศึกษาหาชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนในแต่ละจังหวัด	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนในแต่ละจังหวัด

3.4.4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดตีนแรด 64

3.4.4.1 การเตรียมเส้นใยและสกัดเอนไซม์ 64

3.4.4.2 การเตรียมตัวอย่าง. 64

3.4.4.3 การเตรียม polyacrylamide gel 65

3.4.4.4 การใส่สารตัวอย่าง 65

3.4.4.5 การผ่านกระแสไฟฟ้า 66

3.4.4.6 การย้อมสีเอนไซม์ 66

3.4.5 ชื่อย่อของเอนไซม์ 67

3.4.6 การวิเคราะห์ลักษณะไซโมแกรม 69

3.4.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและการจัดหมวดหมู่ตัวอย่าง 69

3.5 **ส่วนที่ 2 : การทดลอง PCR-RFLP** 69

3.5.1 การเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว 70

3.5.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ 70

3.5.3 ขั้นตอน PCR-RFLP 71

3.5.4 ขั้นตอนอิเล็กโตรฟอริซิส 71

3.5.5 การวิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษา PCR-RFLP 72

3,6 **ส่วนที่ 3 : การทดลองระบบการผสมพันธุ์และมัลทิเพิลอัลลีล** 72

3.6.1 การศึกษาอัตราการเจริญของเส้นใยโมโนคาริออน 73

3.6.2 การศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด 73

3.6.3 การหาจำนวนมัลทิเพิลอัลลีลของเห็ดตีนแรด 74

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 **ส่วนที่ 1 : ผลการทดลอง Isozyme electrophoresis**

4.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดตีนแรดจากพื้นที่ต่างๆ 75

4.1.2 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคารีออนจากสปอร์เห็ด 81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	172
อุปสรรคในการทำวิจัย	174
เอกสารอ้างอิง	175
ภาคผนวก ก	189
ภาคผนวก ข	199
ภาคผนวก ค	207
ประวัตินักวิจัย	223

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบการผสมพันธุ์ของเห็ด	16
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจำนวนมัลทิเพิลอัลลีล	18
2.1 รูปแบบการผสมพันธุ์ของไบโพลาร์ เฮเทอโรทัลลิก	26
2.2 การควบคุมการแสดงออกของยีนบนโลกัส A และ B ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเห็ด	27
2.3 รูปแบบการผสมพันธุ์ของเททระโพลาร์ เฮเทอโรทัลลิก	28
2.4 ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายยีนบริเวณ 18S rRNA	45
2.5 ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายยีนบริเวณ 5S / IGS rRNA	46
2.6 ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายยีนบริเวณ 28S rRNA	46
2.7 ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายยีนบริเวณ LSU rRNA	47
2.8 ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายยีนบริเวณ SSU rRNA	47
3.1 ส่วนประกอบต่างๆ ของสารเคมีที่ใช้ศึกษาไอโซไซม์	67
3.1 แสดงระบบของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจสอบ	70
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดตีนแรดจากพื้นที่ต่างๆ	76
4.2 จำนวนตัวอย่างเส้นใยโมโนคารีออนที่แยกได้ในแต่ละจังหวัด	82
4.3 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase (PGD)	86
4.4 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase (AKP)	87
4.5 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH)	88
4.6 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)	90
4.7 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH)	91
4.8 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ malate dehydrogenase (MDH)	92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ --- **หน้า**

4.9 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ laccase 93

4.10 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase (EST) 94

4.11 กลุ่มตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลไซโมแกรม 96

4.12 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ชนิด 102

4.13 ค่า similality index ของแถบดีเอ็นเอของเห็ดตีนแรด 111

4.14 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 115

4.15 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 116

4.16 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 117

4.17 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 2 118

4.18 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 119

4.19 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 120

4.20 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 121

4.21 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 122

4.22 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคาม 123

4.23 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดศรีสะเกษ 124

4.24 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 126

4.25 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 128

4.26 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 136

4.27 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 2 132

4.28 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 135

4.29 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 138

4.30 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 140

4.31 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 142

4.32 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคาม 145

4.33 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดศรีสะเกษ 147

4.34 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดที่เก็บรวบรวมได้ 6 จังหวัด โดยผสมข้ามดอกที่ละคู่แบบพบกันหมด 150

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะของดอกเห็ดตีนแรด 22

2.2 วงจรชีวิตของเห็ด 24

2.3 คลามีโดสปอร์ 24

2.4 การผสมพันธุ์ของ *Schizophyllum* 29

2.4 แคลมป์คอนเนคชันที่ไม่สมบูรณ์

2.5 แรงกระทำต่างๆที่มีต่อโมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้า 31

2.6 การเกิด polymerization 35

2.7 a-d ระบบบัฟเฟอร์ (a) และ (b) Continuous buffer system

(c) และ (d) Discontinuous buffer system 36

2.8 ตัวอย่างวิเคราะห์ไซโมแกรม 38

2.9 ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ 42

2.10บริเวณ ITS1 และ ITS2 ที่ต้องการเพิ่มขยายด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 44

2.11 บริเวณ IGS ที่ต้องการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR 44

3.1 อุปกรณ์และการรันเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส 66

4.1 ลักษณะของดอกเห็ดในแต่ละจังหวัด 77

4.2 ขนาดของเส้นใยเห็ดตีนแรดในแต่ละจังหวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 78

4.3 ขนาดสปอร์ของเห็ดตีนแรดในแต่ละจังหวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 79

4.4 สีของรอยพิมพ์สปอร์ของเห็ดจังหวัดต่างๆภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 80

4.5 เส้นใยโมโนคารีออนที่งอกจากเบซิดิโอสปอร์ของเห็ดตีนแรด 81

4.6 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด 83

4.7 ชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด 84

4.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด 85

4.9 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase 87

4.10รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase 88

4.11รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase 89

4.12รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ glucose-6-phosphase 90

4.13รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase 91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.14 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ malate dehydrogenase 92
4.15 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ laccase 93
4.16 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase 94
4.17 ฟีโนแกรมของตัวอย่างเส้นใยโมโนคาริออน 138 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.00 98
4.18 แถบ genomic DNA ของเส้นใยเห็ดตีนแรดจากจังหวัดต่างๆ 102
4.19 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ ITS ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ 103
4.20 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ IGS ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ 104
4.21 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ 104
4.22 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ 105
4.23 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ 106
4.24 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ*DdeI* ของเห็ดตีนแรดในจังหวัด 106
4.25 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ 107
4.26 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ 108
4.27 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ 108
4.28 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ 109
4.29 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ*DdeI* ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ 110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.30 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ 110
4.31 เดนโดแกรมของการจัดกลุ่มเห็ดตีนแรด โดยวิธี UPGMA ในโปรแกรม WinBoot 112
4.32 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 127
4.33 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 129
4.34 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 131
4.35 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 2 133
4.36 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 136
4.37 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 139
4.38 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 141
4.39 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 143
4.40 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม 146
4.41 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ 148
4.42 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดสกลนครดอกที่1 X สกลนครดอกที่ 2 151
4.43 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดสกลนครดอกที่1 X มหาสารคาม 152
4.44 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดสกลนครดอกที่2 X มหาสารคาม 152
4.45 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดสกลนครดอกที่1 X ปทุมธานีดอกที่ 1 152
4.46 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดสกลนครดอกที่2 X ปทุมธานีดอกที่ 1 153
4.47 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดมหาสารคาม X ปทุมธานีดอกที่ 1 153
4.48 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X ปทุมธานีดอกที่ 2 153
4.49 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดสกลนครดอกที่2 X ปทุมธานีดอกที่ 2 154
4.50 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดมหาสารคาม X ปทุมธานีดอกที่ 2 154
4.51 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X อุบลราชธานีดอกที่ 1 154
4.52 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X ปทุมธานีดอกที่ 2 155
4.53 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X อุบลราชธานีดอกที่ 1 156

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.54 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดมหาสารคาม X อุบลราชธานีดอกที่ 1 156
4.55 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X อุบลราชธานีดอกที่ 1 156
4.56 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 X อุบลราชธานีดอกที่ 1 157
4.57 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X อุบลราชธานีดอกที่ 2 157
4.58 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X อุบลราชธานีดอกที่ 2 157
4.59 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดมหาสารคาม X อุบลราชธานีดอกที่ 2 158
4.60 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X อุบลราชธานีดอกที่ 2 158
4.61 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 X อุบลราชธานีดอกที่ 2 158
4.62 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 1 159
4.63 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X นครปฐมดอกที่ 1 159
4.64 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนอุบลราชธานีดอกที่ 1 X อุบลราชธานีดอกที่ 2 160
4.65 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดมหาสารคาม X นครปฐมดอกที่ 1 161
4.66 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 1 161
4.67 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 X นครปฐมดอกที่ 1 161
4.68 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนอุบลราชธานีดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 1 162
4.69 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนอุบลราชธานีดอกที่ 2 X นครปฐมดอกที่ 1 162
4.70 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 2 162
4.71 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X นครปฐมดอกที่ 2 163
4.72 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดมหาสารคาม X นครปฐมดอกที่ 2 163
4.73 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 2 163
4.74 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 2 164
4.75 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 2 164
4.76 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 X นครปฐมดอกที่ 2 164
4.77 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 2 165
4.78 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X ศรีสะเกษ 166

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.79 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X ศรีสะเกษ 166
4.80 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดมหาสารคาม X ศรีสะเกษ 166
4.81 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X ศรีสะเกษ 167
4.82 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 X ศรีสะเกษ 167
4.83 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 X ศรีสะเกษ 167
4.84 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 X ศรีสะเกษ 168
4.85 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 X ศรีสะเกษ 168
4.86 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากจังหวัดนครปฐมดอกที่ 2 X ศรีสะเกษ 168

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

เห็ดตีนแรดมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tricholomacrassum* เป็นเห็ดในตระกูล Tricholomataceae เช่นเดียวกับเห็ดนางรม และเห็ดเป๋าฮื้อ ซึ่งได้รับการจัดจำแนกโดยสวนพฤกษศาสตร์แห่งราชสำนักประเทศอังกฤษ (ดีพร้อม, 2529) ในประเทศไทยแต่ละท้องถิ่นจะมีชื่อเรียกเห็ดตีนแรดแตกต่างกัน โดยภาคเหนือเรียกว่า "เห็ดจั่น" ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า"เห็ดตีนแรด" เพราะมีขนาดใหญ่ ส่วนภาคกลางเรียกว่า "เห็ดตับเต่าขาว" (ปัญญาและกิตติพงษ์, 2538) เห็ดชนิดนี้เป็นเห็ดรับประทานได้และมีรสชาติดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีโปรตีน 18.58 กรัม ไขมัน 0.287 กรัม คาร์โบไฮเดรต 10.02 กรัม แคลเซียม 2.71 มิลลิกรัม เหล็ก 3.35 มิลลิกรัม ต่อ น้ำหนักเห็ด 100 กรัม (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2538) มีสารช่วยป้องกันโรคมะเร็ง (ศิริวรรณ สุทธิจิตต์และไมตรี สุทธิจิตต์. 2545) ดอกมีขนาดใหญ่สีขาวหรือสีขาวปนเทา สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ถ้าเปรียบเทียบรสชาติกับเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติแล้วจะเป็นรองเฉพาะเห็ดโคน คุณภาพจะใกล้เคียงกับเห็ดเผาะ เห็ดมันปูและเห็ดขาไก่ เมื่อนำมาประกอบอาหารมีกลิ่นหอม รสหวาน เนื้อกรุบกรอบไม่เหนียว มีคุณสมบัติไม่ย่อยตัวเอง (autolysis) (ดีพร้อม ไชยวงค์เกียรติ. 2529) ในรูปเห็ดสดสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นนาน 1 สัปดาห์ ในรูปของเห็ดแห้งยังคงมีรสชาติและคุณภาพที่เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกูล. 2538) จากคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เห็ดตีนแรดจึงเป็นเห็ดที่น่าสนใจและนำมาพัฒนาเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญในอนาคตได้

ในปัจจุบันเห็ดตีนแรดเริ่มเป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งโดยปกติธรรมชาติของเห็ดตีนแรดจะออกดอกในช่วงฤดูฝนเท่านั้นแต่เนื่องจากเทคโนโลยีมีความเจริญก้าวหน้ามากขึ้น จึงสามารถนำเชื้อเห็ดมาเพาะเป็นการค้าได้ตลอดทั้งปี มีฟาร์มหลายแห่งที่ทำการเพาะเห็ดชนิดนี้ โดยผลิตก้อนเชื้อและดอกเห็ดเพื่อจำหน่าย เคยทดลองส่งออกไปยังฮ่องกงได้รับความนิยมมากและได้รับการเสนอในราคาที่สูง (เกษม สร้อยทอง. 2529) จากการรวมกลุ่มกันของเกษตรกรจังหวัดสุพรรณบุรีในต้นปี 2002 เพื่อหารายได้เสริมโดยเพาะเห็ดตีนแรดร่วมกับการปลูกผักกินใบเพื่อลดต้นทุนการผลิตและไม่ต้องใช้สารเคมี (ชาญยุทธ์ ภานุทัต และ คณะ 2543) ทำให้เห็ดตีนแรดเป็นที่รู้จักกันมากขึ้น ซึ่งราคาเห็ดประมาณ 50 บาทต่อกิโลกรัม แต่เนื่องจากขนาดของเห็ดมีขนาดใหญ่มาก ทำให้ผู้บริโภคที่ไม่รู้จักเห็ดชนิดนี้มาก่อนไม่กล้ารับประทาน ประกอบกับมีข้อมูลในเรื่องการผลิตและการปรับปรุงพันธุ์ไม่มากพอ รวมถึงขาดการประชาสัมพันธ์ที่ดี จึงทำให้ตลาดผู้บริโภครู้จักเห็ดชนิดนี้ไม่เท่ากับเห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดหลินจือ และเห็ดเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ ในตลาดภายในประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรม ไม่เพียงแต่พิจราณาในด้านสัณฐานวิทยาภายนอกจำเป็นต้องศึกษาในระดับชีวโมเลกุลควบคู่ เพื่อช่วยตรวจสอบและวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะพันธุกรรมให้ถูกต้อง และชัดเจนเพื่อการจัดจำแนกกลุ่มเห็ด(Edward, 1999) เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์จะช่วยตรวจสอบถึงความหลากหลายของลักษณะพันธุกรรมในระดับยีนได้ดี เทคนิคที่นำมาใช้และนิยมได้แก่ ไอโซไซม์อิเล็กโตรฟอริซิส (isozyme electrophoresis), RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) และ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

การผลิตดอกเห็ดเป็นผลจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งให้เบสิดิโอสปอร์จำนวนมากที่เจริญเติบโตเป็นเส้นใยโมโนคาริออนที่มีความหลากหลายของลักษณะพันธุกรรม และการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน สายพันธุ์ที่ดีควรมีลักษณะของเส้นใยที่เจริญเติบโตได้ดีเมื่อนำมาผสมพันธุ์ สามารถออกดอกเร็ว ผลผลิตดอกสูงในวัสดุเพาะที่มีต้นทุนต่ำ ขนาด รูปร่าง รสชาติ ตรงกับความนิยมของผู้บริโภค การคัดเลือกและเก็บรวบรวมลักษณะที่ดีเหล่านี้จะช่วยพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์เห็ดให้ดียิ่งขึ้น สายพันธุ์ที่ดีจะช่วยให้ผู้ทำการเพาะเห็ดที่เป็นการค้า ได้รับผลตอบแทนที่แน่นอน

ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ด ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้ การรวมโพรโทพลาสซึม (protoplasm)ของเส้นใยโมโนคาริออน (monokaryon) การรวมนิวเคลียสและการแบ่งแบบไมโอซิสเพื่อผลิตเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore)ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ระบบการผสมพันธุ์ในเห็ดมี 2 แบบคือ โฮโมทัลลิก (homothallic) ซึ่งเป็นเห็ดชนิดที่มีการผสมพันธุ์ภายในตัวเองและเฮเทอโรทัลลิก (heterothallic)ซึ่งเป็นเห็ดชนิดที่ต้องผสมข้าม สำหรับเห็ดชนิดผสมข้าม จะมียีนที่ควบคุมคู่ผสมพันธุ์ 2 แบบ คือ แบบไบโพลาร์ (bipolar) โดยยีนที่ควบคุมคู่ผสมพันธุ์มี 1 โลกัส 2 อัลลีล พบได้ในเห็ดกลุ่ม *Agaricus* Gasteromycetes polypores และ jelly fungi อัตราส่วนของคู่ที่ผสมพันธุ์กันได้ (compatible) ต่อคู่ผสมพันธุ์กันทั้งหมด (incompatible) เท่ากับ 1 :2 และแบบเททระโพลาร์ (tetrapolar) มียีนที่ควบคุมคู่ผสมพันธุ์ 2 โลกัส 4 อัลลีล ยีนบนโลกัสทั้งสองอยู่ต่างโครโมโซม อัตราส่วนของคู่ที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อคู่ผสมพันธุ์กันทั้งหมดเท่ากับ 1 : 4 (Raper. 1966) การศึกษาพบว่าเห็ดส่วนใหญ่มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ การผสมพันธุ์กันได้เพื่อผลิตดอกเห็ดตรวจสอบได้ในห้องปฏิบัติการจากการเกิดแคลมป์ คอนเนคชัน(clamp connection)

การศึกษาประชากรเห็ดจากแหล่งต่างๆที่มีสภาพภูมิศาสตร์แตกต่างกัน ที่มีระบบการผสมพันธุ์ทั้งแบบไบโพลาร์และเททระโพลาร์ พบว่าแต่ละโลกัส มีอัลลีลได้มากกว่า 1 อัลลีลหรือเป็นมัลทิเพิลอัลลีล (multiple alleles) เช่น เห็ดแครง(*Schizophyllum commune*) มีอัลลีล 17A และ 20B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Zervakis and Balis. 1995) และเห็ดนางรม (*P. ostreatus*) มีอัลลีล 63A และ 190B (Eugenio and Anderson. 1968) เป็นต้น การศึกษาจำนวนอัลลีลของยีนคู่ผสมพันธุ์จากแหล่งต่างๆ จะเป็นประโยชน์ที่จะทำให้ทราบถึงระบบการผสมพันธุ์ที่ทำให้เกิดความหลากหลายของลักษณะพันธุกรรมเพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์

โครงงานวิจัยนี้ แบ่งเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. การเก็บรวบรวมและเพาะเลี้ยงเส้นใยจากจังหวัดต่างๆของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 จังหวัด ศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรม และการจัดกลุ่มเส้นใยด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโตรฟอริซิส

2. การรวบรวมตัวอย่างเห็ดเพิ่มเติมจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 จังหวัดและภาคกลางศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรม และการจัดกลุ่มเส้นใยด้วยเทคนิค PCR-RFLP

3. ศึกษาระบบการผสมพันธุ์จากเส้นใยที่เก็บรวบรวมได้เพื่อตรวจสอบและคัดเลือกยีนคู่ผสมพันธุ์ที่ผสมพันธุ์กันได้และสามารถผลิตดอกเห็ด

1.2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเห็ดตีนแรดในประเทศไทย

เห็ดตีนแรดในประเทศไทยเริ่มมีการศึกษากันในปี พ.ศ.2501 โดย ณรงค์ มีนะนันทน์ ได้ศึกษาการเจริญของเห็ดตีนแรดพบว่าสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร corn meal agar และในการทำเชื้อเห็ด (spawn) เส้นใยเห็ดเจริญได้ดีบนเปลือกเมล็ดบัวหมักกับมูลม้าหรือมูลม้าหมักกับขี้เลื่อยไม้ยางในอัตราส่วน 1 : 1 ต่อมาสำเภา ภัทรเกษวิทย์ และคณะ (2514) ได้ศึกษาการเพาะเห็ดตีนแรดในวัสดุเพาะหลายชนิดด้วยกันคือ เปลือกถั่วลิสง ขี้เลื่อยหมักกับมูลม้า ขี้เลื่อยผสมกับเมล็ดข้าวโพดป่นหรือเมล็ดข้าวฟ่างป่น ขี้เลื่อยหมักกับมูลไก่ และปิดผิวหน้า (casing) ด้วยดินร่วนปนทรายผสมกับถ่านไม้ พบว่าสามารถเพาะให้เกิดดอกได้ ยกเว้นขี้เลื่อยหมักกับมูลไก่และขี้เลื่อยเพียงอย่างเดียวที่มีการเจริญของเห็ดน้อยมาก

พันธุ์ทวี ภักดีดินแดน และคณะ (2517) ศึกษาการเพาะเห็ดตีนแรดโดยใช้ฟางสับเป็นท่อนๆ แล้วแช่น้ำให้ชุ่ม นำไปรองพื้นกระบะที่ใช้เพาะ แล้วใส่ส่วนผสมของปุ๋ยหมักหนา 6-7 นิ้ว ใส่เชื้อเห็ดแล้วคลุมด้วยพลาสติก เมื่อเส้นใยเจริญเต็มจึงปิดผิวหน้าด้วยดิน เห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดีแต่ยังให้ผลการงอกของดอกไม่ดีมากนัก

พันธ์ทวี ภักดีดินแดน (2518) ได้ทดลองเลี้ยงเห็ดตีนแรดบนอาหารวุ้น 24 ชนิด พบว่าเส้นใยของเห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่ประกอบด้วย wort agar 20 กรัม มันฝรั่ง 300 กรัม ยีสต์สกัด (yeast extract) 5 กรัม กลูโคส 20 กรัม วุ้น 10 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

พันธุ์ทวี ภักดีดินแดน และคณะ (2518-2519) สามารถเพาะเห็ดตีนแรดโดยไม่ต้องใช้วิธีการปิดผิวหน้าด้วยดิน ส่วนประกอบของปุ๋ยหมักที่ใช้คือฟางสับกับซังข้าวโพดป่น รำ เมล็ดข้าวโพดป่น และ น้ำ พีเอชประมาณ 6.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ (2519, 2520) ทดลองเพาะเห็ดตีนแรดโดยใช้ถุงพลาสติกเป็นผลสำเร็จ และพบว่าเห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดีในวัสดุเพาะหลายชนิด โดยวัสดุที่เพาะคือ ฟางสับผสมกับข้าวโพดป่น ขังข้าวโพดบ่นล้วน ฟางสับกับขี้ม้า และพบว่าหากมีการเติมด้วยรำละเอียด 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดีขึ้น

วสันณ์ เพชรรัตน์ และวิจัย รักวิทยาศาสตร์ (2530a) ศึกษาการเพาะเห็ดตีนแรดในวัสดุเพาะ 8 ชนิดซึ่งมีข้าวโพดเป็นหลักในถุงพลาสติก พบว่าเห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดีและให้ผลผลิตดอกเห็ดสูงสุดในวัสดุเพาะที่ประกอบด้วยข้าวโพดป่น ขี้เลื่อยและเมล็ดข้าวโพดป่นในอัตราส่วน 15: 4 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณวัสดุเพาะที่เหมาะสมคือ 500 กรัมต่อถุง และปิดผิวหน้าด้วยดินร่วน (casing) ทำให้การเกิดดอกเห็ดเกิดได้ดีกว่าไม่มีการปิดผิวหน้าก้อนเชื้อ พีเอชของดินร่วนที่ใช้ปิดผิวหน้าที่เหมาะสมคือพีเอชเท่ากับ 8.4 และ 8.9

ชาญยุทธ์ ภานุทัต และคณะ (2543) ศึกษาการเพาะเห็ดตีนแรดร่วมกับการปลูกผัก คือ ผักบุ้งและกวางตุ้ง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดตีนแรดและผักทั้งสองชนิด พบว่าให้ผลที่ดี โดยเห็ดตีนแรดและผักสามารถใช้น้ำและแร่ธาตุร่วมกัน ผลผลิตที่ได้ปลอดจากการใช้สารเคมี ไม่มีแมลงรบกวน เห็ดตีนแรดสามารถเก็บผลผลิตได้นานถึง 8 เดือน ให้ผลตอบแทนที่สูงโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดูแล ซึ่งผลที่ได้จะนำไปสู่การพัฒนาการปลูกผักปลอดสารพิษ โดยไม่ต้องกางมุ้งและใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภค

1.2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคไอโซไซม์

สุภาภรณ์ จาริยุวัฒน์(2541) ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ esterase(EST), lactate dehydrogenase (LDH), leucine aminopeptidase(LAP), และ malate dehydrogenase(MDH) จากเส้นใยโมโนคา รีออน พบว่ามีลักษณะแถบเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 59 แบบ ซึ่ง esterase ให้ความแตกต่างได้ดีกว่าเอนไซม์อื่น สามารถจัดกลุ่มของเส้นใยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันได้ 10 กลุ่ม

วันดี ยินดียั่งยืน (2533) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์ และความสามารถในการเกิดดอกของสายพันธุ์ลูกผสมเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) จากผลการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ glutamate dehydrogenase(GDH), acid phosphatase(ACP), laccase(LAC) และ esterase โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าลูกผสมบางกลุ่มมีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์พ่อหรือแม่ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ MU4 และ MU12 และลูกผสมที่ไม่เกิดดอกมีรูปแบบไอโซไซม์ต่างจากกลุ่มที่เกิดดอกอย่างชัดเจน

ชัชฎาพร อินทำมา (2538) ได้ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดโคน (*Termitomyces* sp.) โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์ 4 ชนิดคือ 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH), isocitrate dehydrogenase(IDH), malate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(G-6PDH) โดยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ในเห็ดโคน 11 ตัวอย่าง ได้เป็น 6 กลุ่ม

ประเสริฐ วุฒิคีมภีร์ (2539) ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Plerotus* sp.) และเห็ดนางรมสีทอง (*P. Ostreatus*) โดยรวบรวมเห็ดที่คาดว่าจะเป็นเห็ดชนิดนี้จากพื้นที่ต่างๆ จำนวน 28 ไอโซเลท นำมาวิเคราะห์แถบเอนไซม์ alcohol dehydrogenase, (ADH), esterase, glucose-6- phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenaseประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกกลุ่มเห็ดออกเป็นแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจน การจำแนกเห็ดในสกุลนี้ทำได้ยาก โดยเฉพาะเห็ดนางฟ้าและเห็ดนางฟ้าภูฐานที่มีความคล้ายคลึงกันมาก แต่ผลของรูปแบบไอโซไซม์ที่ปรากฏมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

เทพบุตร ดีรักษาพร และคณะ (2540) ได้ศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อทดสอบความเป็น พ่อ แม่ ลูก ระหว่างลูกผสมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว จากระบบเอนไซม์ 6 ระบบคือ esterase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase, diaphorase(DIA), shikimic dehydrogenase(SKDH) และ formate dehydrogenase(FDH) พบว่ามีไซโมแกรมปรากฏเพียง 3 ระบบคือ MDH, EST และ SKDH ที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างลูกผสม กับ พ่อ แม่ ได้

ฐิติพร อำพนพิบูล (2544) ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของเห็ดฟาง (*Volvariell volvacea*) ที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ 6 แหล่งใน 4 จังหวัดคือ บางจาก (กรุงเทพฯ) ตลาดท่าน้ำนนทบุรี(นนทบุรี) สามย่าน (กรุงเทพฯ) อ่างทอง ปากน้ำ (สมุทรปราการ) และบ้านพฤกษา (สมุทรปราการ) เพื่อหาความแปรผันทางพันธุกรรมของเห็ดฟางในแต่ละพื้นที่ โดยนำเส้นใยเห็ดฟางอายุ 14 วัน มาศึกษาไซโมแกรมของไอโซไซม์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล (PAGE) ในเอนไซม์ 8 ระบบคือ acid phosphatase(ACP), glutamate oxaloacetate transaminase(GOT), G-6-PD, peroxidase(PER), MDH, 6-PGDH, EST และ SKDH พบว่าปรากฏแถบไซโมแกรมเพียง 6 ระบบเอนไซม์ได้แก่ EST, G-6-PDH, SKD, PER, MDHและ 6-PGD H แล้ววิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ด้วยโปรแกรม Bioasys2 เพื่อแยกความแตกต่างและจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งสามารถจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1ได้แก่ เห็ดฟางจาก บางจาก ปากน้ำ และตลาดน้ำนนทบุรี กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เห็ดฟาง สามย่าน อ่างทอง และบ้านพฤกษา ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นมาคเกอร์ (marker) ในการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดฟางเพื่อบ่งชี้ลักษณะที่ต้องการได้

เบญจมาภรณ์ บุนนาค (2544) ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.) ที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ 6 แห่งใน 3 จังหวัดคือ ปากคลองตลาด (กรุงเทพฯ) อำเภอตลิ่งชัน (กรุงเทพฯ) อำเภอปากเกร็ด (นนทบุรี) อำเภอเมือง (นนทบุรี) อำเภอมหาชัย (สมุทรสาคร) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อำเภอบ้านแพ้ว (สมุทรสาคร) เพื่อหาความแปรผันทางพันธุกรรม โดยนำเส้นใยเห็ดนางฟ้าอายุ 12 วัน มาศึกษาหาไซโมแกรมของไอโซไซม์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสอะคริลาไมด์เจล ในเอนไซม์ 8 ระบบด้วยกันคือ ACP, GOT, G-6-PDH, PER, MDH, 6-PGDH, EST และ SKD H ปรากฏแถบไซโมแกรม 5 ระบบได้แก่ EST, G-6PDH, SKDH, PER และ MDH นำผลของไซโมแกรมที่ได้มาแปลผลเพื่อวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ด้วยโปรแกรม Bioasys2 เพื่อแยกความแตกต่างและจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ปากคลองตลาดและอำเภอปากเกร็ด กลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มแรกได้แก่ เขตตลิ่งชันและอำเภอเมืองนนทบุรี กลุ่มย่อยที่สอง คือ อำเภอมหาชัยและอำเภอบ้านแพ้ว

ศรินทร์ทิพย์ งามรัตนวงศ์ (2544) ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของเห็ดขี้ควายที่เก็บจาก 3 พื้นที่คือ หมู่บ้านที่ 3 หมู่บ้านที่ 4 และหมู่บ้านที่ 5 ของตำบลโรงช้าง อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสอะคริลาไมด์เจล (PAGE) ใน 8 ระบบเอนไซม์คือ ACP, GOT, G6PDH, PER, MDH, 6-PGDH, EST และ SKD H พบว่าปรากฏแถบไซโมแกรมใน 5 ระบบเอนไซม์ คือ MDH, GOT, EST, SKDH และ G6PD H โดยตัวอย่างในหมู่บ้านที่ 4 มีลักษณะไซโมแกรมที่แตกต่างจากหมู่บ้านที่ 3 และหมู่บ้านที่ 5 ในระบบเอนไซม์ 2 ระบบคือ EST และ G6PDH จากการวิเคราะห์หาความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Biosys2 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างหมู่บ้านที่ 3 และหมู่บ้านที่ 5 ที่มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (genetic of similarity) เท่ากับ 1.000 และกลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างหมู่ที่ 4 มีค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมเท่ากับกลุ่มแรกคือ 0.722

ส่องแสง วิงวาท (2544) ได้ศึกษาแบบแผนของรูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum*) เพื่อหาความแปรผันทางพันธุกรรม โดยศึกษาจากเอนไซม์ 8 ระบบคือ ACP, GOT, G6PDH, PER, MDH, 6-PGDH, EST และ SKDH พบว่ามีเอนไซม์ 4 ระบบที่แสดงความแตกต่างของตัวอย่างเห็ดอย่างชัดเจนคือ MDH, EST, ACP และ GOT ซึ่งจากผลการศึกษาสามารถนำผลที่ได้ไปใช้เป็นไอโซไซม์มาคเกอร์ ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดหมื่นปีต่อไป

Prilling and Molitoris (1979) ศึกษากลุ่มเห็ดนางรม(*P. ostreatus*) โดยใช้ไซโมแกรมของเอนไซม์ฟีโนออกซิเดส (phenoloxidase) และ laccase พบว่าสามารถจำแนกเห็ดนางรมได้ 2 กลุ่มสายพันธุ์ และไซโมแกรมที่ได้เกิดจากการควบคุมของยีนเพียงยีนเดียว และพบว่าในจำนวน 9 แถบมีเพียงแถบเดียวที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของดอก

Royse and May (1982) ศึกษาความแปรผันของของรูปแบบไอโซไซม์ ของเห็ด *Agaricus brunnescens* 34สายพันธุ์ที่มีการเพาะเลี้ยงเป็นการค้า และ 162 สายพันธุ์ของศูนย์รวบรวมพันธุ์เห็ดมหาวิทยาลัยเพนซิลเวเนีย โดยตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ของเห็ดชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นี้จากสารสกัดเส้นใยและทดอสบจากเอนไซม์ 20 ระบบ พบว่ามี 5 loci และ 27 กลุ่ม genotypic ด้วยกัน ซึ่งเห็ดที่เพาะเป็นการค้านั้นมีเพียง 5 กลุ่ม genotypic เท่านั้น

May and Royes (1982) ทำการตรวจสอบผลของการผสมข้ามระหว่างตัวอย่างของเห็ดชนิด *Agaricus brunnescens* โดยใช้สายพันธุ์ชนิด homokaryotic ที่แยกได้จาก single spore ของเห็ด และตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ศึกษาการผสมข้ามโดยนำมาเลี้ยงผสมในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA อยู่ จากนั้นแยกเอาส่วนตรงกลางที่เกิดการชนกันของเส้นใยของแต่ละคู่ตัวอย่างมาเลี้ยงรวมกันในจานเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง นำลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามภายในเห็ดชนิดเดียวกันที่ได้มาตรวจสอบการแสดงออกของไอโซไซม์ พบว่ามีลักษณะใหม่ๆ เกิดขึ้น

Evers and Ross (1983) ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นของเห็ด *Coprinus congregatus* ด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิสอะคริลาไมด์เจล โดยใช้ส่วนผสมที่แตกต่างกันของสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ MDH เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบที่เกิดขึ้น พบว่าสาร phenazine methosulfate (PMS) มีผลต่อการเกิดรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ MDH และเมื่อใช้ส่วนผสมที่ประกอบด้วยสารหลายชนิดเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดชนิด dikaryon และ monokaryon พบว่ารูปแบบที่เกิดขึ้นของ dikaryon มีรูปแบบที่มาจากการรวมกันของรูปแบบ monokaryon

Kulkani *et.al.* (1986) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ด *Pluerotus ostreatus* ชนิด dikaryon 30 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิสอะคริลาไมด์เจล โดยศึกษาจากกิจกรรมของเอนไซม์ 15 ชนิดในการเกิดแถบสีบนแผ่นเจล แล้วคำนวณรูปแบบแถบที่ได้ พบว่าตัวอย่างมี genotypic ที่แตกต่างกัน 28 กลุ่ม และค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของตัวอย่างคำนวณได้จากการเปรียบเทียบตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้าง dendrogram เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่าง ผลที่ได้คือตัวอย่างมีความแปรผันทางพันธุกรรมมากภายในกลุ่ม ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้อาจเป็นประโยชน์ต่อการสร้างลูกผสมใหม่ๆ โดยการผสมข้ามตัวอย่างชนิด monokaryons

Magae *et.al.* (1990) ได้ศึกษาเอนไซม์ในสกุลเห็ด โดยเปรียบเทียบวิธีการทางอิเล็กโทรโฟรีซิส 4 วิธี และใช้เอนไซม์ 7 ชนิดพบว่า 4-15 เปอร์เซ็นต์ gradient PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) มีความเหมาะสมมากที่สุดในการวิเคราะห์หาดัชนีความคล้ายคลึงกัน (index of similarity) ของเห็ดนางรม (*P. ostreatus*) และเห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) จะมีค่าความเหมือนที่สอดคล้องกัน ดังนั้นจึงสามารถที่จะนำมาผสมกันได้

Fukuda and Tokimoto (1991) ศึกษารูปแบบอิเล็กโทรโฟรีซิสของเอนไซม์ 9 ชนิด ของเส้นใยเห็ดหอมในธรรมชาติ 93 สายพันธุ์ พบว่าเห็ดหอมจากประเทศญี่ปุ่น จีน ปาปัวนิวกินี และนิวซีแลนด์ แต่ละสายพันธุ์มีรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันในเอนไซม์ 9 ชนิด ยกเว้นในเห็ดหอมที่มาจากประเทศญี่ปุ่นและจีนบางตัวอย่างที่มีรูปแบบไอโซไซม์ที่ใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lagarere and Iracabal (1993) ศึกษาความแปรผันของรูปแบบ polymor phism และ phenetic ของเอนไซม์ 2 กลุ่มคือ กลุ่ม hydrolase และกลุ่ม oxidroreductases ในเห็ด *Agaricus bisporus* และ *Pleurotus cornucopiae* พบว่ารูปแบบของ polymorphism และ phenetic ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนจะพบในเอนไซม์ hydroase มากกว่ากลุ่มเอนไซม์ oxidroreductases โดยสามารถจัดกลุ่มตัวอย่าง *A. bisporus* จาก 12 ตัวอย่าง ได้ 3 กลุ่ม ส่วนเห็ด *P. cornucopiae* นั้นพบว่ามีความแปรผันสูงมาก โดยจะสัมพันธ์กับพื้นที่ของตัวอย่างนั้นๆ

Zervakis *et. al.* (1994) ศึกษาความแปรผันทั้งภายในและภายนอกของเห็ด *Pleurotus* 11 ชนิด จากกิจกรรมของเอนไซม์ 11 เอนไซม์ พบว่ามีทั้งหมด 18 loci โดย peptidase(PEPa) มี 3 loci ส่วน G6PDH, LAP, MDH, PEPcและ phosphoglucomutase(PGM) มีอย่างละ 2 loci สำหรับ acid phosphatase(APH), hexokinase(HK), isocitrate dehydrogenase(IDH), 6PGDH มีเพียงอย่างละ 1 locus ซึ่งแบ่งเป็น 51 genotypic class ความแปรผันทางพันธุกรรมภายในชนิดของ *P. cystidiosus* และ *P. eryngii* จะสูงที่สุด ส่วน *P. cornucopiae, P. dryinus* และ *P. sajor-caju* มีความแปรผันทางพันธุกรรมภายในชนิดที่ต่ำ นอกจากนี้ ยังพบว่า *P. cornucopiae, P. dryinus*, *P. eryngii* และ *P. cystidiosus* มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

Matsumoto *et. al.* (1995) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ด *Pleurotus ostreatus* ที่คัดเลือกมาจาก ญี่ปุ่น ยุโรป และอเมริกา ทั้งหมด 33 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค isoelectric focusing บนพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยศึกษาจากเอนไซม์ 5 ชนิดคือ APH, ADH, EST, LAC และ MDH พบว่าแต่ละเอนไซม์มีรูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นคือ 19, 9, 32, 11 และ 10 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์รูปแบบที่เกิดขึ้นจาก 5 เอนไซม์พบว่าแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างของ eletrophoretic phenotype อย่างชัดเจน 33 แบบและสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ 4 กลุ่มด้วยกันซึ่งแต่ละกลุ่มก็มีพื้นที่ที่ต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับพื้นที่ของตัวอย่างด้วย

Justin and Abraham (2001) ได้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ *Pleurotus citrinopileatus* ที่กลายพันธ์แล้ว 7 ตัวอย่างด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสโพลีอะคริลาไมด์เจล จากเอนไซม์ 7 ชนิดคือ EST, superoxide dismutase (SOD), polyphenol oxidase (PPO), ACP, lactate LDH, PER และ MDH พบว่ามีทั้งหมด 19 loci และมีความแปรผันของยีนโดยเฉลี่ย 0.21 สูงกว่าพ่อและแม่ (0.15) และทำให้ทราบว่ามีกลุ่มตัวอย่างที่กลายพันธุ์ 3 กลุ่มที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง

1.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิค RFLP - PCR

Anderson *et. al.* (2001) ได้ทำการแยก *Pisolithus* 53 ไอโซเลท จากพื้นที่ต่างๆในภาคกลางและภาคตะวันออกของออสเตรเลีย และนำ2ไอโซเลทจากภาคตะวันออกเฉียงใต้ และ1ไอโซเลทจากอเมริกามาเปรียบเทียบกันโดยใช้เทคนิค ITS-RFLP และหาลำดับเบสบริเวณ ITS(internal transcribed

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spacers) ผลจากการวิเคราะห์ RFLP กลุ่มแรกสามารถแยกได้เป็น8กลุ่ม ตัวอย่างส่วนใหญ่จะถูกแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อยอยู่ภายใน2กลุ่มใหญ่ ไอโซเลทจากออสเตรเลียส่วนใหญ่จะสอดคล้องกับการจัดกลุ่มของ *P. albus* หรือ *P. marmoratus* มีเพียงไอโซเลทเดียวที่มีอันดับเบสที่จัดจำแนกได้ต่ำกว่าไอโซเลทอื่น(61.6-78%) สังเกตุพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญภายในสปีชีส์ของ *P. albus* โดยเทคนิค ITS-RFLP

Begeron *et. al.* (2002) จัดโครงสร้างอนุกรมวิธานของราสนิมในจีนัส *Entyloma* จากข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์ โดยทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ LSU (large subunits) และ ITS พบว่าลำดับเบสแสดงความคล้ายคลึงกันภายในสปีชีส์ของ *Entyloma* สูงกว่าในราสนิมอื่นๆ นอกจากนี้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในจีนัส *Entyloma* ยังมีความสัมพันธ์กับพืชที่อาศัยร่วมอีกด้วย

Bunyard *et. al.*(1996) จัดจำแนก DNA polymorphism ของเห็ดราจำพวก Morels โดยทำการเพิ่มขยายบริเวณ ITS และ IGS(intergenic spacer ของไรโบโซมอลนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ หลังจากนั้นทำ RFLP และวิธี microsattellite ผลจากการเพิ่มขยายปริมาณที่ได้สามารถนำมาเป็นแนวทางในการประเมิน รวมทั้งผลจากวิธี microsattellite แสดงให้เห็นว่า Morels มี intraspecific DNA polymorphism น้อยกว่าราในกลุ่ม Ascomycetes อื่นๆ

Chen et. al. (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Ophioceras* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์โดยทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 18 S ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ภายในสปีชีส์ของ *Ophioceras* และ *Pseudohalonectria* ซึ่งเป็นจีนัสที่มีความใกล้ชิดกันได้ แต่วิธีทางอณูพันธุศาสตร์พบว่า *Pseudohalonectria* จะถูกจัดเป็นกิ่งย่อยในแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Ophioceras* ดังนั้นจึงเป็นการสนับสนุนว่าทั้งสองจีนัสมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกัน

Coates *et. al.* (2002) ศึกษาความผันแปรของ *Beauveria bassiana* 9 ไอโซเลท บริเวณ 5.8 S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอยีน และ ITS โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และการหาลำดับเบสในบริเวณ ITS1 และ ITS2 จากการทดลองพบว่ามีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I *Hha*I *Hin*fI *Sin*I *Tru*9AI และบริเวณตัดจำเพาะ 2 ตำแหน่งของเอนไซม์ *Tha*I ทำให้เกิด 7 polymorphic จึงสามารถแบ่ง *B. bassiana* 24 จีโนไทป์เป็น 8 กลุ่ม

Collado *et. al.* (2002) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ของ *Monosporascus ibericus* เปรียบเทียบกับสปีชีส์อื่นในจีนัส ได้แก่ *M. cannonballes M. eutypoides* และ *M. monosporus* โดยทำการแยก *M.ibericus* จากรากและลำต้นพืช 3 สปีชีส์ที่เจริญในดินทรายและที่ลุ่มดินเค็มในประเทศสเปน ลักษณะสำคัญของ *M.ibericus* คือ ในแอสคัสมีแอสโคสปอร์มากกว่า 6 อัน ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากบริเวณ 18S ไรโบโซมอลดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอ็นเอยังไม่สามารถจะจัดจำแนก *Monosporascus* ได้ชัดเจน ถึงแม้ว่าจะแสดงให้เห็นว่าจีนัสนี้มีความเกี่ยวข้องกับราในกลุ่ม Xylariales มากกว่า ราในกลุ่ม Sordariales

Crous *et. al.* (2001) จัดจำแนก *Mycosphaerella* 30 สปีชีส์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้พืชในตระกูล Myrtaceaeใบร่วงและมีพืชอาศัยจำนวนมาก โดยใช้ข้อมูลอันดับเบสจากบริเวณ ITS ของ rRNA สามารถจำแนกความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกัน ซึ่งก่อนหน้านี้ใช้รูปแบบการงอกของแอสโคสปอร์ ข้อมูลอันดับเบสที่แสดงในการศึกษานี้ ทำให้การจัดจำแนกของสปีชีส์ *Mycosphaerella* สะดวกและชัดเจนขึ้น

Diez *et. al.* (2002) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใน pezizalean hypogeous fungi ที่ประกอบด้วย Terfezia และ Tirmania ซึ่งทั้งคู่มักถูกเรียกว่า desert truffles มีลักษณะการดำรงชีวิตเป็นไมคอไรซ่าพบตามที่แห้งแล้ง หรือ กึ่งแห้งแล้งในเขตเมดิเตอเรเนียน มีการเจริญร่วมกับสปีชีส์ *Helianthemum* ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค RFLP และหาลำดับเบสดีเอ็นเอของ ITS ในนิวเคลียร์ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ตัวอย่างที่นำมาศึกษาคือ *Terfezia arenaria T.boudieri T.claveryi T.leptoderma T.terfezioides (Mattirolomyces terfezioides) Tirmania nivea* และ *T.pinoyi* ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี distance และ parsimony method พบว่า *Tirmania* และ *Terfezia* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันมากจึงเป็นไปได้ว่า *Terfezia* อาจจะพัฒนามาจาก pezizalean สายพันธุ์เดียวกัน แต่มีการพัฒนาปรับเข้ากับอากาศร้อนและแล้งในสิ่งแวดล้อมของเขตเมดิเตอเรเนียน เมื่อนำผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจีนัส *Tirmania* และ *Terfezia* ก็พบว่ามีความสอดคล้องกันคือ กลุ่ม *Tirmania* ประกอบด้วยกลุ่มแรก คือ desert truffles ที่มีสปอร์เรียบและ amyloid asci กลุ่มที่สอง คือ *Terfezia* พบในบริเวณกึ่งแห้งแล้ง มีสปอร์กลม มีความสามารถปรับตัวอยู่ในดินหลายชนิดทั้งที่เป็นกรดและด่าง นอกจากนี้แล้วผลจากการวิเคราะห์นี้ยังสนับสนุนการจัดจำแนกใหม่ในจีนัส *Mattirolomyces* ด้วย

Dresler-Nurmi *et. al.* (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Phlebia* และ *Phanerochaete* 11 สปีชีส์ โดยเทคนิค RFLP บริเวณ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอและ ITS จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลที่โดย UPGMA algorithm พบว่าข้อมูลจาก PCR-RFLP ของยีน 18Sไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอเพียงพอที่จะแยกความแตกต่างของสปีชีส์ *Phlebia* ได้แต่ไม่แสดงความผันแปรภายใน *Phanerochaete spp.* ส่วนผลจากการเพิ่มขยายปริมารดีเอ็นเอบริเวณ ITS จาก *Phlebia spp.* ซึ่งมีขนาด 570-745 คู่เบส โดยชิ้นส่วน ITS ที่เพิ่มขยายได้ขนาดเล็กที่สุดมาจาก*P.subcretacea* และชิ้นส่วน ITS ที่เพิ่มขยายขนาดได้ยาวที่สุดมาจาก *P.hydnoides* แต่ขนาดชิ้นส่วนที่เพิ่มขยายจาก *Phanerochaete spp.* มีขนาดเดียวคือ 635 คู่เบส ยกเว้น *P. sanguinea* มีขนาด 690 คู่เบส ผลจากการทำ PCR-RFLP บริเวณ ITS ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของ *Phanerochaete spp.* ได้ เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำผลการทำ PCR-RFLP ของทั้งสองบริเวณมารวมกันสรุปได้ว่า *Phlebia gigantea* มีความใกล้ชิดกับ *Phanerochaete* มาก ซึ่งตรงกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Dupont *et. al.* (2002) ศึกษาการจัดจำแนก สปีชีส์ *Phaeoaremonium* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในองุ่นประเทศอาร์เจนตินา โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ในบริเวณ ITS ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอและบางส่วนของยีน β-tubulin พบว่าสาเหตุการเกิดโรคคือ *P.parasiticum* และ *P.allophilum* ซึ่งนับได้ว่าเป็นการรายงานครั้งแรกที่เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง *P.parasiticum* กับโรคในองุ่น

Gardes *et. al.* (1990) ได้จัดจำแนกราพวก ectomycorrhiza โดยทำการเพิ่มขยายปริมาณที่บริเวณ ITS และ LSU ของไมโทคอนเดรียลไรโบโซมอลดีเอ็นเอ และสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อซึ่งให้ผลดีเท่ากับที่สกัดจากรากฝอย สิ่งที่คำนึงถึงในการประเมินความแปรผันคือ ความยาวของชิ้นส่วนที่ถูกเพิ่มขยาย บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ และลำดับเบสขั้นต้นที่ใช้จำแนก จีนัส สปีชีส์ และสายพันธุ์ การเพิ่มขยายและหาลำดับเบสของ ITS จะทำใน *L.bocolor* 3 สายพันธุ์ *L.laccata* 1 สายพันธุ์ *L.proxima* 1 สายพันธุ์ และ *T. terrestris* 1 สายพันธุ์ ความผันแปรของลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ระหว่าง *L. bocolor* และ *T. terrestris* เป็น 32 เปอร์เซ็นต์ ใน *Laccaria sp.*เป็น 3-5 เปอร์เซ็นต์ และภายใน *L. bocolor* เป็น 1-2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากความแปรผันที่ได้สามารถใช้เป็น specific oligonucleotides เพื่อใช้จำแนก ITS ที่ได้จากการเพิ่มขยาย และอาจนำไปสู่การออกแบบและตรวจสอบตัวติดตามซึ่งสามารถใช้แยก *L.bocolor* 2 ไอโซเลท ด้วยเบส 1 คู่ที่มีความแตกต่างในการวิเคราะห์ filter-based hybridization

Gaitan *et. al.* (2002) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของ *Beauveria bassiana* 95 ไอโซเลท จากภูมิประเทศและพืชอาศัยที่ต่างกันโดยใช้วิธี RAPD และ ITS-RFLP จากนั้นนำมาจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA และ Principle Coordinates พบว่าจากวิธี RAPD สามารถแบ่ง *B. bassiana* เป็น 4 กลุ่ม ส่วนเทคนิค RFLP ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ PN16 จะได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 930 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *MspI* จะสามารถแบ่ง *B. bassiana* เป็น 2 กลุ่มใหญ่ จากผลการทดลองสามารถสรุปว่า *B. bassiana* มีความผันแปรทางพันธุกรรมต่ำ ไม่มีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยหรือพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ ลักษณะเหล่านี้จึงสามารถจำแนกการนำสายพันธุ์ต่างถิ่นเข้ามา

Glen *et. al.* (2001) จัดจำแนกเห็ดราพวก Basidiomycetes ออกจากพวก ectomycorrhizal ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งนับว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพโดยใช้ไพรเมอร์ต่างกัน 6 คู่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณเป้าหมายบนไมโตคอนเดรียล 3 แห่ง ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษานี้สามารถนำไปเป็นตัวอย่างในการจัดจำแนก เห็ดราพวก Basidiomycetes ได้

Gomes *et. al.* (1999) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมภายในยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Pisolithus* 19 ไอโซเลท จากถิ่นกำเนิดและพืชอาศัยที่แตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ในบริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ITS เมื่อทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจะได้ดีเอ็นเอ ขขนาด 640 - 750 คู่เบส นำมาตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะและจัดกลุ่ม พบว่าจากขนาดชิ้นส่วนขนาดต่างๆแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ประกอบด้วยตัวอย่างจากภาคเหนือยกเว้นไอโซเลท Pt1 กลุ่ม 2 ประกอบด้วยตัวอย่างจากประเทศบราซิล และกลุ่ม 3 ประกอบด้วยไอโซเลท Pt1 นอกจากนี้แล้วการศึกษาบริเวณอื่นๆ เช่น IGS 17S และ 25S ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

Ito and Yanagi (2002) พัฒนาวิธีการจัดกลุ่มเห็ดราพวก Basidiomycetes โดยใช้เส้นใยจากจีนัส *Coprinus* และ *Tricholoma* มาเพาะเลี้ยงและสกัดดีเอ็นเอ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างจาก *Coprinus* 7 สปีชีส์ ได้โดยเทคนิค RAPD นอกจากนี้ชิ้นเนื้อเยื่อของ *Coprinus* ซึ่งไม่ทราบสายพันธุ์ยังสามารถถูกจัดจำแนกเป็น *C.cinereus* ได้ ส่วนใน *Tricholoma* 5 สปีชีส์ คือ *T. matsutake* และอีก 4 สปีชีส์ที่ไม่เกี่ยวข้อง ถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่มอย่างชัดเจนซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแบ่งโดยใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

Jensen and Eilenberg (2001) ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมภายในจีนัส *Entomorphthora* โดยทำการเพิ่มขยายบริเวณ ITS II และส่วนแรกของ LSU rDNA จาก 26 ไอโซเลท ขนาด ITS II ที่ถูกเพิ่มขยายอยู่ในช่วง 1200-2000 คู่เบส ต่อมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 8 ชนิดและวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA การจัดจำแนกจีนัส *Entomorphthora* โดยใช้สัณฐานของโคนีเดียให้ตรงกับการวิเคราะห์ LSU rDNA โดยกลุ่มของ *E.muscae* แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยสัมพันธ์กับ *E. schizophorae* และ *E. syrphi* ที่อยู่ต่างสปีชีส์ เป็นที่น่าสังเกตว่า *E. muscae* ไม่สามารถแบ่งกลุ่มตามพืชอาศัย ภูมิประเทศของแหล่งกำเนิดหรือสัณฐานวิทยาโคนีเดีย

Kretzer *et. al.* (1996) ศึกษาลำดับเบสซ้ำบริเวณ ITS ในนิวเคลียร์ไรโบโซมอลของ *Suillus sensu lato* 47 ไอโซเลท จาก 38 สปีชีส์ หลังจากนั้นจัดทำเป็นแผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและอธิบายการจัดอนุกรมวิธานด้วยวิธี parsimony ซึ่งให้ผลดีใกล้เคียงกับวิธี distance method จากรายงานที่ผ่านมาจีนัส *Boletinus* และ *Fuscoboletinus* มักถูกจัดให้อยู่ใน *Suillus sensu lato* ในการทดลองนี้ไอโซเลท *Suillus granulatus* ได้รับมาจากอเมริกาเหนือหรือยุโรป และเอเชีย ซึ่งจะเป็นตัวแทนอย่างน้อย 2 สปีชีส์ที่แตกต่างกัน จากการศึกษานี้พบว่าจีนัสดังกล่าวอยู่ใน *Suillus sensu lato* เช่นเดียวกัน นอกจากนี้แล้วยังพบว่าเป็นไมคอไรซ่าร่วมกับ *Larix* และจะเปลี่ยนพืชอาศัยเป็นสน หรือ *Pseudotsuga*

Lickey *et. al.* (2002) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Artomyces pyxidatus* (Auriscalpiaceae) โดยหาลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียร์ไรโบโซมอล (ITS -5.8S - ITS2) และวิเคราะห์ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า *A. pyxidatus* 255 ไอโซเลทให้รูปแบบของ RFLP สอดคล้องกับรูปแบบของแหล่งภูมิศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Matsumoto and Fukumasa-Nakai (1995) ศึกษาการใช้เทคนิค RFLP บน ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอในเห็ดนางรม 34 ไอโซเลท ซึ่งถูกเก็บจากธรรมชาติโดยมาจากญี่ปุ่น 18 ไอโซเลท จากยุโรป 10 ไอโซเลท อเมริกา 5 ไอโซเลทและเกาหลี 1 ไอโซเลท จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI *Eco*RI และ *Eco*RV จะได้รูปแบบ RFLP ที่ต่างกัน เมื่อนำรูปแบบทั้งหมดมาศึกษาร่วมกันจะแบ่งได้ 22 แบบต่างกัน เมื่อนำมาจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่มใหญ่ตามแหล่งที่มาของตัวอย่าง จากผลจะเห็นได้ว่า *P.ostreatus* ที่มาจากภูมิศาสตร์ที่ต่างกันจะมีพันธุกรรมต่างกันด้วย

Moncalvo *et. al.* (1996) จัดจำแนกอันดับราในกลุ่ม Agaricales โดยหาลำดับเบสบริเวณ 25S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอจำนวน 900 เบส ต่อจากนั้นสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี maximum parsimony พบว่านอกจากค่า bootstrap ที่ได้มีค่าสูงพอประมาณแล้ว ค่าที่ได้จากวิธีที่ใช้หลักสัณฐานวิทยาสามารถจัดตัวอย่างเป็นกลุ่มอยู่ในวงศ์ Amanitaceae, Coprinaceae (แยกจาก *C. comatus* และวงศ์ย่อย Panaeolideae) และ วงศ์ Agaricaceae (แยกจาก Cytodemateae) และ จีนัส *Tricholoma*, *Termitomyces* และมีความเกี่ยวข้องกับ *Podabrella*, *Pleurotus* และ *Hohenbuehelia*

Myburg *et. al.* (2002) จัดจำแนกเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อสาเหตุที่มีลักษณะคล้ายโรคแคงเกอร์ใน *T. granulosa* จากแอฟริกาใต้ โดยเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากบริเวณ ITS รวมทั้งหาลำดับเบสของยีน β-tubulin นอกจากนี้ยังมีการทดสอบการทำให้เกิดโรคบน *T. granulosa* และ *E. grandis* พบว่าเชื้อบน *T. granulosa* เป็น *Cryphonectria cubensis* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์ในยูคาลิปตัสพบที่เขตร้อน กึ่งร้อน และแอฟริกาใต้ บางครั้งพบว่าเป็นสาเหตุโรคใน *Syzygium aromaticum* ด้วย

Patino *et. al.* (2002) ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะในการจำแนกสปีชีส์ *Fusarium veticillioides* และสายพันธุ์อื่นๆ จากแหล่งกำเนิดที่สามารถผลิตสารพิษ fumonisins ซึ่งเป็นอันตรายต่อทั้งสัตว์และมนุษย์ โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ในบริเวณ IGS ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยลำดับเบสบางส่วนใน IGS จะถูกนำมาออกแบบเป็นไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะ

Schmidt and Moreth (2000) ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะต่อ *Serpula himantioides* และ *S. lacrymans* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสียหายต่อ สิ่งก่อสร้างที่เป็นไม้ โดยการหาลำดับเบสบริเวณ ITS ของนิวเคลียร์ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ พบว่าขนาด ITS ที่ถูกเพิ่มขยายใน *S. lacrymans* มีขนาด 654 คู่เบส และ *S. himantioides* มีขนาด 650 คู่เบส อันดับเบสที่แตกต่างกันระหว่างทั้งสองสปีชีส์ถูกนำมาออกแบบเป็นไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะได้สำเร็จโดยจะไม่ทำการเพิ่มขยายเชื้ออื่นที่เป็นสาเหตุทำให้สิ่งก่อสร้างที่เป็นไม้เสียหาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sierra *et. al.* (1999) จัดจำแนก *Armillaria* sp.ซึ่งเป็นสาเหตุในการทำให้เกิดโรคพืชในป่าและสวน โดยทำการเพิ่มขยายบริเวณ IGS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอจาก 96 ไอโซเลท จาก 6 สปีชีส์ที่รวบรวมมาจากสหราชอาณาจักรและยุโรป เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I พบว่า *A. mellea* *A. gallica* และ *A. tabescens* ให้รูปแบบเหมือนกันและเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsm*I พบว่า *A. ostoyae* จะแตกต่างจาก *A. borealis* และ *A. cepistipes* โดยก่อนหน้านี้ไม่มีรายงานเกี่ยวกับรูปแบบการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ตัดจำเพาะของ *A. mellea* และ *A. gallica* มีการสันนิษฐานว่าไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *A. gallica* เป็น heterozygotes จากความแตกต่างของรูปแบบแถบ *A. mellea* *A. gallica* *A. borealis* และ *A. cepistipes* ถูกแบ่งไปสู่กลุ่มต่างๆ ซึ่งจะนำไปสัมพันธุ์กับความแตกต่างในทางสัณฐานวิทยา

Tuohy *et. al.* (2002) จัดจำแนก *Drechslera teres* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค net blotch ในบาร์เล่ย์ทั่วโลก การเกิดโรคมี 2 รูปแบบ คือ เป็นตาข่าย จะมีรอยไหม้รูปตาข่ายบนบาร์เล่ย์ และ เป็นจุด จะมีรอยแผลรูปไข่สีดำหรือสีน้ำตาลบนพืช โดยนำเส้นใยจากทั้ง 2 รูปแบบมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จึงเก็บ เส้นใยมาสกัดดีเอ็นเอ และทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณ SSU (small subunits) ในไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอยีน และ ITS1 / ITS2 ด้วยไพรเมอร์ NS1 / NS8 และ ITS4 / ITS5 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับเบส 18S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ พบว่าทั้งสองรูปแบบมีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 100 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส ITS1 และ ITS2 พบว่ามีความแตกต่างกันเพียงร้อยละ 1.6 เนื่องจากทั้งสองรูปแบบมีความคล้ายคลึงกันมากจึงเป็นไปได้น้อยที่จะพัฒนาเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณที่มีความเฉพาะต่อรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งเพื่อแยกทั้งสองรูปแบบออกจากกัน

1.2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสปอร์ ระบบการผสมพันธุ์และมัลทิเพิลอัลลีล

การเพาะเลี้ยงสปอร์

การเพาะเลี้ยงสปอร์เพื่อเก็บเส้นใยโมโนคาริออนสำหรับการผสมพันธุ์และศึกษามัลทิเพิลอัลลีลของเห็ดมีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวของดังนี้

Nisikado and Kimura (1951) รายงานว่าเบสิดิโอสปอร์ของ *Tricholoma congiobatum* (Vitt.) Sacc. สามารถงอกได้ดีบนอาหารที่มีพีเอช 4-7

Fries (1954) ได้ทดสอบการงอกเบสิดิโอสปอร์ของเห็ด *Tricholoma* รายงานว่าเมื่อผสมเบสิดิโอสปอร์กับอาหารแข็งเอ็มอีเอ (MEA) และเพาะเลี้ยงร่วมกับยีสต์ "Hefe X" (yeast "X" unidentified) พบว่า สปอร์สามารถงอกได้และในสภาวะเดียวกัน ถ้าเพาะเลี้ยงเบสิดิโอสปอร์บนผิวหน้าอาหาร สปอร์ของเห็ดจะสามารถงอกได้เร็วกว่าสปอร์ที่ผสมอยู่ในอาหาร นอกจากยีสต์ "Hefe X" แล้วพบว่ายีสต์ *Torulopsis sanguinea* (Schimon) Cif.&Red. สามารถกระตุ้นการงอกของเบสิดิโอสปอร์ได้เช่นเดียวกับยีสต์ "Hefe X"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cochrane (1958) รายงานว่าวิตามินที่ผลิตจากเชื้อยีสต์มีผลต่อการงอกของเบสิดิโสปอร์และสปอร์ของราพวก saprobe สามารถงอกได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียสและพีเอช 4.5-6.5

Bulmer and Beneke (1961) ได้เปรียบเทียบการงอกของเบสิดิโอสปอร์ของเห็ด *Calvatia gigantea*(Pers.) Lloyd. บนอาหาร 6 ชนิดและบนอาหารแข็งเอ็มอีเอที่มี *Rhotorula mucilaginosa* (Jorg.) Harrison var. *sanguinea*(Schim.)Lodd. พบว่าเมื่อบ่มไว้ 28 วัน สปอร์เห็ดจะงอกบนอาหารแข็งเอ็มอีเอที่มีเชื้อราดังกล่าวเจริญอยู่ ส่วนบนอาหารอื่นๆอีก 6 ชนิดพบว่าไม่มีการงอกของสปอร์

Bulmer and Beneke (1964) รายงานว่าการงอกของเบสิดิโอสปอร์ ในเห็ดพวก *Lycoperdon* spp. *Calvatia gigantea* และ *Scleroderma lycoperdoides* Schw. นอกจากจะต้องมียีสต์เจริญร่วมด้วยแล้ว จำนวนหรือความเข้มข้นของสปอร์ก็มีผลต่อการงอกของสปอร์ด้วย คือในจานเพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นของสปอร์สูงเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์จะน้อยกว่าในจานเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของสปอร์ที่ต่ำกว่า

Chang (1972) ศึกษาการงอกของเบสิดิโอสปอร์ของเห็ดฟาง พบว่าสามารถงอกในสภาพที่มีความเข้มข้นของสปอร์สูงได้ดีกว่าสภาพที่มีความเข้มข้นของสปอร์ต่ำ นอกจากนี้การงอกของ สปอร์ยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและพีเอชของอาหารด้วย

Brown and Merrill (1973) ทดสอบการงอกของเบสิดิโอสปอร์ของรา *Fomes applanatus* (Pers. Ex Wallr.) Gill พบว่าเบสิดิโอสปอร์สามารถงอกบนอาหารที่มีกลูโคสได้ถึง 78 เปอร์เซ็นต์แต่ต้องมีแบคทีเรียหรือราหรือยีสต์บางชนิด เช่น *Rhodotorula* sp. *Candida* sp. *Hormodendrum* sp. หรือ *Pullularia* sp. เจริญร่วมด้วยหรือมีสารระเหยจากรา *Ceratocystis fagacesrum*(Bretz.)Hunt ส่วนในสภาวะอื่น ๆ เบสิดิโอสปอร์งอกได้น้อยมาก โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์

Chapman and Barankovich (1979) รายงานว่าพีเอชมีผลต่อการงอกของเบสิดิโอสปอร์ของเห็ด *Coprinus domesticus* Fries. โดยพีเอชที่เหมาะสมคือ 5.5-7.1 และเบสิดิโอสปอร์จะไม่งอกที่พีเอช 2.7 ส่วนอาหารที่เหมาะสมต่อการงอก ได้แก่ อาหาร คอร์น มิล อาการ์ (corn meal agar) และอาหารแข็งเอ็มอีเอ

วสัณน์ เพชรรัตน์ (2522) ศึกษาการงอกของสปอร์เห็ดตีนแรดพบว่า สปอร์เจริญเติบโตได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ปัจจัยอื่น ๆ ที่กระตุ้นให้ สปอร์งอกได้ดี คือ อุณหภูมิ โดยสปอร์จะงอกภายใน 3 วัน เมื่อบ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และความเข้มข้นของสปอร์ที่เหมาะต่อการงอกคือ $6.4X10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบบการผสมพันธุ์

ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดที่มีผู้ศึกษาวิจัย มีทั้งชนิดผสมตัวเองและชนิดผสมข้ามแบบไบโพลาร์ และ เททราโพลาร์ ซึ่งรวบรวมไว้ในตารางที่ 1.1 นอกจากนี้งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจำนวนมัลทิเพิลอัลลีลได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 1.2 ดังนี้

ตารางที่ 1.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบการผสมพันธุ์ของเห็ด

ชื่อวิทยาศาสตร์	ระบบการผสมพันธุ์	เอกสารอ้างอิง
Agaricus campestris *A.Edulis* *A. bitorquis*	Bipolar heterothallic	Raper. 1976
Agaricus bisporus	Bipolar heterothallic	Raper et al. 1972 Miller. 1971
Armillaria mallea	Tetrapolar heterothallic	Korhonen. 1978 Andeson and Ullrich. 1979
Armillaria luteobubalina	Tetrapolar heterothallic	Kile. 1983
Auricularia auricula	Bipolar heterothallic	Barnett. 1937 Chang and Hayes. 1978
Auricularia polytricha	Tetrapolar heterothallic	Chang and Hayes. 1978
Coprinus fimetarius	Tetrapolar heterothallic	Chang and Hayes. 1978
Cyathus striatus	Tetrapolar heterothallic	Fries. 1936
Flammulina velutipes	Tetrapolar heterothallic	Chang and Hayes. 1978
Ganoderma boinense	Tetrapolar heterothallic	Pilotti et al. 2002
Ganoderma lucidum *G. tsugae*	Tetrapolar heterothallic	Adaskveg and Gilbertson. 1986
Lentinula edodes	Tetrapolar heterothallic	Fox et al. 1994 Chang and Hayes. 1978

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1.1 (ต่อ) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบการผสมพันธุ์ของเห็ด

ชื่อวิทยาศาสตร์	ระบบการผสมพันธุ์	เอกสารอ้างอิง
Marasmius oreades	Bipolar heterothallic	Mallett and Harrison. 1987
Melanotus textilis *M. defraudatus*	Tetrapolar heterothallic	Walker et al. 1994 Peterson. 1992
Melanotus hartii *M. eccentricus*	Bipolar heterothallic	Peterson. 1992
Myxarium nucleatum	Tetrapolar heterothallic	Hung and Wells. 1975
Phellinus tremulae	Tetrapolar heterothallic	Mallett and Myrholm. 1995
Phellinus gilvus	Tetrapolar heterothallic	Rizzo et al. 1995
Pholiota nameko	Bipolar heterothallic	Chang and Hayes. 1978
Pleurotus ostreatus	Tetrapolar heterothallic	Eugenio and Anderson. 1968 Kay and Vilgalys. 1992 Chang and Hayes. 1978
Pleurotus sajor-caju	Tetrapolar heterothallic	Eugenio and Anderson. 1968
Pleurotus sapidus	Tetrapolar heterothallic	Eugenio and Anderson. 1968
Pleurotus tuberregium	Tetrapolar heterothallic	Isikhuemhen et al. 2000
Podoscypha multizonata	Tetrapolar heterothallic	Welden and Bennett. 1973
Polyporus abietinus	Tetrapolar heterothallic	Fries and Jonason. 1941
Schizophyllum commune	Tetrapolar heterothallic	Brasier. 1970 Raper et al. 1958
Sistotrema brinkmannii	Bipolar heterothallic	Ullrich. 1973 Ullrich and Raper. 1974
Tricholoma crassum	Tetrapolar heterothallic	วสันน์ เพชรรัตน์. 2522
Volvariella volvacea	Homothallic	Chang and Hayes. 1978

67996
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มัลทิเพิลอัลลีล

ตารางที่ 1. 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาจำนวนมัลทิเพิลอัลลีล

ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนดอกเห็ด	จำนวนอัลลีล	เอกสารอ้างอิง
Armillaria mellea	10	14A 15B	Korhonen. 1978
A. luteobubalina	9	11A 10B	Kile. 1983
Coprinus lagopus	-	96A 56B	Raper. 1966
C. fimetarius	-	27A 27B	Brunswik. 1924
C. macrorhizus	-	20A 20B	Kimura. 1952
Cyathus striatus	-	4A 5B	Fries. 1936
Lentinula edodes	33	41A 48B	Tokimoto. 1973
L. edodes	17	9A 10B	Fox et al. 1994
Pleurotus pulmonarius	19	29A 27B	Zervakis and Balis. 1995
P. ostreatus	10	16A 18B	Zervakis and Balis. 1995
P. ostreatus	-	126A 354B	Anderson et al. 1991
P. ostreatus	12	17A 20B	Eugenio and Anderson. 1968
P. ostreatus	8	13A 13B	Kay and Vilgalys. 1992
Podoscypha ravelii	3	5A 4B	Welden and Bennet. 1973
Polyporus obtusus	24	39A 39B	Eggertson. 1953
P. abietinus	-	23A 26B	Fries and Jonason. 1941
Schizophyllum commune	114*	96A 56B	Raper et al.. 1958
S. commune	-	288 A 81B	Koltin. 1978
S. commune	12	23A 21B	Roshal. 1950
S. commune	12	6A 6B	Brazier. 1970

- หมายถึง ไม่ระบุจำนวนดอกเห็ด

* หมายถึง จำนวนโมโนคาริออน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 วัตถุประสงค์

1. เก็บรวบรวมเห็ดตีนแรดตามพื้นที่ต่างๆ ของจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางพร้อมทั้งการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา
2 ศึกษาการคัดแยกสปอร์เดี่ยวและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออน (monocaryon) ที่คัดแยกจากสปอร์เดี่ยวและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเห็ดที่เก็บรวบรวมได้
3. ศึกษาความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมในเส้นใยโมโนคารีออนด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส และวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์เพื่อจัดจำแนกกลุ่มเส้นใย
4. ศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรมของด้วยเทคนิค PCR-RFLP และวิเคราะห์การจัดจำแนกกลุ่มเห็ดจากลายพิมพ์ DNAจากเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมได้
5. ศึกษาระบบการผสมพันธุ์โดยจะพิจารณาคู่ผสมพันธุ์ของโมโนคาริออนแต่ละคู่ เพื่อตรวจสอบหายีโนไทป์ของยีนควบคุมคู่ผสมพันธุ์ของเส้นใยที่ผสมพันธุ์กันได้และผสมพันธุ์กันไม่ได้
6. ศึกษาจำนวนมัลทิเพิลอัลลีลในยีนที่ควบคุมคู่ผสมพันธุ์ของแต่ละโลกัสในประชากรเห็ดตีนแรด

1.4 ขอบเขตการศึกษา

งานวิจัยนี้จะแบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งเป็นการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมได้จากพื้นที่ของจังหวัดต่างๆในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส รูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบในระบบเอนไซม์ 11 ระบบ จะนำมาใช้วิเคราะห์ เพื่อจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างเส้นใยของเห็ดตีนแรดในพื้นที่ ส่วนที่สอง เป็นการศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP บริเวณยีน ITS และ IGS ของ rDNA และ จัดจำแนกกลุ่มเห็ดสกุลนี้จากความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และในส่วนที่สาม จะเป็นการศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมได้ โดยการผสมพันธุ์โมโนคาริออนภายในดอกเดียวกันทีละคู่แบบพบกันหมด เพื่อตรวจหายีโนไทป์ของยีนควบคุมคู่ผสมพันธุ์ และ ทำการผสมพันธุ์ข้ามดอกทีละคู่แบบพบกันหมด เพื่อหาจำนวนมัลทิเพิลอัลลีลของประชากรเห็ดตีนแรดตามวิธีของ Eugenio and Anderson (1968)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถเก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญเติบโตของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง
2. เส้นใยที่คัดแยกจากสปอร์เห็ดและจากเนื้อเยื่อเห็ดสามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส และเทคนิค PCR –RFLP ทำให้ทราบถึงความแปรผัน และ ความหลากหลายทางพันธุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรรมที่เกิดขึ้นกับเห็ดตีนแรดในสภาพพื้นที่และสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มเส้นใยของเห็ดในแต่ละพื้นที่ของจังหวัดต่างๆซึ่งเส้นใยเหล่านี้จะนำมาใช้เป็นสายพันธุ์สำหรับการคัดเลือก และ การผสมพันธุ์เพื่อการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์เห็ดตีนแรดในอนาคต

3. สามารถนำเทคนิคที่ศึกษาไปประยุกต์ใช้กับเห็ดชนิดอื่นๆ ในด้านการจัดอนุกรมวิธาน(taxonomy) สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic relationship) และ การจัดจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ (Identification)
4. การศึกษาระบบการผสมพันธุ์ จะทำให้ทราบถึงระบบการผสมพันธุ์ของเห็ด และทราบยีโนไทป์ของโมโนคาริออนซึ่งจะทำให้ได้รับข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการผลิตลูกผสมและในการเพาะดอกเห็ดในโรงเรือน
5. การศึกษาจำนวนมัลทิเพิลอัลลีลอัลลีลในประชากรเห็ดที่เก็บรวบรวมได้ ทำให้ทราบถึงความแปรปรวนของลักษณะทางพันธุกรรมที่ควบคุมโดยยีนที่ควบคุมคู่ผสมพันธุ์ในระบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เห็ดตีนแรดต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด

2.1.1 การจำแนกเห็ดตีนแรด (Taxonomy)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tricholoma crassum* (Berk)Sacc.

ชื่อสามัญ	: เห็ดตีนแรดขาว เห็ดจั่น เห็ดตับเต่าขาว
Class	: Basidiomycetes
Subclass	: Holobasidiomycetidae
Order	: Agaricales
Family	: Tricholomataceae
Genus	: Tricholoma
Species	: crassum

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดในสกุล *Tricholoma* เกือบทั้งหมดพบว่าอยู่ในเขตอบอุ่น มีเพียง 2-3 สปีชีส์ เท่านั้นที่พบในเขตร้อนและมีหลายชนิดที่สามารถนำมารับประทานได้ เช่น เขตยุโรป ได้แก่ *T. albobrunneum* และ *T. flavovirens* อเมริกาใต้ ได้แก่ *T. mutsukake* (วสันณ์ เพชรรัตน์. 2522) ญี่ปุ่นและฮ่องกง ได้แก่ *T.mutsukake*, และ *T. mongolicum* ส่วนในประเทศไทย ได้แก่ *T.crassum* (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และกิตติพงษ์ ศิริวานิชกูล. 2538)ซึ่งเห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ เจริญได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ลักษณะของดอกเห็ดประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

2.1.2.1 หมวกดอก (cap) หมวกดอกขณะที่ยังไม่บานเต็มที่มีลักษณะเป็นรูปครึ่งวงกลมคว่ำ ขอบหมวกม้วนเข้าด้านใน และค่อยๆ เจริญแผ่ขยายออกเมื่อเจริญเต็มที่ ดอกจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 3.1 - 12.5 เซนติเมตร ผิวดอกเห็ดด้านบนเรียบสีขาว หรือขาวปนเทา เมื่อแก่จัดอาจเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน หมวกดอกมีความหนา 1-3 เซนติเมตร เนื้อด้านในสีขาว

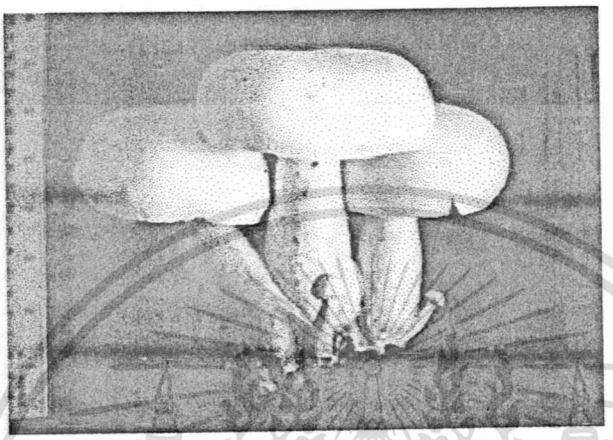
2.1.2.2 ครีบดอก(gills) ขึ้นอยู่กับขนาดของหมวกดอก จำนวนครีบถ้านับจากขอบดอกประมาณ 20-25 ครีบต่อความยาวดอก 1 เซนติเมตร ครีบดอกจะเรียงกันเป็นรัศมีรอบก้านดอก ครีบดอกจะเปราะและขาดง่าย ครีบดอกเป็นอิสระจากก้านดอก

2.1.2.3 ก้านดอก (stalk) มีสีขาว ปลายด้านบนติดอยู่กึ่งกลางของหมวกดอก ตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีความยาวตั้งแต่ 7-27 เซนติเมตร ที่โคนก้านจะใหญ่กว่าส่วนที่ติดอยู่กับหมวกดอกเล็กน้อย เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดอกแก่ขึ้นที่โคนก้านดอกจะเปลี่ยนเป็นสีเนื้อหรือสีชมพูอ่อน เนื้อเยื่อที่โคนก้านดอกจะมีลักษณะสานกันโปร่งๆ ส่วนเนื้อเยื่อตรงกลางของก้านดอกจะมีลักษณะเป็นเส้นและมีรูเล็กๆ คล้ายเห็ดฟาง

2.1.2.4 สปอร์ (spore) เมื่อเห็ดตีนแรดเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์ที่บริเวณครีบดอก สปอร์มีสีขาว มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ขนาด 5-5.6 × 6.5-7.6 ไมโครเมตร (ปัญญา โพธิ์จิติรัตน์. 2538)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของดอกเห็ดตีนแรด (สุภาภรณ์ จาริยุวัฒน์. 2541)

2.1.3 ลักษณะการเจริญเติบโต

เห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่เจริญได้ดีบนพื้นดินที่มีอินทรีย์วัตถุ หรือทิ้งส่วนรากไว้ในดินเมื่อตอไม้เริ่มผุ เห็ดตีนแรดก็จะเจริญตามรากไม้หรือพื้นดินที่มีอินทรีย์วัตถุ หลังจากนั้นเมื่อความชื้นและสภาวะเหมาะสมเห็ดตีนแรดก็จะเจริญและสร้างดอกเห็ดโผล่พ้นพื้นดินขึ้นมาเป็นกลุ่มๆ สำหรับการเจริญของเส้นใย จากการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดตีนแรดในสภาพแวดล้อมต่างๆ โดยวสันต์ เพชรรัตน์ (2522) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและดอกเห็ดตีนแรดคือ

2.1.3.1 อุณหภูมิ (Temperature) เส้นใยเห็ดตีนแรดเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาเป็นอุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนที่ระดับ 20 และ 40 องศาเซลเซียสเส้นใยเจริญได้น้อยมาก

2.1.3.2 ชนิดของอาหารวุ้น เมื่อทดลองเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตรต่างๆ พบว่าเส้นใยเจริญได้ดีและหนาแน่นมากในอาหาร PDA

2.1.3.3 พีเอช (pH) เส้นใยของเห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอช 4-8 แต่ พีเอช ที่เส้นใยเจริญได้เร็วที่สุดคือ พีเอช 6 รองลงมาเป็น พีเอช 5 และ พีเอช 7

2.1.3.4 จุลินทรีย์ชนิดอื่น พบว่า เชื้อยีสต์หลายชนิดมีอิทธิพลต่อการงอกของสปอร์ของเห็ดตีนแรดบนอาหารวุ้น ซึ่งสปอร์ของเห็ดตีนแรดไม่สามารถงอกได้หากไม่มีโคโลนีของยีสย์เจริญร่วมอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วย ยีสต์หลายชนิดที่กระตุ้นให้สปอร์เห็ดตีนแรดงอก ได้แก่ *Endomycopsis* sp. *Hansenula* sp. , *Kluveromyces* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเชื้อ *S. cerevisiae* จะกระตุ้นการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด โดยงอกได้ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ชาญยุทธ์ ภานุทัต และคณะ. 2543)

จากการศึกษาการผลิตก้อนเชื้อเห็ดตีนแรดของกรมวิชาการเกษตร (2543) พบว่า อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์และแสงที่เหมาะสมมีผลอย่างมากต่อการเจริญของเส้นใยและระยะการเกิดดอก ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในระยะเกิดดอกเป็น 28 – 32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 75-90 เปอร์เซ็นต์ และแสงที่มีความเข้มสูง ใช้เวลาบ่มเชื้อประมาณ 50-60 วัน ก่อนนำก้อนเชื้อมาเพาะให้เกิดดอกปล่อยให้ฟักตัวประมาณ 7 – 10 วัน จะทำให้ก้อนเห็ดเจริญได้ดี

2.1.4 **วงจรชีวิตของเห็ด**

วงจรชีวิตของเห็ดมีการเจริญเติบโต 9 ระยะ ดังนี้ (ภาพที่ 2.2)

2.1.4.1 เมื่อดอกเห็ดเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างเบสิดิโอสปอร์บริเวณเบสิเดียม (basidium) ซึ่งอยู่ใต้ครีบดอกสปอร์พวกนี้เป็นแฮพลอยด์ เมื่อสปอร์ปลิวไปตกในที่ที่เหมาะสมต่อการเจริญก็จะงอกเป็นเส้นใยออกมา

2.1.4.2 เส้นใยที่งอกออกมาเป็นเส้นใยปฐมภูมิซึ่งมีโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ เรียกว่า โมโนคาริออน

2.1.4.3 เส้นใยปฐมภูมิจะรวมตัวกันเรียกว่า พลาสโมแกมี (plasmogamy) เกิดเป็นเส้นใยทุติยภูมิ ระยะนี้เส้นใยปฐมภูมิจะเชื่อมต่อกันและโพรโทพลาซึมของทั้งสองฝ่ายรวมเข้าด้วยกัน ทำให้มีนิวเคลียส 2 อันในเซลล์เดียวกัน

2.1.4.4 ระยะนี้ภายในแต่ละเซลล์มี 2 นิวเคลียส เรียกว่าไดคาริออน (dikaryon) เส้นใยทุติยภูมิจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว

2.1.4.5 เส้นใยทุติยภูมิจะเจริญเพิ่มมากขึ้นและรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน เรียกว่า เส้นใยตติยภูมิ เส้นใยจะเริ่มพัฒนาเป็นตุ่มดอกเล็ก ๆ และเจริญเติบโตขึ้นเรื่อย ๆ

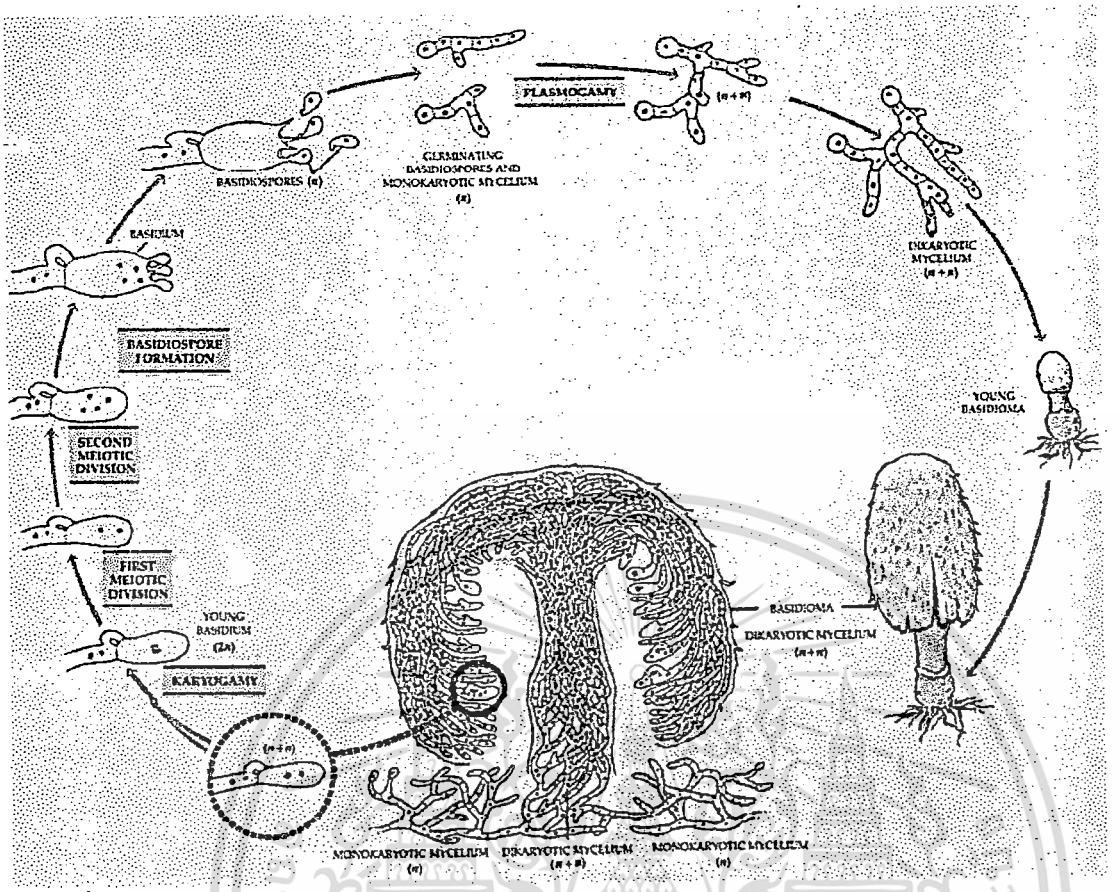
2.1.4.6 ตุ่มดอกพัฒนาเป็นดอกเห็ดที่มีรูปร่างคล้ายร่ม และมีการสร้าง เบสิเดียมคล้ายรูปกระบอง ในแต่ละเบสิเดียมจะมีนิวเคลียส 2 อัน

2.1.4.7 นิวเคลียสทั้ง 2 อัน (n_1+n_2) ในเบสิเดียมจะรวมตัวกันและแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกัน เรียกขั้นตอนนี้ว่า คารีโอแกมี (karyogamy) นิวเคลียสระยะนี้เป็นดิพลอยด์

2.1.4.8 นิวเคลียสที่รวมตัวกันแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส ได้นิวเคลียส 4 อัน

2.1.4.9 เบสิเดียมสร้างก้านชูสปอร์ 4 อันและนิวเคลียส 4 อัน จะพัฒนาเป็นเบสิดิโอสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 วงจรชีวิตของเห็ด (Breuil. 2003)

2.1.5 การสืบพันธุ์ของเห็ดรา

การสืบพันธุ์แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

2.1. 5.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีหลายวิธี ได้แก่

2.1.5.1.1 การแตกหักของเส้นใย (fragmentation) เส้นใยจะหักเป็นท่อนซึ่งเส้นใยท่อนที่หักนั้นสามารถเจริญเป็นเส้นใยใหม่ได้ ส่วนใหญ่เป็นเห็ดราพวกเส้นใย (filamentous fungi)

2.1.5.1.2 การแบ่งเซลล์ (fission) เซลล์ร่างกายแบ่งออกเป็น 2 เซลล์ เช่น ยีสต์

2.1.5.1.3 การแตกหน่อ (budding) เซลล์ร่างกายหรือสปอร์มีการสร้างหน่อและแต่ละหน่อสามารถเจริญเป็นเซลล์ใหม่ได้ เช่น ยีสต์

2.1.5.1.4 การสร้างสปอร์ (spore formation) เป็นวิธีการสืบพันธุ์ของเห็ดราส่วนใหญ่ สปอร์มีหลายรูปร่าง เช่น รูปไข่ กลม เกลียว คล้ายเข็ม เป็นต้น และมีหลายขนาดตั้งแต่ขนาดเล็กมากจนถึงขนาดใหญ่ สีมีหลายสี เช่น สีส้ม เหลือง น้ำตาล แดง ดำ เป็นต้น ซึ่งสปอร์ที่พบในคลาสเบซิดิโอไมซีเทสมีหลายชนิด (บัญญัติ สุขศรีงาม. 2538) ได้แก่

1 อาร์โทรสปอร์ (arthrospore) เกิดจากเส้นใยที่หักเป็นส่วน ๆ แต่ละส่วนจะมีผนังหนาล้อมรอบ เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมจะสามารถเจริญเป็นเส้นใยได้

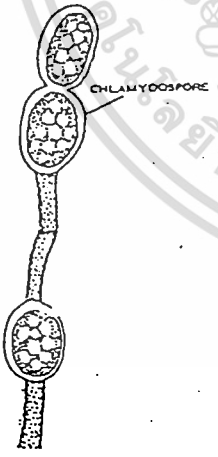
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ออยเดีย (oidia) พบในเบซิดิโอไมซีสบางชนิด เช่น *Coprinus lagopus* จะมีแขนงไฮฟาเล็ก ๆ ยื่นออกมา เรียกว่า ออดิโอฟอร์ (oidiophores) ทำหน้าที่สร้างออยเดียและสามารถเจริญเป็นเส้นใยปฐมภูมิต่อไปได้

3 คลามิโดสปอร์ (chlamydospore) เกิดจากเซลล์ในเส้นใย (อาจเป็นเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ก็ได้) สร้างผนังหนาขึ้นห่อหุ้ม ดังภาพที่ 2.3ก และ 2.3ข ภายในมีอาหารสะสมอยู่มากมายและเซลล์จะสูญเสียน้ำทำให้มีเมตาบอลิซึมต่ำ เนื่องจากมีผนังหนาจึงทำให้สามารถพักตัวอยู่ได้เป็นเวลานานและทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี พบในเห็ดบางชนิด เช่น *Tricholoma crassum* (วสันณ์ เพชรรัตน์. 2522)

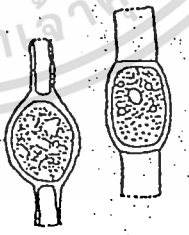
4 โคนิเดีย (conidia) หรือ โคนิดิโอสปอร์ (conidiospore) เป็นสปอร์ที่ไม่สิ่งหุ้ม เกิดที่ปลายเส้นใยที่ทำหน้าที่ชูสปอร์ (conidiophore) ซึ่งที่ปลายของเส้นใยจะมีเซลล์ที่เรียกว่า สเตอริกมา (sterigma) ทำหน้าที่สร้างโคนิเดีย ในเห็ดราบางชนิดมีโคนิเดียเกิดที่ปลายของเส้นใยเพียงหนึ่งอันหรือหลาย ๆ อันมาเรียงตัวกันเป็นแบบลูกโซ่ พบในเห็ดราพวก smuts และ rusts

5 เจมมา (gemma) เกิดจากโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายหน่อจะมีการสร้างผนังหนาขึ้นห่อหุ้ม เมื่อหลุดออกไปจะเจริญเป็นเส้นใยใหม่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบในเห็ดราพวกไฮมีโนไมซีเทส (Hymenomycetes)



2.3ก

ภาพที่ 2.3 ก คลามีโดสปอร์ (Gupta. 1981)



2.3ข

ภาพที่ 2.3 ข คลามีโดสปอร์ (Kaul. 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.5.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ การรวมโพรโทพลาสซึม การรวมตัวของนิวเคลียสและการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส ซึ่งถ้าแบ่งเห็ดราตามความสามารถในการผสมพันธุ์ จะแบ่งได้ 2 กลุ่ม ดังนี้ (Esser and Kuenen. 1967 ; Raper.1966)

2.1.5.2.1 โฮโมทัลลิก ฟังไจหรือคอมแพททิเบิล สปีชีส์ (Homothallic Fungi หรือ Compatible species) เห็ดราในกลุ่มนี้สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ผสมพันธุ์ภายในทัลลัสเดียวกันได้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1 ไพรมารี โฮโมทัลลิก (Primary homothallic) สามารถผสมตัวเองได้ เส้นใยเจริญมาจากสปอร์เดี่ยวที่มี 1 นิวเคลียสซึ่งได้จากการแบ่งแบบไมโอซิสหรืออาจจะเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ แต่ส่วนใหญ่เมื่อผสมกันแล้วจะได้เส้นใยที่มีหลายนิวเคลียส เรียกว่า มัลทิคาริโอติก (multikaryotic) ซึ่งแต่ละนิวเคลียสไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมหรือมีเมทิ่งไทป์เหมือนกัน การรวมตัวของนิวเคลียสและการแบ่งตัวแบบไมโอซิสเกิดขึ้นที่เบสิเดีย (basidia) ของดอกเห็ด เช่น เห็ดฟาง (*Volvariella volvaceae*)

2 เซคคันดารี โฮโมทัลลิก (Secondary homothallic) เห็ดราพวกนี้ทัลลัสเจริญมาจากสปอร์ที่มีนิวเคลียส 2 อัน ซึ่งมีเมทิ่งไทป์แตกต่างกัน ดังนั้นเห็ดรากลุ่มนี้จึงสามารถผสมพันธุ์ภายในทัลลัสเดียวกันได้

2.1.5.2.2 เฮเทอโรทัลลิก ฟังไจ หรือ อินคอมแพททิเบิล สปีชีส์ (Heterothallic fungi หรือ incompatible species) เห็ดรากลุ่มนี้ไม่สามารถผสมพันธุ์ภายในทัลลัสเดียวกันได้ ต้องมีการผสมข้าม การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดขึ้นได้เมื่อมีการรวมตัวของนิวเคลียสที่มีเมทิ่งไทป์ที่แตกต่างกันเท่านั้น การสืบพันธุ์แบบนี้แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1. ไบโพลาร์ เฮเทอโรทัลลิก หรือ ยูนิแฟคทอเรียล อินคอมแพททิบิลิที (Bipolar heterothallic หรือ unifactorial incompatibility) เป็นระบบการผสมพันธุ์ที่มีเมทิ่งไทป์ 1 คู่ 2 อัลลีลคือ A และ a เช่น เห็ดหูหนู (*Auricularia* sp.) ระบบการผสมพันธุ์แบบไบโพลาร์ เฮเทอโรทัลลิก (ตารางที่ 2.1)

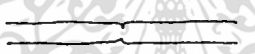
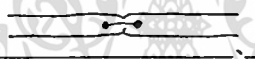
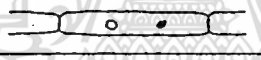
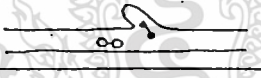
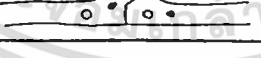
ตารางที่ 2.1 ระบบการผสมพันธุ์แบบไบโพลา ร์(+ คือผสมพันธุ์กันได้ -คือผสมพันธุ์กันไม่ได้)

อัลลีล	A	A	a	a
A	-	-	+	+
A	-	-	+	+
a	+	+	-	-
a	+	+	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 เททระโพลาร์ เฮเทอโรทัลลิก หรือ ไบแฟคทอเรียล อินคอมแพททิบิลิที (Tetrapolar heterothallic หรือ bifactorial incompatibility) เป็นระบบการผสมพันธุ์ที่มี ยีนที่ควบคุมคู่ผสมพันธุ์ 2 คู่ 4 อัลลีล คือ A_1 A_2 B_1และ B_2 ซึ่งยีนทั้งสองนี้อยู่ต่างโครโมโซมกัน ดังนั้นการแยกตัวของยีนจึงเป็นอิสระต่อกันทำให้สปอร์ที่ได้จากเห็ดชนิดนี้จะมีเมทิ่งไทป์ที่ แตกต่างกัน 4 แบบ คือ A_1B_1 A_1B_2 A_2B_1 และ A_2B_2 ยีนบนโลกัส A ควบคุมการเข้าคู่กันของนิวเคลียส (nuclear pairing) และสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น ยีนบนโลกัส B ควบคุมการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสและการเชื่อมระหว่างเซลล์ (clamp fusion) ซึ่งการควบคุมการแสดงออกของยีนบนโลกัส A และ B ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยนั้นได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การควบคุมการแสดงออกของยีนบนโลกัส A และ B ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเห็ด (Bos. 1998)

Event		Locus
Septal dissolution		B
Nuclear migration		B
Nuclear pairing		A
Hook cell formation		A
Conjugate division		A
Cell septation		A
Hook cell fusion		B

ถ้ายีนควบคุมคู่ผสมพันธุ์บนโลกัส A ต่างกันแต่โลกัส B เหมือนกัน (A≠B=) จะผสมกันได้เพียงกึ่งเดียว (hemicompatible) มีการเข้าคู่กันของนิวเคลียสแต่นิวเคลียสไม่มีการเคลื่อนที่จึงไม่สามารถเกิดดอกเห็ดได้ ลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันจะมีลักษณะเป็นร่องลึกเรียกว่า barrage ถ้ามียีนบนโลกัส A เหมือนกันแต่โลกัส B ต่างกัน (A=B≠) ก็ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ นิวเคลียสมีการเคลื่อนที่และสร้างผนังเซลล์กั้นแต่ไม่เกิดแคลมป์ คอนเนคชั่นจึงทำให้ไม่สามารถเกิดดอกเห็ดได้ ลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเป็นแถบหนาเรียกว่า flat (Papazian. 1950) ถ้ายีนยีนควบคุมคู่ผสมพันธุ์ต่างกันทั้งสองโลกัส (A≠B≠) จะผสมพันธุ์กันได้เกิดแคลมป์ คอนเนคชั่นและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเกิดดอกเห็ดได้ การเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่นจะเกิดเมื่อเซลล์อยู่ในระยะเมตาเฟสและสิ้นสุดในระยะเทโลเฟส ระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ เฮเทอโรทัลลิก (ตารางที่ 2.3) และลักษณะการเจริญของโมโนคาริออนที่นำมาผสมพันธุ์แสดงไว้ในภาพที่ 2.4

ตารางที่ 2.3 ระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ เฮเทอโรทัลลิก

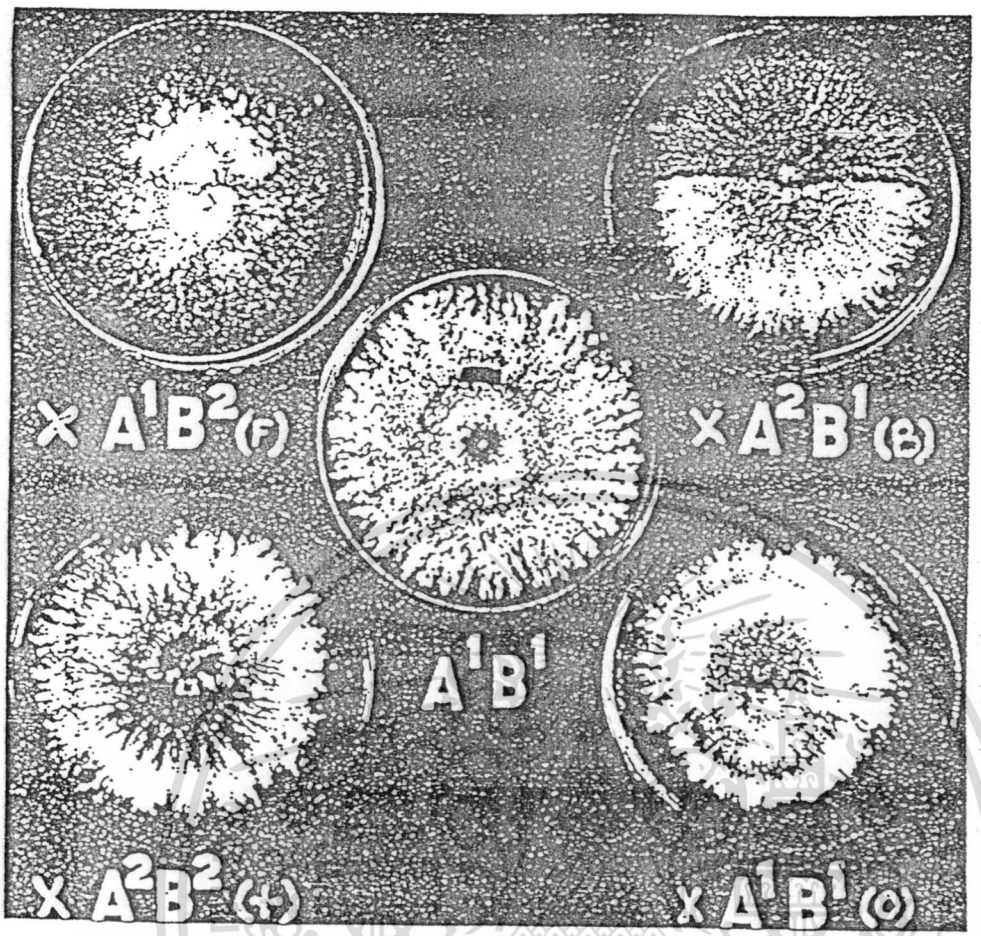
เมทติ่งไทป์	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
A_1B_1	-	(-)	(+)	+
A_1B_2	(-)	-	+	(+)
A_2B_1	(+)	+	-	(-)
A_2B_2	+	(+)	(-)	-

- หมายถึง ผสมพันธุ์กันไม่ได้
+ หมายถึง ผสมพันธุ์กันได้อย่างสมบูรณ์ เกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น
(+) หมายถึง ผสมพันธุ์กันได้เพียงกึ่งเดียว จะเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่นที่เจริญไม่สมบูรณ์ (pseudoclamp connection) (ภาพที่ 2.5) และเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันจะมีลักษณะเป็นร่องลึก (barrage)
(-) หมายถึง ผสมพันธุ์กันไม่ได้ ไม่เกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น และเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันจะมีลักษณะเป็นแถบหนา (flat)

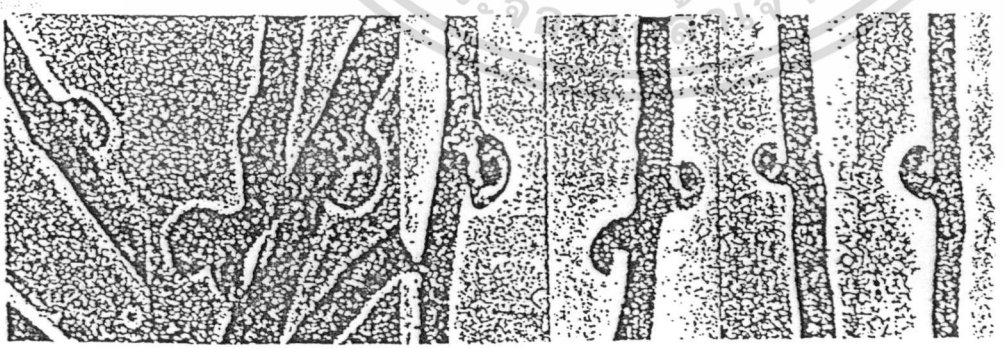
2.1.6 มัลทิเพิลอัลลีล (Multiple Alleles)

เห็ดที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศพวกเฮเทอโรทัลลิก มี 35 เปอร์เซ็นต์เป็นเห็ดที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบไบโพลาร์และอีก 65 เปอร์เซ็นต์มีระบบการผสมพันธุ์แบบ เททระโพลาร์ โดยมียีนที่ควบคุมคู่ผสมพันธุ์ 2 โลกัสคือ A และ B ซึ่งเป็นอิสระต่อกันแต่ละโลกัสจะมีมากกว่า 1 อัลลีลหรือมัลทิเพิลอัลลีล (Raper. 1966 ; Whitehouse. 1949) และเห็ดในคลาสเบสิดิโอไมซิเทสที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์จะมีจำนวนอัลลีลแต่ละโลกัสประมาณ 100 อัลลีล (Whitehouse.1949)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 แสดงการผสมพันธุ์ของ *Schizophyllum* โดย A^1B^1 คือ โมโนคาริออน ; (F) คือ Flat ; (B) คือ Barrage ; (+) คือ เกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ; (o) คือ overlap (Papazian. 1950)



ภาพที่ 2.5 แคลมป์ คอนเนคชั่นที่เจริญไม่สมบูรณ์ (Raper. 1966)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

2.2.1 หลักการเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันออกจากกันในสนามไฟฟ้า โดยอาศัยความแตกต่างของชนิด ปริมาณของประจุ ขนาดและรูปร่างรวมทั้งปัจจัยร่วมอื่นๆ ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยก โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่มีประจุ โปรตีนบางชนิดมีประจุลบ บางชนิดมีประจุบวก และบางชนิดเป็นกลาง(ไม่มีประจุ) ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโปรตีนในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปร่าง และประจุสุทธิของโปรตีน ซึ่งอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประโยชน์ และนิยมใช้กันมากในการวิเคราะห์โปรตีนและรูปแบบไอโซไซม์

การแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสมีหลักการคือ โปรตีนที่มีประจุถูกบังคับให้เคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าและเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม การเคลื่อนที่นี้จะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนและความพรุนของเจลที่เป็นตัวกลางสำหรับให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่าน ตัวกลางที่ใช้ต้องมีคุณสมบัติเฉื่อย ที่นิยมใช้กันมาก คือ พอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) (ดวงพร วรสุนทโรสถ. 2538)

โดยทั่วไปการแยกจะเกิดขึ้นในสารละลายบัฟเฟอร์บนตัวกลางค้ำจุนที่เป็นแผ่นเจลหรือเป็นแท่ง (supporting medium) เพื่อช่วยลดความร้อนที่มักทำให้แถบตัวอย่างโค้ง และผลจากการแพร่ทั้งระหว่างการแยกและเมื่อสิ้นสุดการแยกแล้ว สารค้ำจุนที่ใช้กันมาก ได้แก่ กระดาษแบบเซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate) และแบบ เจล ได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) แป้ง (starch) อะกาโรส (agarose) อะกาโรสอะคริลาไมด์ (agaroseacrylamide) ซึ่งสารค้ำจุนประเภทเจล หรือวุ้นยังสามารถมีส่วนช่วยเสริมการแยก โดยอาศัยหลักการกรองโมเลกุล (molecular sieving effect) ช่วยให้โมเลกุลขนาดต่างกันแยกออกจากกันได้ดีขึ้น เนื่องจากเจลมีลักษณะเป็นรูพรุน ซึ่งการเลือกชนิดของเจลที่มีขนาดของรูพรุนใกล้เคียงกับขนาดของโมเลกุลของสารตัวอย่างนั้น จะเป็นผลดีต่อการแยก โดยจะทำให้สารที่มีโมเลกุลใหญ่เคลื่อนที่ได้ช้าลงเมื่อเทียบกับสารที่มีโมเลกุลเล็ก เช่น การใช้แผ่นแป้งเจลและอะคริลาไมด์เจล ซึ่งมีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกับสารโปรตีนทั่วไปและนิยมใช้ในการแยกโปรตีน ส่วนอะกาโรสเจล มีขนาดรูพรุนที่ใหญ่เกินไปสำหรับโปรตีน ดังนั้นจึงเหมาะที่จะใช้ในการแยกกรดนิวคลีอิก และนิวคลีโอโปรตีน

2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.2.2.1 คุณสมบัติของสารตัวอย่าง

2.2.2.1.1 ชนิดและปริมาณประจุ ซึ่งเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเช่น โมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ และโมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก

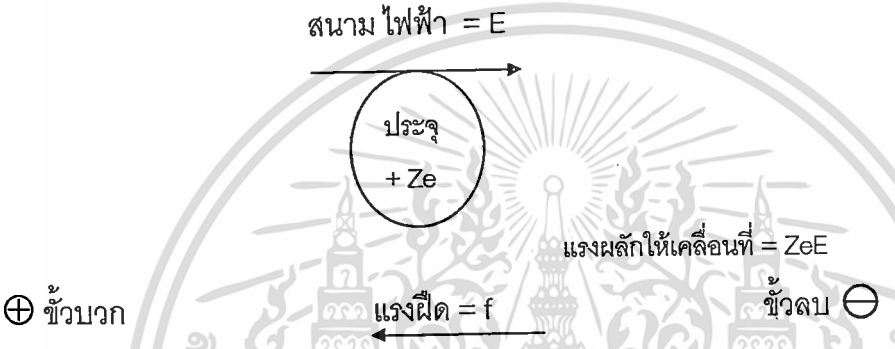
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.1.2 ขนาดของโมเลกุล โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทาน(friction) กับตัวกลางแวดล้อม (surounding medium) มากกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก

2.2.2.1.3 รูปร่างของโมเลกุล โมเลกุลที่มีรูปร่างทรงกลม (sพีเอชerical หรือ globular shape) จะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างยาวรี หรือเป็นสาย

2.2.2.2 สนามไฟฟ้า

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ และระยะเวลาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แต่แปรผกผันกับความต้านทานไฟฟ้า



ภาพที่ 2 .6 แสดงแรงกระทำต่างๆ ที่มีต่อโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้า

Z = จำนวนประจุบนโมเลกุล e = หน่วยอิเล็กตรอนสถิตในหนึ่งหน่วยประจุ

E = ความแรงของสนามไฟฟ้า (โวลต์ต่อเซนติเมตร)

V = ความเร็วของโมเลกุลที่เคลื่อนที่ไปด้วยความสม่ำเสมอ (เซนติเมตรต่อวินาที)

จากภาพที่ 2 .6 จะเห็นว่าที่ความเร็วปลาย

แรงที่เกิดจากสนามไฟฟ้า = แรงฝืด

$ZeE = fv$

$v/E = Ze/f$

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลต่อหน่วยสนามไฟฟ้า = Ze/f

(Electrophoretic Mobility)

ถึงแม้ว่าการเคลื่อนที่ของโมเลกุลขึ้นอยู่กับกระแสไฟฟ้าแต่ถ้าใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดผลเสียได้คือ ทำให้เกิดการระเหยของสารละลาย และทำให้เกิดความร้อนสูงในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งจะทำให้เกิดการแตกตัวของโมเลกุล และผลของการแยกสารไม่ดีเท่าที่ควร โดยเฉพาะสารที่เสียสภาพได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น เอนไซม์ และหากใช้กำลังไฟฟ้าที่ต่ำเกินไปผลของการทำอิเล็กโทรโฟริซิสจะไม่ดีเนื่องจากใช้เวลาในการทำนานขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มอัตราการเกิดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกตัวของสารเช่นกัน ดังนั้นควรเลือกใช้กระแสหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม (เทพบุตร ดีรักษาพร และคณะ. 2540)

2.2.2.3 บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์นอกจากจะทำหน้าที่รักษาสภาวะความเป็นกรด-ด่างของตัวกลางค้ำจุน (support medium) และเป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่างแล้ว ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าอีกด้วย คือ

2.2.2.3.1 ความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ เนื่องจากสารชีวโมเลกุลโดยทั่วไปไม่ว่าจะเป็นโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิค มักมีหมู่ที่แสดงประจุบวกและประจุลบอยู่ในโมเลกุล ซึ่งมีค่าการแตกตัว (dissociation constant, pK) ต่างๆ กัน การแตกตัวของหมู่ประจุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ พีเอช ของสารละลายนั้นๆ

2.2.2.3.2 Ionic strengthของ บัฟเฟอร์ การเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุในสนามไฟฟ้าแปรผกผันกับรากที่สองของ ionic strength นั่นคือสารชนิดเดียวกันจะเคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำ ได้ดีกว่าในบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูง แต่ในขณะเดียวกัน การทำอิเล็กโทรโฟรีซีสในบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูง จะได้แถบ (band) ของการแยกคมชัดกว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำ

Ionic strengthของ บัฟเฟอร์ นอกจากมีความสำคัญดังกล่าวแล้วยังเกี่ยวข้องกับความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสด้วย ถึงแม้ว่าการใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูงจะทำให้ได้การแยกของสารที่คมชัดก็ตาม แต่ก็ทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งเป็นผลเสียต่อการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส เนื่องจากความร้อนที่เพิ่มสูงขึ้นจะเพิ่มการแผ่กระจาย (diffusion) และอัตราการเคลื่อนที่ของอิออนประมาณ 2.4 เปอร์เซ็นต์ ต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ความร้อนที่เกิดขึ้นยังไปลดความหนืดของตัวกลางค้ำจุน ทำให้ความต้านทานไฟฟ้าลดลง ซึ่งเป็นผลทำให้กระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น (V = IR, เมื่อใช้ constant voltage) และทำให้เกิดความร้อนเพิ่มขึ้นต่อเนื่องกันไปอีก ดังนั้นเพื่อที่จะให้ได้ผลดีควรคำนึงถึง ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ด้วย โดยปกติจะใช้ ionic strength ระหว่าง 0.05-0.10 โมลต่อลิตร (เทพบุตร ดีรักษาพร และคณะ. 2540)

2.2.2.4 ตัวกลางค้ำจุน

การเลือกใช้ตัวกลางค้ำจุนให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส มีผลต่อการแยกของสาร เพราะตัวกลางค้ำจุนบางชนิดอาจทำให้เกิดการดูดซับ (absorption) ระหว่างสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุน หรืออาจมีการแลกเปลี่ยนประจุของสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุนได้รวมทั้งความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (inhomogenesis) ของตัวกลางค้ำจุน สิ่งเหล่านี้มีผลต่อการแยกของสารโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งสิ้น

ตัวกลางค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะทั่วไปดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.4.1 ไม่ไวในการทำปฏิกิริยา

2.2.2.4.2 ยอมให้สารตัวอย่างผ่านได้อย่างรวดเร็ว

2.2.2.4.3 สามารถแยกสารตัวอย่างได้อย่างชัดเจน

2.2.4.4.4 สามารถถูกแยกเป็นส่วน ๆ ได้ง่าย

2.2.3 การแยกโปรตีน

อิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้สำหรับการแยกโปรตีนมี 2 แบบคือ

2.2.3.1 การแยกโปรตีนในสภาพธรรมชาติ (non-denaturing or polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) เหมาะสำหรับใช้แยกและจำแนกโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกัน แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างทางรูปร่าง ขนาด หรือประจุของโปรตีนชนิดต่างๆ ได้ เพราะโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันอาจเคลื่อนที่ได้เท่ากันในระบบนี้

2.2.3.2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)วิธีนี้ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนระหว่างขั้นตอนการทำโปรตีนบริสุทธิ์ ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนหรือหน่วยย่อยของโปรตีน (subunit) หลักการคือ SDS (sodium dodecylsulfate) เป็นสารที่มีประจุลบจะเข้าไปเกาะกับโปรตีนอย่างแน่นหนาทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุเป็นลบ นอกจากนี้ SDS จะทำให้โปรตีนเสียสภาพจากรูปร่างกลมเป็นเส้นตรง การเคลื่อนที่ของโปรตีนทุกชนิดจึงอาศัยความแตกต่างกันของน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว

2.2.4 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจลหรือที่เรียกย่อๆ ว่า PAGE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนและสารละลายโปรตีนผสม ถึงแม้ว่าเทคนิคการแยกสารแบบ 2 มิติจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการแยกโปรตีนแบบพอลิอะคริลาไมด์ แต่การแยกสารแบบเจล 1 มิติก็ยังคงเป็นที่นิยมใช้และให้ผลที่ดี

PAGE เป็นเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสที่เป็นการแยกสารแบบเจล 1 มิติ ที่มีตัวกลางเป็นพอลิอะคริลาไมด์เจลซึ่งเฉื่อยต่อสารเคมีต่างๆ ในระหว่างเกิดกระบวนการแยกสาร สำหรับตัวกลางที่เป็นกระดาษและเซลลูโลสอะซีเตตสามารถลดการพาของโปรตีนได้ การแยกโปรตีนโดยใช้ตัวกลาง 2 ชนิดนี้จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุโปรตีนที่ค่าพีเอชนั้นๆ แต่สำหรับตัวกลางประเภทเจลนั้นสามารถลดการแพร่และป้องกันการพา ทำให้แยกสารได้คมชัด รวมทั้งเป็นตัวกลางที่มีรูพรุน ทำหน้าที่เป็นตะแกรงร่อนโมเลกุล สามารถปรับขนาดของรูพรุนให้มีความเหมาะสมกับสารที่ต้องการจะแยกได้ ดังนั้นการแยกโปรตีนโดยใช้ตัวกลางที่เป็นเจลจึงขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุและขนาดของสาร ซึ่งโปรตีน 2 ชนิดที่แตกต่างกันแต่มีความหนาแน่นของประจุเท่ากันจะไม่ถูกแยกออกจากกันเมื่อแยกด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ ในขณะที่เทคนิค PAGE ขนาดของรูพรุนเจลที่เหมาะสมจะมีผลทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดใหญ่ช้ากว่าขนาดโปรตีนที่เล็ก ทำให้โปรตีน 2 ชนิดแยกออกจากกันได้ (เบญจมาภรณ์ บุนนาค. 2544)

ความสามารถในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลของเจลนั้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดรูพรุนของเจลว่ามีขนาดใกล้เคียงกับขนาดอนุภาคที่เคลื่อนที่หรือไม่ ขนาดรูพรุนของอะกาโรสเจลค่อนข้างใหญ่ทำให้ความสามารถในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลของโปรตีนส่วนใหญ่ลดลง การแยกจึงขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุเพียงอย่างเดียว ในขณะที่เจลแป้งและพอลิอะคริลาไมด์เจลมีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกับขนาดโมเลกุลของโปรตีน ทำให้การแยกขึ้นอยู่กับขนาดและความหนาแน่นของประจุ สำหรับเจลแป้งผลของการแยกยังขึ้นอยู่กับคุณภาพของแป้งด้วย เนื่องจากเจลแป้งเตรียมจากผลผลิตทางชีวภาพจึงอาจมีการปนเปื้อนและมีผลต่อการแยกสารได้ ในขณะที่พอลิอะคริลาไมด์เจลเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer) ของอะคริลาไมด์มอโนเมอร์ (acrylamide monomer) ซึ่งเตรียมจากสารที่มีความบริสุทธิ์สูงและยังเป็นสารที่เฉื่อยต่อสารเคมี เสถียรที่ช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่กว้าง มีความโปร่งใส สามารถที่จะเตรียมเจลที่มีขนาดรูพรุนได้ขนาดต่างๆ กัน ซึ่งต่างจากเจลแป้งที่มีขนาดรูพรุนค่อนข้างจำกัด ดังนั้นพอลิอะคริลาไมด์เจลจึงเป็นตัวกลางที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซน (ส่องแสง วิงวาท. 2544)

พอลิอะคลิลาไมด์เจล เป็นตัวกลางที่มีคุณสมบัติที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวกลางที่ต้องการแยกและไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยกด้วย ตัวกลางนี้เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสร้างพอลิเมอร์ (polymer) ระหว่าง อะคริลาไมด์ (acrylamide) และ N,N′เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์หรือบิสอะคริลาไมด์ (bisacrylamide, หรือเรียกสั้นๆ ว่า Bis) ซึ่งเป็นตัวต่อเชื่อม (cross-link) ระหว่างสายของอะคลิลาไมด์ โดยมีเททระเมธิลีนไดอามีน (tetramethylenediamine; TEMED) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) และแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) เป็นตัวเริ่มต้น (initiator) ทำให้ได้ลักษณะตาข่ายหรือร่างแหสามมิติ ความเข้มข้นของอะคลิลาไมด์และบิส จะเป็นตัวกำหนดความยาวของสายพอลิเมอร์และขนาดรูตาข่ายที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 2.7)

2.2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพอลิอะคลิลาไมด์เจล

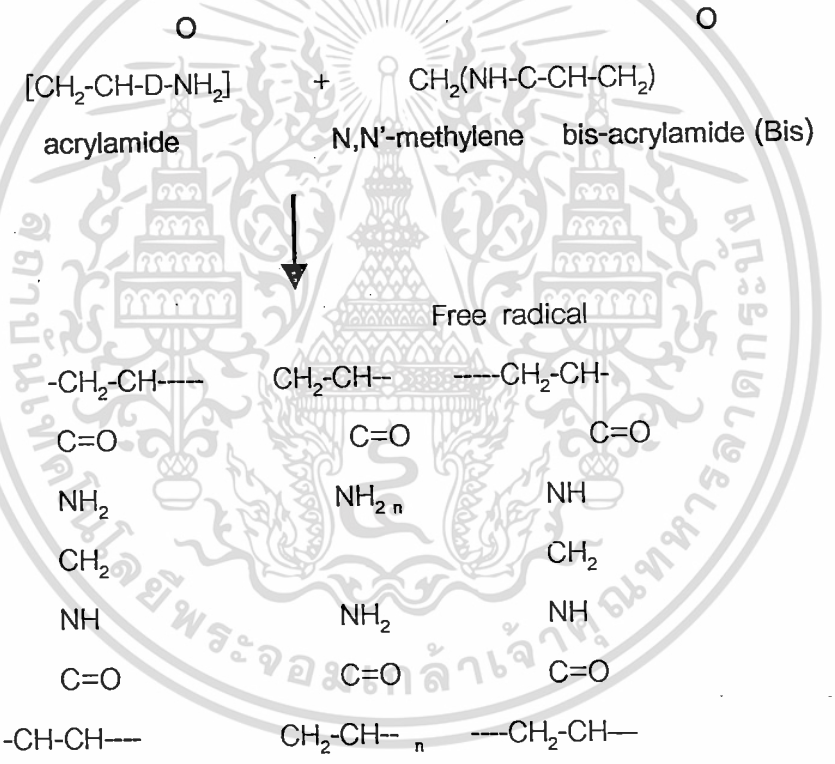
2.2.5.1 ความเข้มข้นของพอลิอะคลิลาไมด์เจล

การที่โปรตีนขนาดต่างๆ สามารถแยกจากกันโดยใช้พอลิอะคลิลาไมด์เจลที่มีรูปร่างและแรงเคลื่อนที่ต่อมวลเท่ากัน เนื่องจากคุณสมบัติการเป็นตาข่ายหรือตะแกรง (sieving properties) ของพอลิอะคลิลาไมด์เจล ซึ่งตาข่ายหรือตะแกรงนี้จะทำหน้าที่กักหรือกรองสารที่มีขนาดต่างกันออกจากกันดังนั้นการเลือกใช้ความเข้มข้นของเจลเพื่อให้ได้ขนาดตาข่ายหรือตะแกรงที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5.2 การเกิด polymerization

พอลิอะคลิลาไมด์เจล เกิดจากการ polymerization ของ acrylamide monomer โดย free radical ซึ่งได้จาก ammonium persul phate โดยการกระตุ้นของ base-catalyst คือ N,N,N',N' – tetramethylethylenediamine (TEMED) หรือ 3-di-methylaminopropionitrile (DMAPN) นอกจาก free radical แล้ว polymerization ยังเกิดขึ้นได้จาก photochemical reaction ระหว่าง riboflavin กับแสงอีกด้วย ปริมาณของ ammonium persulphate และ base-catalyst ที่ใช้มีผลต่อการ polymerization ของเจล ซึ่งถ้าใช้ในอัตราส่วนที่ไม่พอเหมาะก็จะทำให้ polymerization เกิดอย่างไม่สมบูรณ์ และการแยกสารจะไม่ได้ผลดีท่าที่ควร



ภาพที่ 2.7 การเกิด polymerization (เทพบุตร ดีรักษาพร และคณะ. 2540)

2.2.5.3 การเลือกระบบบัฟเฟอร์

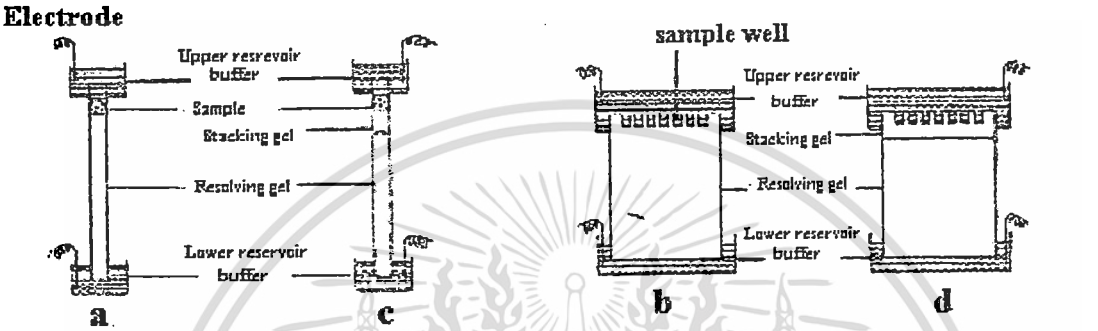
การศึกษาโปรตีนของพอลิอะคริลาไมด์เจล สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ได้แก่ ทริส-ไกลซีน (พีเอช 8.3-9.5) ทริส-บอเรต (พีเอช 8.3-9.3) ทริส-อะซีเตต (พีเอช 7.2-8.5) และทริส-ซิเตต (พีเอช 7.0-8.5) ซึ่งระบบของบัฟเฟอร์ที่เหมือนกัน (continuous buffer system) คือ ไอออนของบัฟเฟอร์เหมือนกันทั้งในสารตัวอย่างในเจล และในอ่างอิเล็กโทรด (electrode reseroir) และมี พีเอช คงที่เท่ากัน ส่วนระบบของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัฟเฟอร์ที่ต่างกัน คือไอออนของบัฟเฟอร์ต่างกันในส่วนของเจล ในอ่างอิเล็กโทรด และมี พีเอชไม่เท่ากัน (ภาพที่ 2.8) (อาภัสสรา ชมิดท์. 2538)

2.2.5.4 การเลือกพีเอช

สิ่งที่ต้องพิจารณาอันดับแรกคือ ช่วงพีเอชที่ทำให้โปรตีนเสถียร และทำให้อิเล็กโทรโฟรีซิสดำเนินไปอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการแยก ประมาณครึ่งหนึ่งของโปรตีนที่ศึกษากันมีค่า pI อยู่ในช่วง พีเอช 4.0-6.5 บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้จึงอยู่ในช่วง พีเอช 8.0-9.5



ภาพที่ 2.8 ระบบบัฟเฟอร์ (a) และ (b) Continuous buffer system
(c) และ (d) Discontinuous buffer system

2.3 เทคนิคไอโซไซม์ (Isozyme technique)

การศึกษาลักษณะความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) ของสิ่งมีชีวิตสามารถศึกษาได้จากการทำงานของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพราะเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของยีนโดยวิธีการสังเคราะห์โปรตีน โดยพบว่าเอนไซม์บางชนิดประกอบด้วยโปรตีนที่มีรูปร่างของโมเลกุลแตกต่างกันแต่มีความจำเพาะของสับสเตรทเหมือนกัน ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน เรียกว่าไอโซไซม์ (isozyme) เอนไซม์เป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนจะถูกกำหนดโดยตรงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน เอนไซม์แตกต่างกันในองค์ประกอบกรดอะมิโนที่มีประจุสุทธิไม่เหมือนกัน รวมทั้งขนาด และรูปร่างโมเลกุลต่างกัน เมื่อนำมาแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในสนามไฟฟ้าบนสารตัวกลางที่เป็นเจล เอนไซม์จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วในอัตราที่ต่างกัน เมื่อย้อมสีเจล ซึ่งก็คือให้เอนไซม์ที่ค้างอยู่บนเจลทำปฏิกิริยากับสับสเตรท แล้วตกตะกอนมองเห็นเป็นแถบ (band) ขึ้น มีรูปแบบเฉพาะเรียกว่า "ไซโมแกรม" (zymogram) หรือรูปแบบแถบเอนไซม์ (isozyme banding pattern) ในสภาพการทดลองที่ได้มาตรฐาน โอกาสการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไอโซไซม์เหล่านี้จะเกิดเท่ากัน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของแถบไอโซไซม์ที่เกิดอย่างสม่ำเสมอระหว่างไซโมแกรมของแต่ละตัวอย่างจะเป็นไปตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแตกต่างของจีโนไทป์ (genotype) ระหว่างพันธุ์ และสภาพทางสรีระของตัวอย่างที่นำมาเปรียบเทียบ

การเกิดไอโซไซม์ อาจเกิดขึ้นที่โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) โดยเกิดจากยีนหลายยีนที่แปรรหัสให้โครงสร้างของสายโพลีเปปไทด์ของเอนไซม์แตกต่างกันหรือเกิดจากหลายอัลลีลที่ตำแหน่งเดียวกันหรืออาจเกิดจากโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงหลังโครงสร้างปฐมภูมิแล้ว เช่นการเติมหมู่อะมิโน (amino group) หรือหมู่คาร์บอกซิล (carboxly group) หรือหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxly group) ในสายโพลีเปปไทด์ แต่การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ใช่ส่วนจำเป็นในการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นไอโซไซม์ยังคงมีหน้าที่เหมือนเดิมแต่มีรูปร่างโมเลกุลที่เปลียนแปลงไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เกิดจากพันธุกรรมที่เป็นคุณสมบัติของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ดังนั้นการศึกษาไอโซไซม์จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ และการศึกษาไอโซไซม์ในปัจจุบันก็สามารถทำได้ง่ายโดยสกัดจากตัวอย่างสด ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ ใช้ในปริมาณน้อย และสามารถตรวจสอบได้หลายตัวอย่างพร้อมๆกัน สะดวกในการเปรียบเทียบ ให้ผลแม่นยำ สำหรับตัวกลางที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบเจล มีหลายชนิด เช่น เจลแป้ง พอลีอะคริลาไมด์เจล อะกาโรสเจล และ อะกาโรสอะคริลาไมด์เจล (เทพบุตร ดีรักษาพร และคณะ. 2540) ซึ่งสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและประสิทธิภาพในการแยกสารได้แตกต่างกัน ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการจะแยกด้วย

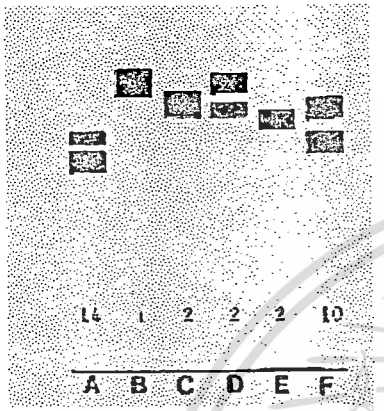
การประยุกต์ใช้งานไอโซไซม์โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสส่วนใหญ่นำมาใช้ในงานอนุกรมวิธานของพืช หรือด้านโรคพืช แต่ก็ได้มีการใช้ในงานอนุกรมวิธานของเห็ด และเชื้อราอื่น ๆ เพื่อบอกชนิดหรือชนิดย่อย (subspecies) เนื่องจากความแปรผันทางสันฐานวิทยา (morphology) ของโครงสร้างภายนอก และส่วนขยายพันธุ์ (fruiting body) จากสภาพแวดล้อมมีจำนวนมากขึ้น บางชนิดไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอีกหลายชนิดที่มีความสับสน และยุ่งยากในการจำแนก (Burdon และ Marshall, 1983; Clare, 1963 ; Kohn, 1992) อย่างไรก็ตาม Burdon และ Marshall (1983) ได้รายงานว่าพบความแตกต่างภายในกลุ่มของตัวอย่าง (intra group) จะมีความแตกต่างน้อยกว่าระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (inter group) แต่ต้องใช้เอนไซม์หลาย ๆ ชนิดจึงจะให้ข้อมูลที่เชื่อถือได้

2.4 การวิเคราะห์ผลจากไซโมแกรม

สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจากสปอร์เดี่ยวซึ่งมีนิวเคลียสเป็นแฮพลอยด์ (n) นั้นการวิเคราะห์ลักษณะแถบเอนไซม์ (electrophoretic typesหรือ Ets) จะแสดงในรูปของระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบเอนไซม์ที่ปรากฏเปรียบเทียบกับสีมาตราฐาน (ค่า R_f) (Caugant *et. al.* 1981 ; Baptist *et. al.* 1969) ซึ่งเป็นลักษณะไซโมแกรมที่เกิดขึ้นของแต่ละเอนไซม์ที่ทำการศึกษา โดยเรียงลำดับของค่า R_f จากมากไปหาน้อยหรือจากน้อยไปหามากก็ได้ และแทนค่า R_f ด้วยการจัดลำดับเป็นหมายเลขหรือตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อักษร (สุภาภรณ์ จาริยุวัฒน์. 2541) และจัดชนิดของรูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นของแต่ละเอนไซม์ (ดังภาพที่ 2.9) แล้วนำข้อมูลของตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ เพื่อหาค่า Sm (Similarity matrix) ของตัวอย่างทำให้ทราบความสัมพันธ์ ความคล้ายคลึงกัน ของตัวอย่างได้



Isolate	APH	HK	IDH	MDH	PGI	PGM	6PGD	TPI
F.s. 694	A	D	F	G	C	A	B	C
F.s. 695	A	D	F	G	C	A	B	C
F.s. 696	C	D	F	G	C	A	B	C
F.s. 707	A	D	F	—	C	A	B	C
F.s. 710	A	D	F	G	C	A	B	C
F.t. 648	B	B	E	C	B	B	C	B
F.t. 649	B	B	E	C	B	B	C	B
F.t. 650	B	B	E	C	B	B	C	B
F.t. 701	B	B	E	C	B	B	C	B
F.t. 702	B	B	E	C	B	B	C	B
F.t. 703	B	B	E	C	B	B	C	B
F.t. 704	B	B	E	C	B	B	C	B
F.t. 705	B	B	E	C	B	B	C	B
F.t. 706	B	B	E	C	B	B	C	B
F.t. 713	B	B	E	C	B	B	C	B
F.t. 1347	B	B	E	C	B	B	C	A
F.t. 1708	B	B	E	C	B	B	C	B
F.t. 1709	B	B	E	C	B	B	C	B

ภาพที่ 2.9 ตัวอย่างการวิเคราะห์ไซโมแกรม (a) การใส่ตัวเลขหรือตัวอักษรของรูปแบบแถบเอนไซม์ (b) รูปแบบของ Ets ของตัวอย่างจากเอนไซม์ทั้งหมดที่ศึกษา (Havens. 1976 ; Altomare *et. al.* 1997 ; Mill et. al. 1991)

2.5 การสกัดดีเอ็นเอ

ในแต่ละการทดลองจะมีวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมกับตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ในแต่ละตัวอย่างที่มีผนังเซลล์หนาจึงต้องมีการทำให้ผนังเซลล์แตกโดยวิธีการต่างๆดังนี้

1. วิธีนำเซลล์ตัวอย่างหมุนเหวี่ยงโดยใส่ glass bead ลงในบัฟเฟอร์

2. วิธีบดเซลล์ด้วยไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่ง

3. วิธีบดเซลล์ด้วย microscope slide (Weir and Blackwell. 2001)

4. วิธีย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ zymolase และ glusalase โดยปกติเอนไซม์ zymolaseจะย่อยผนังเซลล์ได้ดีกว่า glusalase

5. วิธีการ sonication แต่ไม่นิยมนำมาใช้เพราะจะทำให้สายดีเอ็นเอฉีกขาดได้ นอกจากนี้ถ้าตัวอย่างมีดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะใช้วิธี autolysis ใน saline EDTA, 2-mercaptoethanol และ sodium lauryl sulfate

ภายหลังจากที่เซลล์แตกสามารถแยกดีเอ็นเอและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. นำมาแขวนลอยในสารละลายที่มีส่วนผสมของ Sodium perchlolate และ 1% sarcosate จากนั้นสกัดด้วย chloroform-isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายหลังจากการบ่มด้วยอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมจะทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงเติมเอทานอลที่เย็นจัดแล้วปั่นเหวี่ยงซ้ำจะได้ตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นกำจัดโปรตีนและอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ pronase และ Rnase (Price *et.al.* 1978)

2. เติม CTAB extraction buffer บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วเติม $CHCl_3$: IAA ในอัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตรเท่ากันนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวมาเติม isopropanal จะได้ตะกอนดีเอ็นเอนำมาล้างด้วยเอทานอล 70% ที่เย็นจัด ปล่อยให้แห้งแล้วเติม TE buffer (Saghai *et.al.* 1984)

3. เติม 3M sodium acetate นำไปปั่นเหวี่ยง แยกส่วนใสเติม isopropanal ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งจะได้ตะกอนดีเอ็นเอ นำมาล้างด้วยเอทานอล 70% ซึ่งเย็นจัด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (Cenis. 1992)

หลังจากที่กล่าวมาอาจจะทำการตรวจความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยการหาอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอสายคู่ที่บริสุทธิ์ ถ้าหากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในการเตรียมดีเอ็นเอนั้นมีอาร์เอ็นเอปนอยู่ ถ้าค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลที่ใช้ในการสกัดปนอยู่ สำหรับอาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรจะได้ค่าประมาณ 2

2.6 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคารีโอตมีตำแหน่งยีนซึ่งอยู่ภายในนิวเคลียส หรือภายในออร์แกเนลล์ต่างๆ เช่น คลอโรพลาสต์อยู่ที่ดีเอ็นเอ และ ไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอสามารถจำลองตัวเอง และส่งถ่ายข้อมูลทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นถัดไป ในบางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงภายในยีนอันเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อม สารเคมี หรือความผิดปกติที่เกิดขึ้นในเซลล์เอง การเปลี่ยนแปลงนี้มีผลกระทบต่อข้อมูลทางพันธุกรรมที่ส่งถ่ายออกไป การเปลี่ยนแปลง เช่น การเปลี่ยนลำดับเบส และจำนวนโครโมโซมในรูปแบบต่างๆ เช่น การขาดหายไปของโครโมโซม การเพิ่มจำนวนชุดหรือแท่ง การสลับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ การโยกย้ายของยีนไปยังโครโมโซมแท่งอื่นๆ ปรากฏการณ์เหล่านี้มีผลทำให้เกิดความหลากหลายของลักษณะพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต การศึกษาที่จะตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเช่น RFLP, RAPD, AFLP และ isozyme วิธี RFLP นั้นจะนำเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีคุณสมบัติเฉพาะในการตัดดีเอ็นเอให้ได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดคงที่ ในกรณีที่ดีเอ็นเอเป้าหมายนี้มาจากสิ่งมีชีวิตชนิดที่แตกต่างกัน การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันย่อมให้ผลของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันด้วความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตรวจสอบนี้เรียกว่า polymorphism

2.6.1 ประโยชน์ของ RFLP

เทคนิค RFLP จะช่วยในการตรวจสอบความแปรปรวนของลักษณะทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดได้ จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในการศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุลในด้านต่างๆดังนี้

2.6.1.1 หาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต จากเทคนิค RFLP ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ไมโทคอนเดรีย และนิวเคลียส

2.6.1.2 ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น ใช้ติดตามการถ่ายทอดยีนจากพันธุ์พ่อแม่ วิเคราะห์ลักษณะปริมาณ วิเคราะห์ลักษณะประจำพันธุ์

2.6.1.3 ติดตามลักษณะบางอย่างโดยใช้ RFLP marker ที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นมากๆ เช่น การวินิจฉัยโรคบางชนิด

2.6.2 ข้อดีของเทคนิค RFLP เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น ๆ

ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น RFLP RAPD และ isozyme ในจำนวนทั้งหมดนี้ เทคนิค RFLP มีการใช้อย่างกว้างขวางมากที่สุด เทคนิคของ RFLP มีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค RAPD และ isozyme เช่น

2.6.2.1 ข้อมูลจากเทคนิค RFLP แสดงลักษณะชัดเจนและไม่ได้รับผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

2.6.2.2 แหล่งของดีเอ็นเอจากแหล่งใดก็สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ได้

2.6.2.3 สามารถใช้ marker หลายตัวในการทำแผนที่ยีนภายในประชากรที่ศึกษา โดยไม่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของฟีโนไทป์ สำหรับ RAPD marker แสดงลักษณะชัดเจนแต่ไม่อาจจะตัดสินได้ชัดเจนสำหรับ heterozygous individual สำหรับ isozyme marker มีลักษณะด้อยคือโปรตีนที่ปรากฏออกมาไม่สามารถแสดงออกทุกครั้งในเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันในระยะเวลาเดียวกันที่มีการพัฒนา

2.7 PCR (Polymerase Chain Reaction)

เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายช่วงสั้นๆ แบบปฏิกิริยาลูกโซ่โดยอาศัยเอนไซม์ DNA Polymerase ที่ทนความร้อนทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆเช่นการวินิจฉัยโรคหรือการศึกษาความรู้พื้นฐานต่างๆ

2.7.1 ปัจจัยสำคัญในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

2.7.1.1 Template เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณช่วงดีเอ็นเอที่พร้อมจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะต้องแยกจากดีเอ็นเอสายคู่ เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1.2 Primer เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งด้านปลาย 5′ และ 3′ ทำหน้าที่เป็นแม่แบบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2.7.1.3 เอนไซม์โพลีเมอเรส เป็นเอนไซม์ทนความร้อนสูงใช้เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา ปัจจุบันนิยมใช้ Taq DNA polymerase สามารถทนความร้อนในช่วงที่แยกดีเอ็นเอจากสายคู่เป็นสายเดี่ยวโดยที่ไม่ต้องเติมเอนไซม์ทุกรอบทำให้เกิดความสะดวก และประหยัดเวลา

2.7.1.4 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิด คือ dATP ,dCTP ,dGTP ,dTTP ทำหน้าที่เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอชนิดต่างๆ

ปัจจัยอื่นๆได้แก่ น้ำ เกลือชนิดต่างๆ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

2.7.2 ขั้นตอนการทำ PCR

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้งสองสายที่แยกได้จะถูกใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อไป

2. Primer annealing ขั้นตอนนี้จะเป็นการลดอุณหภูมิลงมาที่ช่วง 40-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับคู่อย่างจำเพาะที่ด้านปลาย 3′ ของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งสองสาย

3. Primer extension ขั้นตอนนี้จะสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ให้ยาวขึ้น โดยมีการต่อเชื่อมของ dNTP ที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มีทิศทางจาก 5′ ไป 3′ สายดีเอ็นเอใหม่ที่สังเคราะห์ต่อจากไพรเมอร์จะมีลำดับเบสที่จับคู่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยามักอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

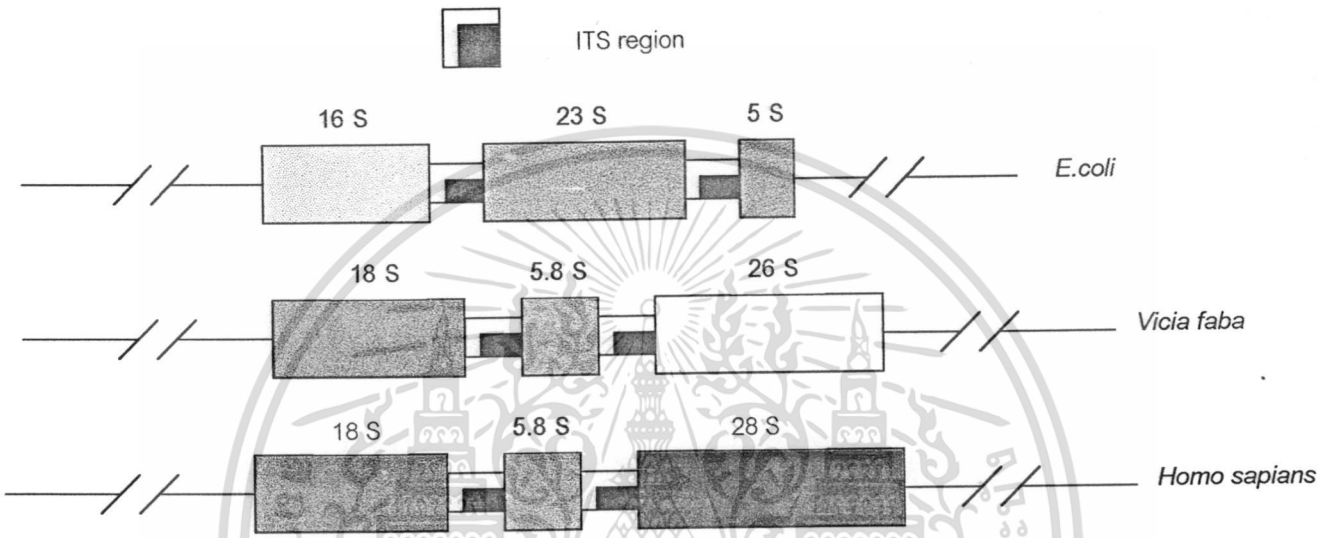
ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้ง 3 ขั้นตอน นับเป็น 1 รอบ ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณนับเป็นผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (PCR product) ซึ่งผลที่ได้มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเดิมสองสายเป็นสี่สาย ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมากรอบขึ้น อัตราการเพิ่มปริมาณจะเป็นทวีคูณคือ 2^n โดยที่ n เท่ากับจำนวนรอบการสังเคราะห์

การใช้เทคนิค PCR มีทั้งข้อดีและข้อจำกัด ข้อดีที่นิยมใช้เนื่องจากดีเอ็นเอเป้าหมายที่นำมาศึกษาไม่ต้องใช้ปริมาณมาก การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้จำนวนมากในเวลาที่จำกัด ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มนี้มีขนาดเบสได้ตั้งแต่ 50 คู่เบส – 2000 คู่เบส สำหรับข้อจำกัดที่ใช้เทคนิค PCR นั้นได้แก่ การพิจารณาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมและทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษาด้วย การปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอจากการถ่ายหลอดจากการดูดสารละลายโดยการปิเปต จะมีผลต่อการใช้เทคนิค PCR ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 Ribosomal RNA Gene (rDNA)

ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดเล็ก (small subunits) และขนาดใหญ่ (large subunits)ที่มีหน่วย S (Svedberge) ที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตพวกโพรคารีโอทและยูคารีโอท เช่น *E.coli* *Viccia faba* และ *Homo sapians* มีไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอที่มีหน่วยย่อยขนาดเล็กเป็น 16S,18S และ 5.8S ตามลำดับ สำหรับหน่วยใหญ่จะเป็น 23S, 26S และ 28S ตามลำดับ (Avise. 1994) (ภาพที่ 2.10)



ภาพที่ 2.10 ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยเล็ก (small subunits) หน่วยย่อยใหญ่ (large subunits) และบริเวณ ITS (ITS region)

บนสายดีเอ็นเอมีข้อมูลสำหรับการสังเคราะห์ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอทั้งชนิดหน่วยย่อยขนาดเล็กและขนาดใหญ่ โดยผ่านขบวนการลอกรหัสและแปรรหัส (coding region) ยังมีบริเวณอื่นๆ ที่พบว่าแทรกอยู่ระหว่างไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอยีนได้แก่ บริเวณ ITS และบริเวณ IGS

ITS และ IGS เป็นบริเวณที่มีหน่วยความซ้ำกันในไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอยีน มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง และมีความแตกต่างกันอย่างมากในสิ่งมีชีวิตระหว่างสปีชีส์ ยีนบริเวณนี้ไม่ถูกลอกรหัสและแปรรหัส (non coding region) แต่สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นถัดไป ทำให้นำมาใช้ประโยชน์ในการแยกสปีชีส์ (White et.al,1990) ทั้ง 2 บริเวณมีความยาวของเบสที่แตกต่างกัน มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาและจัดจำแนกชื่อฟังไจ (White *et.al.* 1990 ; Gardel *et.al.* 1991)

2.9 Primer

การเลือกใช้ไพรเมอร์มีความสำคัญในเทคนิค PCR เนื่องจากใช้เป็นสารตั้งต้นที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ไพรเมอร์ที่ใช้ขยายยีนบริเวณ ITS และบริเวณ IGS ในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันจะต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

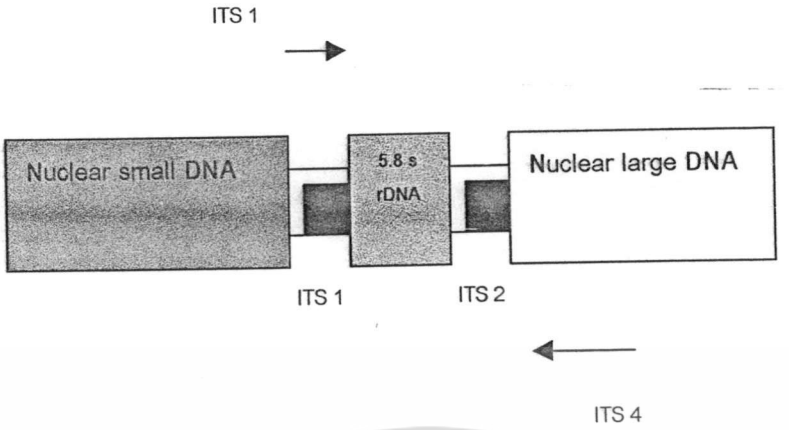
ใช้ให้เหมาะสม ซึ่งอาจมีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับยีนที่สนใจ การออกแบบไพรเมอร์อาจจะใช้คอมพิวเตอร์ช่วยจากเว็บไซด์ของ National Center for Biotechnology information ซึ่งสามารถพบข้อมูลของการเรียงลำดับกรดอะมิโน และนำลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ได้มาจัดเรียง(alignment)ให้เหมาะสมโดยใช้เว็บไซด์ของtoulouse(http:www.toulouse.inra.fr/multalin.html/) จะได้ไพรเมอร์ทั้งด้านปลาย 3′ และปลาย 5′ โดยมีลำดับเบสขนาดความยาวพอเหมาะสำหรับการทำ PCR

นอกเหนือจากการออกแบบไพรเมอร์ยังสามารถทดลองใช้ไพรเมอร์ที่ทราบลำดับเบสและมีรายงานวิจัยในการทดลองขยายยีนบริเวณ ITS และ IGS ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น ITS1 และ ITS4 โดยมีลำดับเบสด้านปลาย 3' ของ 25S และปลาย 5' ของ 5S-rDNA ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ โดยลำดับเบสในบริเวณ ITS1 เป็น 5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′ และบริเวณ ITS4 เป็น 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′ ไพรเมอร์ทั้งสองเป็นสารตั้งต้นในการขยายยีนบริเวณ ITS ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง ใช้ประโยชน์มากในการจัดจำแนกกลุ่มเห็ดรา (White *et.al.* 1990 ; Sierra *et.al.* 1999) (ภาพที่ 2.11)

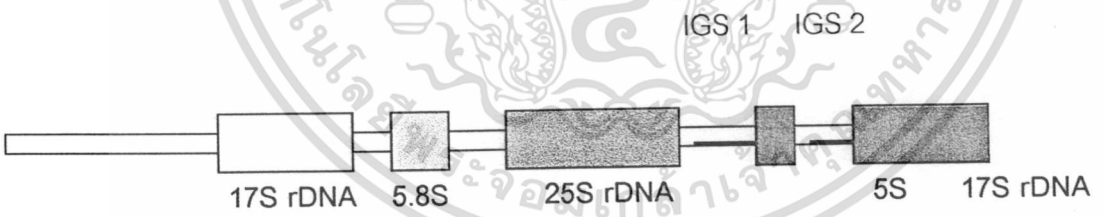
ไพรเมอร์ชนิดอื่นๆได้แก่ CNL12 และ 5SA ซึ่งมีลำดับเบสด้านปลาย 3′ ของ 25Sและปลาย 5′ ของ 5S-rDNA ใช้ในการขยายยีนบริเวณ IGS (Buscot *et.al.* 1990) มีรายงานในการใช้ไพรเมอร์ $LR12R_5$ ซึ่งมีลำดับเบส 21 ตัวคือ 5′CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA3′ (Veldman *et.al.* 1981) และไพรเมอร์ O-1 ซึ่งมีลำดับเบส 18 ตัว คือ 5 ′AGTCCTATGGCCGTGGAT3′ (Duchesne and Anderson. 1990) สำหรับไพรเมอร์ชนิดอื่นๆที่ใช้ในการเพิ่มขยายยีนในบริเวณต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.4 – 2.8)

ในการขยายยีนบริเวณ IGS ปัจจุบันได้มีการนำไปจัดกลุ่มเห็ดราที่มีลักษณะเป็น ไมคอไรซ่า (mycorrhiza) ทั้งBasidiomycetes และAscomycetes (Gardes *et. al.* 1991 ; Henrion *et.al.* 1992 ; Henrion *et.al.* 1994)(ภาพที่ 2.12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.11 บริเวณ ITS 1 และ ITS 2 ที่ต้องการเพิ่มขยายด้วยไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 (White *et.al*. 1990)



ภาพที่ 2.12 บริเวณ IGS ที่ต้องการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR (Erland. 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายยีนบริเวณ 18S rRNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	Tm
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	49
CNS1	GAGACAAGCATATGACTACTG	55
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	65
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	65
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	62
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	55
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC	72
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	72
NS8	TCCGCAGGTTCACCTACGGA	59
TW12	AAGTCGTAACAAGGTTT	53
CTW12	AAACCTTGTTACGACTT	53
NS17	CATGTCTAAGTTTAAGCAA	55
NS18	CTCTTCCAATTACAAGACC	60
NS19	CCGGAGAAGGAGCCTGAGAAAC	74
NS20	CGTCCCTATTAATCATTACG	61
NS21	GAATAATAGAATAGGACG	50
NS22	AATTAAGCAGACAAATCACT	57
NS23	GACTCAACACGGGAAACTC	64
NS24	AAACCTTGTTACGACTTTTA	58
NS1.5R	TCTAGAGCTAATACATGC(T/C)G	52
NS2.8R	GGCCCTCAAATCTAAGGATT	53
CNS2.8R	AATTTGCGCGCCTGCTGCAA	57
NS3.2R	CGTATATTAAAATTGTTGAC	45
CNS3.3R	GACTACGAGCTTTTTAAAGT	51
CNS3.5R	TTTCGCAGTAGTTTGTCTTA	49
NS3.6R	CAAACTACTGCGAAAGCATC	53
CNS3.6R	AATGAAGTCATCCTTGGCAG	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายบริเวณ 5S/IGS rDNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	Tm
5SA - Anderson	CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT	61
5S - Bruns	GCATCCCGTCCGATCTGCGCA	69

ตารางที่ 2.6 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายบริเวณ 28S rRNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	Tm
CTB6	GCATATCAATAAGCGGAGG	51
NL1f	TGGGTGGTAAATTCCATCTA	51
NL2f	GTGAAATTGTTAAAAGGGAAAC	53
CNL2f	GTTTCCCTTTTAACAATTTCAC	53
TW13	GGTCCGTGTTTCAAGACG	53
CTW13	CGTCTTGAAACACGGACC	51
TW14	GCTATCCTGAGGGAAACTTC	55
CTW14	GAAGTTTCCCTCAGGATAGC	64
TW15	CTTGGAGACCTGCTGCGG	55
CTW15	CCGCAGCAGGTCTCCAAG	72
CNL12	CTGAACGCCTCTAAGTCAG	53
CTB11	GCAGCAGGTCTCCAAGGTG	71
TB11	CACCTTGGAGACCTGCTGC	71
NL13	CAAGCGAACTTTCATCATGCACG	63
NL14	CTTTAGAACAAGGGTTGAAC	51
CNL14	GTTCAACCCTTGTTCTAAAG	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายบริเวณ LSU rRNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	Tm
ML7	GACCCTATGCAGCTTCTACTG	63
ML6	CAGTAGAAGCTGCATAGGGTC	59
ML8	TTATCCCTAGCGTAACTTTTATC	57
TB9	CGACTTATCCTATCCTCCG	63
ML5.5	GATCCTCATAGTTAAGACCGC	57
CML5.5	TAGCGGTCTTAACTATGAGG	53
ML7.5	GGCAGTTTGACTGGGGCGG	59
CML7.5	CCGCCCCAGTCAAACTGCC	59
ML5	CTCGGCAAATTATCCTCATAAG	66
ML4	GAGGATAATTTGCCGAGTTCC	68
ML3	GCTGGTTTTCTACGAAACATATTTAA	67
ML2	TATGTTTCGTAGAAAACCAGC	63

ตารางที่ 2.8 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ SSU rRNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	Tm
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	63
MS2	GCGGATTATCGAATTAAATAAC	53
MS4	AACCACCATTCATCGTTGAC	63
U1	TAATTTTGGTGCCGATTGAACG	57
U3	CCAAATTTGGTGCCAGAAGACTCGGTAA	77
U8	GTAGCCGTACTGGAAAGTGC	57
CU6	TGTGGCACGTCTATAGCCCA	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme)

การค้นพบการตัดด้วย endonucleases (Linn and Arber. 1968 ; Meselson and Yuan. 1968) เป็นการพัฒนาชีววิทยาระดับโมเลกุล เอนไซม์ตัดจำเพาะประเภทที่ 2 (Kessler. 1987) จะตัดสายดีเอ็นเอที่โอลิโกนิวคลีโอไทด์ โดยทั่วไปมักจะมี 4, 5 หรือ 6 คู่เบส เช่น EcoRI (แยกได้จาก *Escherichia coli*) ตัดสายดีเอ็นเอทำให้เกิดลำดับเบส 5′– GAATTC – 3′ เอนไซม์มีจำนวนมากสามารถจดจำลำดับเบสที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์เหล่านี้จะแยกมาจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (Robert. 1984) ในแบคทีเรียเอนไซม์เหล่านี้จะไม่ทำลายดีเอ็นเอ เนื่องจากมีระบบการป้องกันแบบ methylation ในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล เอนไซม์ตัดจำเพาะถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์ RFLP

การวิเคราะห์ RFLP ทั้งหมดจะทำการตัดดีเอ็นเอด้วย endonucleases 1 หรือมากกว่าแล้วทำการแยกผลของชิ้นดีเอ็นเอซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสและดูขนาดชิ้นส่วน ลักษณะการตัดที่ต่างกันอาจมีผลมาจากการแทนที่ของเบสในบริเวณที่ถูกตัด การเพิ่มหรือขาดหายไปของดีเอ็นเอหรือการจัดเรียงตัวใหม่ของลำดับเบสจากแต่ละสาเหตุ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแถบ

ตามปกติอิเล็กโทรโฟรีซิสจะใช้อะกาโรสหรืออะคริลาไมด์เจล ดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก โดยใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้นที่ความเป็นกรดด่างเป็นกลาง ดีเอ็นเอจะมีประจุลบ (เนื่องจากอัตราส่วนของน้ำตาลและฟอสเฟต) และเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วบวกตามอัตราส่วนของขนาดโมเลกุลอะกาโรสเจล (0.6-2.0%) ถูกใช้ในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 300 -20,000 คู่เบส และอะคริลาไมด์เจล (3.5-20.0%) ใช้ในการแยกขนาด 10 - 1000 คู่เบส เพื่อความสะดวกในการประมาณความยาวชิ้นส่วนดีเอ็นเอตัวอย่าง ในเจลแต่ละแผ่นควรใช้ขนาดโมเลกุลมาตรฐาน

การดูขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอสามารถทำได้หลายวิธีในการวิเคราะห์อิเล็กโทรโฟรีซิส บางครั้งเริ่มด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีบริสุทธิ์สูงจากแหล่งต่างๆ โดยเฉพาะ เช่น ไมโทคอนเดรีย ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในเจลจะถูกย้อมด้วยสารเคมีหรือกัมมันตภาพรังสี เมื่อจำนวนดีเอ็นเอมาก (มากกว่า 50 นาโกรัมต่อแถบ) เพื่อความสะดวกจะใช้เอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งจะเข้าไปเกาะดีเอ็นเอตามสัดส่วนของขนาดชิ้นส่วนและโครงสร้างการย่อย ในการศึกษาดีเอ็นเอปริมาณน้อยจะย้อมด้วยซิลเวอร์น้อยกว่า 100 พิโคกรัม (Guillemette and Lewis. 1983) ในกระบวนการติดฉลากที่ปลายดีเอ็นเอ จะติดฉลากด้วย ^{32}P หรือ ^{35}S ก่อนจะถูกแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส หลังจากรันเจลแล้วจะทำให้แห้งและประกบด้วยฟิลม์ X-ray โดยสามารถพัฒนาไปเป็นวิธี autoradiograph ซึ่งสามารถแสดงตำแหน่งการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอการติดฉลากที่ปลายดีเอ็นเอนั้นความเข้มข้นของแถบไม่ขึ้นกับขนาดชิ้นส่วนและวิธี เพราะชิ้นส่วนทั้งหมดติดฉลากที่ปลายทั้ง 2 ด้าน ดังนั้นวิธีการติดฉลากที่ปลายดีเอ็นเอจึงเป็นประโยชน์ในการแสดงชิ้นส่วนขนาดเล็กเมื่อดีเอ็นเอมีจำนวนจำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการวิเคราะห์แบบ RFLP อื่นๆ เริ่มด้วยดีเอ็นเอประเภท heterogeneous เช่น นิวเคลียสดีเอ็นเอทั้งหมด โดยการใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากยีนที่มีความจำเพาะ หลังการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเทคนิค Southern Hybridization (Southern. 1975) โดยวิธีนี้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดในเจลจะถูกทำให้เสียสภาพในสารละลายพื้นฐาน หลังจากนั้นย้ายดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดย capillary action หรือ อิเล็กโทรโฟรีซิสสู่ไนลอน หรือ nitrocellulose membrane เมมเบรนจะถูกบ่มด้วย single-standard probe ก่อนหน้านี้ดีเอ็นเอถูกแยกทำให้บริสุทธิ์และติดฉลากกัมมันตรังสี ภายใต้สภาวะที่เส้นดีเอ็นเอในเมมเบรนจะจับกับโพรบเมื่อให้สภาวะ high-stringency การจับกันระหว่างเส้นดีเอ็นเอ และ โพรบจะสัมพันธ์กับระยะทาง หรือ เป็นการหลีกเลี่ยงดีเอ็นเอที่ไม่เป็น homologous ดังนั้นโพรบในปฏิกิริยาจะทำให้เกิดความสมบูรณ์ และ homologous sequence จากชิ้นส่วนที่ไม่สามารถระบุได้จำนวนพันหรือหมื่นจะจับกับโพรบซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านเจล ชิ้นส่วนเหล่านี้มีลำดับเบสคล้ายกับโพรบหลังจากนั้นจะทำ southern blot

โพรบใน Southern Hybridization ซึ่งใช้จำแนกดีเอ็นเอภายใต้การวิเคราะห์โดยเฉพาะโพรบนี้จะประกอบด้วยยีนเดี่ยวจากนิวเคลียสหรือ cytoplasmic genome, noncoding stretch ของลำดับเบสดีเอ็นเอหรือไมโทคอนเดรียของสัตว์ทั้งหมดถ้าโพรบบรรจุดีเอ็นเอที่เป็น multiple copies ในจีโนม southern blot จะแสดงชิ้นส่วนจากทั้งหมดซึ่งโพรบสามารถจับกับสายดีเอ็นเอได้ ในบางกรณี southern blot จะแสดงโครงสร้างการย่อยที่มีความซับซ้อนมากแต่ละตัวจะมีความใกล้เคียงกันสามารถจำแนกโดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โพรบใน Southern Hybridization ต้องได้จากดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงตามความหมายทางกายภาพ เช่น ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่แยกแล้วผ่าน CsCl gradient centrifugation หรือได้จากการโคลนของยีนเฉพาะผ่านเวคเตอร์ (vectors) (Sambrook *et al.* 1989) การใช้ประโยชน์ของโพรบจะจำกัดการวิเคราะห์ภายในสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกัน สำหรับอันดับเบสที่มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ในขณะที่อันดับเบสที่มีการพัฒนาช้า โพรบยังคงต้องมีการ cross-hybrid ทำให้สามารถจัดจำแนก ประชากรที่มีกลุ่มกว้างได้ ส่วนใหญ่ปัจจัยจำกัดทั่วไปใน Southern Hybridization เป็นประโยชน์ในการหาดีเอ็นเอโพรบ

2.10.1 ประเภทของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

แบ่งเป็น 3 แบบตามลักษณะการทำงาน องค์ประกอบของหน่วยย่อยของเอนไซม์ องค์ประกอบร่วม (cofactor) และวิธีการตัดดีเอ็นเอ คือ

2.10.1.1 แบบที่ 1 เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเพพไทด์ 3 ชนิด สามารถตัดดีเอ็นเอ(nuclease)และเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมธิล (methylase) เข้าไปที่เบสบางเบสได้ในขณะเดียวกันเอนไซม์กลุ่มนี้จะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำ (recognition site) ที่จำเพาะ แต่จะตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่ไม่เจาะจงห่างออกไป 400-700 คู่เบส การตัดดีเอ็นเอต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน (Mg^{+})ATP และ S-adenosylmethionine (SAM) ขณะที่เกิดการตัดสายดีเอ็นเอ แต่ยังคงมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สลาย ATP (ATPase) ต่อไปได้อีก นอกจากนี้เอนไซม์ในแบบที่ 1 นี้จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำด้วย เช่น เอนไซม์ที่พบใน *E.coli* K12 จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งที่ 6 ของเบส A ที่บริเวณจดจำ ดังนี้

5'-AACNNNNNNGTGC-3'

3'-TTGNNNNNNCACG-5'

N คือเบสใดๆแต่เป็นคู่กันในสองสาย A คือตำแหน่งที่มีการเติมหมู่เมธิล เอนไซม์นี้จะตัดดีเอ็นเอเมื่อไม่มีหมู่เมธิลที่Aทั้งสองสายของบริเวณจดจำเท่านั้น ถ้ามีหมู่เมธิลแม้เพียงสายเดียว เอนไซม์ก็จะไม่ตัดดีเอ็นเอนั้น แต่จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ A ของอีกสายหนึ่งที่ว่างอยู่

ในแบคทีเรียพวกที่อยู่ในทางเดินอาหาร เช่น *E.coli* โพลีเพพไทด์ทั้ง 3 ชนิดของเอนไซม์นี้ เกิดจากยีนที่อยู่ใกล้กันบนโครโมโซม คือ hsd R, hsd M และ hsd S การสร้าง mRNA นั้น hsd M และ hsd S จะสร้างร่วมกัน (dicistronic mRNA) และให้โพลีเพพไทด์ 2 ชนิดที่มีหน้าที่เติมหมู่เมธิลให้แก่เบส ส่วน hsd R ให้โพลีเพพไทด์ที่มีหน้าที่ตัดดีเอ็นเอ

2.10.1.2 แบบที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่ใช้มากในการตัดต่อยีน เนื่องจากโมเลกุลไม่ซับซ้อนประกอบด้วยโพลีเพพไทด์เพียงชนิดเดียว การตัดดีเอ็นเอจะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำหรือที่จุดใกล้กับบริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน และในปฏิกิริยาต้องการเฉพาะแมกนีเซียมไอออนเท่านั้น มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะอย่างเดียว การเติมหมู่เมธิลให้กับเบสอาศัยเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง

2.10.1.3 แบบที่ 3 ประกอบด้วยโพลีเพพไทด์ 2 ชนิด มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะและเติมหมู่เมธิลในขณะเดียวกัน การตัดดีเอ็นเอจะเกิดห่างจากบริเวณจดจำประมาณ 25 - 27 คู่เบส ในปฏิกิริยาต้องมีแมกนีเซียมไอออนและ ATP โดยไม่จำเป็นต้องมี S-adenosylmethionine แต่ถ้ามี S-adenosylmethionine จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และเอนไซม์จะสามารถเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะได้ พบว่ายีนที่กำหนดการสร้างโพลีเพพไทด์ทั้ง 2 ชนิดของเอนไซม์นี้มีตำแหน่งอยู่ใกล้ๆกัน ในส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมของ *E.coli* บางสายพันธุ์ การสร้าง mRNA แยกกันเป็น 2 หน่วย ยีนหนึ่งทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอและอีกยีนหนึ่งทำหน้าที่เติมหมู่เมธิล

เอนไซม์แบบที่ 1 และแบบที่ 3 จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดไม่แน่นอนและปฏิกิริยามีการแข่งขันกันว่าจะเกิดการตัดดีเอ็นเอหรือเติมหมู่เมธิล จึงไม่นิยมใช้ในการโคลนยีน

ในปัจจุบันเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2 สามารถแยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ซึ่งพบแล้วว่า 400 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก วิเคราะห์ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาและวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม อีกทั้งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็วและประหยัด นอกจากนี้ยังมีข้อดีที่สำคัญคือ สามารถใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันมากได้โดยที่เทคนิคอื่นๆ เช่นการหมุนเหวี่ยงในเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (density gradient centrifugation) ไม่สามารถแยกได้ การตรวจหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอหลังอิเล็กโทรโฟรีซิสทำได้ค่อนข้างง่ายและมีความไวสูง ซึ่งทำโดยการย้อมอะการโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้นต่ำๆ จากนั้นตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอ (ethidium bromide-DNAcomplex) โดยดูการวาวแสง (fluorescence) เมื่อส่องอะกาโรสเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเลต โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจแถบดีเอ็นเอที่มีประมาณต่ำมากขนาด 1 นาโนกรัมได้

2.11.1 หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก ซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้นๆ ในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้น การแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะทำในตัวกลาง (medium) โดยการใส่สารที่ต้องการแยกลงในตัวกลาง แล้วจึงปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านตัวกลางนั้น ดังนั้นจึงมีอิเล็กโทรโฟรีซิสหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวกลางเช่นโพลีอะคริลาไมล์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ตัวกลางเป็นโพลีอะคริลาไมล์เจล สตาร์ชเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อใช้ตัวกลางเป็นสตาร์ชเจล เป็นต้น ส่วนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสก็คืออิเล็กโทรโฟรีซิสที่ทำในตัวกลางที่เป็นอะกาโรสเจลนั่นเอง

ในการแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะทำในบัฟเฟอร์ซึ่งมีพีเอชประมาณ 8 ซึ่งที่พีเอชนี้ดีเอ็นเอจะมีประจุลบ เนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.11.1.1 ขนาดและโครงรูป (conformation) ของดีเอ็นเอ

เมื่อพิจารณาจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอ จะเห็นได้ชัดเจนว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ถึงแม้จะมีจำนวนประจุลบสูงเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก(จำนวนหมู่ฟอสเฟตมากกว่า) แต่อัตราส่วนของประจุลบต่อมวลของดีเอ็นเอไม่ว่าโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ดังนั้นอัตรเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจึงเป็นผลจากขนาดของดีเอ็นเอโดยตรง ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเอนั้นอยู่ในโครงรูปแบบเดียวกัน ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่โครงรูปต่างกัน จะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนได้แก่ การเคลื่อนที่ของพลาสมิดในขณะที่มีโครงรูปต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กัน เมื่อพลาสมิดชนิดหนึ่งๆอยู่ในรูปที่เรียกว่าซูเปอร์คอยล์ (supercoiled form) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ในรูปปลายเปิด (linear form) และ รูปรีแลกซ์ (relaxed form) ตามลำดับ

2.11.1.2 ความเข้มข้นของอกาโรสเจล(Agarose gel concentration)

ขณะอิเล็กโทรโฟรีซิสดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุน (pore) ภายในเจล ถ้ารูพรุนมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอก็จะสูง ขนาดของรูพรุน (pore size) ภายในเจลจะเปลี่ยแปลงไปตามความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้เตรียมเจล กล่าวคือเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นสูงๆ ขนาดรูพรุนก็จะเล็กกว่าเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นต่ำ ๆ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลระหว่างอิเล็กโทรโฟรีซิสจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจลนั้นดังสมการ

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r C$$

เมื่อ μ = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

μ_0 = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสภาวะที่ไม่มีอะกาโรสเจล

C = ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

K_r = สัมประสิทธิ์ความหน่วง (retardation coefficient)

โดยปกติค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วง (K_r) เป็นค่าคงที่ขึ้นกับขนาดและโครงรูปของดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลนั้น ถ้ากำหนดให้ดีเอ็นเอปลายเปิดมีรูปร่างเป็นแท่งกลมยาว ค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วงจะขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอนั้น ดังนั้นที่ความเข้มข้นหนึ่งๆ ของอะกาโรสเจล ค่า log ของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอจะมีความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันกลับกับการเคลื่อนที่ ดังนั้นในการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆ จะต้องเลือกความเข้มข้นของอะกาโรสให้เหมาะสม

2.11.1.3 ความต่างศักย์ไฟฟ้า

โดยปกติอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5 - 5โวลต์ / เซนติเมตร แต่ค่าความต่างศักย์ที่นิยมใช้มักจะมีค่าต่ำๆ (ประมาณ 1 โวลต์ / เซนติเมตร) ทั้งนี้เพราะที่ความต่างศักย์ต่ำๆ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดจะเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้นการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่ๆ จะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก เป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆ ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะที่ใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (0.5 โวลต์ / เซนติเมตร)

เมื่อใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (1 โวลต์/เซนติเมตร) เวลาสำหรับการแยกจะค่อนข้างยาว (มากกว่า 10 ชั่วโมง) ฉะนั้นจะเกิดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้มากทำให้แถบดีเอ็นเอที่แยกได้ไม่คม หรือในกรณีที่ขนาดโมเลกุลไม่ต่างกันมากจะไม่สามารถแยกจากกันได้เลย ดังนั้นสำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (ต่ำกว่า 2 กิโลเบส) จึงมักจะทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ความต่างศักย์สูงๆ เพื่อลดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอลง

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะทำในแนวราบโดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ใต้บัฟเฟอร์ประมาณไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ด้วยเหตุที่ความต้านทานไฟฟ้าในอะกาโรสเจลและในบัฟเฟอร์ใกล้เคียงกันมาก ฉะนั้นกระแสไฟฟ้าส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการอิเล็กโทรโฟรีซิสจะเคลื่อนผ่านแผ่นอะกาโรสเจล อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้เพราะอัตราเร็วสัมพัทธ์ของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดขนาดต่างๆ จะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 4-30 องศาเซลเซียส แต่กรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำกว่า 0.5% มักจะทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสต่ำเจลจะอยู่ในสภาพค่อนข้างนิ่ม ในที่เย็นจะช่วยให้เจลอยู่คงรูปมากขึ้น

2.12 การจัดจำแนก (Classification)

มนุษย์นิยมจัดจำแนกสิ่งรอบตัวเพื่อความสะดวกและความเข้าใจที่ตรงกันในการเรียกสิ่งนั้นๆ ในทางชีววิทยาจะนำพื้นฐานการมีลักษณะรูปร่างที่เหมือนกันของสิ่งมีชีวิตต่างๆ มาใช้ในการจัดจำแนก โดยสามารถทำได้ตั้งแต่ระดับที่เป็นกลุ่มใหญ่ เช่น ไฟลัม (phylum) และเล็กลงมาจนถึงระดับสปีชีส์ (species) เรียกการจัดจำแนกทางชีววิทยาว่าอนุกรมวิธาน ซึ่งประกอบด้วยการจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิต การตั้งชื่อสิ่งมีชีวิตและการตรวจหาสิ่งมีชีวิต ระบบอนุกรมวิธานนี้พัฒนาโดย Carolus Linnaeus ในศตวรรษที่18และถูกใช้อย่างต่อเนื่องมาโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษารวบรวมและจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต

2.12.1 การจัดจำแนก

จะมีวิธีวิเคราะห์ข้อมูลเป็น 2 แนวคิด คือ

2.12.1.1 Robert Sokal และ Peter Sneath ในปี ค.ศ. 1963 ซึ่งในช่วงนั้นนิยมเรียกว่าอนุกรมวิธานเชิงจำนวน (numerical taxonomy) หลักการคือจะวัดความคล้ายคลึงกันของลักษณะภายนอกโดยรวมทั้งหมด (overall similarity) ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา โดยจะเปลี่ยนค่าความแตกต่างทางลักษณะให้กลายเป็นค่าระยะห่าง (distance) ระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด หลังจากนั้นก็จะใช้วิธีทางสถิติแบบต่างๆ เช่น UPGMA มาสร้างเป็นเดนโดรแกรมจากตารางแมทริกซ์ของค่าระยะห่าง (distance matrix) นั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.1.2 คลาดิสติกซ์ (cladistics) นำเสนอในปี คศ.1950 โดยนักกีฏวิทยาชาวเยอรมัน Willi Hennig มีหลักการว่าความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในเชิงวิวัฒนาการจะมีพื้นฐานคล้ายคลึงกันแบบเฉพาะ (special similarity) โดยมีข้อกำหนด 3 ข้อ คือ

- สมาชิกของกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่จะศึกษาจะเกี่ยวพันกันโดยมีวิวัฒนาการสืบทอดมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน
- กิ่งของแผนภูมิจะอยู่ในรูปส้อมสองกิ่ง (bifurcating pattern)
- กลุ่มที่จะเกิดขึ้นได้ก็ด้วยการมีลักษณะจำเพาะที่เป็นเอกลักษณ์ร่วมกัน (shared derived characters)

ในการศึกษาลักษณะต่างๆของสิ่งมีชีวิตนั้น สามารถจะเลือกใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characters) หรือลักษณะระดับโมเลกุล (molecular characters) สำหรับลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นมีข้อดี คือง่ายต่อการศึกษา ค่าใช้จ่ายไม่สูง มีสภาวะลักษณะ (character states) หลายสภาวะที่เหมาะสมต่อการลดปัญหาวิวัฒนาการแบบเข้าหากัน และช่วยให้เราเข้าใจได้ว่าวิวัฒนาการของรูปร่างลักษณะนั้นๆเกิดขึ้นได้อย่างไร สำหรับข้อเสียของการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นได้แก่ ความลำบากในการที่จะแยกโฮโมโลจีออกจากอะนาโลจี สิ่งมีชีวิตบางชนิดที่วิวัฒนาการแยกจากกันมานานอาจจะเหลือลักษณะที่ร่วมกันอยู่น้อยมาก การแสดงของลักษณะต่าง ๆอาจจะได้รับผลกระทบมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกก็ได้

สำหรับการศึกษาลักษณะระดับโมเลกุลนั้นสามารถจะศึกษาได้ทั้งโปรตีน(protein) และกรดนิวคลีอิกของสิ่งมีชีวิต ข้อได้เปรียบของลักษณะทางโมเลกุล ได้แก่ การที่หลักฐานระดับโมเลกุลทำให้สามารถวัดลักษณะทางพันธุกรรมในรูปแบบจีโนไทป์ (genotype)ได้ใกล้เคียงขึ้น ไม่มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ดีเอ็นเอมีอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตและลำดับดีเอ็นเอคู่สม (homologous sequenes) ก็มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆดีเอ็นเอมีเบสเพียง 4 แบบแตกต่างกันโดยเป็นลักษณะที่เป็นค่าเดี่ยวอย่างแท้จริง และบริเวณต่างๆในจีโนมของสิ่งมีชีวิตมีอัตราวิวัฒนาการที่ระดับแตกต่างกันได้ สำหรับข้อเสียเพียงอย่างเดียวของลักษณะระดับโมเลกุลก็คือ ค่าใช้จ่ายสูงถึงแม้ว่าจะมีแนวโน้มที่จะลดลงต่อไปก็ตาม

ในช่วงเวลาที่ผ่านมา วิธีการทดลองศึกษาลักษณะของสิ่งมีชีวิตทางโมเลกุลได้ถูกพัฒนาขึ้นมาอย่างมาก มีทั้งที่เป็นการเปรียบเทียบโปรตีนของสิ่งมีชีวิต เช่น การศึกษา immunological distance เพื่อวัดอัตราส่วนในการจับตัวตกตะกอนระหว่างแอนติบอดีของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งกับแอนติเจนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เทคนิค DNA restriction mapping เช่น RFLP ซึ่งอยู่บนพื้นฐานของการทำงานของเอนไซม์ที่จะตัดสายดีเอ็นเอที่ลำดับจำเพาะ ซึ่งอาจจะอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ และการอ่านลำดับเบสของสายดีเอ็นเอจากยีนที่สนใจจะศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.1 การสร้างเดนโดรแกรม

โดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ

2.12.2.1 Parsimony analysis การวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับขนาดของกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งอาจจะต้องใช้เวลาในการคำนวนมากเช่น การหาค่า bootstrap จะต้องทำซ้ำจำนวนหลายครั้งเพื่อความถูกต้องทางสถิติ อาจต้องทำซ้ำมากกว่า 2000 ครั้ง จึงจะจัดอยู่ในระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95(Hedges. 1992)

2.12.2.2 Cluster analysis การวิเคราะห์ใช้หลักการ การ คำนวนค่าแมททริกซ์ของความคล้ายคลึงกันของตัวอย่างทีละคู่ จากนั้นจะจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ซึ่งใช้เวลาการคำนวนไม่มากนัก

หลักพื้นฐานในการสร้างแผนภูมิต้นไม้ มีหลักการคร่าว ๆ ดังต่อไปนี้

1. รวบรวมข้อมูลที่เป็นลักษณะร่วมกันของสิ่งมีชีวิตที่เราสนใจจะศึกษา
2. กำหนดสภาวะลักษณะดั้งเดิมให้เป็นเลขศูนย์
3. กำหนดสภาวะที่พัฒนาแล้วเป็นเลขอื่น ๆ
4. สร้างตารางแมททริกซ์ระหว่างลักษณะกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา

ค่าที่ใช้ในการตรวจสอบเดนโดรแกรม

1. Cophenetic correlation เป็นค่าที่บอกถึงการจัดกลุ่มได้ดีเพียงใดโดยดูได้จากค่า goodness of fit โดยคำนวนหาค่า cophenetic correlation (r) โดย

r มีค่ามากกว่า 0.9 ถือว่าการจัดกลุ่มได้ดีมาก

r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.8 – 0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดี

r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.7 – 0.8 ถือว่าจัดกลุ่มได้ปานกลาง

r มีค่าน้อยกว่า 0.7 ถือว่า การจัดกลุ่มได้ไม่ดี

2. Bootstrap เป็นค่าความน่าเชื่อถือของกลุ่มที่จัดนั้นมีมากน้อยเท่าไหร่ โดยบอกเป็นเปอร์เซ็นต์ของโอกาสที่จะมีการจัดกลุ่มเหมือนเดิมเท่าไหร่เมื่อมีการสุ่มเอาตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการคำนวนการจัดกลุ่มออกตามจำนวนครั้งที่ต้องการ กลุ่มตัวอย่างที่มีค่า bootstrap มากแสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่จัดได้มีความน่าเชื่อถือ โอกาสที่การจัดกลุ่มจะเปลี่ยนไปน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีค่า bootstrap น้อย ตัวอย่างที่แยกออกเป็นกลุ่มเดี่ยวจะไม่สามารถคำนวนค่า bootstrap ได้

นอกจากนี้แล้วยังมีค่าทางสถิติหลายๆ แบบเพื่อใช้สนับสนุนลักษณะและแผนภูมิเพื่อบอกความลงตัวของข้อมูลที่มีต่อแผนภูมิต้นไม้ที่สร้างขึ้น ค่าทางสถิติเหล่านี้ได้แก่ CI (consistency index), RI (rotention index), decay index, bootstrap และ jackknife

การเลือกใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์ จะต้องพิจารณาถึงระบบปฏิบัติการของเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ใช้อยู่ ความเร็วของโปรแกรม ความง่ายในการใช้ และ ราคา เช่น Phylip เป็นชุดโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวนทำงานบนเครื่อง PC ซึ่งสามารถหามาใช้ได้โดยไม่ต้องซื้อ แต่ใช้งานได้ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง่ายนัก ขณะที่ PAUP เป็นโปรแกรมที่ใช้งานได้ง่ายเพราะทำงานได้ดีบนระบบปฏิบัติการของเครื่องแม็คอินทอช แต่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการซื้อโปรแกรม

Felsenstein's PHYLIP (Phylogeny Inference Package) เป็นโปรแกรมที่สามารถหาค่า bootstrap ได้ และสร้างแผนภูมิโดยวิธี parsimony ถึงแม้ว่า PHYLIP จะสามารถ คำนวนโดยวิธี UPGMA ได้แต่ก็ไม่สามารถหาค่า bootstrap ได้ จึงมีการพัฒนาโปรแกรม WinBoot ขึ้นมาเพื่อที่จะใช้ในการคำนวนด้วยวิธี UPGMA และได้ค่า bootstrap

การนำไปใช้ประโยชน์ในทางชีววิทยา สามารถนำความรู้ที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทาง เช่น สามารถใช้ในการบอกลำดับของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตนั้นไปตามแนวกิ่งของแผนภูมิต้นไม้ ศึกษาเปรียบเทียบดูรูปแบบการเกิดวิวัฒนาการร่วมของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น นำสิ่งมีชีวิตในนิเวศน์วิทยาเดียวกันมาศึกษาเปรียบเทียบเพื่อประโยชน์ในเชิงอนุรักษ์ นอกจากนี้ยังอาจศึกษาการเคลื่อนที่ของทวีปต่างๆ ในอดีต และศึกษาการเคลื่อนที่ของสิ่งมีชีวิตเองซึ่งเป็นปัจจัยหลักในการกระจายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในโลก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
การทดลอง

จุลินทรีย์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์

3.1.1 เห็ดตีนแรด (*Tricholoma crassum*)

ตัวอย่างเห็ดตีนแรดที่ใช้ในการทดลอง Isozyme electrophoresis เป็นตัวอย่างที่เก็บมาจากพื้นที่ต่างๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 จังหวัด ตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้แต่ละจังหวัดจะนำไปแยกให้ได้เส้นใยโมโนคารีออน เห็ดตีนแรดที่ใช้ในการศึกษาคือ

1. เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ (S) ตำบลวังหิน (SV) 3.1.1.1ตำบลโพนข่า (SP)
2. เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม (M)
3. เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา (N)
4. เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี (U)
5. เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร (K)

3.1.2 เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จากภาควิชาชี วิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้เลี้ยงร่วมกับสปอร์ของเห็ดตีนแรดในขั้นตอนการแยกเส้นใยโมโนคารีออน

3.1.3 ตัวอย่างเห็ดตีนแรดที่ใช้ในการทดลอง PCR-RFLP เป็นตัวอย่างที่เก็บเพิ่มเติมมาจากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนืออีก 2 จังหวัดจากหัวข้อ 3.1.1 และภาคกลาง 2 จังหวัด รวมทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ดังนี้

6. เห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์
7. เห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด
8. เห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี
9. เห็ดตีนแรดจังหวัดกรุงเทพฯจากฟาร์มเห็ดอรัญญิก

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง Isozyme electrophoresis

Acetic acid	Merck
Acetone	Merck
Ammonium persulphate	Pharmacia Biotech

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bis-acrylamide	Bio-Rad
Boric acid	Merck
Bromophenol blue	Fluka
Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4)	Merck
Ethanol	Merck
EDTA	Merck
Fast black K salt	Sigma
Fast blue RR salt	Sigma
Fast blue BB	Sigma
D-glucose-6-phosphase	Sigma
กลีเซอรอล (Grycerol)	J. T. Baker
ไกลซีน (Glycine)	Promega
2-บิวทานอล	J. T. Baker
Hydrochloric acid (HCl)	J. T. Baker
D,L-lactic acid	Fluka
L-leucyl-β-napthylamide	Sigma
Malic acid	Sigma
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)	Fluka
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$)	J. T. Baker
β- Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	Sigma
(β- Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) NADP	Sigma
α-Naphthyl acid phosphate	Sigma
α-Naphthyl acetate	Sigma
Nitro blue tetrazolium (NBT)	Sigma
O-Tolidine	Sigma
Phenazine methosulphate (PMS)	Sigma
6-phosphogluconic acid	Sigma
Polyacrylamide	Amersham
Potato drextros agar	Scharlau
Potato drextros broth	Scharlau

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

D,L- isocitric acid	Sigma
Sodum acetate trihydrate	Merck
Yeast extract	Difco
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Merck
โซเดียมไดไฮโดรเจนไดไฮเดรท ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	Merck
ซูโครส	Merck
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylenediamine)	Sigma
MTT (Tetrazolium salt)	Sigma
Tris base	Sigma
น้ำกลั่นสองครั้ง	
ไนโตรเจนเหลว	

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง PCR-RFLP

3.2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1. TE buffer

Tris-HCl	pH8.0	10	มิลลิโมลาร์
EDTA	pH8.0	1	มิลลิโมลาร์

2. Extraction buffer

Tris-HCl	pH8.5	200	มิลลิโมลาร์
NaCl		250	มิลลิโมลาร์
EDTA		25	มิลลิโมลาร์

SDS 0.5 %

3. 3M sodium acetate pH 5.2
4. isopropanol
5. liquid nitrogen
6. ethanol 70 %

3.2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR - RFLP

สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน PCR

1. PCR reaction mixture ประกอบด้วย

Taq polymerase	0.2	ไมโครลิตร
$MgCl_2$	3	ไมโครลิตร
dNTPs อย่างละ	0.25	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

primer 1	2.5	ไมโครลิตร
primer 2	2.5	ไมโครลิตร
2. ดีเอ็นเอ (template)	1	ไมโครลิตร
3. 10xBuffer	5	ไมโครลิตร
4. H_2O	36.5	ไมโครลิตร

2. สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน RFLP

1. PCR product	5	ไมโครลิตร
2. Buffer	2	ไมโครลิตร
3. เอนไซม์ตัดจำเพาะ	0.4	ไมโครลิตร

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งตัดจำเพาะ
*Hinf*I	G/ANT
*Hind*III	A/AGCT
*Hae*III	GG/CC
*Eco*RI	G/AATT
*Dde*I	C/TNA

4. BSA	1	ไมโครลิตร
5. H_2O	11.6	ไมโครลิตร

3.2.2.3 สารเคมีที่ใช้ใน electrophoresis

1. TBE (Tris-borate)

Trisborate	89	มิลลิโมลาร์
Boric acid	89	มิลลิโมลาร์
EDTA pH8.0	2	มิลลิโมลาร์

2. Bromophenol blue
3. Ethidium bromide 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
4. Agarose (agar) powder
5. Marker 100 bp ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เครื่องมือ

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius รุ่น BP2215
เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	Hermle รุ่น 383k
เครื่องเขย่า	Unitron
เครื่องปรับความเป็นกรดด่าง (pH meter)	Denver Instrument รุ่น 215
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Shimadzu รุ่น UV-1601
เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง	Apparatus corporation รุ่น EC570-90
ไมโครเวฟ	Hitachi รุ่น MR-8215
ตู้บ่มเชื้อ	SL (Shellab) รุ่น 2020
ตู้เขี่ยเชื้อ	ISSCO lamina flow รุ่น H5123
เดซิคเคเตอร์ (Dessicator)	
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	
อุปกรณ์ในการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)	PCR-200 Peltier Thermal Cycler
Microfuge tube	รุ่น Tomy SS 325
ชุดเครื่องรันอิเล็กโตรโฟริซิส	Mini Protein® cell Bio-Rad laboratories
เครื่องฉายแสงยูวี	
กล้องจุลทรรศน์	บริษัท Nicon รุ่น YS2-H
Vortex	Scientific Industries รุ่น G560E
ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)	
ไมโครปิเปต	NICHIRYO
Microtip	
Appendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	
ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร	
จานเลี้ยงเชื้อ	
cork borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร	
ขวดรูปกรวย (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร	
โกร่งบด	
หลอดทนร้อน (ใช้แทน cork borer)	
กรวยกรอง กระดาษกรอง (Whatman No. 1)	
ผ้าขาวบาง ถุงมือ และ เครื่องแก้วต่างๆ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

3.4 ส่วนที่ 1 : การทดลอง Isozyme electrophoresis

3.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดตีนแรดจากพื้นที่ต่างๆ

ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดจากจังหวัดต่างๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามลักษณะต่างๆ ดังนี้

3.4.1.1 สีของดอกเห็ด

3.4.1.2 ขนาดของดอกเห็ด

3.4.1.3 สีของ spore print

3.4.1.4 ขนาดและสีของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.1.5 ขนาดของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.2 การเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคารีออนจากสปอร์เห็ด

3.4.2.1 นำตัวอย่างเห็ดมาตัดหมวกดอกและตัดเป็นชิ้น ใช้ สก๊อตเทปยึดติดผิวบนของดอกเห็ดกับฝาจานแก้ว จากนั้นนำไปครอบบนบีกเกอร์ที่มีกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งทิ้งไว้ในที่ลมสงบ เพื่อให้สปอร์ตกลงบนกระดาษกรองประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำดอกเห็ดออกแล้วปิดบีกเกอร์ด้วยฟอยล์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.4.2.2 นำกระดาษกรองที่ มีสปอร์มาผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นของสารละลายสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยทำการนับสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.4.2.3 ดูดสารละลาย สปอร์ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA ประมาณ 50 - 100 ไมโครลิตร ทำการ spread plate จนแห้ง จากนั้น streak เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ลงบนอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.4.2.4 ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยที่เจริญจากแต่ละ basidiospore พร้อมทั้งชิ้นวุ้นอาหารภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แยกไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง PDA ในหลอดทดลอง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบการเกิด clamp ของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ละหลอดทดลองที่แยกได้ คือเส้นใยที่แยกได้จากสปอร์เดี่ยว เรียกเส้นใยชนิดนี้ว่าโมโนคารีออน

3.4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออน ในอาหารเหลวเพื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์

การเลี้ยงเส้นใยโมโนคารีออนในอาหารเหลวเพื่อนำไปใช้ในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์นั้น จำเป็นอย่างยิ่งต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด เพื่อต้องการที่จะลดเวลาในการเลี้ยงเส้นใยให้ได้ปริมาณที่มากพอในการทดลองขั้นตอนการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ 11 ชนิด ซึ่งหากเลี้ยงเชื้อเพียงครั้งเดียวและได้เส้นใยในปริมาณที่เพียงพอต่อการศึกษาเอนไซม์ทั้ง 11 ชนิด ก็จะทำให้ลด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวแปรบกวนคือ สภาวะในการเพาะเลี้ยงเส้นใยลงได้ เนื่องจากจากการศึกษาของ Zervakis and Labarere (1992)พบว่าสภาวะในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อรูปแบบของไอโซ ไซม์ที่เกิดขึ้น อีกทั้งยังประหยัดแรงงานและค่าใช้จ่าย จากการศึกษาที่ผ่านมาได้เลี้ยงเส้นใยโมโนคารีออนในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (สุภาภรณ์ จาริยุวัฒน์. 2541) พบว่าเส้นใยเจริญช้าและจมในอาหาร อีกทั้งเส้นใยโมโนคารีออนที่ทำการคัดแยกได้จาก 5 จังหวัดสำหรับการศึกษาครั้งนี้มีการเจริญของเส้นใยที่แตกต่างกันและยังไม่มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมมาก่อนดังนั้นการทดลองนี้จึงเป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัดขั้นตอนการศึกษามีดังนี้

3.4.3.1 การศึกษาระยะเวลาที่มีการเจริญสูงสุดของเส้นใยโมโนคารีออนของแต่ละจังหวัด

ทำการศึกษาหาระยะเวลาที่มีการเจริญของเส้นใยมากที่สุด โดยใช้สภาวะเดิมของคุณสุภาภรณ์ จาริยุวัฒน์ (2541) คือเลี้ยงเส้นใยในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การทดลองมีดังนี้

3.4.3.1.1 นำเส้นใยโมโนคารีออนที่แยกได้จากสปอร์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดต่างๆมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.4.3.1.2 ใช้หลอดทนร้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะที่บริเวณขอบรอบนอกของเส้นใยของแต่ละจังหวัดแล้วถ่ายเส้นใยพร้อมชิ้นวุ้นลงในฟลาสท์ที่มีอาหารเหลว PDB อยู่ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่สภาวะปกติ เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

3.4.3.1.3 เก็บตัวอย่างโดยกรองเส้นใยผ่านผ้าขาวบางสองชั้นและล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้งนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หาน้ำหนักแห้งและนำมาเปรียบเทียบเพื่อหาวันที่มีการเจริญสูงสุดของเส้นใย ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ

3.4.3.2 การศึกษาชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัด

โดยอาหารที่เลือกใช้ในการทดสอบคืออาหาร PDB เป็นอาหารที่คุณสุภาภรณ์ จาริยุวัฒน์ (2541) ใช้ในการเลี้ยงเส้นใยเห็ดตีนแรดชนิดโมโนคารีออนของจังหวัดขอนแก่นมาก่อน ส่วนอาหารชนิดอื่นๆ เป็นอาหารที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในสกุล Basidiomycetes ซึ่งได้แก่ อาหาร CYM (Roux and Labarere., 1991 ; Zervakis and Lavarere. 1992 ; Zervakis *et. al.*, 1994) อาหาร MYG (Teruyuki *et. al.*, 1995) และ PDYB (เป็นอาหาร PDB ที่เติมด้วย yeast extract 5 กรัมต่อลิตร) (Rajiv *et. al.*, 1986 ; May and Royse., 1982) (ภาคผนวก) การทดลองมีดังนี้

3.4.3.2.1 นำเส้นใยโมโนคารีออนที่แยกได้จากสปอร์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดต่างๆมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.4.3.2.2 ใช้หลอดทนร้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะที่บริเวณขอบรอบนอกของเส้นใยของแต่ละจังหวัดแล้วถ่ายเส้นใยพร้อมชิ้นวุ้นลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว PDB, CYM, MYG และ PDYB อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะปกติ เป็นเวลา 21 วัน ในแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ

3.4.3.2.3 เก็บตัวอย่างเชื้อโดยกรองผ่านผ้าขาวบางสองชั้นและล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หาน้ำหนักแห้งและนำมาเปรียบเทียบเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด

3.4.3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัด

อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้อุณหภูมิในช่วง 20-35 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาสภาวะการเจริญของเส้นใยเห็ดตีนแรดในอาหารแข็งของ วสันต์ เพรชรัตน์ ในปี 2522 นั้นพบว่า เส้นใยเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเจริญน้อยได้มาก ดังนั้นการทดลองครั้งนี้เป็นการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดตีนแรด แต่เป็นเส้นใยชนิดโมโนคารีออนที่เจริญในอาหารเหลว อุณหภูมิที่ใช้ทดลองจึงเลือกใช้ในช่วง 20-35 องศาเซลเซียส การทดลองมีดังต่อไปนี้

3.4.3.3.1 นำเส้นใยโมโนคารีออนที่แยกได้จากสปอร์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดต่างๆมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.4.3.3.2 ใช้หลอดทนร้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะที่บริเวณขอบรอบนอกของเส้นใยของแต่ละจังหวัดแล้วถ่ายเส้นใยพร้อมชิ้นวุ้นลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว PDYB อยู่ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ที่สภาวะปกติ เป็นเวลา 21 วัน

3.4.3.3.3 เก็บตัวอย่างโดยกรองเส้นใยผ่านผ้าขาวบางสองชั้นและล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง นำเส้นใยที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หาน้ำหนักแห้งและนำมาเปรียบเทียบเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดตีนแรด

3.4.4.1 การเตรียมเส้นใยและสกัดเอนไซม์ (ขนิษฐา พรเจริญโรจน์. 2543)

3.4.4.1.1 เลี้ยงเส้นใยเห็ดโมโนคารี ออนบนอาหาร PDA ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.4.4.1.2 ใช้หลอดทนร้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะลงบนเส้นใย บริเวณขอบของโค โลนี ใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายชิ้นวุ้นลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร PDYB อยู่ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

นำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDYB มากรองด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ชั้น จากนั้นล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ซับเส้นใยให้แห้งด้วยกระดาษกรอง หลังจากนั้นนำมาบดในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม extraction buffer ในอัตราส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักเส้นใย 3 กรัม (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539) รักษาอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียสโดยการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง

3.4.4.1.3 นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.4.1.4 เก็บส่วนใสที่ได้ไว้ทำการทดลองต่อไป หากยังไม่ทำอิเล็กโทร-โฟรีซิส ควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 หรือ –80 องศาเซลเซียสโดยเติมกลีเซอรีนเข้มข้น 1 ส่วนต่อตัวอย่าง 9 ส่วน (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539)

3.4.4.2 การเตรียมตัวอย่าง

นำส่วนใสที่ได้มาตรวจหาปริมาณโปรตีนตามวิธีวิเคราะห์ของ Bradford (1976) (ภาคผนวก) เพื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่จะใช้ ปริมาณโปรตีนที่ใช้คือ 30 ไมโครกรัมต่อการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 ตัวอย่าง (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539) หากยังไม่ใช้ควรเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นอุณภูมิ–20องศาเซลเซียสและเมื่อจะใช้จึงนำมาทำให้ละลายและผสมสารตัวอย่างกับสารละลาย sample buffer ก่อนใส่ลงในช่องตัวอย่างบนเจล (วัฒนาลัยปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536)

3.4.4.3 การเตรียม polyacrylamide gel แบบ vertical slab gel (ขนิษฐา พรเจริญโรจน์. 2543)

3.4.4.3.1 ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับทำแผ่นเจล

3.4.4.3.2 ประกอบชุดแผ่นแก้วเข้ากับอุปกรณ์ ของเครื่องรันอิเล็กโทรโฟริซิสรุ่น Mini Protein® cell Bio-Rad laboratorie (ภาพที่ 3.1) โดยมี spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจลในช่วง 0.75-1.0 มิลลิเมตร จากนั้นคำนวณปริมาตรของเจลที่จะใช้โดยใส่ stacking gel ให้มีความสูงประมาณ 1.0-2.0 เซ็นติเมตรหรือ เหนือ seperating gel

3.4.4.3.3 วิธีการเตรียมสารละลาย seperating gel คือ เติมสารละลาย acrylamide-bis 2.5 มิลลิลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง 4.85 มิลลิลิตร และ seperating gel buffer 2.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.4.4.3.4 เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่เตรียมใหม่) 70 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆให้สารละลายทั้งหมดผสมกันโดยไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น

3.4.4.3.5 เทสารละลายเจล ลงบนช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ ให้เหลือระยะห่างจากขอบบน 2-3 เซนติเมตร จากนั้นเติมสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลคลุมผิวหน้าเจล ทิ้งให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นเป็นรอยต่อระหว่างเจลกับสารละลายที่คลุมผิวหน้า เทสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.3.6 เตรียมสารละลายของ stacking gel โดยเติมสาร acrylamide-bis 1.3 มิลลิลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง 6.1 มิลลิลิตร และ stacking gel buffer 2.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.4.4.3.7 เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่เตรียมใหม่) 100 ไมโครลิตร และ TEMED 12.5 ไมโครลิตร วนขวดให้สารละลายทั้งหมดผสมกันโดยไม่มีฟองอากาศ เทสารละลายของ stacking gel บน seperating gel ใส่หวี (template comb) ลงใน stacking gel ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที

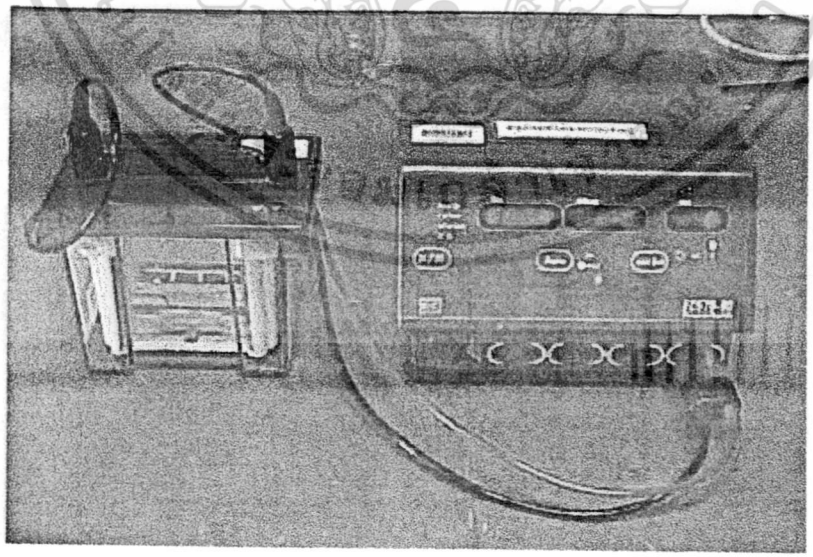
3.4.4.3.8 ประกอบชุดรัน เจล แล้วเติม electode buffer (Tris-glycine pH 8.3)ลงไปในช่องใส่บัฟเฟอร์ เพื่อเป็นการรักษาสภาพให้เย็นควรแช่ electrode buffer ให้มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนเท และควบคุมอุณหภูมิในการรันเจลให้มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดการรันเจล

3.4.4.4 การใส่สารตัวอย่าง

หยอดตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.2 ลงบนเจลแต่ละช่อง ช่องละหนึ่งตัวอย่าง จำนวน 20.0-30.0 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย

3.4.4.5 การผ่านกระแสไฟฟ้า

ผ่านกระแสไฟฟ้า โดยควบคุมค่าความต่างศักย์ที่ 200 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ลงมาจนระดับสีของ sample buffer ที่ผสมในสารละลายตัวอย่าง อยู่ห่างจากขอบล่างเจล 1 เซนติเมตร ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นจึงหยุดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส



ภาพที่ 3.1 อุปกรณ์และ การรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.6 การย้อมสีเอนไซม์

นำแผ่นเจลที่ได้มากระตุ้นให้เกิดสีในสารละลายของ substrate ของเอนไซม์แต่ละชนิด ซึ่งการย้อมสีเจลใช้วิธีของ Allendorf *et.al.* (1977), ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์ (2539) และ Pasteur *et. al.*(1988) แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบต่างๆ ของสารเคมีที่ใช้ศึกษาไอโซไซม์

ชนิดของเอนไซม์	สารละลายสีย้อมเอนไซม์	ปริมาณ	แหล่งที่มา
1. Isocitrate dehydrogenase (IDH)	0.2โมล Tris-HCl buffer pH 8.0 0.25 โมล $MnCl_2$ 0.5 โมล $MgCl_2$ NADP (1% ในน้ำ) NBT (1% ในน้ำ) PMS (1% ในน้ำ) MTT (1% ในน้ำ) 0.1 โมล D, L-isocitric acid	10 มิลลิลิตร 1.0มิลลิลิตร 1.0 มิลลิลิตร 0.3 มิลลิลิตร 0.3 มิลลิลิตร 0.3 มิลลิลิตร 0.3 มิลลิลิตร 1.0 มิลลิลิตร	Pasteur *et. al.* (1988)
2. Leucine aminopeptidase (LAP)	0.2 โมล Tris/Malate buffer pH 5.5 L-Leuctl -β-Naphthyllamide 0.5 โมล $MgCl_2$ Black K salt	40มิลลิลิตร 100 มิลลิกรัม 5 มิลลิลิตร 30 มิลลิกรัม	Pasteur *et. al.* (1988)
3. Acid phosphates (ACP)	0.15 โมล Acetate/NaOH buffer pH 5.0 α-napthyl acid phosphate Fast blue BB salt	40 มิลลิลิตร 50 มิลลิกรัม 50 มิลลิกรัม	Allendorf *et.al.* (977)
4. Phosphogluconate dehydrogenase	0.2 โมล Tris-HCl buffer pH 8.0 0.5 โมล $MgCl_2$ 6-phosphogluconic acid NADP (1% ในน้ำ) NBT (1% ในน้ำ) PMS (1% ในน้ำ) MTT (1% ในน้ำ)	10 มิลลิลิตร 1.0 มิลลิลิตร 20 มิลลิกรัม 0.1 มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตร	Pasteur *et. al.* (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชนิดของเอนไซม์	สารละลายสีย้อมเอนไซม์	ปริมาณ	แหล่งที่มา
5. Alkaline phosphatase (AKP)	0.05 โมล Tris/NaCl/HCl buffer pH 8.7 α-napthyl acid phosphate Fast blue BB 0.5 โมล $MgCl_2$ 0.25 โมล $MnCl_2$	40 มิลลิลิตร 50 มิลลิกรัม 0.6 มิลลิลิตร 1.2 มิลลิลิตร	Allendorf *et.al.* (1977)
6. Alcohol dehydrogenase (ADH)	0.2 โมล Tris-HCl buffer pH 7.0 0.5 โมล $MgCl_2$ เอทธานอล 95เปอร์เซ็นต์ NAD (1% ในน้ำ) PMS (1% ในน้ำ) NBT (1% ในน้ำ) MTT (1% ในน้ำ)	40 มิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตร 3 มิลลิลิตร 2 มิลลิลิตร 0.5 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร 0.3 มิลลิลิตร	ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์ (2539)
7. Glucose-6-phosphase Dehydrogenase (GDH)	0.1 โมล Tris-HCl buffer pH 8.0 glucose-6-phosphate (disodium salt)NADH MTT PMS NBT 0.5 โมล $MgCl_2$	5 มิลลิลิตร 10 มิลลิกรัม 0.2 มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร 0.3 มิลลิลิตร 2 มิลลิลิตร	Allendorf *et.al.* (1977)
8. Lactate dehydrogenase (LDH)	0.2 โมล Tris-HCl buffer pH 7.0 0.5 โมล D,L-lactic acid NAD (1% ในน้ำ) PMS (1% ในน้ำ) NBT (1% ในน้ำ)	35 มิลลิลิตร 6 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร 0.5 มิลลิลิตร 0.3 มิลลิลิตร	ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์ (2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชนิดของเอนไซม์	สารละลายสีย้อมเอนไซม์	ปริมาณ	แหล่งที่มา
9. Malate dehydrogenase (MDH)	0.2 โมล Tris-HCl buffer pH 8.0 L-malic acid (disodium salt) NAD PMS NBT	100 มิลลิลิตร 250 มิลลิกรัม 30 มิลลิกรัม 2 มิลลิกรัม 30 มิลลิกรัม	ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์ (2539)
10. Laccase (NADP)ADH	0.1 โมล O-Tolidine ใน 0.1 โมลSodium acetate buffer	50 มิลลิลิตร	ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์ (2539)
11. Esterase (EST)	0.05 โมล Phosphate buffer pH 7.2 α-napthyl acetate Fast blue RR salt	100 มิลลิลิตร 10 มิลลิกรัม 50 มิลลิกรัม	ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์ (2539)

หลังจากที่แผ่นเจลมีแถบสีเกิดขึ้น นำแผ่นเจลที่ได้ไปล้างโดยผ่านน้ำไหล และล้างสีส่วนเกินออกด้วย gacail acetic acid 7เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการวาดแถบสีที่เกิดขึ้น เก็บ เจลในรูปของ gel dry (วิธีการแสดงในภาคผนวก)

3.4.5 การกำหนดชื่อย่อของเอนไซม์

การกำหนดชื่อย่อของเอนไซม์ (enzyme commission number) และ subunit composition ของเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาใช้วิธีการของ Royse และ May (1982) และ Laday *et. al* (2000) ในตารางที่ 3.2

3.4.6 การวิเคราะห์ลักษณะไซโมแกรม

นำข้อมูลของแถบไซโมแกรมที่ได้ในแต่ละเอนไซม์ มาประเมินผลจากการเปรียบเทียบแถบสีที่ปรากฏขึ้น โดยคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative fraction หรือ R_f) ของตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละเอนไซม์ ซึ่งเป็นค่าคงที่เฉพาะตัวของแถบไอโซไซม์แต่ละชนิด มีสูตรดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางเคลื่อนที่ของแถบไอโซไซม์}}{\text{ระยะทางเคลื่อนที่ของแถบสี Bromophenol Blue}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จัดรูปแบบไซโมแกรมที่ได้ในแต่ละเอนไซม์ บันทึกค่า R_f ที่ได้ลงในรูปแบบไซโมแกรม จากนั้นนำผลของรูปแบบไซโมแกรมของเอนไซม์ทั้งหมด 8 ชนิดไปวิเคราะห์ผล

ตารางที่ 3.2 แสดงระบบของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจสอบ

เอนไซม์	ชื่อย่อของเอนไซม์	EC	Subunit composition
1. Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.42	2
2. Leucine aminopeptidase	LAP	3.4.11.1	2
3. Acid phosphates	ACP	3.1.3.2	2
4. Phosphoguconase	PGD	1.1.1.43	2
dehydrogenase			2
5. Alkaline phosphatase	AKP	3.1.3.1	2
6. Alcohol dehydrogenase	ADH	1.1.1.1	2
7. Glucose-6-phosphate	G6PD	1.1.1.49	
dehydrogenase			
8. Lactate dehydrogenase	LDH	1.1.1.27	4
9. Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37	2
10. Laccase	LAC	1.1.1.2	1
11. Esterase	EST	3.1.1.2	1, 2

3.5 ส่วนที่ 2 : การทดลอง PCR - RFLP

3.5.1 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลว

3.5.1.1 เลี้ยงเส้นใยบน PDA (Potato Dextrose Agar) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.5.1.2 ย้ายเส้นใยที่เจริญบนวุ้นลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีอาหารเหลว 5 ชนิด คือพีดีบี (potato dextrose broth), ซีวายเอ็ม (complete yeast media), เอ็มวายจี (malt yeast glucose media), เอ็มอีบี (malt extract broth) และ พีดีวายบี (potato dextrose yeast broth) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วางในที่ไม่มีแสง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจากวิธีของ Cenis.1992)

1. นำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลวมาแยกโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1
2. ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น
3. นำเส้นใย 0.1 กรัม ใส่ microfuge tube
4. ล้างด้วย TE buffer หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
5. ดูดส่วนใสทิ้งเติม extraction buffer 300 ไมโครลิตร
6. บดเส้นใยด้วยไนโตรเจนเหลว
7. เติม 3M Sodium acetate 150 ไมโครลิตร เขย่าแล้วนำไปบ่มที่ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
8. นำไปเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
9. เทส่วนใสลง microfuge tube อันใหม่
10. เติม isopropanol ปริมาตรเท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
11. นำไปเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
12. ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 %
13. คว่ำหลอดบนกระดาษชำระเพื่อให้เอทานอลระเหย
14. ละลายดีเอ็นเอใน TE buffer 50 ไมโครลิตร
15. เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.5.3 ขั้นตอน PCR - RFLP

3.5.3.1 ขั้นตอน PCR

1. ใช้ดีเอ็นเอ 5 ng และ PCR mixture ทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มขยายปริมาณโดยมีสภาวะสำหรับไพรเมอร์ ITS1และ ITS4 ดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5	นาที
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	40	วินาที
Annealing	55 องศาเซลเซียส	40	วินาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	1	นาที

ขั้นตอนการ Initial denaturation ทำปฏิกิริยา 1 รอบ แต่ปฏิกิริยา Denaturation จนถึง Extension ทำปฏิกิริยา 40 รอบ ในการทดลองควรมีการเตรียมตัวควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอเสมอ

สำหรับสภาวะสำหรับไพรเมอร์ O1 – LR12R มีดังนี้

Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	5	นาที
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	45	วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Annealing	60 องศาเซลเซียส	45	วินาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	2	นาที

ขั้นตอนการ Initial denaturation ทำปฏิกิริยา 1 รอบ แต่ปฏิกิริยา Denaturation จนถึง Extension ทำปฏิกิริยา 30 รอบ ในการทดลองควรมีการเตรียมตัวควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอเสมอ

3.5.3.2 ขั้นตอน RFLP

1.เติมเอนไซม์ตัดจำเพาะลงใน PCR reaction mixture 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.เมื่อครบ 24 ชั่วโมงหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ โดยนำหลอด PCR reaction mixture มาบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.5.4 ขั้นตอน Electrophoresis

เมื่อทำการเพิ่มขยายปริมาณแล้วนำดีเอ็นเอมาแยกตามขนาดโดยวิธีอิเล็คโทรโฟริซีสบนอะกาโรสเจล 0.8 % ใน TBE ใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลท์ นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ก่อนนำไปตรวจดูแถบใต้แสงยูวีเพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ

ส่วนในขั้นตอน RFLP จะใช้อะกาโรสเจล 2 % ใน ใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลท์ นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ก่อนนำไปตรวจดูแถบใต้แสงยูวีเพื่อตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.5.5 **การวิเคราะห์ผลข้อมูลในการศึกษา** PCR – RFLP

3.5.5.1 หาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนการทำอิเล็คโตรโฟรีซีสมาหาขนาดดีเอ็นเอโดยเทียบกับ Marker และวัดระยะทางเพื่อพลอตกราฟ logarithm

3.5.5.2 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม WinBoot

ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการทำ PCR-RFLPบริเวณ ITS และ IGS ของเห็ดจะถูกบันทึกข้อมูลเป็นตัวเลข 0 และ 1 (โดย 0 หมายถึงไม่พบแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดคู่เบสนั้นๆ และ 1 หมายถึง พบแถบดีเอ็นเอ) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม WinBoot (Yap และ Nelson. 1996) โดยคำนวณหาดัชนีความคล้ายคลึงกัน (similarity index) เป็นค่า Simple matching (SM) โดยใช้สูตรดังนี้

$$SM = m / n$$

เมื่อ m คือจำนวนแถบที่เหมือนกัน

n คือจำนวนแถบทั้งหมดที่ปรากฏ

จากนั้นสร้างเดนโดรแกรมด้วยวิธี UPGMA (Sneath and Sokal. 1973) โดยใช้โปรแกรม WinBoot

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 ส่วนที่ 3 : การทดลองระบบการผสมพันธุ์และมัลทิเพิลอัลลีล

3.6.1 ศึกษาอัตราการเจริญของเส้นใยเส้นใยโมโนคาริออน

3.6.1.1 นำเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดสกลนคร มหาสารคาม อุบลราชธานี ศรีสะเกษ ปทุมธานี และนครปฐม (ศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก) ดอกละ 30 ไอโซเลท (isolate) เพาะแยกไปเลี้ยงบนจานอาหารพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 วันตรวจสอบเส้นใยโมโนคาริออน โดยตรวจการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.6.1.2 ใช้ cork borrer ตัดเส้นใยโมโนคาริออนทุกไอโซเลทของแต่ละดอกในทุกจังหวัดเพาะเลี้ยงบนจานอาหารพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(เซนติเมตร) เมื่อเส้นใยอายุได้ 3 วันและ 12 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.61.2 หาอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยโมโนคาริ ออน (เซนติเมตรต่อวัน)ทุกไอโซเลทของแต่ละดอกในทุกจังหวัด

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต (เซนติเมตรต่อวัน)} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยวันที่ 12 - วันที่ 3}}{9}$$

3.6.1.3 คัดเลือกเส้นใยโมโนคาริออนที่มีอัตราการเจริญเติบโตดีดอกละ 12 ไอโซ เลท เพาะเลี้ยงไว้ในหลอดอาหารเอียงพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.6.2 ศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากเส้นใยโมโนคาริออน

3.6.1.1 นำเส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทผสมภายในดอกเดียวกันทีละคู่แบบพบกันหมด โดยใช้ cork borrer ตัดเส้นใยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเอ็มอีเอในจานเพาะเชื้อ วางเส้นใยห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันโดยใช้สัญลักษณ์ดังต่อไปนี้

\+ : clamp connection หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันได้และมีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น

\- : overlap หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันไม่ได้ เส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเหลื่อมซ้อนกันและไม่มีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น

(+) : barrage หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันได้เพียงกึ่งเดียว เส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเป็นร่องและมีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่นที่เจริญไม่สมบูรณ์

(-) : flat หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันไม่ได้ เส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเป็นแถบหนาและไม่มีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1.2 คำนวณหาอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันทั้งหมด ถ้าได้เท่ากับ 1 : 4 แสดงว่าเห็ดตีนแรดมีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ เฮเทอโรทัลลิก

3.6.1.3 จัดกลุ่มของการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออ นจากการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่นและลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันตามหลักของ Papazian (1950) จะทำให้ทราบว่าแต่ละไอโซเลทมีเมทติ่งไทป์เป็นแบบ A_1B_1 A_1B_2 A_2B_2 หรือ A_2B_1

3.6.3 การหาจำนวนของมัลทิเพิลอัลลีล

3.6.3.1 คัดเลือกเส้นใยโมโนคาริออนไอโซเลทที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดในแต่ละกลุ่มที่มี เมทติ่งไทป์ แบบ A_1B_1 A_1B_2 A_2B_2 และ A_2B_1 (จากข้อ 3.6.1.3) กลุ่มละ 1 ไอโซเลททำการคัดเลือกเช่นเดียวกันทุกดอก

3.6.3.2 นำเส้นใยโมโนคาริออนที่เป็นตัวแทนกลุ่มของเมทติ่งไทป์ A_1B_1 A_1B_2 A_2B_2 และ A_2B_1 ของแต่ละดอก ทั้งหมด 40 ไอโซเลท ทำการผสมข้ามดอกที่ละคู่แบบพบกันหมด โดยใช้ cork borrer ตัดเส้นใยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเอ็มอีเอในจานเพาะเชื้อ วางเส้นใยห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจดูการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกัน โดยใช้สัญลักษณ์เช่นเดียวกับการหาเมทติ่งไทป์

3.6.3.3 หาจำนวนอัลลีลของโลกัส A และ B ตามวิธีของ Eugenio และ Anderson (1968) ดังนี้ โดยดูตรวจดูการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่นและลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกัน คือ

ถ้าสัญลักษณ์ + หมายถึง อัลลีลของคู่ผสมพันธุ์ต่างกันทั้งโลกัส A และ B

\- หมายถึง อัลลีลของคู่ผสมพันธุ์เหมือนกันทั้งโลกัส A และ B

(+) หมายถึง อัลลีลของคู่ผสมพันธุ์ที่โลกัส A ต่างกันแต่โลกัส B เหมือนกัน

(-) หมายถึง อัลลีลของคู่ผสมพันธุ์ที่โลกัส A เหมือนกันแต่โลกัส B ต่างกัน

การหาจำนวนอัลลีลจะต้องเริ่มจากการหายีโนไทป์ของแต่ละไอโซเลท โดยดูการผสมพันธุ์ ของเส้นใยโมโนคาริออนแต่ละคู่เริ่มจากไอโซเลทที่ 1 ของดอกที่ 1 ผสมกับไอโซเลทที่ 1 ของดอกที่ 2 ไอโซเลทที่ 2 ของดอกที่ 1 ผสมกับไอโซเลทที่ 1 ของดอกที่ 2 ไอโซเลทที่ 3 ของดอกที่ 1 ผสมกับไอโซเลทที่ 1 ของดอกที่ 2 ไอโซเลทที่ 4 ของดอกที่ 1 ผสมกับไอโซเลทที่ 1 ของดอกที่ 2 ...จนถึงไอโซเลทที่ 4 ของดอกที่ 9 ผสมกับไอโซเลทที่ 4 ของดอกที่ 10

3.6.3.4 เมื่อทราบยีโนไทป์ของเส้นใยโมโนคาริออนแต่ละไอโซเลทจะทำให้ทราบจำนวนอัลลีลของโลกัส A และ B ซึ่งได้จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดตีนแรด 40 ไอโซเลท จาก 10 ดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ส่วนที่ 1 : ผลการทดลอง Isozyme electrophoresis

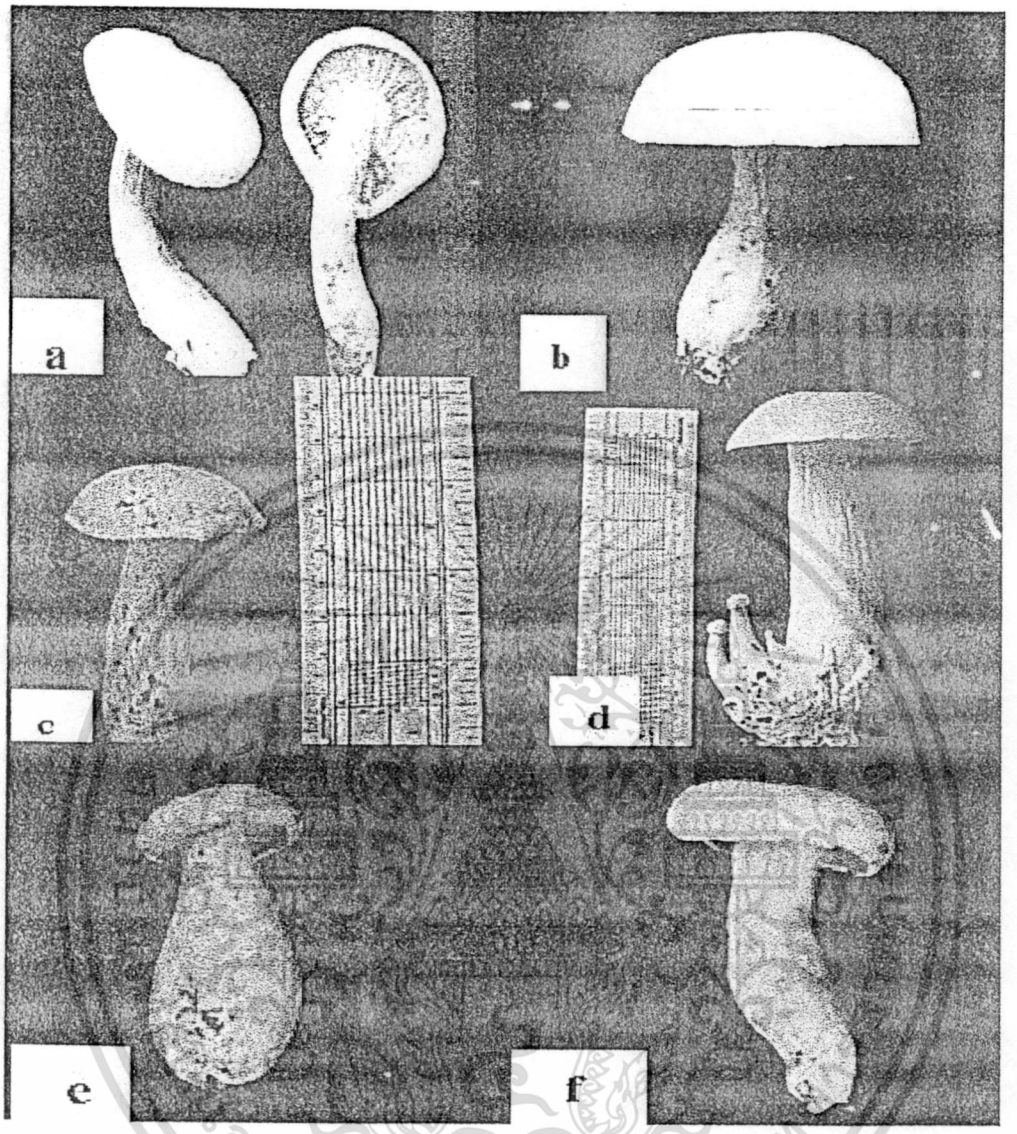
4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดตีนแรดจากพื้นที่ต่างๆ

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดตีนแรดจาก 5 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดมหาสารคาม จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดสกลนคร และจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหินและตำบลโพนข่า มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าขนาดหมวกดอกเห็ดจังหวัดนครราชสีมา, จังหวัดมหาสาคาม และจังหวัดอุบลราชธานี มีขนาดหมวกดอกใหญ่ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 13, 11.2 และ 9.0 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนขนาดหมวกดอกเห็ดจังหวัดสกลนครและจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่าและตำบลวังหินมีขนาดหมวกดอกเล็ก คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.0, 5.0 และ 6.5 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับรูปร่างหมวกดอกของเห็ดจังหวัดนคราชสีมาและจังหวัดศรีสะเกษ มีรูปร่างหมวกดอกเห็ดเป็นรูปครึ่งวงกลมคว่ำขอบหมวกม้วนเข้าด้านใน ส่วนหมวกดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคาม จังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดสกลนคร หมวกดอกเห็ดเป็นรูปครึ่งวงกลมคว่ำขอบหมวกไม่ม้วนเข้าด้านใน สีของหมวกดอกมีสีเทาขาวทุกจังหวัดยกเว้นจังหวัดนครราชสีมาหมวกดอกมีสีเทาขาวอมครีม สีของก้านดอกจังหวัดมหาสาคามและจังหวัดนครราชสีมาก้านดอกมีสีครีมอมน้ำตาล จังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหินและตำบลโพนข่าก้านดอกมีสีขาว ส่วนจังหวัดสกลนครก้านดอกมีสีเทาขาวอมครีม สีรอยพิมพ์สปอร์ทุกจังหวัดมีสีเทาขาว สำหรับสีและรูปร่างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เห็ดทุกจังหวัดสปอร์มีสีใส และรูปร่างกลมรี ยกเว้นจังหวัดอุบลราชธานีสปอร์มีรูปร่างค่อนข้างกลมกว่าจังหวัดอื่นๆ ขนาดสปอร์และขนาดของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า มีความแตกต่างกันคือ สปอร์ของเห็ดจังหวัดมหาสารคามจะมีขนาดสปอร์ใหญ่ที่สุดโดยมีขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 3.0 × 2.9 ไมโครเมตร รองลงมาคือจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหิน จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดสกลนคร และจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่า มีขนาดสปอร์ 2.8 × 2.9, 2.8 × 2.8, 2.7 × 2.8 และ 2.7 × 2.8 ไมโครเมตรตามลำดับ ส่วนขนาดของเส้นใยจังหวัดมหาสารคามมีขนาดเส้นใยใหญ่ที่สุดคือ มีขนาดเท่ากับ 1.94 ไมโครเมตร รองลงมาคือจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่าและตำบลวังหิน และจังหวัดสกลนคร มีขนาดเส้นใย 1.89, 1.86, 1.83 , 1.75 และ 1.71 ไมโครเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1-4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดตีนแรดจากพื้นที่ต่างๆ

ตัวอย่างเห็ด (จังหวัด)	ศรีสะเกษ ตำบลวังหิน (SKV)	ศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า (SKP)	อุบลราชธานี (E)	มหาสารคาม (M)	นครราชสีมา (K)	สกลนคร (S)
ขนาดดอกเห็ด (ซม.)	6.5	5.0	9.0	11.2	13	6.0
รูปร่างดอกเห็ด	ครึ่งวงกลมคว่ำขอบหมวกม้วนเข้าด้านใน	ครึ่งวงกลมคว่ำขอบหมวกม้วนเข้าด้านใน	ครึ่งวงกลมคว่ำขอบหมวกไม่ม้วนเข้าด้านใน	ครึ่งวงกลมคว่ำขอบหมวกไม่ม้วนเข้าด้านใน	ครึ่งวงกลมคว่ำขอบหมวกม้วนเข้าด้านใน	ครึ่งวงกลมคว่ำขอบหมวกไม่ม้วนเข้าด้านใน
สีหมวดอกเห็ด	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาวอมครีม	เทาขาว
สีก้านดอก	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	ครีมอมน้ำตาล	ครีมอมน้ำตาล	เทาขาวอมครีม
สีรอยพิมพ์สปอร์	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว
ลักษณะและสีสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	กลมรี, ใส	กลมรี, ใส	ค่อนข้างกลม, ใส	กลมรี. ใส	กลมรี, ใส	กลมรี, ใส
ขนาดเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (μm)	1.71	1.75	1.86	1.94	1.89	1.83
ขนาดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (μm)	2.8 × 2.9	2.7 × 2.8	2.8 × 2.8	2.9 × 3.0	2.8 × 2.9	2.7 × 2.8



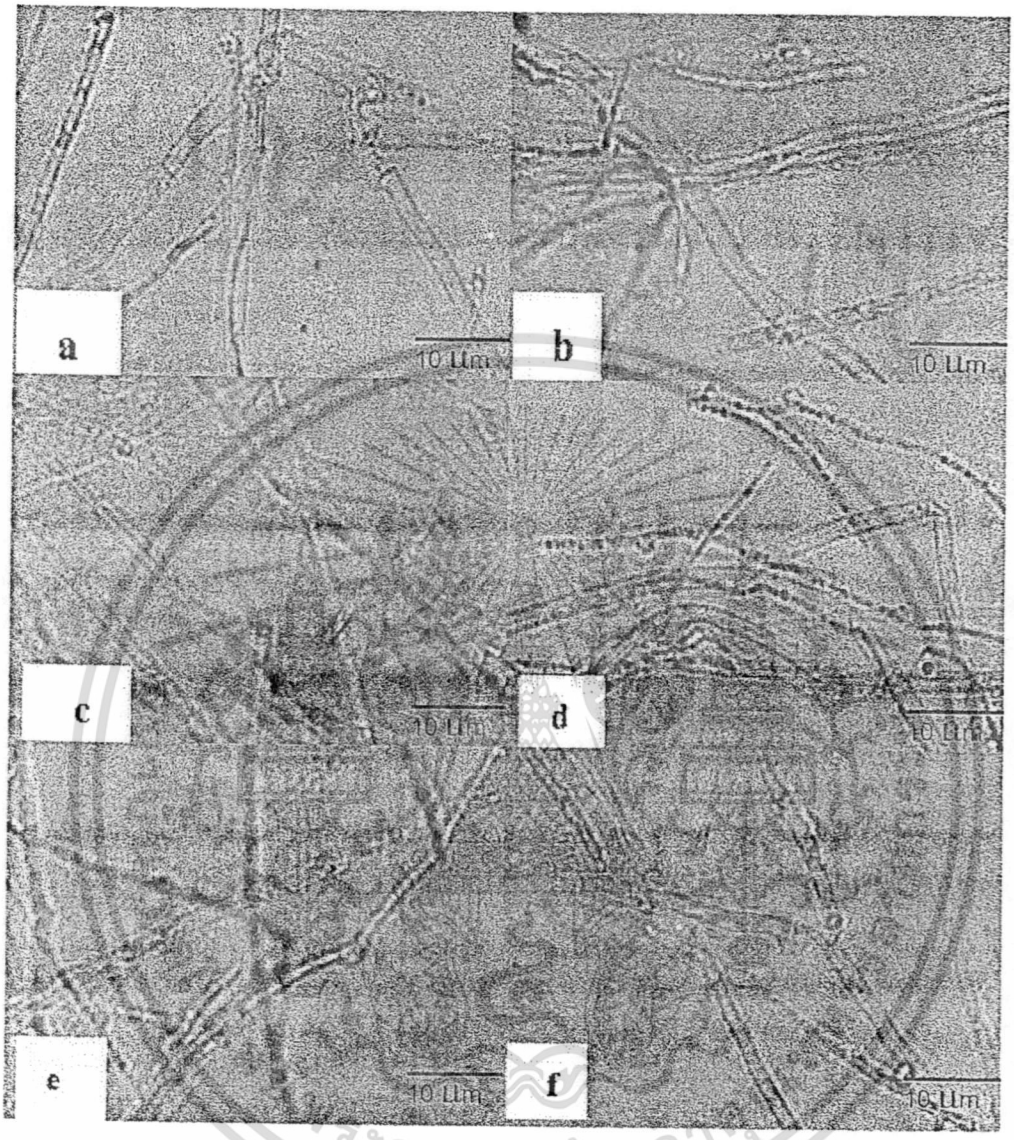
ภาพที่ 4.1 ลักษณะของดอกเห็ดตีนแรด

a คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา d คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี

b คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร e คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่า

c คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม f คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหิน

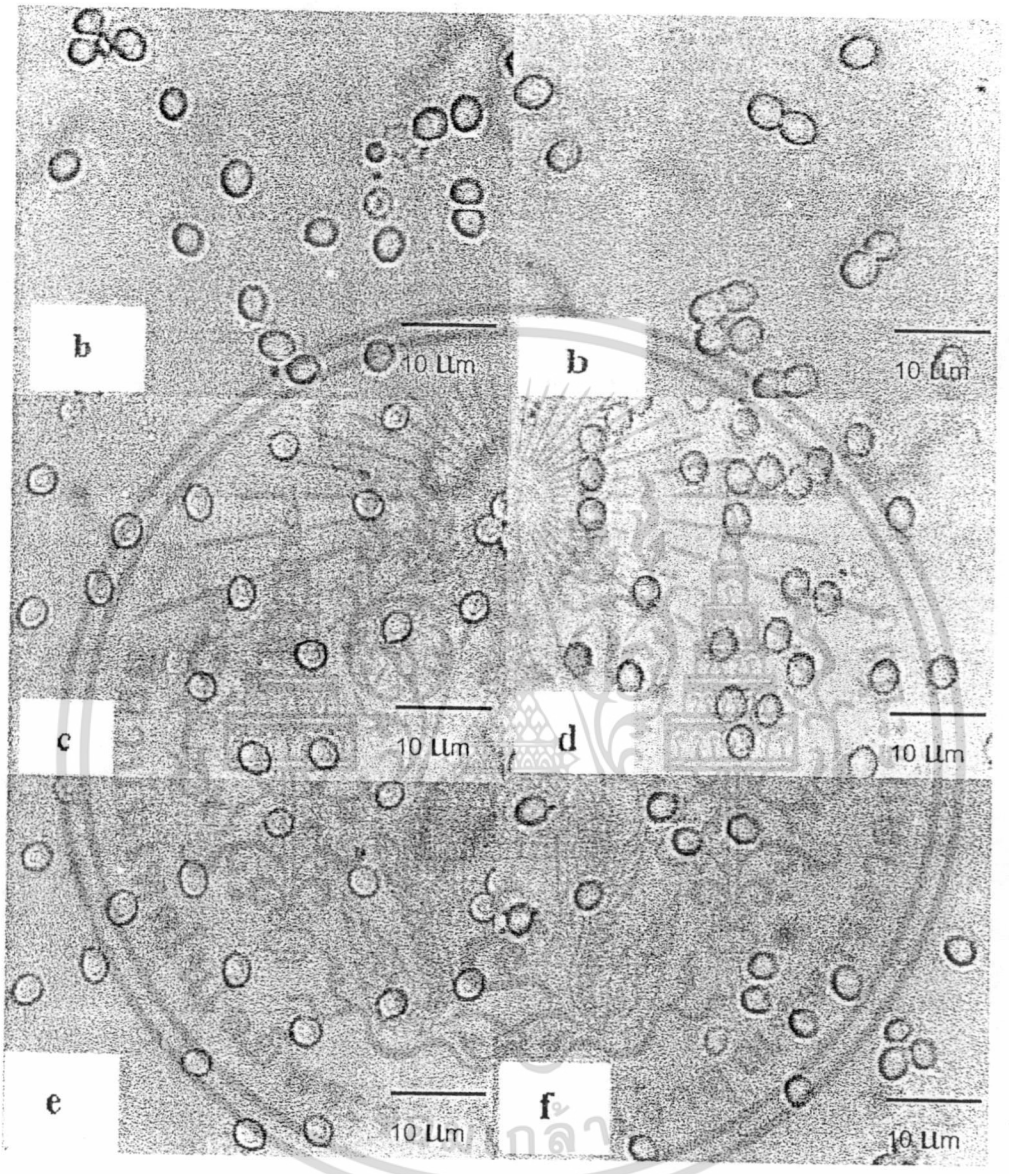
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ขนาดของเส้นใยเห็ดตีนแรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

a คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา
b คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร
c คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม
d คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี
e คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่า
f คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหิน

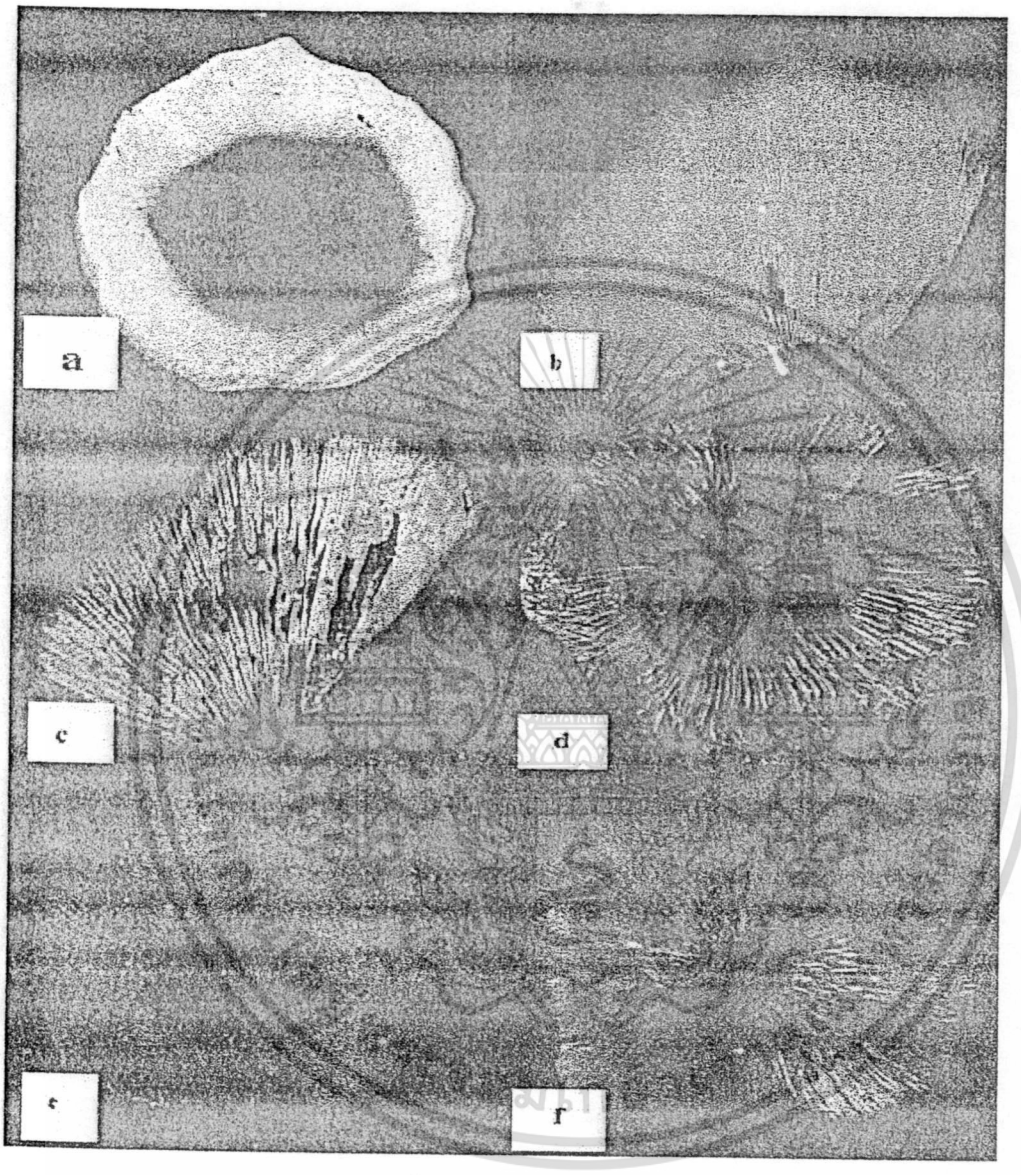
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ขนาดของสปอร์เห็ดตีนแรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

a คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา
b คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร
c คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม
d คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี
e คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่า
f คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



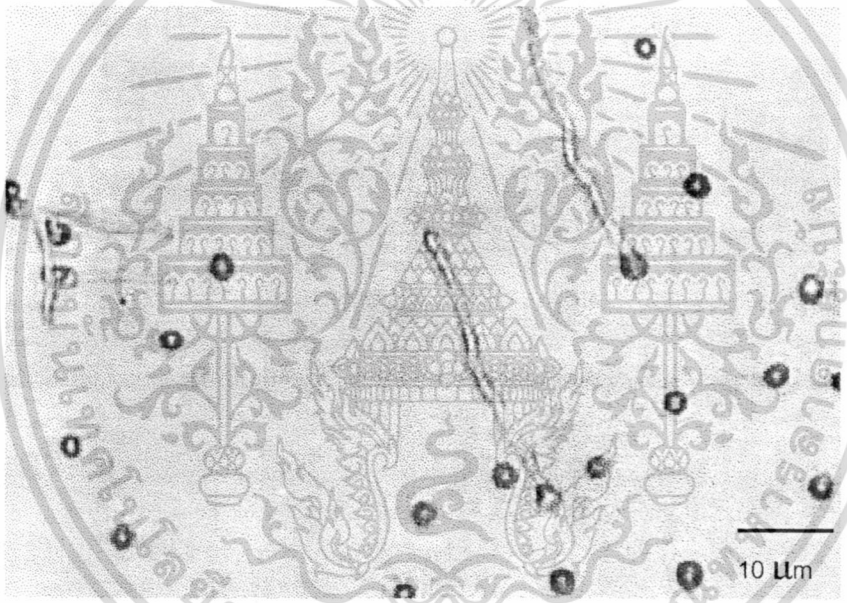
ภาพที่ 4.4 สีรอยพิมพ์สปอร์ของเห็ดตีนแรด

a คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา
b คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม
c คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร
d คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี
e คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่า
f คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลของการเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคารีออนจากสปอร์เห็ด

จากการเก็บสปอร์ของเห็ดตีนแรดในพื้นที่ 5 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคารีออน โดยนำ basidiospore (เบซิดิโอสปอร์) มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่มีเชื้อยีสต์เจริญร่วมด้วย หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการตรวจเช็คเส้นใยพบว่าเบซิดิโอสปอร์เริ่มงอกในวันที่ 7 แสดงดังภาพที่ 4.5 เมื่อทำการแยกเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถแยกเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดแต่ละจังหวัดได้ดังนี้คือ จังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่า (SP) แยกเส้นใยโมโนคารีออนได้ 18 ตัวอย่าง ตำบลวังหิน (SV) 3 ตัวอย่าง จังหวัดอุบลราชธานี (U) 38 ตัวอย่าง จังหวัดมหาสารคาม (M) 39 ตัวอย่างนครราชสีมา (N) 16 ตัวอย่าง และจังหวัดสกลนคร (K) 24 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งตัวอย่างของเส้นใยโมโนคารีออนที่แยกได้นี้จะเก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียง PDA เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนการศึกษาไอโซไซม์ต่อไป



ภาพที่ 4.5 เส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรดที่กำลังงอกจากเบซิดิโอสปอร์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 จำนวนตัวอย่างเส้นใยโมโนคารีออนที่แยกได้ในแต่ละจังหวัด

จังหวัด	**จำนวน**	**ตัวอย่าง**
ศรีสะเกษตำบลวังหิน (SV)	3	SV1 - SV3
ศรีสะเกษตำบลโพนข่า (SP)	18	SP2, SP3, SP5 - SP8, SP26 - SP27, SP30- SP33, SP36, SKP38, SKP40 - SP43
มหาสารคาม (M)	39	M4 - M5, M7, M10, M12 - M15, M17-M19 M21 - M32, M34 - M49
นครราชสีมา (N)	16	N3 , N5- N8, N10, N12, N16, N18, N21 - N23, N26, N33, N35, N39
อุบลราชธานี (U)	38	U4, U7 - U9, U11 - U12, U16, U20, Un1, Un4 - Un6, Un8, Un10, Un12, Un26 - Un34, Un36 - Un39, Un42 - Un43, Un46 - Un53
สกลนคร (K)	24	K6 - K7, K9, K12 - K14, K20 , K34, Kn11 - Kn17, Kn19 - Kn24, Kn28, Kn30, Kn33
รวม	138	

หมายเลขของตัวอย่างแต่ละจังหวัดเรียงลำดับตามตัวอย่างที่แยกได้ ส่วนตัวเลขที่ขาดไปนั้นเนื่องมาจากตัวอย่างดังกล่าวเกิดการ ปนเปื้อน (contaminate) จากเชื้อตัวอื่นในระหว่างการเก็บรักษา

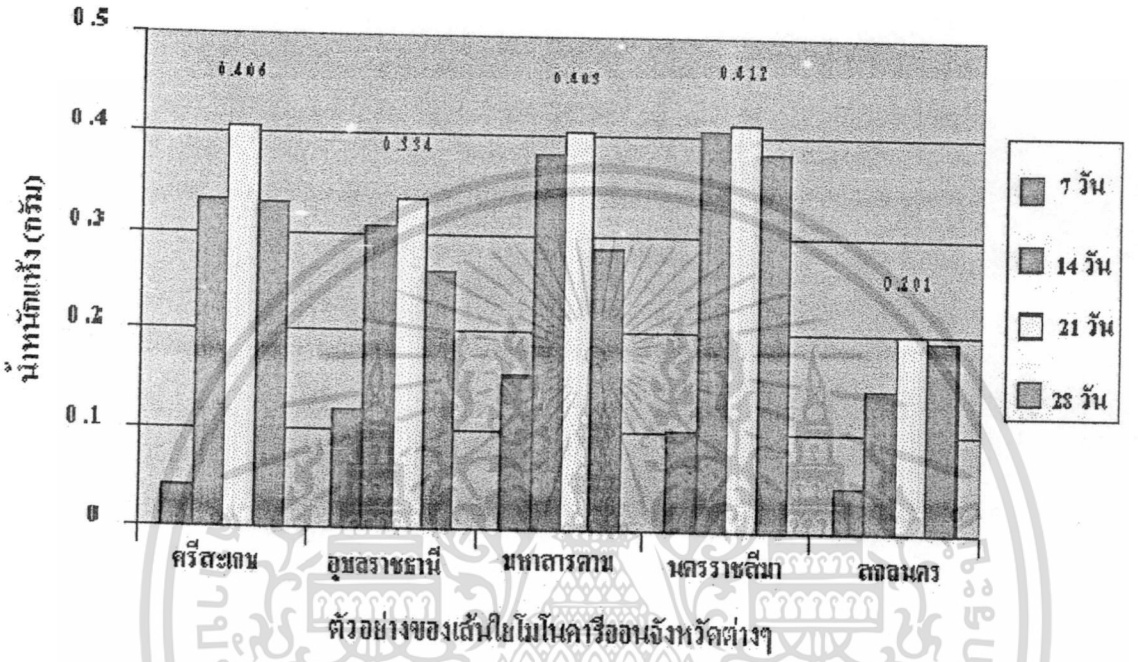
4.1.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนจากสปอร์เห็ดเพื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์

4.1.2.1 ผลการศึกษาระยะเวลาที่มีการเจริญของเส้นใย

จากการศึกษาระยะเวลาที่มีการเจริญสูงสุดของเส้นใยโมโนคารีออนของจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี มหาสารคาม นครราชสีมา และสกลนคร พบว่าเส้นใยโมโนคารีออนของแต่ละจังหวัดมีการเจริญของเส้นใยเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 7, 14 และ 21 โดยมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 21 และจะลดลงเล็กน้อยในวันที่ 28 ซึ่งน้ำหนักแห้งสูงสุดที่ได้ในวันที่ 21 ของจังหวัดต่างๆ 0.406, 0.334, 0.403, 0.412 และ 0.201 กรัมตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.6 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT (ภาคผนวก) พบว่าเส้นใยโมโนคารีออนที่เลี้ยงได้ 21 วันของจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี และสกลนคร มีการเจริญของเส้นใยสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(P>0.05) กับการเจริญของเส้นใยในวันที่ 7, 14 และ 28 วัน ส่วนการเจริญสูงสุดของเส้นใยโมโนคา รีออนที่เลี้ยงได้ 21 วันของจังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดนครราชสีมานั้น พบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05) กับการเจริญของเส้นใยในวันที่ 7 และ 28 วัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเจริญของเส้นใยในวันที่ 14



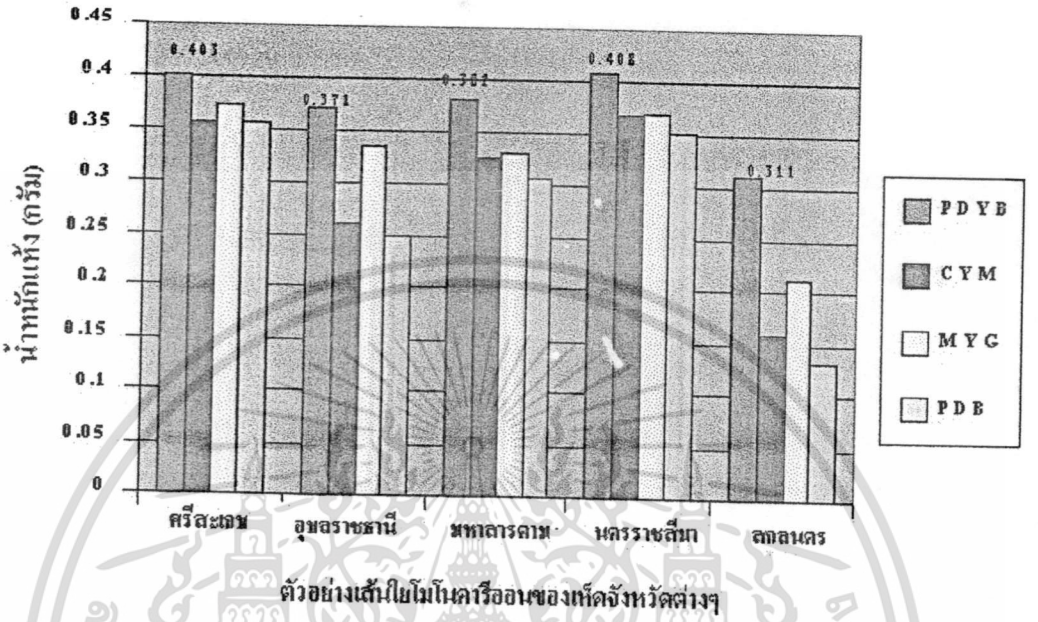
ภาพที่ 4.6 วันที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรดในแต่ละจังหวัดจังหวัด

4.1.3.2 ผลการศึกษาหาชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัด

จากการศึกษาหาชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของจังหวัดศรีษะเกษ อุบลราชธานี มหาสารคาม นครราชสีมา และสกลนคร พบว่าตัวอย่างเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัดเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลว PDYB โดยมีน้ำหนักแห้งสูงสุดของแต่ละจังหวัด 0.403, 0.371, 0.382, 0.408 และ 0.311 กรัมตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเหลว MYG, CYM และ PDB แสดงดังภาพที่ 4.7 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธี DMRT (ภาคผนวก) พบว่าเส้นใยโมโนคารีออนที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDYB ของจังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดสกลนครมีการเจริญของเส้นใยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05) กับการเจริญในอาหารของเส้นใยเหลว CYM, MYG และ PDB ส่วนจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มหาสารคามนั้น พบว่าการเจริญของเส้นใยในอาหาร PDYB แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05) กับการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลว CYM และ PDB แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลว MYG

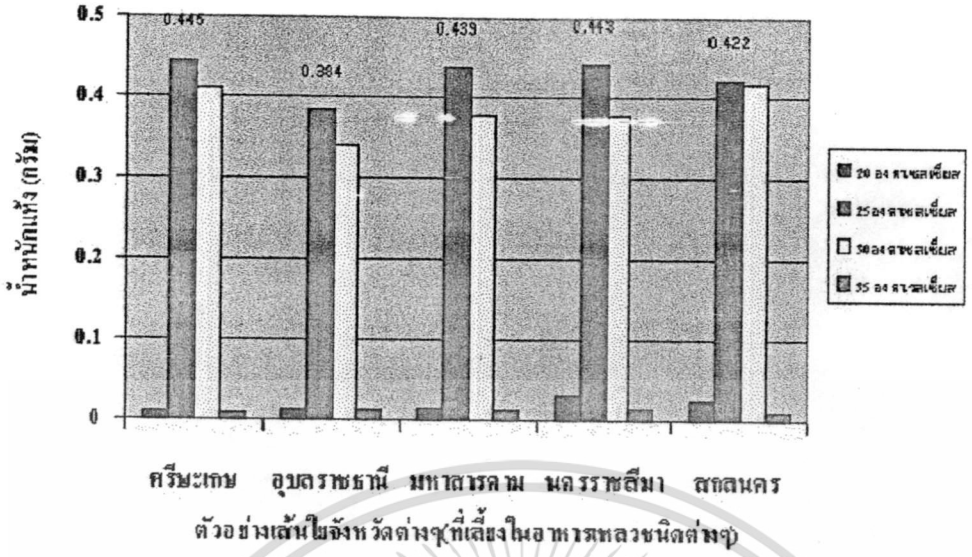


ภาพที่ 4.7 ชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรดในแต่ละจังหวัด

4.1.2.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัด

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี มหาสารคาม นครราชสีมา และสกลนคร พบว่าเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดแต่ละจังหวัดเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีน้ำหนักแห้ง 0.445, 0.411, 0.439, 0.443 และ 0.422 กรัมตามลำดับ รองลงมาคืออุณหภูมิ 30, 20 และ 35 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพที่ 4.8 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี DMRT (ภาคผนวก) พบว่าเส้นใยโมโนคารีออนของจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี และนครราชสีมา ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการเจริญของเส้นใยสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P>0.05) กับการเจริญของเส้นใยที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ส่วนตัวอย่างเส้นใยจังหวัดมหาสารคามและสกลนครที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญการเจริญของเส้นใยที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 และ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเจริญของเส้นใยที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคารีออนเห็ดตีนแรดในแต่ละจังหวัดสกลนคร

4.1.4 ผลการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดตีนแรด

จากการศึกษาลักษณะรูปแบบไอโซไซม์ของตัวอย่างเส้นใยชนิดโมโนคารีออนเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการทางอิเล็คโทรโฟรีซีสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยศึกษาจากเอนไซม์ 11 ชนิดได้แก่ isocitric dehydrogenase (IDH), acid phosphates (ACP), leucine aminopeptidase (LAP), phosphogluconate dehydrogenase (PGD), glucose-6-phosphase dehydrogenase (G6PD), alkaline phosphatase (AKP), alcohol dehydrogenase (ADH), lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH), laccase and esterase (EST)พบว่ามีการแสดงออกของรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันของตัวอย่างในแต่ละจังหวัดดังนี้

รูปแบบไอโซไซม์ระบบต่างๆ ที่ศึกษา

4.1.4.1 isocitric dehydrogenase (IDH)

จากการศึกษาเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรดทั้ง 138 ตัวอย่างโดยเอนไซม์ IDH พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์เพียง 1 แถบ มีค่า R_f เท่ากับ 0.71 พบในตัวอย่าง 7 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างจังหวัดนครราชสีมา 3 ตัวอย่าง ได้แก่ N12, N23 และ N26 จังหวัดมหาสารคาม 4 ตัวอย่างได้แก่ M5, M7, M26 และ M43 จากผลการทดลองแถบเอนไซม์ที่ปรากฏในตัวอย่างทั้งหมดไม่มีความสม่ำเสมอหรือไม่ค่อยปรากฏแถบเอนไซม์ ดังนั้นจึงไม่ได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4.2 leucine aminopeptidase (LAP)

จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ LAP พบว่าไม่มีแถบไอโซไซม์เกิดขึ้นในทุกๆตัวอย่างดังนั้นจึงไม่ได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.1.4.3 acid phosphates (ACP)

จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ ACP พบว่าไม่มีแถบไอโซไซม์เกิดขึ้นในทุกๆ ตัวอย่าง ดังนั้นจึงไม่ได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.1.4.4 phosphogluconate dehydrogenase (PGD)

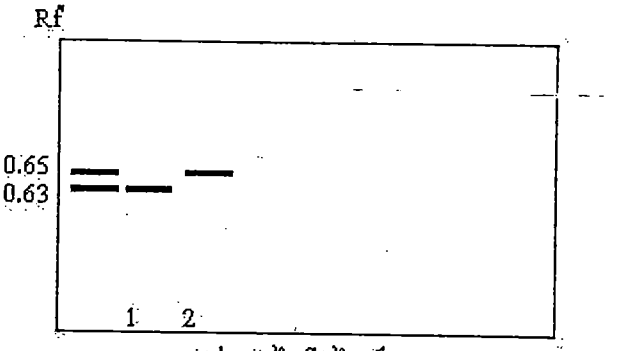
จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ PGD พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ 2 แถบ มีค่า R_f เท่ากับ 0.63 และ 0.65

จากตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.9 พบว่า PGD แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 2 รูปแบบ โดยทั้ง 2 รูปแบบมีจำนวนแถบเพียง 1 แถบ ซึ่งรูปแบบไอโซไซม์ทั้ง 2 รูปแบบพบในตัวอย่างทั้ง 5 จังหวัด ยกเว้นจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหินที่แสดงรูปแบบไอโซไซม์เพียงชนิดเดียวคือรูปแบบไอโซไซม์แบบที่ 2

ตารางที่4.3 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase (PGD)

เห็ดตีนแรด	รูปแบบไอโซไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2,	1, 1
จังหวัดนครราชสีมา	1, 2	1, 1
จังหวัดอุบลราชธานี	1, 2	1, 1
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	1, 2	1, 1
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	2	1
จังหวัดสกลนคร	1, 2	1, 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปแบบไอโซไซม์

ภาพที่ 4.9 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase (PGD) ของตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

4.1.4.5 alkaline phosphatase (AKP)

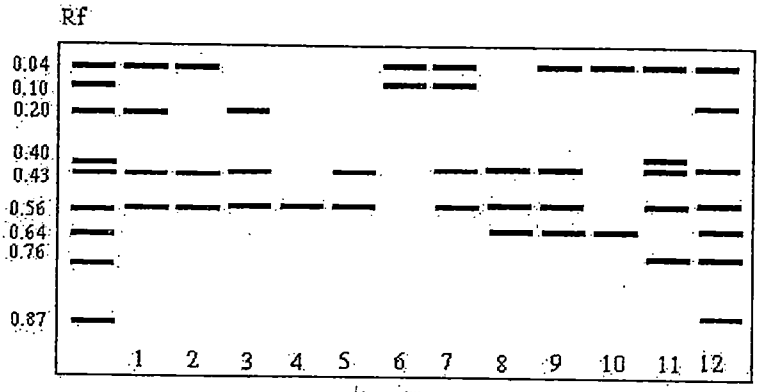
จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ AKP พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ 8 แถบ มีค่า R_f ระหว่าง 0.04-0.76

จากตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.10 พบว่า AKP แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 12 รูปแบบโดยรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบน้อยที่สุดคือรูปแบบที่ 4 มีจำนวนแถบเพียง 1 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม 2 ตัวอย่างคือ M32 และ M47 ส่วนรูปแบบไอโซไซม์อื่นๆ มีแถบตั้งแต่ 2 แถบขึ้นไปพบในตัวอย่างทุกๆ จังหวัด สำหรับรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบมากที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 12 มี 7 แถบพบเพียงตัวอย่างเดียวในจังหวัดอุบลราชธานี คือ Un48

ตารางที่ 4.4 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase (AKP)

เห็ดตีนแรด	**รูปแบบเอนไซม์**	**จำนวนแถบ**
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	4, 3, 3, 1, 2, 2, 4
จังหวัดนครราชสีมา	2, 5, 8, 9, 10	3, 2, 3, 4, 2
จังหวัดอุบลราชธานี	1, 2, 5, 8, 11, 12	4, 3, 2, 3, 4, 7
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	2, 5	3, 2
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	5	2
จังหวัดสกลนคร	5, 8	2, 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปแบบไอโซไซม์

ภาพที่ 4.10 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase (AKP) จากตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

4.1.4.6 alcohol dehydrogenase (ADH)

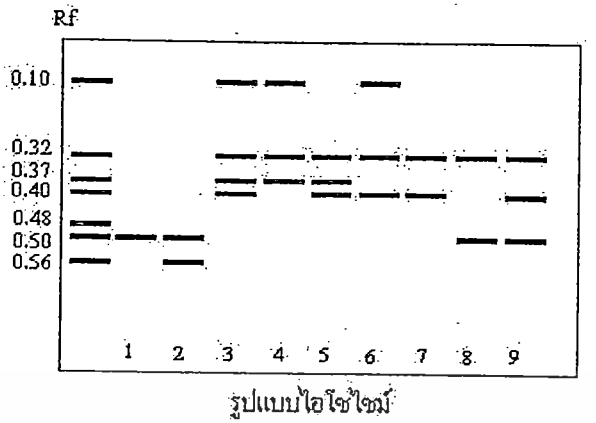
จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ ADH พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ 7 แถบ มีค่า R_f ระหว่าง 0.1-0.56

จากตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.11 พบว่า ADH แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 9 รูปแบบโดยรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบน้อยที่สุดคือรูปแบบที่ 1 มีเพียง 1 แถบ พบในตัวอย่าง 4 จังหวัด คือ จังหวัดมหาสารคาม อุบลราชธานี จังหวัดนครราชสีมา ศรีสะเกษตำบลโพนข่าและตำบลวังหิน ยกเว้นจังหวัดสกลนคร สำหรับตัวอย่างทั้งหมดของจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่าและตำบลวังหินแสดงรูปแบบไอโซไซม์เพียงแบบเดียวคือรูปแบบที่ 1 ส่วนรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบมากที่สุดคือ รูปแบบที่ 3 มี 4 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดสกลนครเพียงจังหวัดเดียว 10 ตัวอย่าง คือ K11, K12, K13, K15, K16, K19, K20, K21, K22 และ K23 สำหรับรูปแบบไอโซ ไซม์ที่ 2- 9 พบว่ามีแถบตั้งแต่ 2 แถบขึ้น ไปพบในตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม อุบลราชธานี และสกลนคร

ตารางที่ 4.5 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH)

เห็ดตีนแรด	**รูปแบบเอนไซม์**	**จำนวนแถบ**
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2,	1, 2,
จังหวัดนครราชสีมา	1	1
จังหวัดอุบลราชธานี	1, 8, 9	1, 2,, 3
จังหวัดศรีสะเกษ(SP)	1	1
จังหวัดศรีสะเกษ(SV)	1	1
จังหวัดสกลนคร	3, 4, 5, 6, 7	4, 3, 3, 3, 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH) จากตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

4.1.4.7 glucose-6-phosphase dehydrogenase (G6PD)

จากการศึกษาเห็ดตีนแรดทั้ง 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ G6PD พบว่ามีแถบไอโซไซม์ทั้งหมด 10 แถบมีค่า R_f ระหว่าง 0.08-0.60

จากตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.12 พบว่า G6PD แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 14 รูปแบบโดยรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบน้อยที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 1 และ 2 มีเพียง 1 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม 35 ตัวอย่างจังหวัดโคราช 15 ตัวอย่างและจังหวัดอุบล 8 ตัวอย่าง ส่วนจำนวนแถบไอโซไซม์ที่มีแถบมากที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 12, 13 และ 14 มี 6 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานีเพียงจังหวัดเดียว ไอโซไซม์รูปแบบที่ 3-14 มีจำนวนแถบตั้งแต่ 2 แถบพบในทุกจังหวัด นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างของจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่าและตำบลวังหินแสดงรูปแบบไอโซไซม์เพียงชนิดเดียวและเหมือนกันคือ รูปแบบไอโซไซม์ที่ 7

4.1.4.8 lactate dehydrogenase (LDH)

จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ LDH พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ 8 แถบ มีค่า R_f ระหว่าง 0.14-0.41

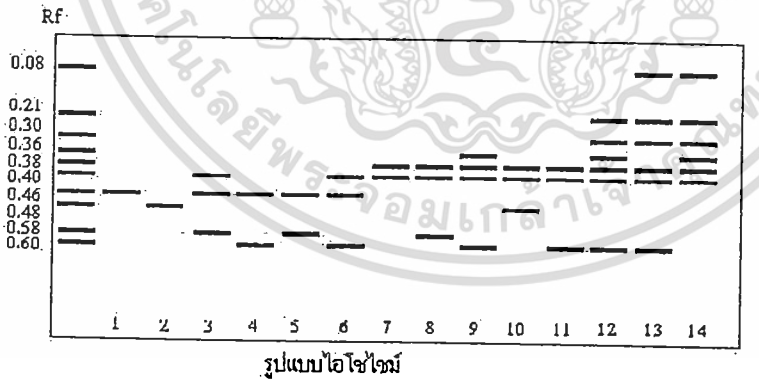
จากตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.13 พบว่า LDH แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 12 รูปแบบ โดยรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบที่น้อยที่สุดคือรูปแบบที่ 3, 8-10 มีเพียง 1 แถบ พบในทุกจังหวัด ส่วนไอโซไซม์รูปแบบ 1-2, 4-7, 11 และ 12 มีจำนวนแถบตั้งแต่ 2 แถบขึ้นไป สำหรับรูปแบบไอโซไซม์ที่พบแถบมากที่สุดคือ รูปแบบไอโซไซม์ที่ 4, 6 และ 7 มี 4 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม 1 ตัวอย่าง คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

M26 และตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 9 ตัวอย่าง คือ Un5, Un8, Un10, Un12, Un27, Un28, Un29, Un30, Un31 นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างจังหวัดสกลนคร และศรีสะเกษตำบลวังหินแสดงรูปแบบไอโซไซม์เพียงแบบเดียวและเหมือนกันคือรูปแบบที่ 9

ตารางที่ 4.6 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ glucose–6-phosphase dehydrogenase (G6PD)

เห็ดตีนแรด	รูปแบบเอนไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 1, 3, 2, 2, 3
จังหวัดนครราชสีมา	1, 2, 10	1, 1, 3
จังหวัดอุบลราชธานี	2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,14	1, 2, 3, 4, 3, 3, 6, 6, 6
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	7	2
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	7	2
จังหวัดสกลนคร	7, 8, 9, 11,	2, 3, 4, 3

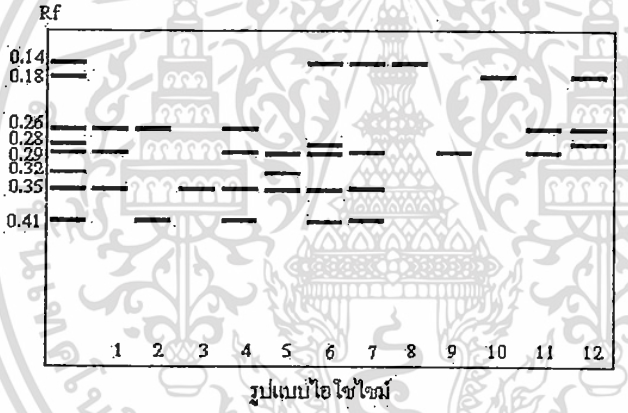


ภาพที่ 4.12 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ glucose-6-phosphase dehydrogenase (G6PD) จากตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH)

เห็ดตีนแรด	รูปแบบไอโซไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2, 3, 4	3, 2, 1, 4
จังหวัดนครราชสีมา	3, 8, 10, 12	1, 1, 1, 3
จังหวัดอุบลราชธานี	1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	1, 4, 3, 4, 4, 1, 1, 1, 2
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	9, 11	1, 2
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	9	1
จังหวัดสกลนคร	9	1



ภาพที่ 4.13 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) จากตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

4.1.4.9 malate dehydrogenase (MDH)

จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ MDH พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ทั้งหมด 13 แถบ มีค่า R_f ระหว่าง 0.06-0.79

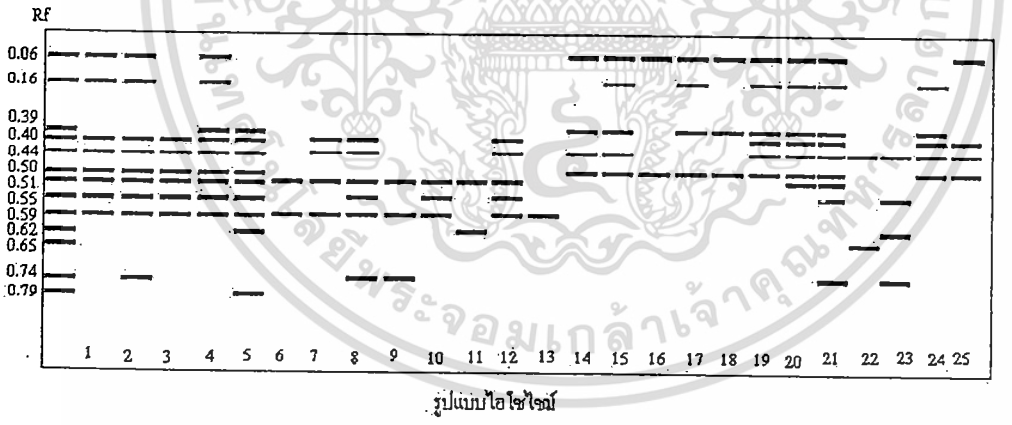
จากตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.14 พบว่า MDH แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 25 รูปแบบ โดยรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบไอโซไซม์ที่น้อยที่สุดคือรูปแบบที่ 13 มีเพียง 1 แถบ พบเพียง 1ตัวอย่างในจังหวัดอุบลราชธานีคือ U20 ส่วนรูปแบบไอโซไซม์ 1-12 และ 14-25 มีจำนวนแถบตั้งแต่ 2 แถบขึ้นไป สำหรับจำนวนแถบไอโซไซม์ที่มากที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 4 และ 21 มี 9 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มหาสารคาม 1 ตัวอย่างคือ M10 และตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 6 ตัวอย่าง คือ Un26, Un33, Un34, Un48, Un49, Un51 และตัวอย่างจังหวัดสกลนคร 2 ตัวอย่างคือ K15 และ K16

ตารางที่ 4.8 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ malate dehydrogenase (MDH)

เห็ดตีนแรด	รูปแบบเอนไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2,	1, 2,
จังหวัดนครราชสีมา	1	1
จังหวัดอุบลราชธานี	1, 8, 9	1, 2,, 3
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	1	1
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	1	1
จังหวัดสกลนคร	3, 4, 5, 6, 7	4, 3, 3, 3, 2



ภาพที่ 4.14 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ malate dehydrogenase (MDH) ของตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

4.1.4.10 laccase

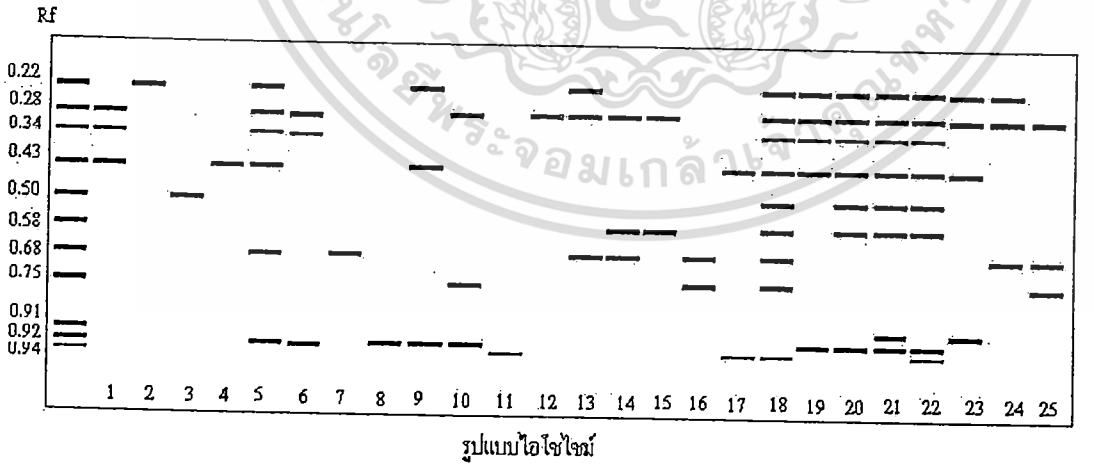
จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ laccase พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ 11 แถบ มีค่า R_f ระหว่าง 0.22-0.94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.15 พบว่า laccase แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 25 รูปแบบ โดยรูปแบบที่มีแถบน้อยที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 2, 3, 7, 8, 11 และ 12 มีจำนวนแถบเพียง 1 แถบ พบในตัวอย่าง 4 จังหวัดคือ มหาสารคาม, นครราชสีมา, ศรีสะเกษ และสกลนคร แต่ไม่พบในตัวอย่างของจังหวัดอุบลราชธานี ส่วนรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบมากที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 18, 21 และ 22 มี 8 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 1 ตัวอย่างคือ U8 และตัวอย่างจังหวัดนครราชสีมา 3 ตัวอย่างคือ N6, N8 และN10

ตารางที่ 4.9 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ laccase

เห็ดตีนแรด	รูปแบบเอนไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	3, 1, 1, 2, 6, 3, 1, 1, 3, 3, 1
จังหวัดนครราชสีมา	5, 6, 9, 19, 20, 21, 22, 23	6, 3, 3, 5, 7, 8, 8, 4
จังหวัดอุบลราชธานี	6, 13, 16, 17, 18, 19	3, 3, 2, 2, 8, 5
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	7, 12, 13, 24	1, 1, 3, 3
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	13, 15, 25	3, 2, 3
จังหวัดสกลนคร	7, 12, 13, 14, 15, 16, 25	1, 1, 3, 3, 2, 2, 3



ภาพที่ 4.15 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ laccase จากตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4.11. Esterase (EST)

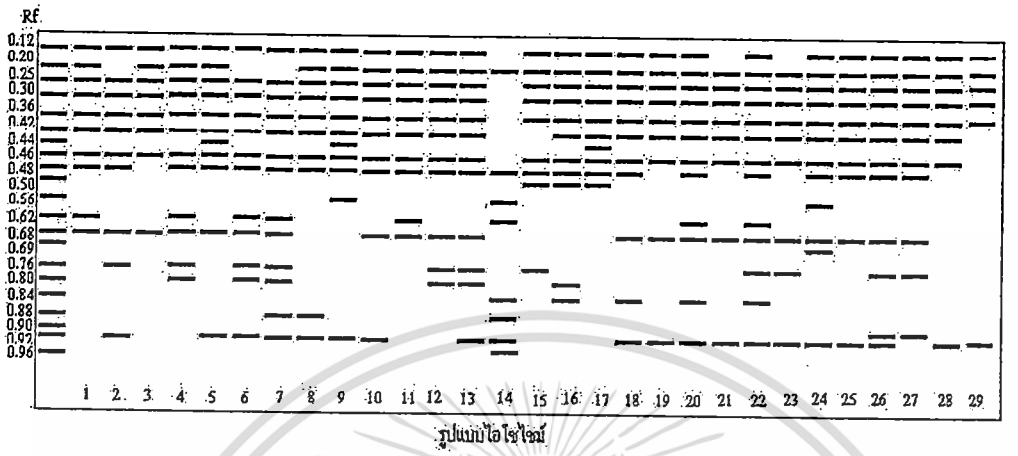
จากการศึกษาเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรดทั้ง 5 จังหวัดด้วยเอนไซม์ EST พบว่ามีแถบไอโซไซม์ปรากฏทั้งหมด 21 แถบ โดยมีค่า R_f ระหว่าง 0.12 – 0.96

จากตารางที่ 4.10 และภาพที่ 4.16 พบว่า EST แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 51 รูปแบบ และมีแถบไอโซไซม์ทั้งหมด 21 แถบ โดยทุกรูปแบบไอโซไซม์มีจำนวนแถบมากกว่า 1 แถบ รูปแบบที่มีแถบน้อยที่สุดคือรูปแบบที่ 29 และ 31 มีแถบไอโซไซม์จำนวน 6 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 2 ตัวอย่างคือ U39 และ U47 และตัวอย่างจังหวัดสกลนคร 1 ตัวอย่างคือ K52 ส่วนรูปแบบไอโซ ไซม์ที่แถบมากที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 42 มี 14 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานีเพียง 1 ตัวอย่างคือ U8

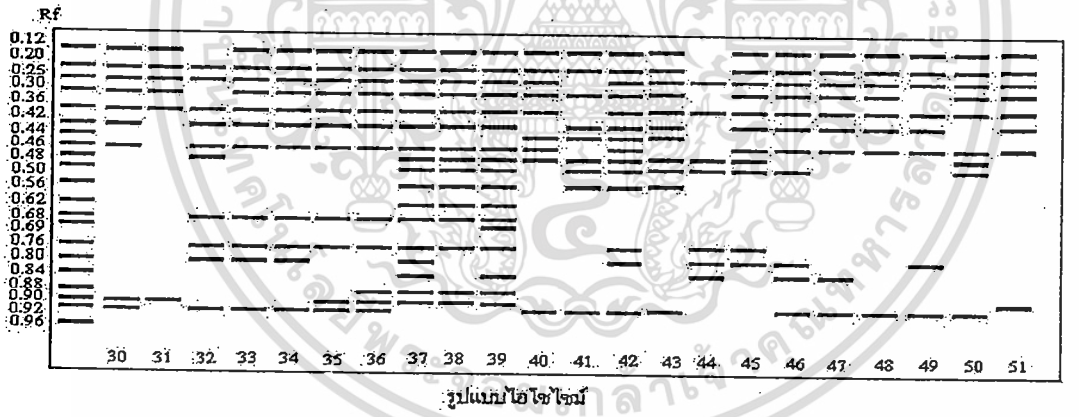
ตารางที่ 4.10 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase (EST)

เห็ดตีนแรด	**รูปแบบเอนไซม์**	**จำนวนแถบ**
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12, 13, 14,	10, 10, 7, 12, 11, 12, 13, 10, 11, 10, 10, 10, 12, 8
จังหวัดนครราชสีมา	15, 16, 17, 44, 45,	9, 11, 10, 7, 11
จังหวัดอุบลราชธานี	19, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43	9, 11, 10, 8, 6, 9, 6, 10, 12, 11, 11, 12, 13, 11, 12, 9, 9, 14, 11
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	46, 47, 48, 49, 50	11, 9, 8, 8, 9
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	46, 47, 51	11, 9, 8
จังหวัดสกลนคร	7, 12, 13, 14, 15, 16, 25	13, 10, 12, 8, 9, 11, 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.16 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase (EST) ของตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง



ภาพที่ 4.16 (ต่อ) รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase (EST) ของตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการจัดหมวดหมู่ตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์ผลของรูปแบบไอโซไซม์จากเอนไซม์ทั้งหมด 8 ชนิด โดยการ score ด้วย "0" คือไม่ปรากฏแถบไอโซไซม์ และ "1" คือปรากฏแถบไอโซไซม์ของตัวอย่างทั้งหมด 138 ตัวอย่าง (ภาคผนวก) นำค่าที่ได้ของตัวอย่างทั้งหมดไปวิเคราะห์และจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.0 โดยใช้โปรแกรม SIMQUAL คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน ด้วยวิธี simple matching หรือ SM (ภาคผนวก) จากนั้นสร้าง phenogram ด้วยวิธีการคำนวณแบบ UPGMA โดยโปรแกรม SAHN พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของตัวอย่างทั้งหมด 138 ตัวอย่างอยู่ระหว่าง 0.67 – 1.00 ซึ่งสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.67 ได้แก่

กลุ่มที่1เป็นตัวอย่างจากจังหวัดมหาสารคามจังหวัดนครราชสีมาทุกตัวอย่างและจังหวัดอุบลราชธานี โดยในตัวอย่างกลุ่มที่ 1 สามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.73 กลุ่มย่อยที่1.1ได้แก่ตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม 35 ตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 8 ตัวอย่าง และจังหวัดนครราชสีมาทุกตัวอย่าง กลุ่มย่อยที่ 1.2 นั้นประกอบด้วยตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม 4 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดศรีษะเกษทั้ง 2 ตำบลและตัวอย่างจังหวัดสกลนคร โดยตัวอย่างกลุ่มที่ 2 สามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.76 ซึ่งกลุ่มย่อยที่ 2.1 เป็นตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 28 ตัวอย่าง จังหวัดศรีษะเกษทั้ง 2 ตำบล และจังหวัดสกลนครทุกตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างกลุ่มย่อยที่ 2.2 เป็นตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 2 ตัวอย่าง(ตารางที่ 4.11 และ ภาพที่ 4.17)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 กลุ่มตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลไซโมแกรม

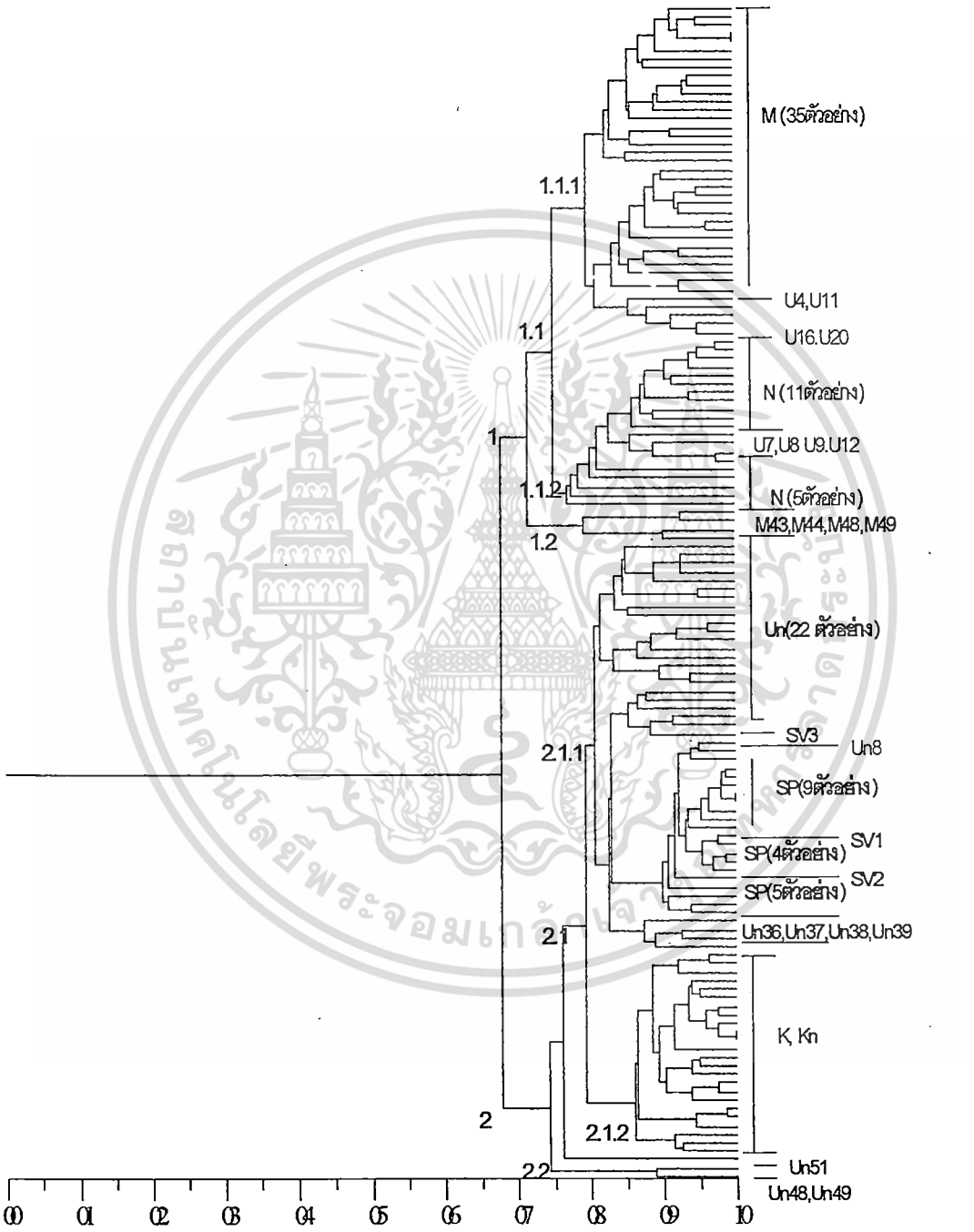
กลุ่มตัวอย่างหลัก	กลุ่มตัวอย่างย่อย	กลุ่มตัวอย่างย่อย	กลุ่มตัวอย่าย่อย	ตัวอย่าง
กลุ่มที่ (SM=0.67)	1.1 (SM=0.73)	1.1.1	1.1.1.1	M24, M25, M26, M27, M29, M31, M32, M34, M35, M37, M38, M39, M40, M41, M42, M45, M46,
			1.1.1.2	M4, M5, M7, M10, M12, M13, M14, M15, M17, M18, M19, M21, M22, M23, M28 M30, M36, M47, U4, U11, U16, U20
		1.1.2	N3, N5, N6, N7, N8, N10, N12, N16, N18, N21, N22, N23, N26, N33, N35, N39, U7,U8, U9, U12	
	1.2 (SM= 0.73)	M43, M44, M48, M49		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11(ต่อ)

กลุ่มตัวอย่างหลัก	กลุ่มตัวอย่างย่อย	กลุ่มตัวอย่างย่อย	กลุ่มตัวอย่างย่อย	ตัวอย่าง
กลุ่มที่ 2 (SM=0.74)	2.1 (SM=0.76)	2.1.1	2.1.1.1	Un1, Un4, Un5, Un6, Un8, Un10, Un12, Un26, Un28, Un29, Un30, Un31, Un33, Un34, Un42, Un43, Un52, Un53
				Un27, Un32 , Un46, Un47, Un50, SV3, SV7, SV8, SP2, SP3, SP5, SP6, SP7, SP8, SP26, SP27, SP30, SP31, SP32, SP33, SP36, SP38, SP40, SP41, SP42, SP43, Un36, Un37, Un38, Un39
			2.1.1.2	K6, K7, K9, K12, K13, K14, K20 , K34, Kn11, Kn12, Kn13, Kn14, Kn15, Kn16, Kn17, Kn19, Kn20, Kn21, Kn22, Kn23, Kn24, Kn28, Kn30, Kn33
		2.1.2	Un51	
	2.2 (SM=0.76)	Un48, Un49		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.17 Phenogram ของเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดตีนแรดทั้ง 5 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่า มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก ---- --ขนาดหมวกดอกและขนาดเส้นใยของจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดมหาสารคาม และ จังหวัดอุบลราชธานี มีขนาดใหญ่ กว่าเห็ดจังหวัดสกลนคร และจังหวัดศรีสะเกษ รูปร่างหมวกดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคามมีความคล้ายคลึงกับหมวกดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานี และ สกลนคร โดยมีรูประฆังคว่ำครึ่งวงกลมขอบหมวกดอกไม่ม้วนเข้าด้านใน แตกต่างจากหมวกดอกของจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดศรีสะเกษ ที่มีรูปร่างดอกเป็นแบบเดียวกัน แต่ขอบหมวกดอกม้วนเข้าด้านใน สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ต้องใช้ดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่เพื่อเก็บสปอร์ ดังนั้นขนาดของหมวกดอกเห็ดที่วัดได้เป็นขนาดที่เห็ดเจริญเต็มที่ สำหรับสีของดอกเห็ดนั้นส่วนใหญ่แล้วจะมีสีที่เหมือนกันคือสีเทาขาว ยกเว้นเห็ดจังหวัดนครราชสีมาที่มีสีเทาขาวอมครีม ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บเห็ด หากโดนอุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงเกินไป ความเข้มของสีดอกอาจเปลี่ยนไปได้ (Stamets,1993)) สำหรับสีของรอยพิมพ์สปอร์นั้นไม่มีความแตกต่างกันในเห็ดทุกๆจังหวัด ขนาดและสีของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีขนาดที่แตกต่างกันในด้านความกว้างและความยาวของสปอร์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันในด้านรูปทรงโดยทั่วไปคือรูปร่างกลมรี การศึกษาในลักษณะข้างต้นจึงไม่ชัดเจนพอในการจัดกลุ่มตัวอย่างได้

เส้นใยโมโนคาริออนที่ศึกษา สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่เหมาะสมดียวกัน คือเจริญในวันที่ 21 บนอาหาร PDYB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของตัวอย่าง 138 ตัวอย่างจากเอนไซม์ 11 ระบบ พบว่ามีเอนไซม์ 3 ชนิดคือ IDH ACP และ LAP ไม่ปรากฏแถบไอโซไซม์ในตัวอย่าง จึงไม่ได้นำมาจัดกลุ่มตัวอย่าง การไม่ปรากฏรูปแบบไอโซไซม์ของ IDH และ ACP นั้นให้ผลตรงกับการศึกษาของ เบญจ มาภรณ์บุนนาค (2524) ที่ได้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเห็ดนางฟ้า สำหรับ LAPไม่พบแถบไอโซไซม์จะแตกต่างจากผลศึกษาของ สุภาภรณ์ จาริยวัฒน์ (2541) ที่ศึกษาจากเห็ดตีนแรดจังหวัดขอนแก่นบนตัวกลางงอะกาโรสเจล โดยพบแถบไอโซไซม์ LAP 6 แถบ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากส่วนประกอบของสารที่ใช้ย้อมเจลเพื่อให้เกิดแถบไอโซไซม์มีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน (Evers et al.1983) ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ใช้ตามวิธีของ Pasteur et al.(1988) อีกทั้งเอนไซม์อาจสูญเสียประสิทธิภาพการทำงาน หรืออาจมีปริมาณน้อยในช่วงอายุเส้นใยที่ทำการศึกษา(ส่องแสง,2544)

เอนไซม์ 8 ชนิดจาก 11 ชนิดที่แสดงรูปแบบไอโซไซม์ได้หลายรูปแบบโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ EST MDH และ Laccase รองลงมาได้แก่ G6PD AKP ADH LDH ความหลากหลายรูปแบบที่เกิดขึ้นนี้พบว่า ตรงกับรายงานของ Magae *et. al* (1990) Prillinger and Molitoris (1978) และ Kulkarni *et. al.* (1986) ที่ได้ศึกษาในเห็ดสกุล *Pleurotus* sp. และรายงานของ Labarere & Iracabal(1993) ที่ศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเห็ดใน *Agaricus bisporus* และ *Pleurotus cornucopiae* รูปแบบไอโซไซม์หลายรูปแบบนี้สามารถนำมาจัดแยกกลุ่มตัวอย่างได้ชัดเจน สำหรับเอนไซม์ PGD พบเพียงรูปแบบเดียว

รูปแบบของแถบที่เกิดในเอนไซม์ EST นั้นแถบจะชิดกันมากและบางช่วงซ้อนกันจนมองเห็นเป็นแถบเดียวกัน จากการทดลองของ Magae *et. al* ศึกษาเปรียบเทียบเจลหลายชนิด โดยศึกษาพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น7.5 เปอร์เซ็นต์ กับพอลิอะคริลาไมด์ช่วงเจล 4-5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพอลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ แถบชิดกันและซ้อนกันแต่เมื่อใช้พอลิอะคริลาไมด์ช่วงเจล 4-5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแถบไอโซไซม์มีการกระจายตัวดี และ มีความแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ 7.5 เปอร์เซ็นต์พอลิอะคริลาไมด์เจล ดังนั้นทำให้ผลที่ได้ในบางเอนไซม์อ่านค่าได้ยากอีกทั้งขนาดของเจลที่ใช้มีขนาดที่เล็กกว่า ทำให้แถบไอโซไซม์ที่ได้ เกิดการซ้อนทับกันของแถบไอโซไซม์

การวิเคราะห์และจัดกลุ่มตัวอย่าง พบว่าสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่มใหญ่ ที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.67 กลุ่มที่ 1 นั้น ประกอบด้วยตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม นครราชสีมา และอุบลราชธานี กลุ่มที่ 1 นี้สามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มย่อย ที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.73 กลุ่มย่อยที่ 1.1 ประกอบด้วยจังหวัดมหาสาคาม กลุ่มย่อยที่ 1.2 เป็นตัวอย่างจังหวัดนครราชสีมา โดยมีตัวอย่างของจังหวัดอุบลราชธานีแทรกอยู่ในกลุ่มย่อยทั้งสองกลุ่ม

กลุ่มตัวอย่างที่ 1 นี้เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาทางสันฐานวิทยา พบว่ามีหลายลักษณะที่ใกล้เคียงกันมากคือเป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีหมวกดอกขนาดใหญ่ ขนาดเส้นใยและขนาดสปอร์ใกล้เคียงโดยเฉพาะจังหวัดมหาสารคามและจังหวัดนครราชสีมา แต่รูปทรงของดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคามจะเหมือนดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีมากกว่า อีกทั้งจากการสังเกตเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดทั้ง 3 พบว่า จังหวัดมหาสารคามและนครราชสีมานั้นลักษณะของเส้นใยค่อนข้างหนาและมีสีขาวเจริญได้ดีกว่าจังหวัดอื่นๆสำหรับจังหวัดอุบลราชธานีนั้น ลักษณะของเส้นใยมีหลายลักษณะคือเส้นใยหนา สีขาวเจริญได้ดี และเส้นใยบางสีเทาขาว เจริญช้า ลักษณะพิเศษที่พบเพิ่มเติมคือพบการเกิดตุ่มดอกในตัวอย่างเห็ดของจังหวัดมหาสาคามและจังหวัดอุบลราชธานี โดยที่ตัวอย่างเห็ดของจังหวัดอุบลราชธานีสามารถเกิดตุ่มดอกในอาหารข้าวฟ่าง และ ตัวอย่างเห็ดจังหวัดมหาสาคามสามารถเกิดตุ่มดอกในอาหาร PYDB

ผลการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ประกอบกับลักษณะทางสันฐานวิทยามีความสอดคล้องกัน กลุ่มเห็ดดังกล่าว จึงมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน จึงสมควรจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

กลุ่มตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ได้แก่ตัวอย่างจังหวัดสกลนครจังหวัดศรีสะเกษทั้ง 2 ตำบล และ จังหวัดอุบลราชธานีแยกเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่มที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.76 โดยกลุ่มย่อยที่ 2.1.1.1 ตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นเห็ดของจังหวัดอุบลราชธานี และศรีสะ เกษ กลุ่มย่อยที่ 2.1.1.2 เป็นตัวอย่างเห็ดจากจังหวัดสกลนครทั้งหมด สำหรับเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 2.1.2 และ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มตัวอย่างที่ 2 นี้เมื่อเปรียบเทียบผลของลักษณะสันฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่า มีความใกล้เคียงกัน คือมีหมวกดอกขนาดเล็กกว่ากลุ่มที่ 1 ขนาดเส้นใย และ ขนาดสปอร์ใกล้เคียงกัน ยกเว้นขนาดสปอร์ของจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังข่ามีขนาดใกล้เคียงกลุ่มที่ 1 สีหมวกดอก สีก้านดอก สีรอยพิมพ์สปอร์เหมือนกัน เมื่อพิจราณาลักษณะการเจริญของเส้นใยพบว่าจังหวัดสกลนคร จังหวัดอุบลราชธานี และ จังหวัดศรีสะเกษทั้ง 2 ตำบล เส้นใยมีสีเทาขาว บาง แตกต่างจากกลุ่ม 1 ชัดเจน และไม่พบการเกิดตุ่มดอก ในอาหารเหลวและข้าวฟ่าง ยกเว้นตัวอย่างเห็ดจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งตัวอย่างเห็ดในจังหวัดนี้จะเป็นชนิด Un ผลการวิเคราะห์รูปแบบไอโซ ไซม์ประกอบกับลักษณะทางสันฐานวิทยา มีความสอดคล้องกัน กลุ่มตัวอย่างข้างต้นมีลักษณะพันธุกรรมใกล้เคียงกันจึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

สำหรับตัวอย่างเห็ดจากจังหวัดอุบลราชธานีที่พบแทรกอยู่ในทุกกลุ่มเกือบทุกจังหวัด ยกเว้นจังหวัดสกลนคร ชี้ให้เห็นว่า เห็ดจากจังหวัดอุบลราชธานีมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง ลักษณะเส้นใยแสดงมีทั้งสองลักษณะในแบบเส้นใยหนา สีขาว เจริญดี กับเส้นใยบางสีเทาขาวเจริญช้ากว่า และสามารถออกตุ่มดอกได้ในอาหารข้าวฟ่าง ซึ่งเห็ดตีนแรดโดยธรรมชาติหรือโดยส่วนใหญ่แล้วจะออกดอกเมื่อลงดิน หรือปิดผิวหน้าด้วยดิน และต้องลงก้อนเชื้อที่ประกอบด้วยสูตรอาหารที่สมบูรณ์ คุณสมบัตินี้จึงเป็นลักษณะที่ดีที่ควรพิจารณา เพื่อนำไปใช้ในการผสมพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ผลการศึกษาและวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาจะทำให้การจัดจำแนกตัวอย่างได้ดีและชัดเจนยิ่งขึ้น

4.2 ส่วนที่ 2 : ผลการทดลอง PCR - RFLP

4.2.1 การเจริญเติบโตในอาหารเหลว

จากการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลว 5 ชนิด ได้แก่ พีดีบี (potato dextrose broth), ซีวายเอ็ม (complete yeast media), เอ็มวายจี (malt yeast glucose media), เอ็มอีบี (malt extract broth) และ พีดีวายบี (potato dextrose yeast broth) พบว่าตัวอย่างจากจังหวัดศรีสะเกษและอุบลราชธานี เจริญเติบโตในอาหารพีดีวายบี ได้ดีที่สุดโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ตัวอย่างจากจังหวัดร้อยเอ็ด ปทุมธานี และ นครราชสีมา เจริญเติบโตในอาหารพีดีวายบีได้ดีที่สุดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญจากอาหารเอ็มวายจี ตัวอย่างจากจังหวัดมหาสารคามเจริญ เติบโตในอาหารพีดีวายบีได้มากที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหาร เอ็มวายจีและซีวายเอ็ม ตัวอย่างจากจังหวัดบุรีรัมย์เจริญเติบโตในอาหารพีดีวายบีดีที่สุดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารเอ็มวายจี ซีวายเอ็ม และ เอ็มอีบี ตัวอย่างจากศูนย์เพาะเห็ดอรัญญิกเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารเอ็มอีบี แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารพีดีวายบี แสดงตามตารางที่ 4.12

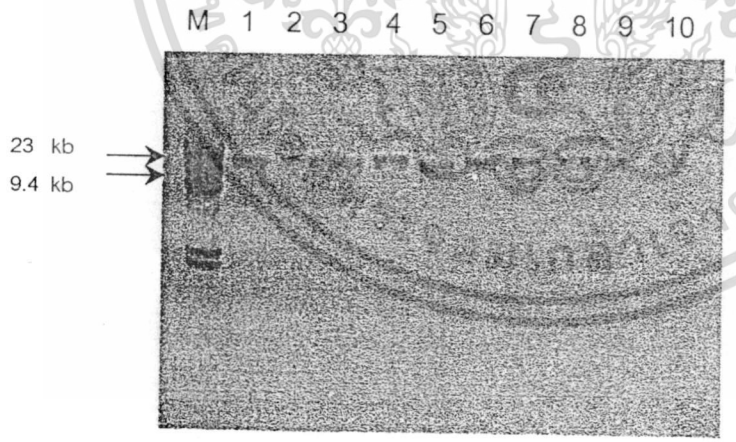
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ชนิด

ชนิดอาหาร / ตัวอย่าง	พีดีบี (กรัม)	พีดีวายบี (กรัม)	เอ็มวายจี (กรัม)	เอ็มอีบี (กรัม)	ซีวายเอ็ม (กรัม)
ศรีสะเกษ	0.9093	2.0565	1.7381	1.4223	1.3149
นครราชสีมา	0.8960	1.6616	1.6136	1.0890	0.9748
ปทุมธานี	0.9623	2.3968	2.1229	1.9583	1.5971
มหาสารคาม	0.3038	0.5767	0.4877	0.3818	0.4452
ร้อยเอ็ด	1.2142	2.2988	2.0973	1.3344	1.7505
สกลนคร	1.1018	1.7388	1.6690	1.9342	1.3603
บุรีรัมย์	1.1673	1.1894	0.9895	0.8898	0.8826
อุบลราชธานี	0.0635	2.1541	0.4581	1.5381	1.4990
อรัญญิก	1.2946	2.3598	1.9771	2.1736	1.5413

4.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธี Cenis (1992) ในเห็ดตีนแรดทั้ง 9 ตัวอย่างพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



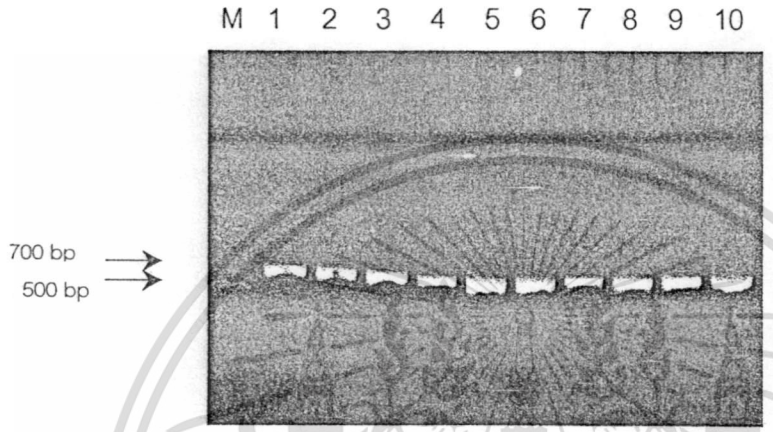
ภาพที่ 4.18 แถบ genomic DNA ของเส้นใยเห็ดตีนแรด จากจังหวัดต่างๆ

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ 4. จังหวัดนครราชสีมา
5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6.จังหวัดสกลนคร 7.จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก)
8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า 10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ

ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS โดยบริเวณ ITS จะอยู่ระหว่างไรโบโซมอลหน่วยเล็กและ ไรโบโซมอลหน่วยใหญ่ นอกจากนี้บริเวณ ITS ยังรวมถึง 5.8S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอไปด้วย ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอได้มีขนาด 741 คู่เบส (ภาพที่ 4.19)



ภาพที่ 4.19 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ ITS ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ
1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6.จังหวัดสกลนคร
7. จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII

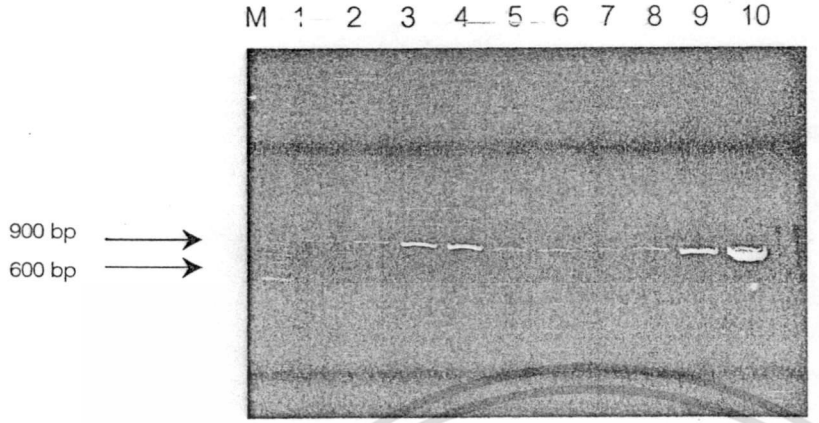
ส่วนบริเวณ IGS อยู่ระหว่างปลาย 3′ของไรโบโซมอลหน่วยใหญ่และปลาย 5′ ของบริเวณ 5S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอใช้ไพรเมอร์ O1 และ LR12R เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอได้มีขนาด 933 คู่เบส (ภาพที่ 4.20)

4.2.4 ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP)

4.2.4.1 ดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ ITS

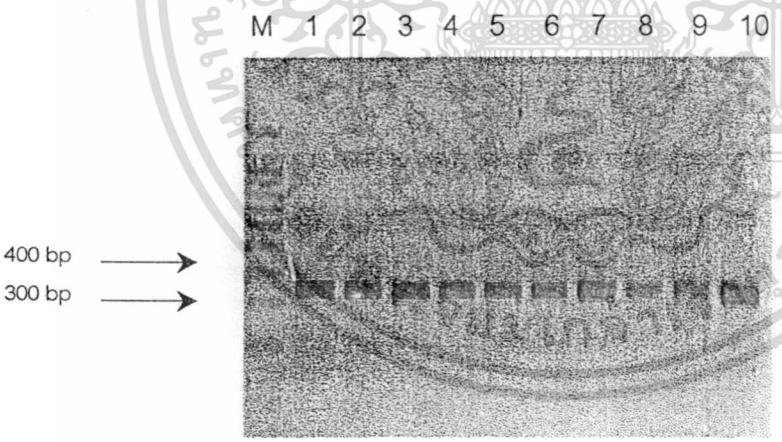
ในการย่อยดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *Eco*RI, *Hind*III, *Hae*III, *Dde*I และ *Hinf*I พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีความหลากหลาย ยกเว้นดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI จะมีขนาด 316 คู่เบสเหมือนกันในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 4.21)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.20 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ IGS ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6.จังหวัดสกลนคร
7.จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII

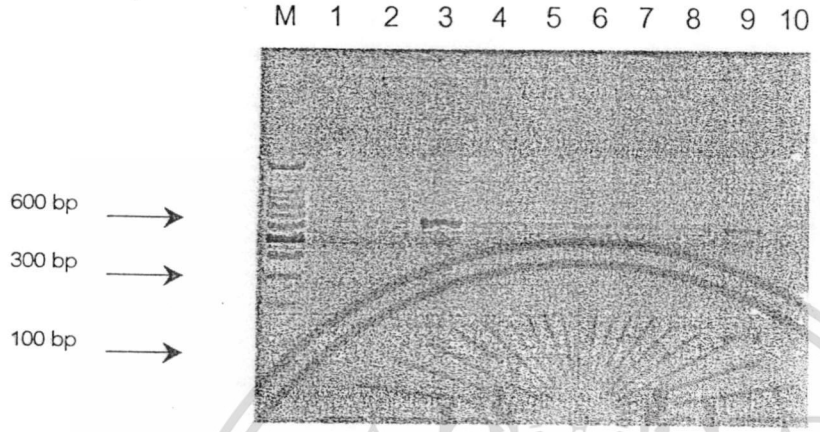


ภาพที่ 4.21 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR*I ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6.จังหวัดสกลนคร
7.จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนาง
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ *Hind*III ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบดีเอ็นเอขนาด 490 คู่เบส และ 295 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 1 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเหมือนกันหมด ในตัวอย่างที่ 9 – 10 ขนาดดีเอ็นเอที่พบมี 135 คู่เบส (ภาพที่ 4.22)



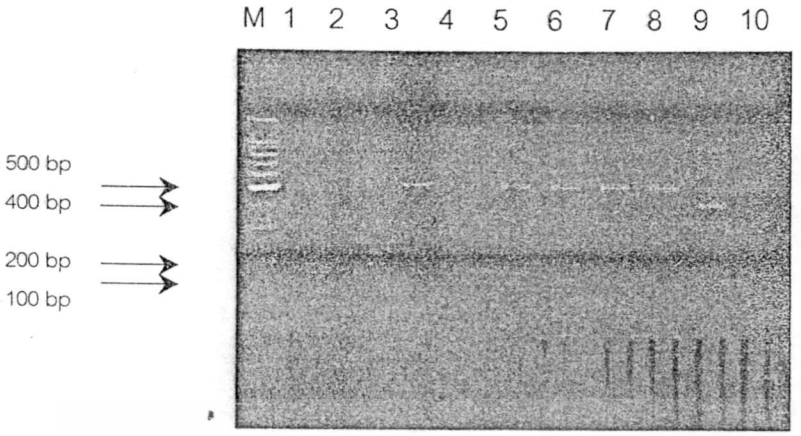
ภาพที่ 4.22 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6. จังหวัดสกลนคร
7.จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /*Hind*III

เอนไซม์ *Hae*III ย่อยดีเอ็นเอได้ 3 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาดดีเอ็นเอ 174 คู่เบส และ 126 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 1 และ 10 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอแถบเดียวขนาด 588 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 2 – 8 แบบที่ 3 พบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 398, 174 และ 155 คู่เบส (ภาพที่ 4.23)

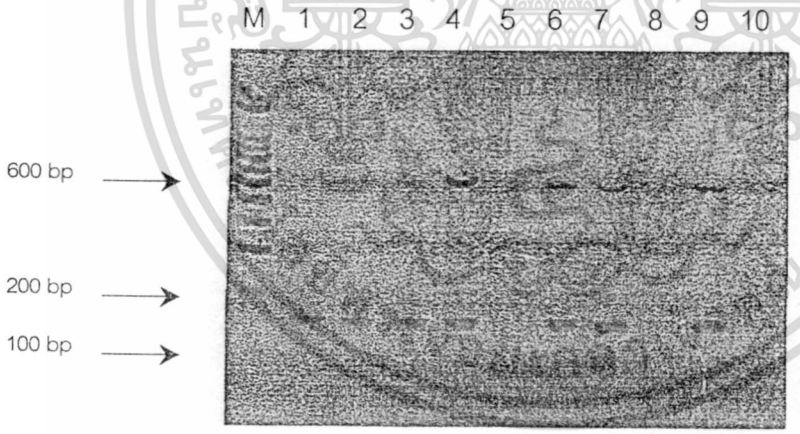
เอนไซม์ *Dde*I ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 661 คู่เบส และ 135 คู่เบสในตัวอย่าง 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 324 คู่เบส และ 229 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 5, 8 และ 10 (ภาพที่ 4.24)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.23 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ

1 . จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา. 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6.จังหวัดสกลนคร
7. จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII

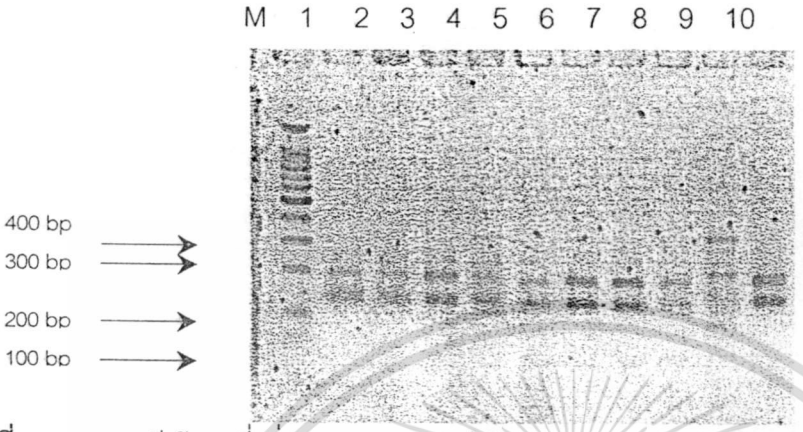


ภาพที่ 4.24 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6. จังหวัดสกลนคร
7.จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ *Hinf*I ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบดีเอ็นเอขนาด 324 คู่เบส และ 209 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 9 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอขนาด 186 คู่เบส และ 132 คู่เบส ในตัวอย่าง 1 – 8 และ 10 (ภาพที่ 4.25)



ภาพที่ 4.25 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ ดังนี้

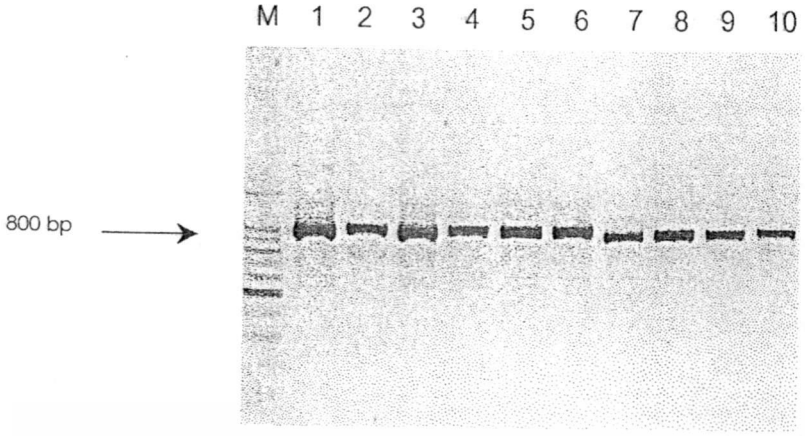
1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6. จังหวัดสกลนคร
7.จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII

4.2.4.2 **ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มขยายบริเวณ IGS**

เมื่อย่อยดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดดังกล่าวมาข้างต้น พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีความหลากหลายยกเว้นดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI จะมีขนาด 891คู่เบสในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 4.26)

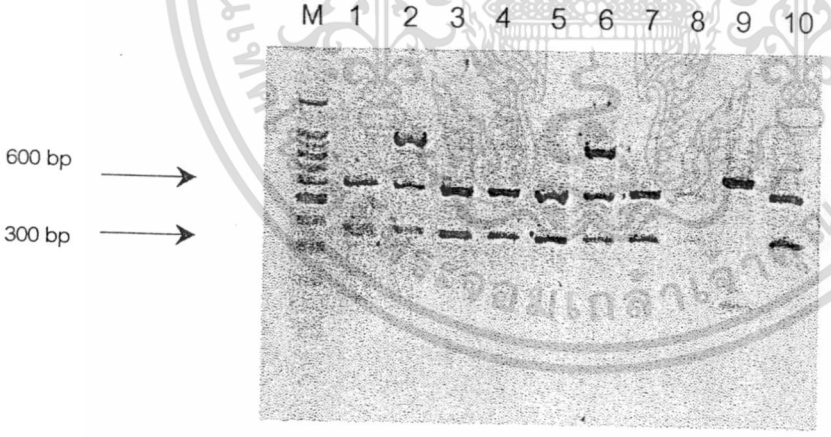
เอนไซม์ *Hind*III ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 676 คู่เบส และ 170 คู่เบสในตัวอย่างที่ 9 แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 617 คู่เบส และ 339 คู่เบส ในตัวอย่างที่เหลือ (ภาพที่ 4.27)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.26 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR*I ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6. จังหวัดสกลนคร
7.จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII

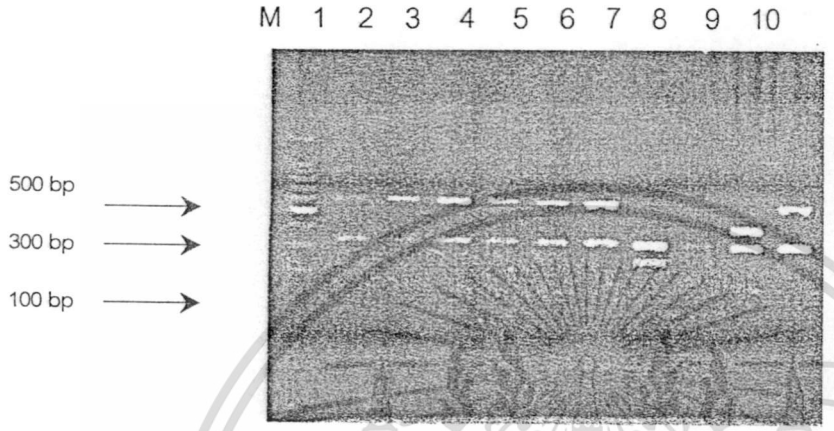


ภาพที่ 4.27 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ของเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆ

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6. จังหวัดสกลนคร
7.จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ *Hae* III ย่อยดีเอ็นเอได้ 3 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 398 คู่เบส, 316 คู่เบส และ186 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 9 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 316 คู่เบส และ234 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 7 และ 8 แบบที่ 3 พบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 602 คู่เบส, 316 คู่เบส และ234 คู่เบสในตัวอย่างที่เหลือ (ภาพที่ 4.28)



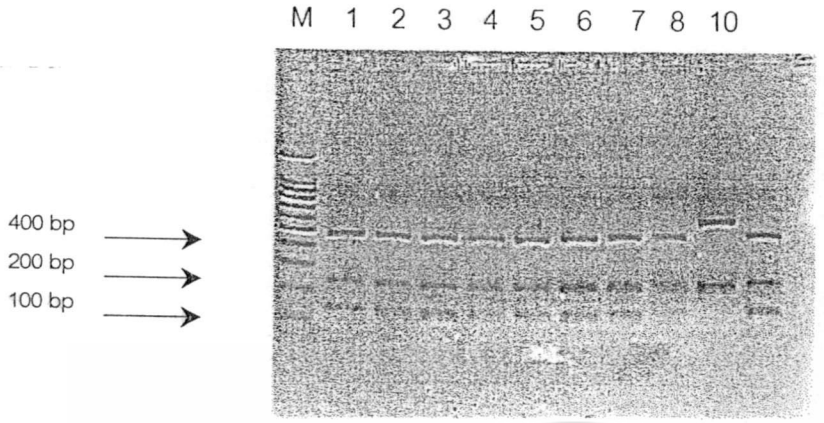
ภาพที่ 4.28 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III ของเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆ

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6. จังหวัดสกลนคร
7.จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII

เอนไซม์ *Dde*I ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 537 คู่เบส และ 209 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 9 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 427 คู่เบส, 209 คู่เบส และ 160 คู่เบส ในตัวอย่างที่เหลือ (ภาพที่ 4.29)

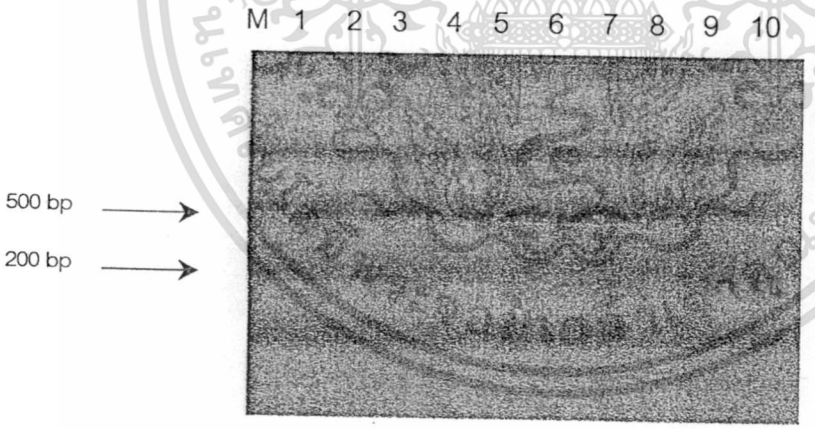
เอนไซม์ *Hinf*I ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 169 คู่เบส, 132 คู่เบส และ 83 ในตัวอย่างที่ 9 และ 10 แบบที่ 2 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 417 คู่เบส และ 169 คู่เบส ในตัวอย่างที่เหลือ (ภาพที่ 4.30)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.29 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I ของเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆ

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6. จังหวัดสกลนคร
7.จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII



ภาพที่ 4.30 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I ของเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆ

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6. จังหวัดสกลนคร
7.จังหวัดกรุงเทพฯ(อรัญญิก) 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker /HindIII

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.5 การวิเคราะห์ผล RFLP ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

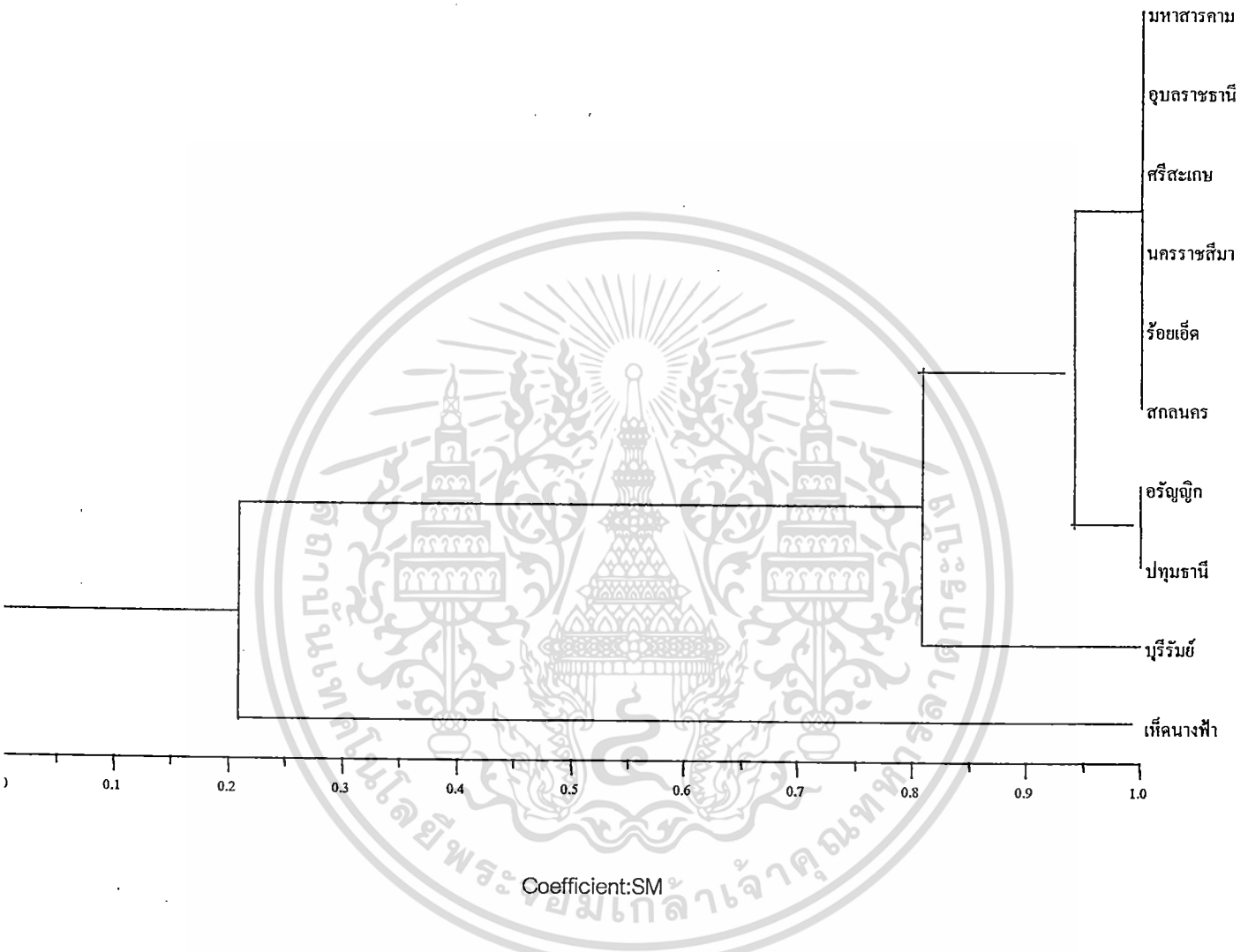
จากการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ WinBoot วิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดทั้ง 9 ตัวอย่าง จากเทคนิค RFLP โดยนำแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 169 แถบซึ่งกำหนดสัญ ลักษณ์ 1 แทนการเกิดแถบดีเอ็นเอและสัญลักษณ์ 0 แทนการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ (ตารางภาคผนวก) มาคำนวณหาค่าดัชนีความคล้ายคลึงกัน (similarity index) ได้ดังตารางที่ 4.13 เมื่อสร้างเดนโดรแกรมโดยวิธี UPGMA (Sneath and Sokal. 1973) เดนโดรแกรมที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 1.000 – 0.8 (ภาพที่ 4.31) สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือกลุ่ม 1 ประกอบด้วยเห็ดตีนแรดจาก 9 จังหวัด และ กลุ่ม 2 คือเห็ดนางฟ้าซึ่งนำมาศึกษาเปรียบเทียบ โดยในกลุ่ม 1 จะแยกออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือกลุ่ม I ประกอบด้วย เห็ดตีนแรดจากจังหวัดมหาสารคาม เห็ดตีนแรดจากจังหวัดอุบลราชธานี เห็ดตีนแรดจากจังหวัดศรีสะเกษ เห็ดตีนแรดจากจังหวัดนครราชสีมา เห็ดตีนแรดจากจังหวัดสกลนคร และ เห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด กลุ่ม II ประกอบด้วย เห็ดตีนแรดจากศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอรัญญิก และ เห็ดตีนแรดจากจังหวัดปทุมธานี กลุ่ม III ประกอบด้วยเห็ดตีนแรดจากจังหวัดบุรีรัมย์ เมื่อเปรียบเทียบเห็ดตีนแรดกลุ่ม I และกลุ่ม II ซึ่งถูกจัดแยกกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.94 กลุ่ม III ที่แยกจากกลุ่ม II มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.94 สำหรับเห็ดตีนแรดในกลุ่ม III และ กลุ่ม I มีสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.8

ตารางที่ 4.13 ค่า Similarity Index ของแถบดีเอ็นเอเห็ดตีนแรด

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.000									
2	0.824	1.000								
3	0.824	1.000	1.000							
4	0.824	1.000	1.000	1.000						
5	0.706	0.882	0.882	0.882	1.000					
6	0.824	1.000	1.000	1.000	0.882	1.000				
7	0.794	0.971	0.971	0.971	0.853	0.971	1.000			
8	0.676	0.853	0.853	0.853	0.971	0.853	0.882	1.000		
9	0.294	0.353	0.353	0.353	0.235	0.353	0.382	0.265	1.000	
10	0.706	0.706	0.706	0.706	0.824	0.706	0.676	0.794	0.353	1.000

* หมายเลขแสดงชนิดของเห็ดตีนแรดในตารางภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.31 เดนโดรแกรมของการจัดกลุ่มเห็ดตีนแรด โดยวิธี UPGMA ในโปรแกรม WinBoot

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาในส่วนที่ 2 นี้ อาหารเหลวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเส้นใยในทุกตัวอย่างของเห็ด ให้ผลเจริญได้ดีในอาหาร PDYB เช่นเดียวกันกับเห็ดที่ได้ทดลองในส่วนที่ 1 อาหารจึงมีความสำคัญเนื่องจากถ้าไม่ใช้อาหารที่เหมาะสมแล้วจะทำให้เส้นใยเจริญช้าและต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการมากขึ้นด้วย เช่น เส้นใยจะมีผนังหนาขึ้น ซึ่งนอกจากจะทำให้การสกัดดีเอ็นเอให้ผลได้ไม่ดีเท่าที่ควรแล้วยังทำให้มีโอกาสที่จะปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ อีกด้วย

การสกัดดีเอ็นเอนั้น ภายหลังการสกัด ควรจะมีการคำนวนหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายปริมาณ ผลของการสกัดดีเอ็นเอ ที่ทดลองได้มี 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนพอควร ปริมาณดีเอ็นเอที่มากเกินไป จะทำให้ขั้นตอนของการ denature ไม่สามารถแยกดีเอ็นเอสายคู่ออกจากกันได้ ทำให้มีผลเสียต่อการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอตามที่ต้องการ นอกจากนี้ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอปริมาณของแมกนีเซียมคลอไรด์ซึ่งใช้ในการเกิดปฏิกิริยาก็จะมีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเพิ่มขยายด้วย

อุณหภูมิในการ annealing จะคำนวนจากค่า Tm ของไพรเมอร์ ในบางกรณีอาจมีการลดอุณหภูมิในการ annealing ลง เพื่อส่งเสริมให้เกิดการจับกันระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มขยาย แต่ถ้าลดอุณหภูมิในการ annealing ลงมากเกินไปจะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีความเฉพาะหรือไม่ใช่แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากบริเวณที่ต้องการศึกษา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดตีนแรดจากทั้ง 9 จังหวัดที่นำมาศึกษาจัดเป็นเห็ดในสปีชีส์เดียวกันถึงจะมีความแตกต่างกันบ้าง แต่ก็ไม่ชัดเจนพอที่จะจัดจำแนกออกเป็นกลุ่ม นอกจากนี้แล้วลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันดังกล่าวก็อาจจะเกิดจากสภาพสิ่งแวดล้อมในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน การตรวจสอบในระดับยีน ที่ใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์จึงมีความเหมาะสมในการตรวจสอบมากกว่า

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี UPGMA ในโปรแกรม WinBoot เดนโดรแกรมที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันในช่วง 1.000 – 0.8 ซึ่งจัดว่าเป็นการจัดกลุ่มได้ดี เห็ดตีนแรดถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยตามแหล่งกำเนิดทางสภาพภูมิศาสตร์ โดยเห็ดตีนแรดที่มีแหล่งกำเนิดจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกจัดอยู่ในกลุ่ม I มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.94 ประกอบด้วยเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะ เกษ เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครและเห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด ยกเว้นเห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์เท่านั้นที่ถูกจัดแยกอยู่ในกลุ่ม III ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.8 ทั้งที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเช่นเดียวกับเห็ดตีนแรดในกลุ่ม I เมื่อพิจารณาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเห็ดตีนแรดจากจังหวัดบุรีรัมย์ พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับเห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา และเห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ดในกลุ่ม I แต่มีความแตกต่างจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัณฐานวิทยาไม่มีความสอดคล้องกับแหล่งกำเนิดหรือมีความสอดคล้องกันเพียงบางส่วน ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากความผันแปรทางพันธุกรรมในเห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์ ดังนั้นการแยกกลุ่มของเห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์จึงอาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน ส่วนในกลุ่ม II ซึ่งประกอบด้วยเห็ดตีนแรดจากศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอรัญญิก และเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.94 การจัดเห็ดในกลุ่มนี้มีความสอดคล้องกับแหล่งกำเนิดเพราะเห็ดทั้งสองชนิดมีแหล่งกำเนิดมาจากภาคกลางเหมือนกัน

4.3 ส่วนที่ 3 : ผลการทดลองระบบการผสมพันธุ์และมัลทิเพิลอัลลีล

4.3.1 การศึกษาอัตราการเจริญของเส้นใยเส้นใยโมโนคาริออน

จากการศึกษาอัตราการเจริญของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดตีนแรดจาก 6 จังหวัด ทั้งหมด 10 ดอก ดอกละ 30 ไอโซเลท เพาะเลี้ยงเส้นใยบนอาหารพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน พบว่าเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดแต่ละดอกมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.14 – 4.23 จากนั้นคัดเลือกเส้นใยโมโนคาริออนที่มีอัตราการเจริญดีที่สุดดอกละ 12 ไอโซเลท เพื่อนำไปศึกษาระบบการผสมพันธุ์ต่อไป ดังนี้

จังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 2 3 5 7 8 10 11 14 15 23 26 27

จังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 4 6 10 11 12 13 14 15 16 17 22 26

จังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 4 15 19 20 21 22 23 24 25 26 27 30

จังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 1 2 4 6 7 10 11 12 13 17 26 28

จังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 2 3 4 5 9 10 12 14 17 18 22 24

จังหวัดสกลนครดอกที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 2 3 5 7 8 9 11 12 14 23 25 29

จังหวัดสกลนครดอกที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 4 6 7 10 12 13 14 15 16 19 20 29

จังหวัดมหาสารคาม ได้แก่ ไอโซเลทที่ 2 3 4 7 8 9 10 11 12 19 21 28

จังหวัดศรีสะเกษ ได้แก่ ไอโซเลทที่ 3 12 16 18 21 22 23 24 26 27 29 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(เซนติเมตร)		อัตราการเจริญเติบโต
	เส้นใยอายุ 3 วัน	เส้นใยอายุ 12 วัน	(เซนติเมตร/วัน)
1	1.20	5.00	0.42
2	0.90	5.50	0.51
3	1.37	6.37	0.56
4	0.63	4.00	0.37
5	0.83	6.23	0.60
6	0.90	5.40	0.50
7	0.93	5.97	0.56
8	1.30	6.03	0.53
9	0.97	4.60	0.40
10	1.23	7.00	0.64
11	1.23	6.33	0.57
12	1.20	5.67	0.50
13	0.97	5.43	0.50
14	1.20	7.43	0.69
15	0.93	6.70	0.64
16	1.10	4.60	0.39
17	1.10	4.80	0.41
18	1.00	4.90	0.43
19	1.00	4.70	0.41
20	0.70	4.57	0.43
21	1.23	5.73	0.50
22	0.90	5.47	0.51
23	1.33	6.57	0.58
24	1.13	5.40	0.47
25	1.20	5.40	0.47
26	1.27	6.23	0.55
27	1.20	6.00	0.53
28	1.07	5.50	0.49
29	1.27	5.70	0.49
30	1.10	5.33	0.47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(เซนติเมตร)		อัตราการเจริญเติบโต
	เส้นใยอายุ 3 วัน	เส้นใยอายุ 12 วัน	(เซนติเมตร/วัน)
1	1.17	6.33	0.57
2	0.90	6.70	0.64
3	1.00	5.53	0.50
4	0.70	7.23	0.73
5	0.83	6.70	0.65
6	0.87	7.10	0.69
7	0.83	6.63	0.64
8	1.30	6.00	0.52
9	0.70	5.50	0.53
10	0.87	7.20	0.70
11	1.03	7.07	0.67
12	1.30	7.13	0.65
13	0.80	6.97	0.69
14	0.83	7.20	0.71
15	0.60	6.90	0.70
16	0.90	7.03	0.68
17	1.17	7.33	0.69
18	1.23	6.23	0.56
19	0.93	5.50	0.51
20	1.00	6.77	0.64
21	1.30	6.23	0.55
22	1.00	7.00	0.67
23	1.00	6.23	0.58
24	1.20	6.27	0.56
25	0.50	5.40	0.54
26	1.30	7.13	0.65
27	1.30	6.40	0.57
28	1.23	7.03	0.64
29	0.97	5.03	0.45
30	0.57	4.00	0.38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(เซนติเมตร)		อัตราการเจริญเติบโต
	เส้นใยอายุ 3 วัน	เส้นใยอายุ 12 วัน	(เซนติเมตร/วัน)
1	0.83	4.23	0.38
2	1.30	5.53	0.47
3	1.13	6.37	0.58
4	1.13	6.60	0.61
5	1.07	6.73	0.63
6	1.17	4.47	0.37
7	0.70	6.23	0.61
8	0.77	5.67	0.54
9	1.07	5.43	0.49
10	0.87	6.20	0.59
11	1.17	5.50	0.48
12	1.00	6.30	0.59
13	1.07	4.43	0.37
14	0.67	5.90	0.58
15	0.90	6.77	0.65
16	0.80	6.03	0.58
17	1.23	5.77	0.50
18	0.60	6.00	0.60
19	1.07	6.90	0.65
20	1.20	7.27	0.67
21	0.77	6.80	0.67
22	0.67	7.13	0.72
23	0.60	7.20	0.73
24	1.10	6.90	0.64
25	0.73	7.33	0.73
26	1.07	6.63	0.62
27	0.50	6.73	0.69
28	1.03	6.50	0.61
29	0.93	6.47	0.61
30	0.53	7.00	0.72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 2

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(เซนติเมตร)		อัตราการเจริญเติบโต
	เส้นใยอายุ 3 วัน	เส้นใยอายุ 12 วัน	(เซนติเมตร/วัน)
1	1.30	7.17	0.65
2	0.50	6.40	0.66
3	0.63	5.80	0.57
4	0.90	5.00	0.46
5	1.17	6.50	0.59
6	1.00	6.03	0.56
7	0.67	5.50	0.54
8	0.83	5.60	0.53
9	1.20	6.10	0.54
10	0.80	5.77	0.55
11	0.77	6.60	0.65
12	0.57	7.20	0.74
13	1.00	4.43	0.38
14	1.03	5.40	0.49
15	0.87	5.00	0.46
16	1.17	5.23	0.45
17	1.13	5.50	0.49
18	1.20	6.53	0.59
19	0.90	5.50	0.51
20	1.13	7.23	0.68
21	0.53	4.70	0.46
22	1.10	5.73	0.51
23	0.63	5.30	0.52
24	1.00	4.40	0.38
25	0.57	6.50	0.66
26	0.63	7.17	0.73
27	1.00	6.33	0.59
28	0.60	5.77	0.57
29	1.00	5.80	0.53
30	0.60	4.37	0.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(เซนติเมตร)		อัตราการเจริญเติบโต
	เส้นใยอายุ 3 วัน	เส้นใยอายุ 12 วัน	(เซนติเมตร/วัน)
1	0.90	6.80	0.66
2	0.87	6.53	0.63
3	1.03	6.43	0.60
4	1.23	7.00	0.64
5	1.00	6.23	0.58
6	0.93	6.77	0.65
7	0.87	6.53	0.63
8	1.20	6.30	0.57
9	1.00	4.40	0.38
10	1.27	7.03	0.64
11	0.87	6.83	0.66
12	1.10	6.87	0.64
13	1.17	6.77	0.62
14	0.93	6.53	0.62
15	1.00	6.43	0.60
16	0.83	6.33	0.61
17	1.03	6.80	0.64
18	1.13	6.60	0.61
19	1.03	6.57	0.61
20	1.13	4.47	0.37
21	1.10	6.70	0.62
22	0.93	5.40	0.50
23	1.10	6.20	0.57
24	1.07	6.00	0.55
25	1.00	5.80	0.53
26	0.93	6.63	0.63
27	0.97	6.57	0.62
28	0.70	7.00	0.70
29	0.97	6.57	0.62
30	1.00	6.57	0.62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(เซนติเมตร)		อัตราการเจริญเติบโต
	เส้นใยอายุ 3 วัน	เส้นใยอายุ 12 วัน	(เซนติเมตร/วัน)
1	1.20	6.43	0.58
2	0.87	6.80	0.66
3	0.77	6.67	0.65
4	0.60	6.47	0.65
5	1.03	6.90	0.65
6	0.60	5.57	0.55
7	0.60	5.83	0.58
8	1.23	4.77	0.39
9	0.70	6.40	0.63
10	0.83	6.30	0.61
11	0.77	6.10	0.59
12	1.03	6.40	0.60
13	1.37	6.13	0.53
14	1.03	6.33	0.59
15	1.20	5.87	0.52
16	1.07	5.40	0.48
17	0.53	6.57	0.67
18	0.50	6.30	0.64
19	1.37	5.87	0.50
20	0.63	4.70	0.45
21	1.20	5.87	0.52
22	0.73	6.40	0.63
23	1.23	6.03	0.53
24	0.70	6.53	0.65
25	0.57	5.50	0.55
26	1.27	6.10	0.54
27	0.77	4.93	0.46
28	1.13	5.17	0.45
29	1.13	6.13	0.55
30	1.17	5.70	0.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.20 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(เซนติเมตร)		อัตราการเจริญเติบโต
	เส้นใยอายุ 3 วัน	เส้นใยอายุ 12 วัน	(เซนติเมตร/วัน)
1	1.00	6.47	0.61
2	1.23	7.33	0.68
3	0.80	6.47	0.63
4	0.90	6.47	0.62
5	0.50	7.27	0.75
6	1.13	6.10	0.55
7	1.00	7.17	0.68
8	0.90	6.90	0.67
9	1.23	6.90	0.63
10	1.23	6.17	0.55
11	0.70	7.00	0.70
12	0.67	6.53	0.65
13	1.40	4.87	0.38
14	0.67	6.80	0.68
15	1.07	6.03	0.55
16	0.73	5.23	0.50
17	0.83	6.23	0.60
18	0.97	6.47	0.61
19	0.67	6.00	0.59
20	0.80	5.57	0.53
21	1.10	6.57	0.61
22	1.07	5.97	0.54
23	1.20	6.90	0.63
24	1.13	5.70	0.51
25	0.93	7.50	0.73
26	1.13	6.00	0.54
27	1.20	6.10	0.54
28	1.27	5.97	0.52
29	0.50	6.50	0.67
30	0.60	6.00	0.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.21 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(เซนติเมตร)		อัตราการเจริญเติบโต
	เส้นใยอายุ 3 วัน	เส้นใยอายุ 12 วัน	(เซนติเมตร/วัน)
1	1.20	6.30	0.57
2	1.00	6.57	0.62
3	1.03	5.67	0.51
4	0.77	6.93	0.68
5	0.90	6.60	0.63
6	1.07	7.00	0.66
7	0.57	6.90	0.70
8	1.30	6.03	0.52
9	0.70	5.70	0.55
10	0.90	7.17	0.70
11	1.10	6.67	0.62
12	1.20	7.30	0.68
13	0.83	7.13	0.70
14	0.70	6.77	0.67
15	0.73	7.03	0.70
16	0.77	7.00	0.69
17	1.17	6.63	0.61
18	1.20	6.90	0.63
19	0.90	7.33	0.71
20	0.50	6.30	0.64
21	0.70	6.23	0.61
22	1.30	5.47	0.46
23	0.70	5.47	0.53
24	1.07	6.60	0.61
25	0.87	5.47	0.51
26	0.83	5.80	0.55
27	1.23	6.87	0.63
28	1.10	6.50	0.60
29	0.57	7.17	0.73
30	1.30	6.23	0.55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.22 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(เซนติเมตร)		อัตราการเจริญเติบโต
	เส้นใยอายุ 3 วัน	เส้นใยอายุ 12 วัน	(เซนติเมตร/วัน)
1	1.03	6.90	0.65
2	0.90	6.87	0.66
3	0.73	7.10	0.71
4	1.17	7.10	0.66
5	0.70	6.47	0.64
6	0.83	7.00	0.68
7	1.13	6.03	0.54
8	0.53	7.10	0.73
9	0.53	6.90	0.71
10	1.03	7.20	0.68
11	0.77	6.90	0.68
12	0.87	7.33	0.72
13	0.83	5.90	0.56
14	0.87	6.40	0.61
15	0.63	6.23	0.62
16	0.70	6.60	0.65
17	0.73	6.17	0.60
18	0.73	6.60	0.65
19	0.67	6.80	0.68
20	1.00	6.97	0.66
21	0.50	6.70	0.69
22	0.53	6.30	0.64
23	1.17	6.50	0.59
24	1.40	7.00	0.62
25	1.37	6.50	0.57
26	1.20	6.40	0.58
27	0.87	6.10	0.58
28	0.70	7.23	0.72
29	1.00	6.47	0.61
30	1.27	7.17	0.65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.23 อัตราการเจริญเติบโตเส้นใยโมโนคาริออนของดอกเห็ดจังหวัดศรีสะเกษ

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(เซนติเมตร)		อัตราการเจริญเติบโต (เซนติเมตร/วัน)
	เส้นใยอายุ 3 วัน	เส้นใยอายุ 12 วัน	
1	0.67	4.27	0.40
2	0.67	4.03	0.37
3	1.37	5.57	0.47
4	1.03	5.17	0.46
5	1.13	4.77	0.40
6	0.53	3.47	0.33
7	0.50	3.43	0.32
8	0.67	4.23	0.39
9	0.73	4.13	0.38
10	1.17	4.53	0.37
11	0.60	4.20	0.40
12	1.20	5.47	0.47
13	0.67	4.27	0.40
14	0.60	4.73	0.46
15	0.83	4.90	0.45
16	0.60	5.10	0.50
17	1.20	4.93	0.41
18	0.73	5.17	0.49
19	1.07	5.20	0.46
20	0.83	4.80	0.44
21	1.13	5.43	0.48
22	0.80	5.20	0.49
23	1.10	5.77	0.52
24	0.87	5.43	0.51
25	0.70	4.57	0.43
26	0.80	6.10	0.59
27	1.20	6.00	0.53
28	0.73	4.27	0.39
29	0.77	5.07	0.48
30	1.20	5.93	0.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ระบบผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดต่าง ๆ

จากการศึกษาระบบการผสมพันธุ์โดยการนำเส้นใยโมโนคาริออนที่มีอัตราการเจริญเติบโตดี 12 ไอโซเลทซึ่งได้จากดอกเห็ดดอกเดียวกันผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดแล้วตรวจดูการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น และลักษณะเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกัน โดยใช้สัญลักษณ์ดังนี้

+ : clamp connection หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันได้และเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น

- : overlap หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันไม่ได้ เส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเหลื่อมซ้อนกันและไม่มีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น

(+) : barrage หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันได้เพียงกึ่งเดียว เส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเป็นร่องและมีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่นที่เจริญไม่สมบูรณ์

(-) : flat หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันไม่ได้ เส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเป็นแถบหนาและไม่มีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น

จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันทั้งหมด ถ้าได้เท่ากับ 1 : 4 แสดงว่าเห็ดตีนแรดมีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ เฮเทอโรทัลลิก หรือ ถ้าได้เท่ากับ 1 : 2 แสดงว่าเห็ดตีนแรดมีระบบการผสมพันธุ์แบบไบโพลาร์ เฮเทอโรทัลลิก และจัดกลุ่มของการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนตามหลักของ Papazian (1950) ได้ผลดังนี้

4.3.2.1 ระบบผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.24 ซึ่งสามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 2 10 11
กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 7 8 27
กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 3 14 23
กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 5 15 26

เมื่อคำนวณอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันทั้งหมด พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 4 แสดงว่าเห็ด ตีนแรดจากจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ จากนั้นจัดกลุ่มการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนตามหลักของ Papazian (1950) โดยดูจากลักษณะของเส้นใย บริเวณที่เจริญมาพบกันและการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ดังภาพที่ 4.32 ทำให้ทราบเมทิ่งไทป์ของแต่ละกลุ่ม ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

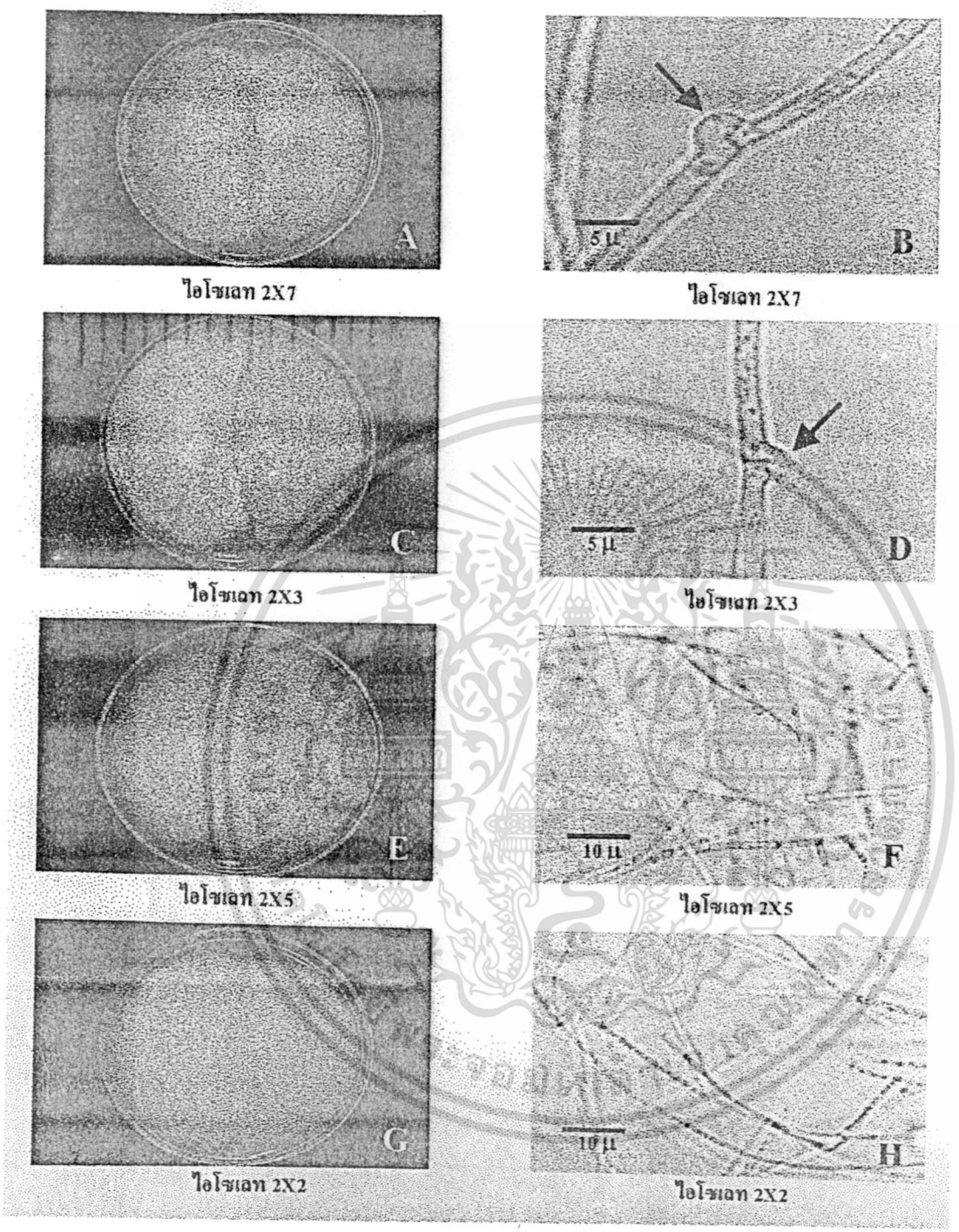
กลุ่มที่ 1 A_1B_1 กลุ่มที่ 2 A_2B_2

กลุ่มที่ 3 A_2B_1 กลุ่มที่ 4 A_1B_2

ตารางที่ 4.24 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดปทุมธานีดอกที่ 1 ทีละคู่แบบพบกันหมด บนอาหารเอ็มอีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

	A_1B_1			A_2B_2			A_2B_1			A_1B_2		
ไอโซเลท	2	10	11	7	8	27	3	14	23	5	15	26
2	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
10	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
11	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
7	+	+	+	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
8	+	+	+	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
27	+	+	+	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
5	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	-	-
15	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	-	-
26	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	-	-
3	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	+	+	+
23	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	+	+	+
14	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	+	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.32 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B ≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B ≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.2 ระบบผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.25 ซึ่งสามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 4 6 11 22

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 12 13

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 14 17 23

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 10 15 26

เมื่อคำนวณอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันทั้งหมด พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 4.23 แสดงว่า เห็ดตีนแรดจากจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ จากนั้นจัดกลุ่มการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนตามหลักของ Papazian (1950) โดยดูจากลักษณะของเส้นใย บริเวณที่เจริญมาพบกันและการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ดังภาพที่ 4.33 ทำให้ทราบเมทติ่งไทป์ของแต่ละกลุ่ม ดังนี้

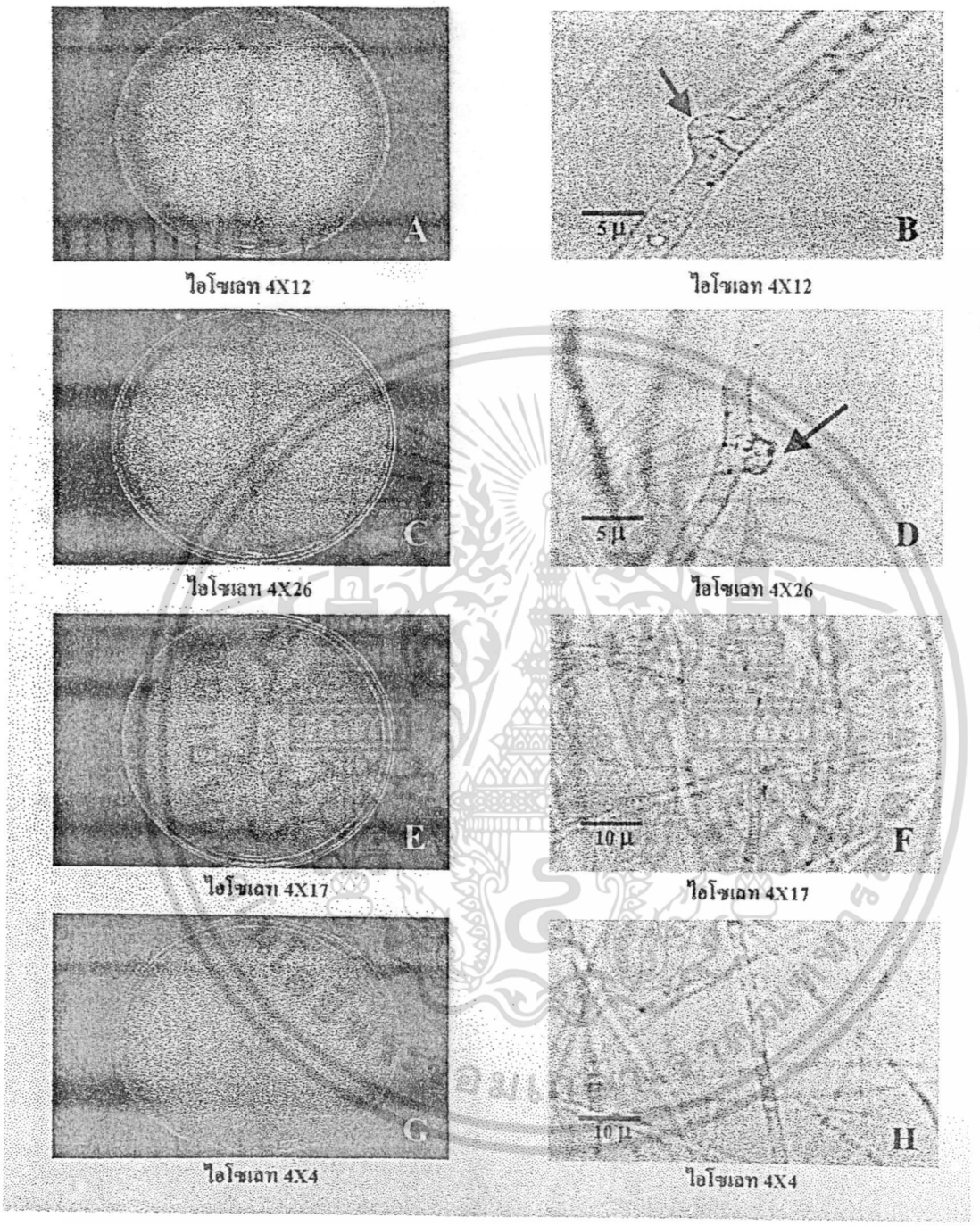
กลุ่มที่ 1 A_1B_1 กลุ่มที่ 2 A_2B_2

กลุ่มที่ 3 A_1B_2 กลุ่มที่ 4 A_2B_1

ตารางที่ 4.25 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดปทุมธานีดอกที่ 2 ทีละคู่แบบพบกันหมดบนอาหารเอ็มอีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

	A_1B_1				A_2B_2		A_1B_2			A_2B_1		
ไอโซเลท	4	6	11	22	12	13	14	17	23	10	15	26
4	-	-	-	-	+	+	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
6	-	-	-	-	+	+	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
11	-	-	-	-	+	+	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
12	+	+	+	+	-	-	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
13	+	+	+	+	-	-	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
14	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	-	-	-	+	+	+
17	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	-	-	-	+	+	+
23	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	-	-	-	+	+	+
10	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	+	+	+	-	-	-
15	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	+	+	+	-	-	-
26	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	+	+	+	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.33 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B ≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B ≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.3 ระบบผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.26 ซึ่งสามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 23 24 30

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 4 15 21 22

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 20 25 26

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 19 27

เมื่อคำนวณอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมเข้ากันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมกันทั้งหมด พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 4 แสดงว่าเห็ดตีนแรดจากจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ จากนั้นจัดกลุ่มการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนตามหลักของ Papazian (1950) โดยดูจากลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันและการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ดังภาพที่ 4.34 ทำให้ทราบเมทิ่งไทป์ของแต่ละกลุ่ม ดังนี้

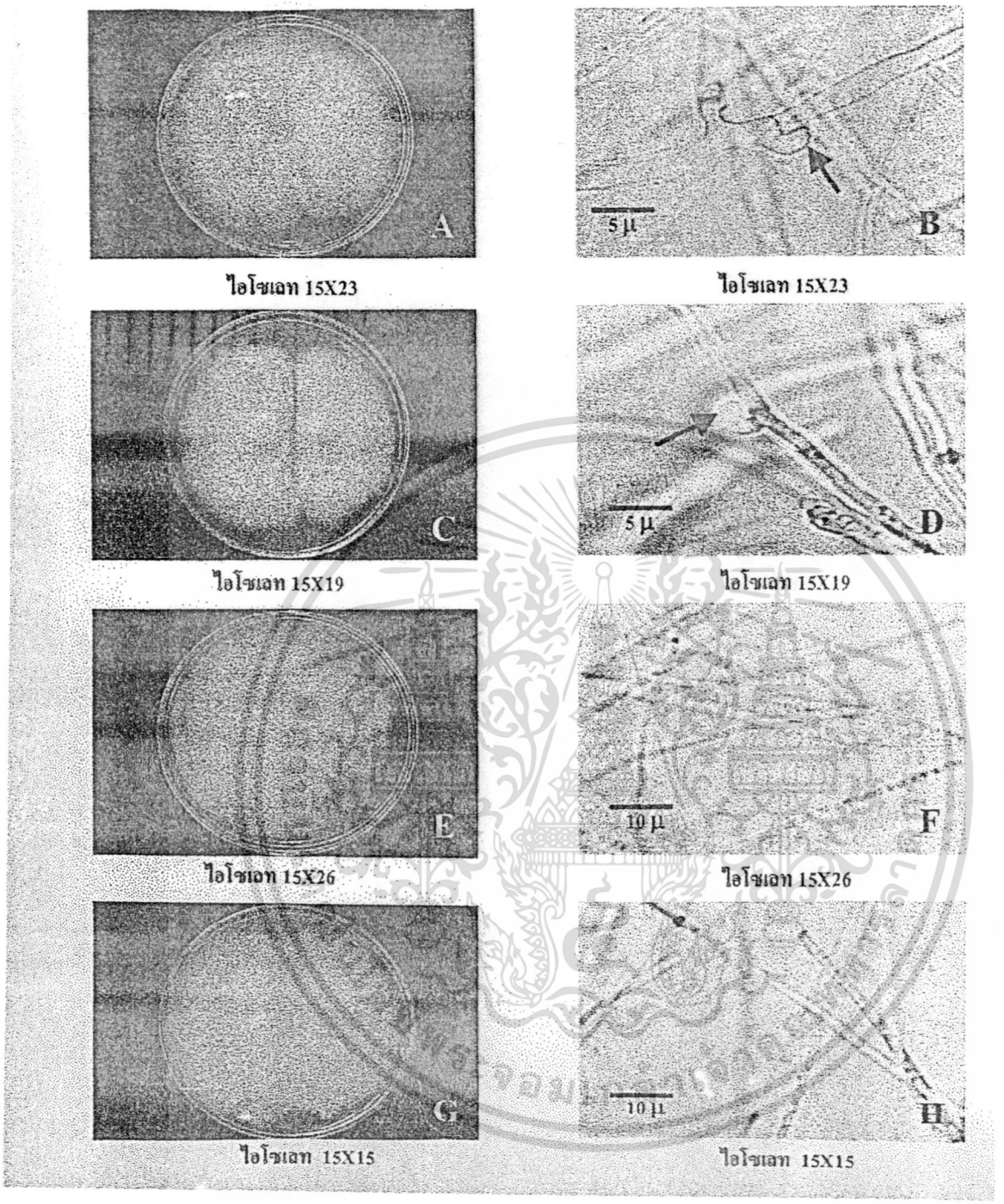
กลุ่มที่ 1 A_1B_1 กลุ่มที่ 2 A_2B_2

กลุ่มที่ 3 A_2B_1 กลุ่มที่ 4 A_1B_2

ตารางที่ 4.26 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดนครปฐมดอกที่ 1 ทีละคู่แบบพบกันหมดบนอาหารเอ็มอีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

	A_1B_1			A_2B_2				A_2B_1			A_1B_2	
ไอโซเลท	23	24	30	4	15	21	22	20	25	26	19	27
23	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
24	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
30	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
4	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
15	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
21	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
22	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
20	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	+	+
25	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	+	+
26	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	+	+
19	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	-
27	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.34 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B ≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B ≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.4 ระบบผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดนครปฐมดอกที่ 2

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.27 ซึ่งสามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 1 5 20

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 11 12 28

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 2 3 18 26

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 25 27

เมื่อคำนวณอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมกันทั้งหมด พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 4.23 แสดงว่าเห็ดตีนแรดจากจังหวัดนครปฐมดอกที่ 2 มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ จากนั้นจัดกลุ่มการผสมพันธุ์ของ เส้นใยโมโนคาริออนตามหลักของ Papazian (1950) โดยดูจากลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันและการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ดังภาพที่ 4.35 ทำให้ทราบเมทติ่งไทป์ของแต่ละกลุ่ม ดังนี้

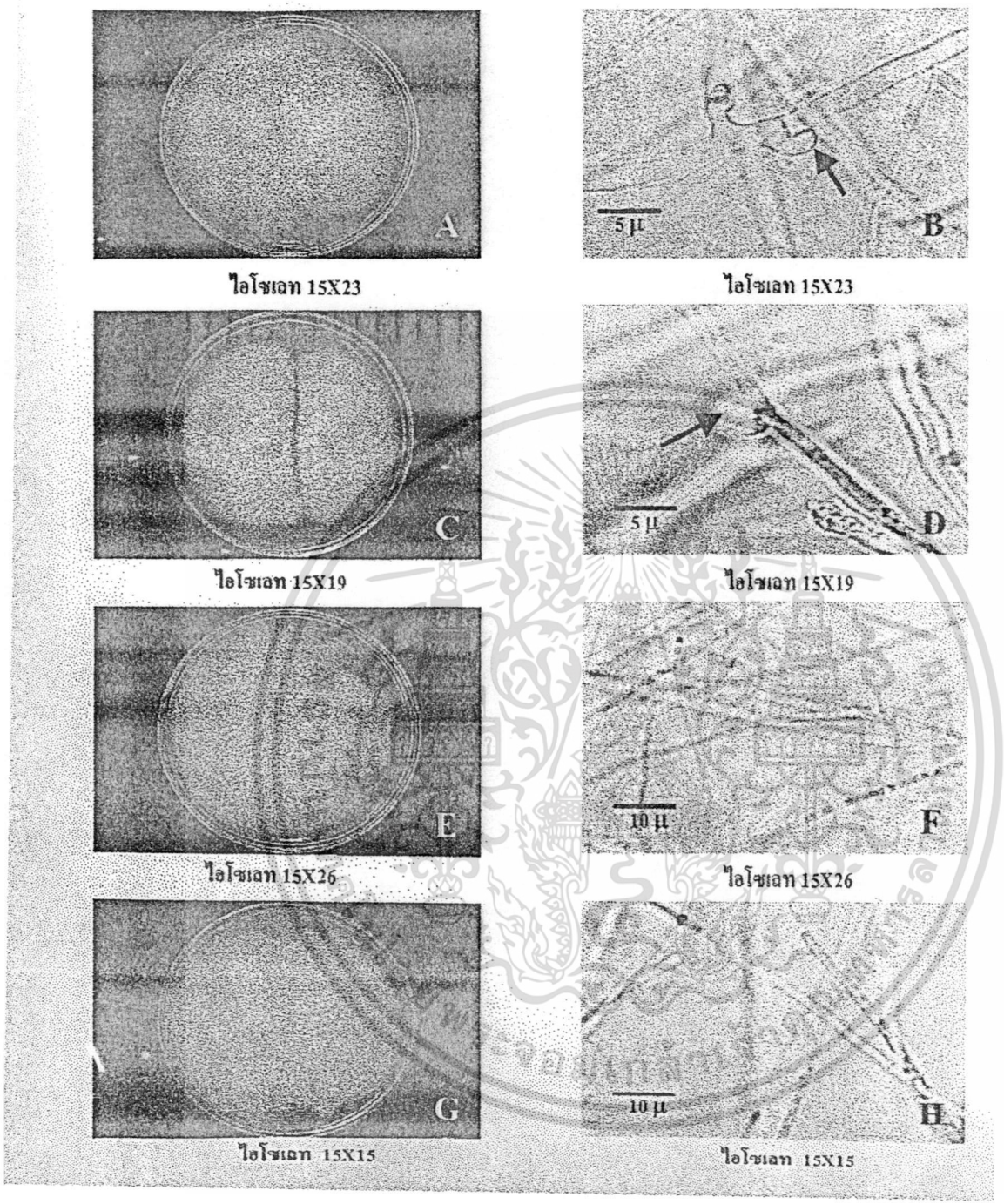
กลุ่มที่ 1 A_1B_1 กลุ่มที่ 2 A_2B_2

กลุ่มที่ 3 A_2B_1 กลุ่มที่ 4 A_1B_2

ตารางที่ 4.27 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดนครปฐมดอกที่ 2 ทีละคู่แบบพบกันหมดบนอาหารเอ็มอีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

	A_1B_1			A_2B_2			A_2B_1				A_1B_2	
ไอโซเลท	1	5	20	11	12	28	2	3	18	26	25	27
1	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
5	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
20	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
11	+	+	+	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
12	+	+	+	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
28	+	+	+	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	+	+
3	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	+	+
18	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	+	+
26	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	+	+
25	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	-	-
27	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.35 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 2

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.3 ระบบผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดสามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้เพียง 3 กลุ่มเท่านั้น จึงได้คัดเลือกเส้นใยโมโนคาริออนอีก 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ 21 27 29 30 ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตดีรองลงมาจากเส้นใย โมโนคาริออน 12 ไอโซเลทที่คัดเลือกมาแล้ว นำมาผสมพันธุ์ทีละคู่กับเส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทที่ได้ทำการผสมพันธุ์แบบพบกันหมดแล้ว ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.28 ซึ่งสามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออ นได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 10 12 13 17

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 21 27 29

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 1 2 4 6 7

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 11 26 28 30

เมื่อคำนวณอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมเข้ากันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมกันทั้งหมด พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 4 แสดงว่าเห็ดตีนแรดจากจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ จากนั้นจัดกลุ่มการ ผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนตามหลักของ Papazian (1950) โดยดูจากลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันและการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ดังภาพที่ 4.36 ทำให้ทราบเมทิ่งไทป์ของแต่ละกลุ่ม ดังนี้

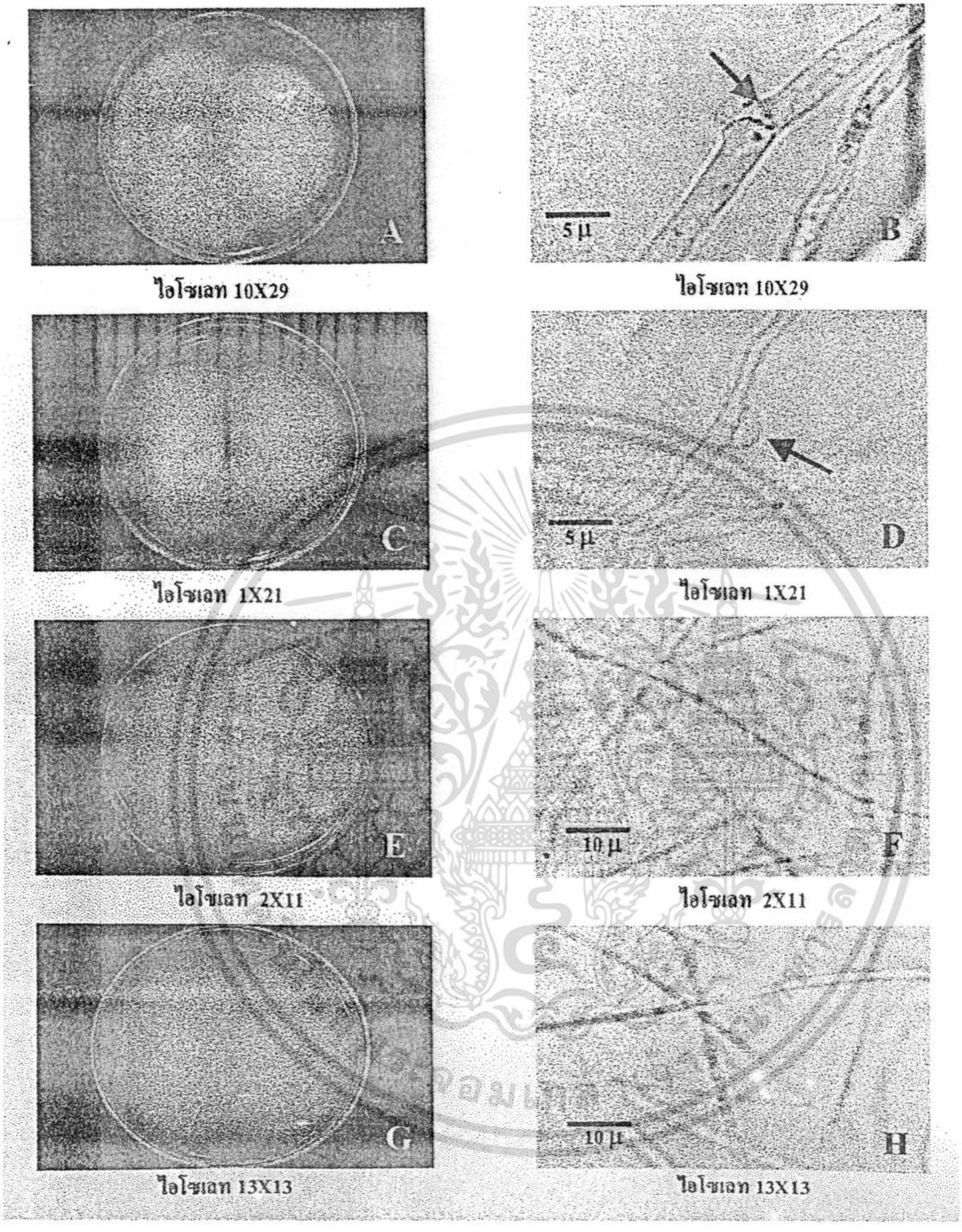
กลุ่มที่ 1 A_1B_1 กลุ่มที่ 2 A_2B_2

กลุ่มที่ 3 A_2B_1 กลุ่มที่ 4 A_1B_2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.28 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 จำนวน 16 ไอโซเลทที่ละคู่แบบพบกันหมดบนอาหารเอ็มอีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

	A_1B_1				A_2B_2			A_2B_1					A_1B_2			
ไอโซเลท	10	12	13	17	21	27	29	1	2	4	6	7	11	26	29	30
10	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
12	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
17	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	+	+	+	+	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
27	+	+	+	+	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
29	+	+	+	+	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
1	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
4	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
6	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
7	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
11	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	-	-	-	-
26	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	-	-	-	-
28	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	-	-	-	-
30	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	-	-	-	-



ภาพที่ 4.36 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.4 ระบบผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมด สามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้เพียง 3 กลุ่มเท่านั้น จึงได้คัดเลือกเส้นใยโมโนคาริออนอีก 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ 1 7 11 29 ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตดีรองลงมาจากเส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทที่คัดเลือกมาแล้ว นำมาผสมพันธุ์ทีละคู่กับเส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทที่ได้ทำการผสมพันธุ์แบบพบกันหมดแล้ว ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.29 ซึ่งสามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 3 10 12 17
กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 1 5 9 14
กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 2 4 7 18 22 24
กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 11 29

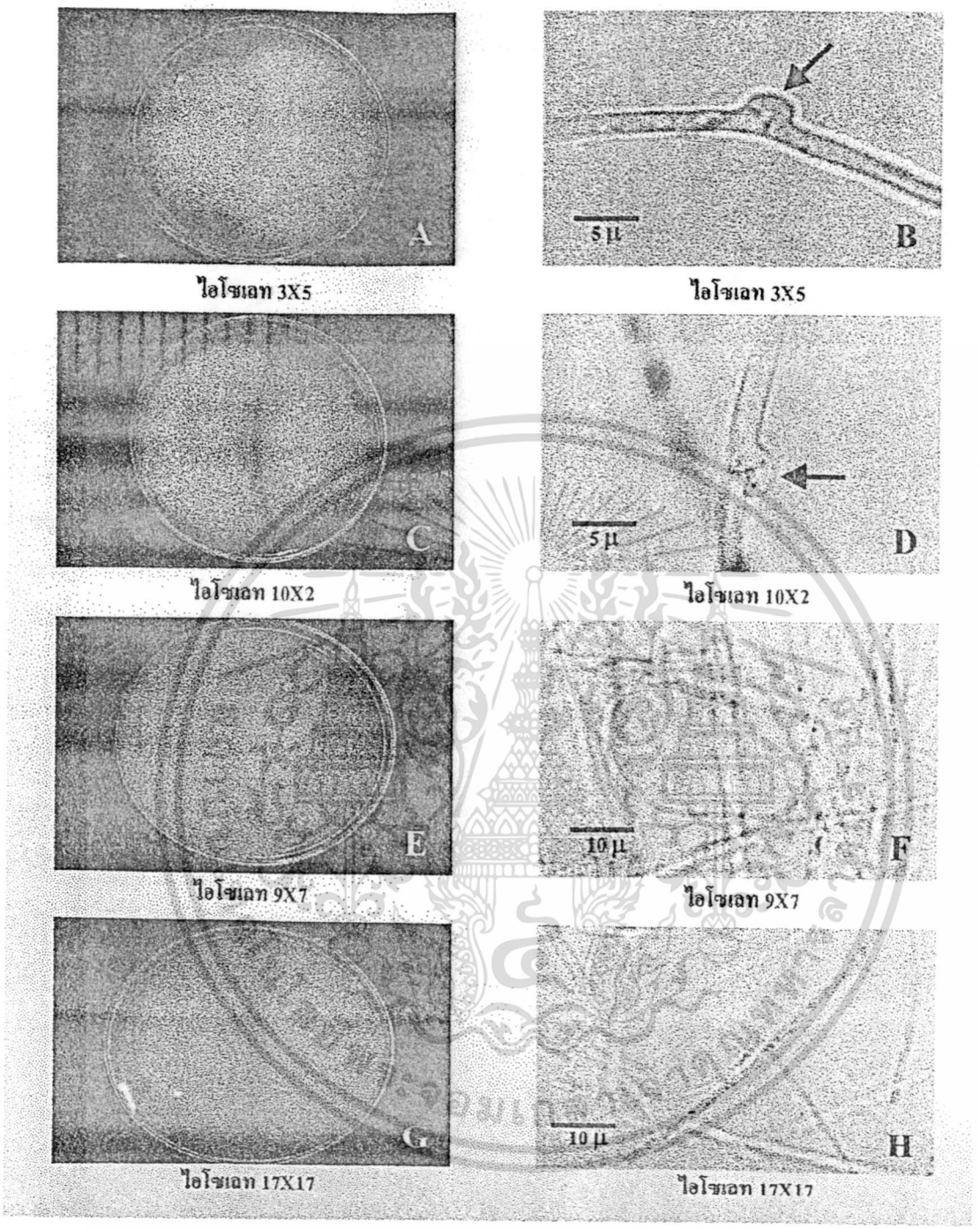
เมื่อคำนวณอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมเข้ากันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมกันทั้งหมด พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 4.57 แสดงว่าเห็ดตีนแรดจากจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ จากนั้นจัดกลุ่มการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนตามหลักของ Papazian (1950) โดยดูจากลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันและการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ดังภาพที่ 4.37 ทำให้ทราบเมทติ่งไทป์ของแต่ละกลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 A_1B_1 กลุ่มที่ 2 A_2B_2
กลุ่มที่ 3 A_2B_1 กลุ่มที่ 4 A_1B_2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.29 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 จำนวน 16 ไอโซเลทที่ละคู่แบบพบกันหมดบนอาหารเอ็มอีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

	A_1B_1				A_2B_2				A_2B_1						A_1B_2	
ไอโซเลท	3	10	12	17	1	5	9	14	2	4	7	18	22	24	11	29
3	-	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
10	-	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
12	-	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
17	-	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
1	+	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
5	+	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
9	+	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
14	+	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
2	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	+	+
4	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	+	+
7	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	+	+
18	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	+	+
22	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	+	+
24	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	+	+
11	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-
29	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-



ภาพที่ 4.37 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กิ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.5 ระบบผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดสกลนครดอกที่ 1

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.30 ซึ่งสามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 2 9 11

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 7 8 29

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 3 14 23

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 5 12 25

เมื่อคำนวณอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมเข้ากันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมกันทั้งหมด พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 4 แสดงว่าเห็ดตีนแรดจากจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ จากนั้นจัดกลุ่มการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนตามหลักของ Papazian (1950) โดยดูจากลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันและการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ดังภาพที่ 4.38 ทำให้ทราบเมท ทิ่งไทป์ของแต่ละกลุ่ม ดังนี้

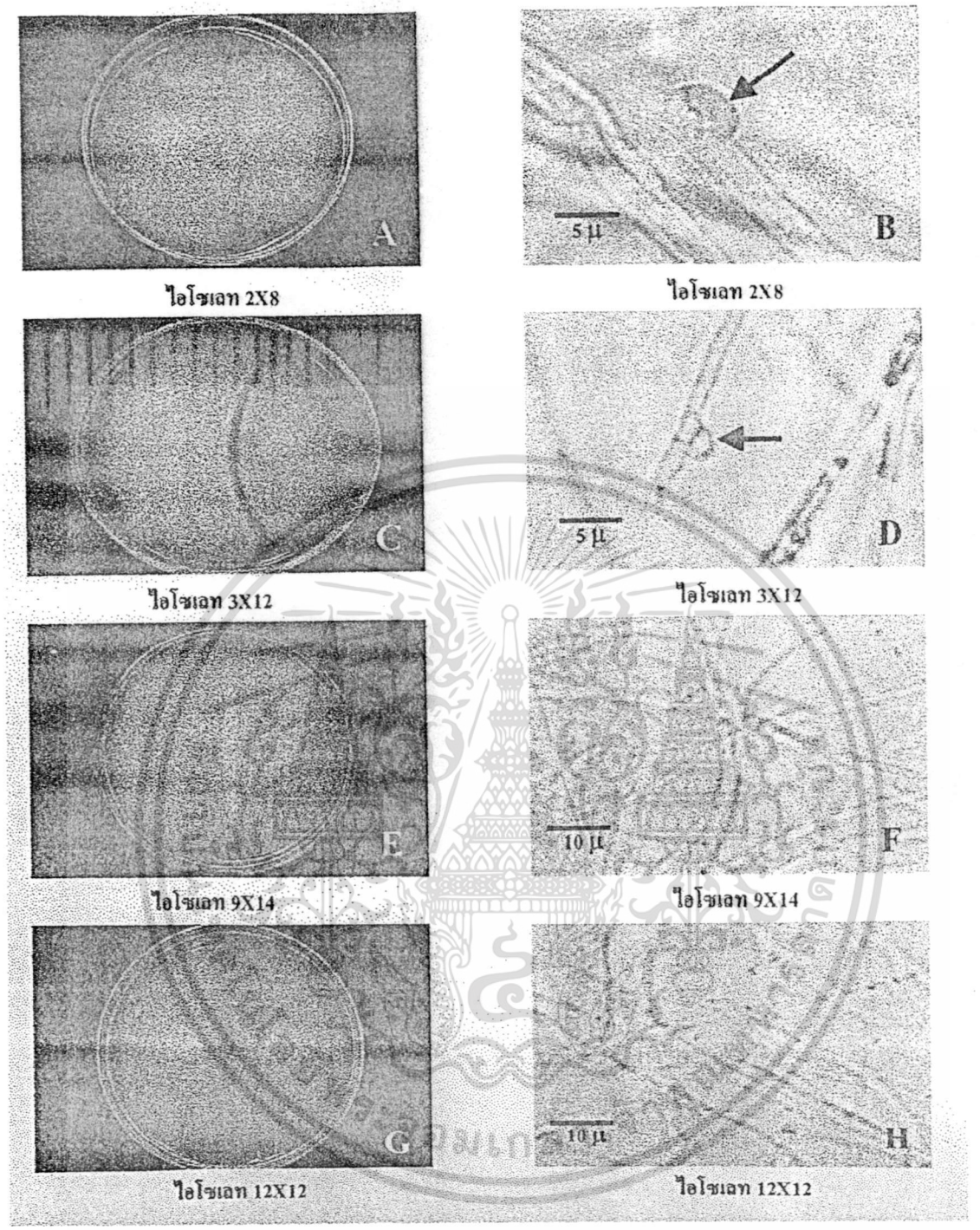
กลุ่มที่ 1 A_1B_1 กลุ่มที่ 2 A_2B_2

กลุ่มที่ 3 A_1B_2 กลุ่มที่ 4 A_2B_1

ตารางที่ 4.39 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดสกลนครดอกที่ 1 ทีละคู่แบบพบกันหมดบนอาหารเอ็มอีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

	A_1B_1			A_2B_2			A_1B_2			A_2B_1		
ไอโซเลท	2	9	11	7	8	29	3	14	23	5	12	25
2	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
9	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
11	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
7	+	+	+	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
8	+	+	+	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
29	+	+	+	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+	+	+
14	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+	+	+
23	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+	+	+
5	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	+	+	+	-	-	-
12	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	+	+	+	-	-	-
25	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	+	+	+	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.38 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กิ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.6 ระบบผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดสกลนครดอกที่ 2

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.31 ซึ่งสามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 10 16

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 6 7 15 19

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 13 14

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 4 12 20 29

เมื่อคำนวณอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันทั้งหมด พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 4.50 แสดงว่าเห็ดตีนแรดจากจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ จากนั้นจัดกลุ่มการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนตามหลักของ Papazian (1950) โดยดูจากลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันและการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ดังภาพที่ 4.39 ทำให้ทราบเมทติ่งไทป์ของแต่ละกลุ่ม ดังนี้

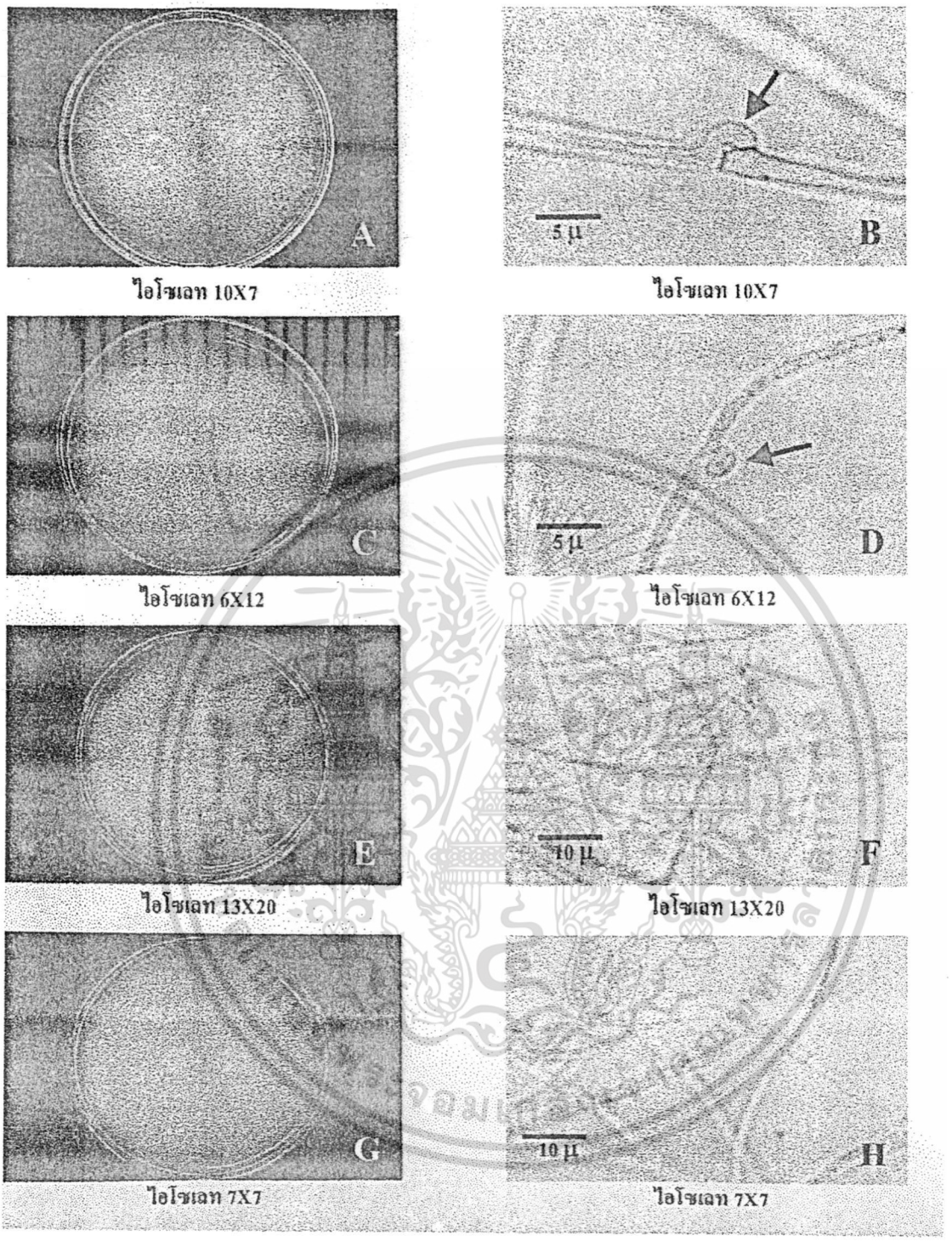
กลุ่มที่ 1 A_1B_1 กลุ่มที่ 2 A_2B_2

กลุ่มที่ 3 A_2B_1 กลุ่มที่ 4 A_1B_2

ตารางที่ 4.31 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดสกลนครดอกที่ 2 ทีละคู่แบบพบกันหมดบนอาหารเอ็มอีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

	A_1B_1		A_2B_2				A_2B_1		A_1B_2			
ไอโซเลท	10	16	6	7	15	19	13	14	4	12	20	29
10	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
7	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
15	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
19	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
13	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	+	+	+	+
14	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	+	+	+	+
4	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	-	-	-	-
12	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	-	-	-	-
20	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	-	-	-	-
29	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.39 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.7 ระบบผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดมหาสารคาม

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมด สามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้เพียง 3 กลุ่มเท่านั้น จึงได้คัดเลือกเส้นใยโมโนคาริออนอีก 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ 1 16 20 30 ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตดีรองลงมาจากเส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทที่คัดเลือกมาแล้ว นำมาผสมพันธุ์ทีละคู่กับเส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทที่ได้ทำการผสมพันธุ์แบบพบกันหมดแล้ว ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.32 ซึ่งสามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 2 4 10 11 16 30

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 7 8 9

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 3 12 19 21 28

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 1 20

เมื่อคำนวณอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันทั้งหมด พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 4.57 แสดงว่าเห็ดตีนแรดจากจังหวัดมหาสารคามมีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ จากนั้นจัดกลุ่มการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนตามหลักของ Papazian (1950) โดยดูจากลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันและการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ดังภาพที่ 4.40 ทำให้ทราบเมทติ่งไทป์ของแต่ละกลุ่ม ดังนี้

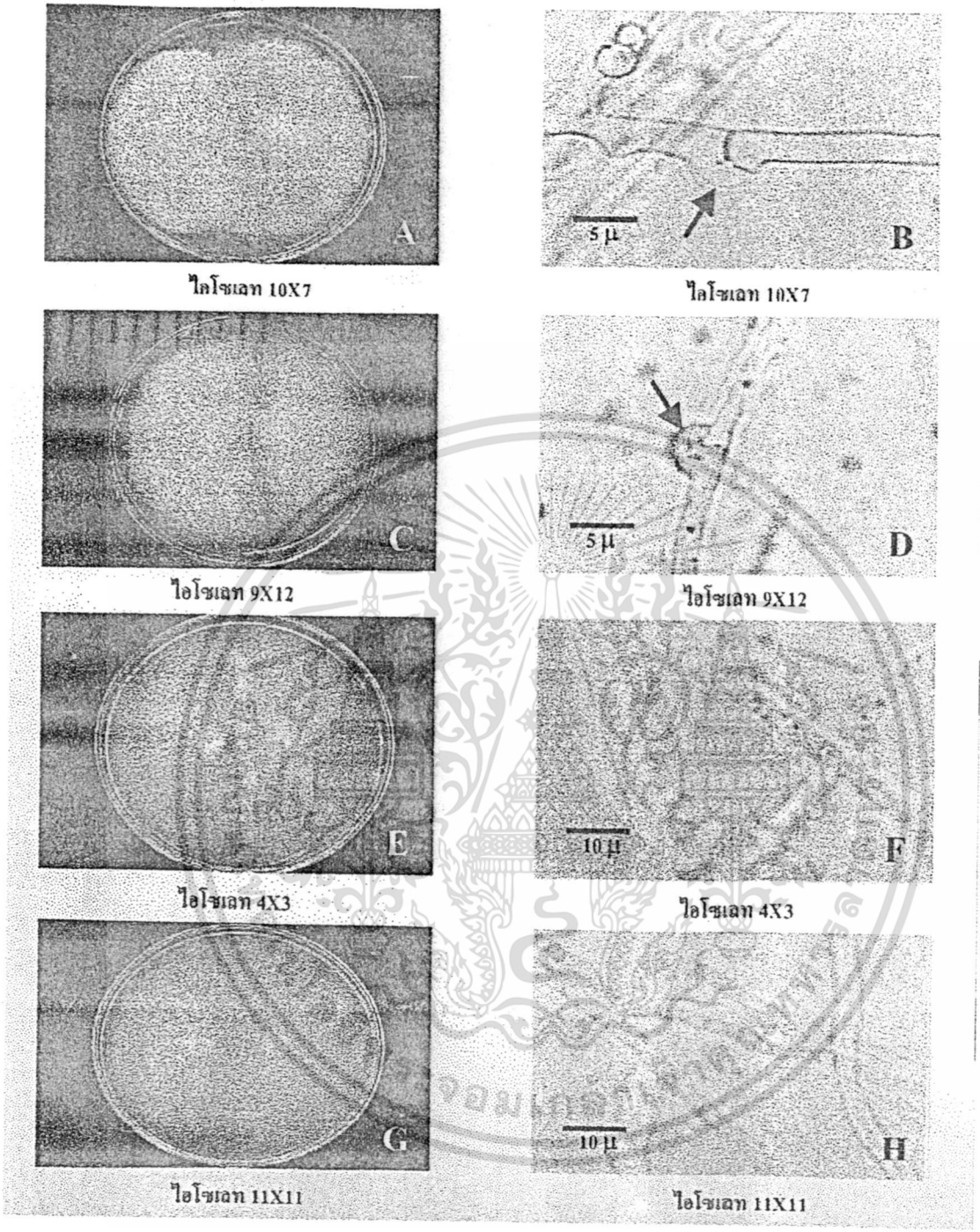
กลุ่มที่ 1 A_1B_1 กลุ่มที่ 2 A_2B_2

กลุ่มที่ 3 A_1B_2 กลุ่มที่ 4 A_2B_1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.32 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคามจำนวน 16 ไอโซเลทที่ละคู่แบบพบกันหมดบนอาหารเอ็มอีเอ ปั่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

	A_1B_1						A_2B_2			A_1B_2					A_2B_1	
ไอโซเลท	2	4	10	11	16	30	7	8	9	3	12	19	21	28	1	20
2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
11	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
16	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
30	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
9	+	+	+	+	+	+	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	+	+
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	+	+
19	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	+	+
21	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	+	+
28	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-	+	+
1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	+	+	+	+	+	-	-
20	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	+	+	+	+	+	-	-



ภาพที่ 4.40 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.8 ระบบผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดจากจังหวัดศรีสะเกษ

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออน 12 ไอโซเลทผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.33 ซึ่งสามารถแบ่งเส้นใยโมโนคาริออนได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 16 18 23 29

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 21 27 30

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 24 26

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 3 12 22

เมื่อคำนวณอัตราส่วนของจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อจำนวนคู่ของเส้นใยโมโนคาริออนที่ผสมพันธุ์กันทั้งหมด พบว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 4 แสดงว่า เห็ดตีนแรดจากจังหวัดศรีสะเกษมีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ จากนั้นจัดกลุ่มการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนตามหลักของ Papazian (1950) โดยดูจากลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันและการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น ดังภาพที่ 4.41 ทำให้ทราบเมทติ่งไทป์ของแต่ละกลุ่ม ดังนี้

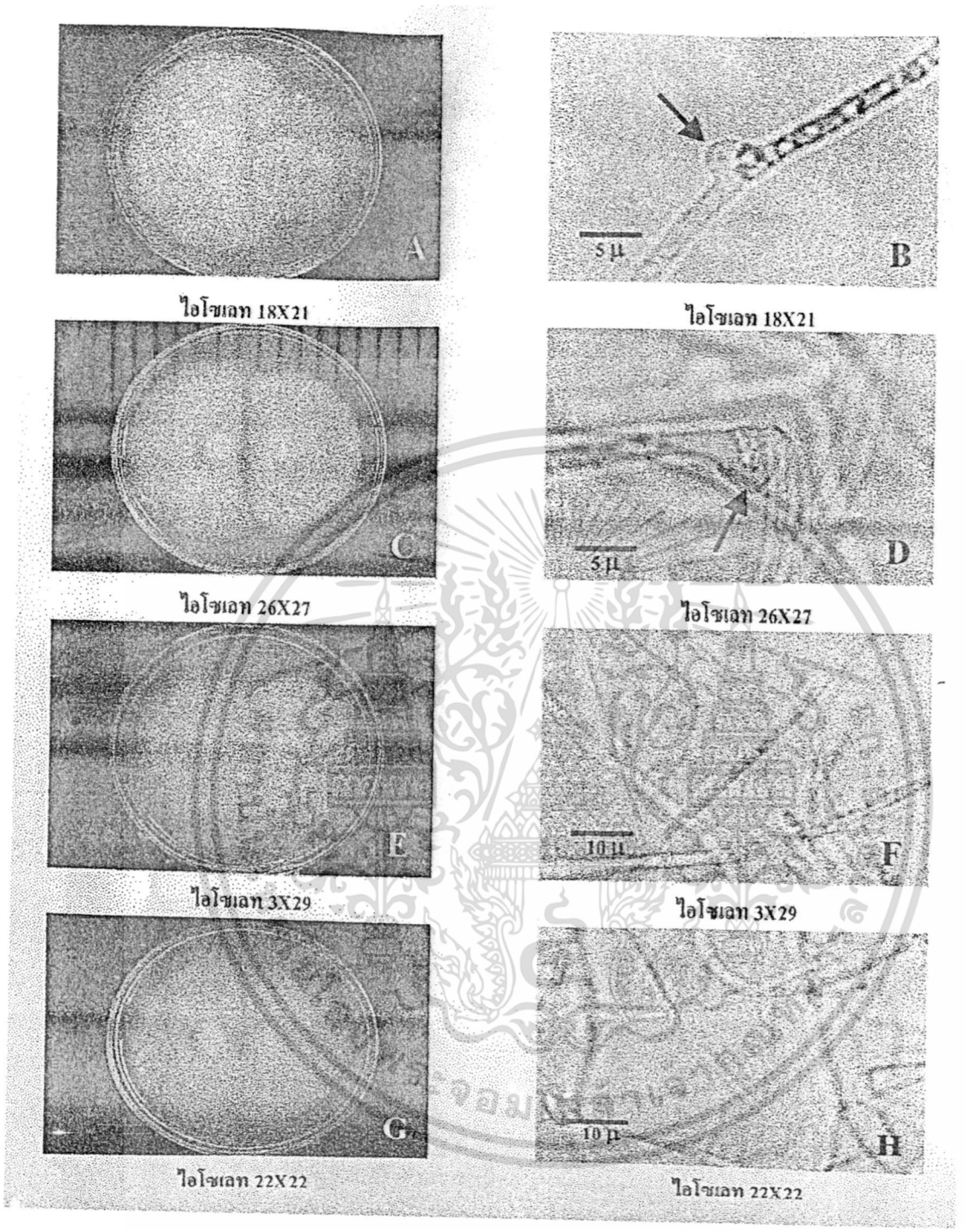
กลุ่มที่ 1 A_1B_1 กลุ่มที่ 2 A_2B_2

กลุ่มที่ 3 A_1B_2 กลุ่มที่ 4 A_2B_1

ตารางที่ 4.33 การผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดศรีสะเกษจำนวน 12 ไอโซเลท ทีละคู่แบบพบกันหมดบนอาหารเอ็มอีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

	A_1B_1				A_2B_2			A_1B_2		A_2B_1		
ไอโซเลท	16	18	23	29	21	27	30	24	26	3	12	22
16	-	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
18	-	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
23	-	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
29	-	-	-	-	+	+	+	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
21	+	+	+	+	-	-	-	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
27	+	+	+	+	-	-	-	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
30	+	+	+	+	-	-	-	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
24	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	+	+	+
26	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	-	-	+	+	+
3	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	-	-	-
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	-	-	-
22	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	+	+	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.41 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลการศึกษาหาจำนวนมัลทิเพิลอัลลีลของเห็ดตีนแรด

จากการศึกษาจำนวนอินคอมแพททิบิลิที อัลลีลของเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมได้ 6 จังหวัด (10 ดอก) โดยทำการคัดเลือกเส้นใยโมโนคาริออน 40 ไอโซเลท ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดในแต่ละกลุ่มที่มีเมทติ่งไทป์แบบ A_1B_1 A_2B_2 A_1B_2 และ A_2B_1 ตามลำดับดังนี้

จังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 10 7 15 14

จังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 4 13 14 10

จังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 23 22 27 25

จังหวัดนครปฐมดอกที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 20 12 25 26

จังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 10 21 28 1

จังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 17 5 11 2

จังหวัดสกลนครดอกที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 11 7 14 5

จังหวัดสกลนครดอกที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลทที่ 10 19 29 13

จังหวัดมหาสารคาม ได้แก่ ไอโซเลทที่ 10 8 12 20

จังหวัดศรีสะเกษ ได้แก่ ไอโซเลทที่ 23 27 26 22

จากนั้นทำการผสมข้ามดอกทีละคู่โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเอ็มอีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ตรวจดูการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น และบันทึกลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกัน โดยใช้สัญลักษณ์ดังนี้

+ : clamp connection หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันได้และเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น

- : overlap หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันไม่ได้ เส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเหลื่อมซ้อนกันและไม่มีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น

(+) : barrage หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันได้เพียงกึ่งเดียว เส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเป็นร่องและมีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่นที่เจริญไม่สมบูรณ์

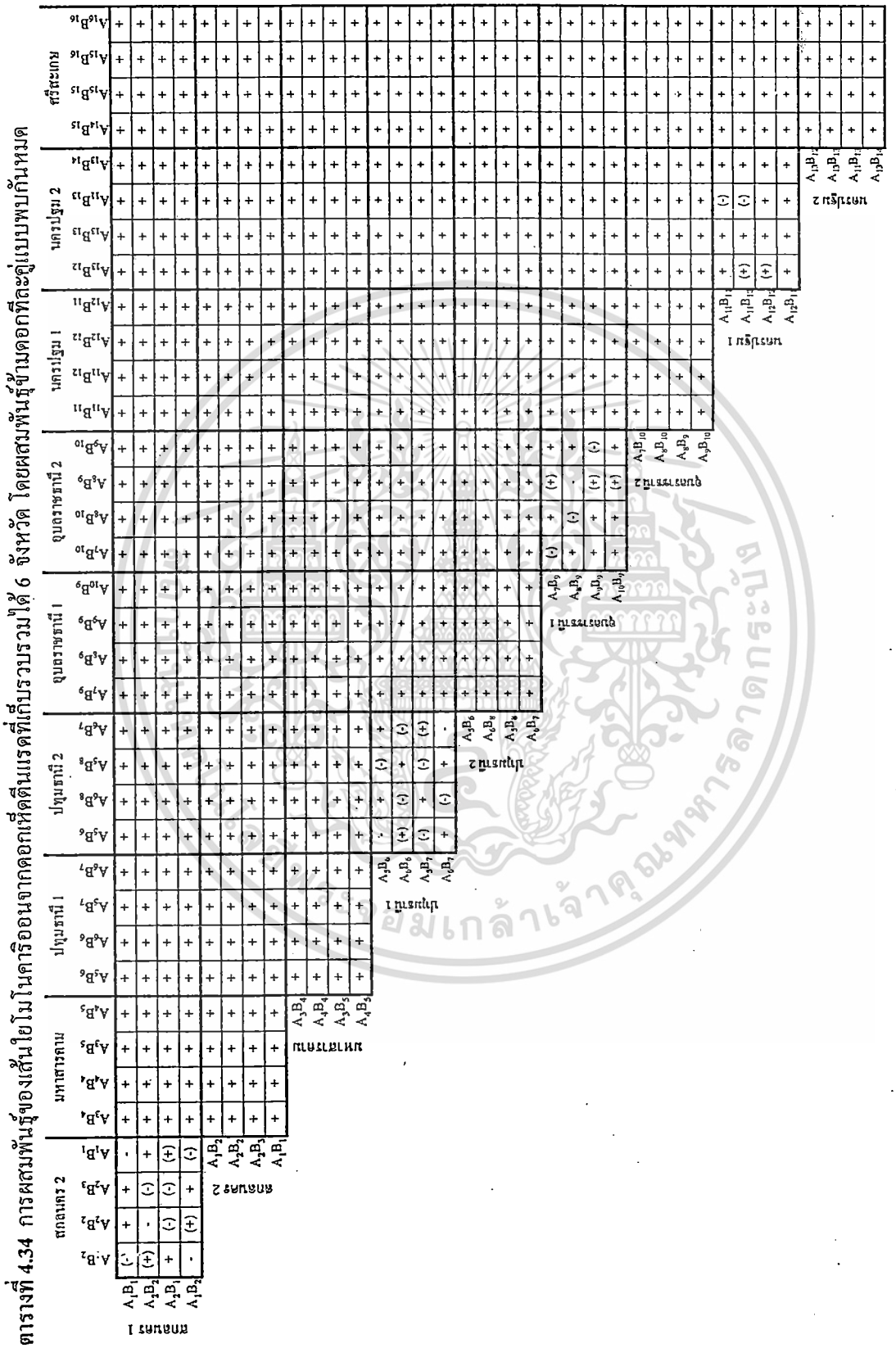
(-) : flat หมายถึง เส้นใยผสมพันธุ์กันไม่ได้ เส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเป็นแถบหนาและไม่มีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น

การหาจำนวนอัลลีลของโลกัส A และ B จะต้องหายีโน ไทป์ของแต่ละไอโซเลท ตามวิธีของ Eugenio และ Anderson (1968) ซึ่งจะตรวจดูการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่นและลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกัน ดังภาพที่ 4.42 - 4.86 จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออ นข้ามดอกทีละคู่ทั้งหมด 40 ไอโซเลท พบว่าเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมได้จาก 6 จังหวัด (10 ดอก) คือ จังหวัดปทุมธานี นครปฐม อุบลราชธานี และสกลนคร จังหวัดละ 2 ดอก และ จังหวัดมหาสารคาม

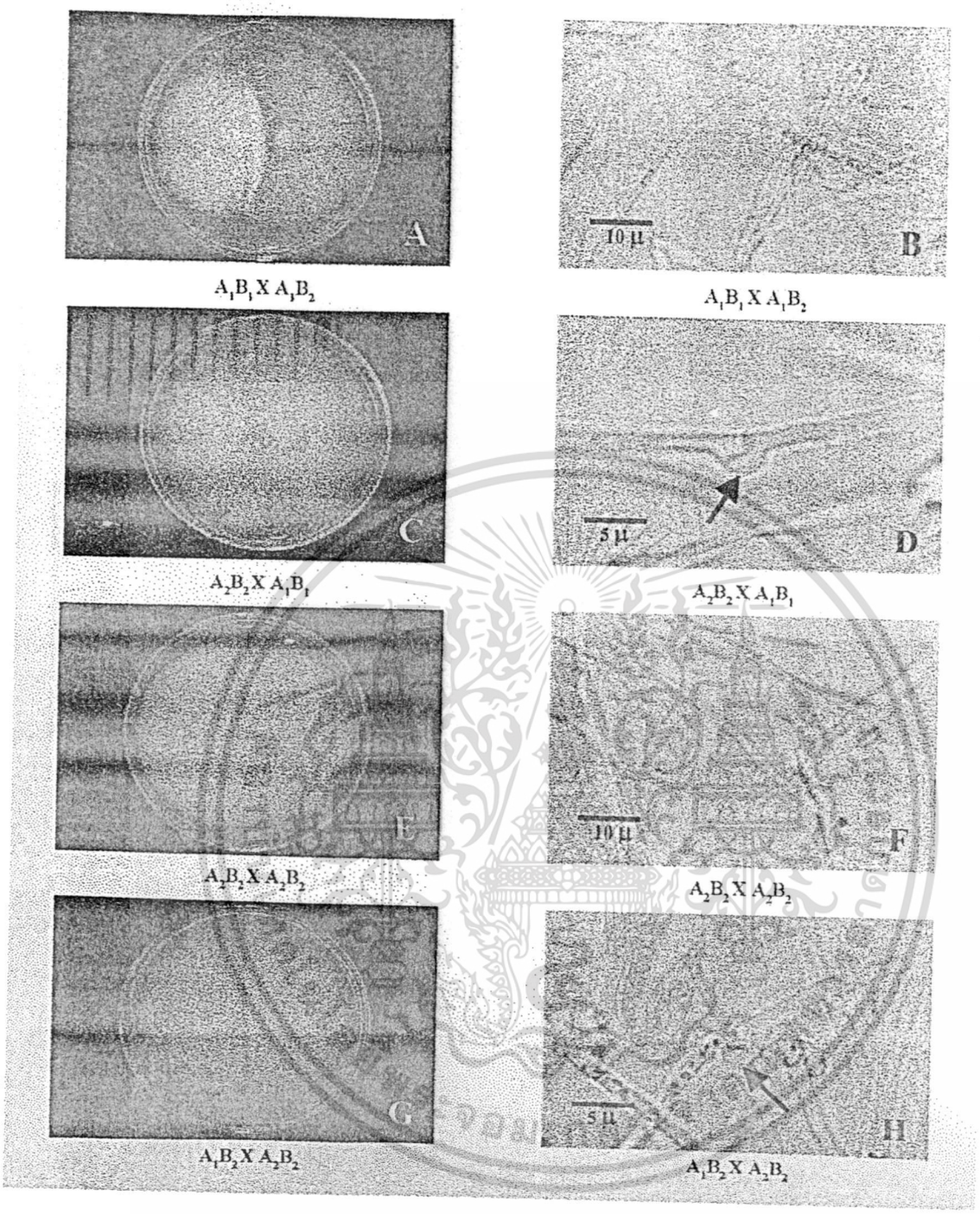
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศรีสะเกษ จังหวัดละ 1 ดอก มีจำนวนอัลลีลทั้งโลกัส A และโลกัส B 16 อัลลีล ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.34

ตารางที่ 4.34 การผสมพันธุ์ของเส้นใยในคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมได้ 6 จังหวัด โดยผสมพันธุ์ข้ามดอกทีละคู่แบบพบกันหมด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.42 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X สกลนครดอกที่ 1

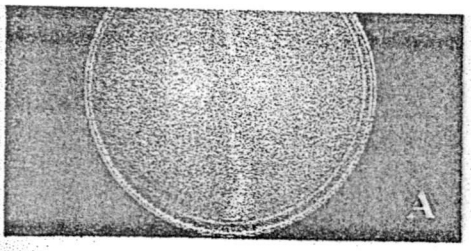
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

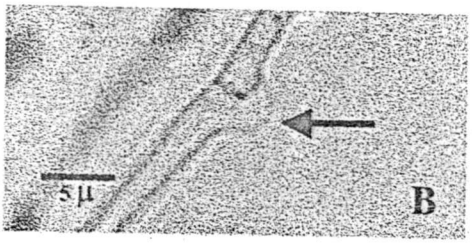
E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

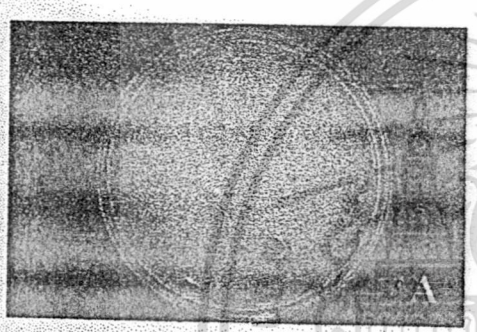


$A_1B_1 X A_3B_4$

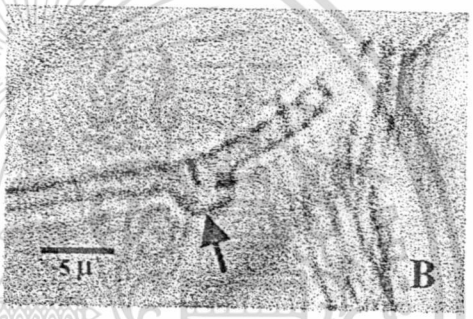


$A_1B_1 X A_3B_4$

ภาพที่ 4.43 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X มหาสารคาม
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)

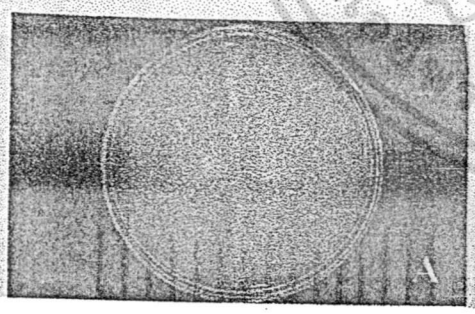


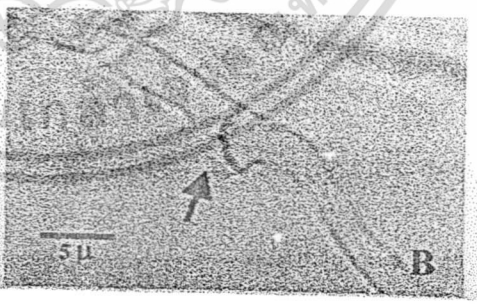
$A_1B_2 X A_3B_5$



$A_1B_2 X A_3B_5$

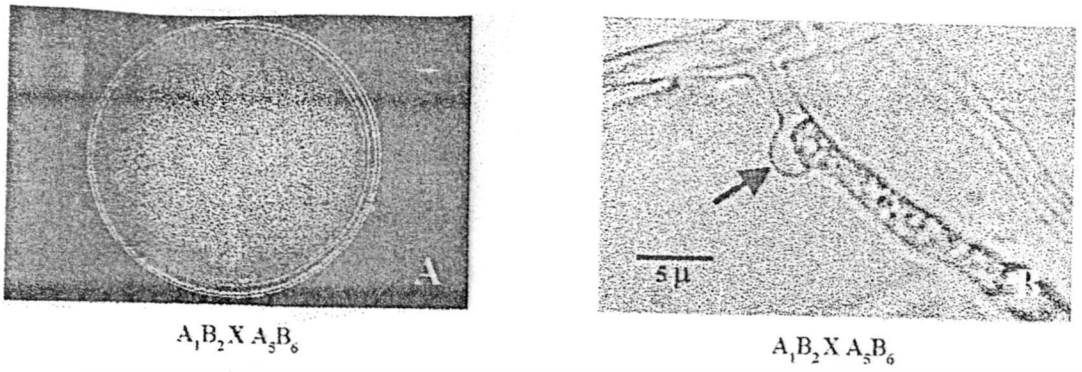
ภาพที่ 4.44 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X มหาสารคาม
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)





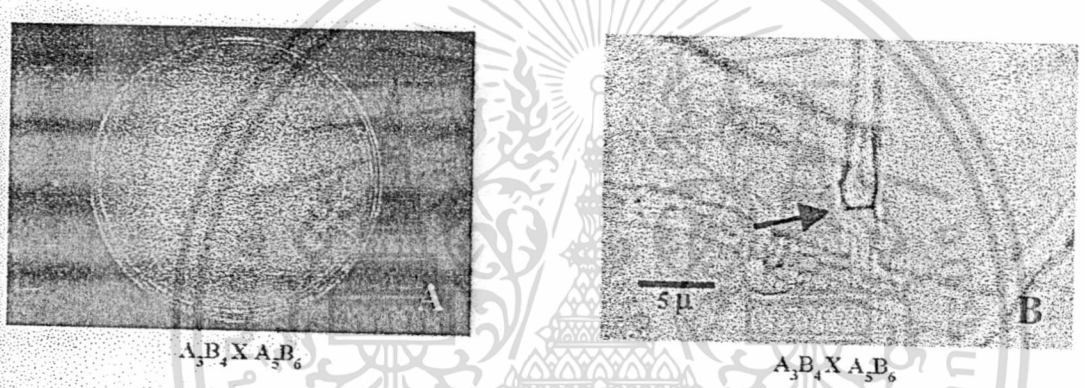
ภาพที่ 4.45 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X ปทุมธานีดอกที่ 1
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน ($A \neq B \neq$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



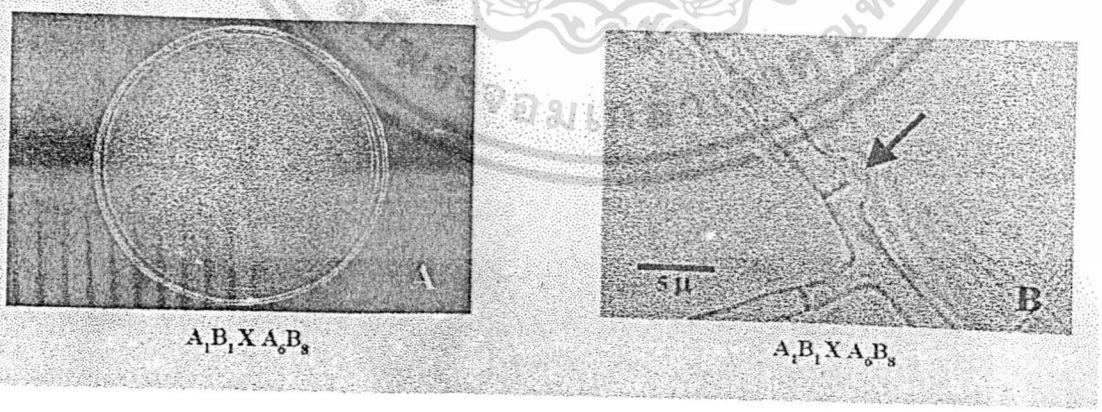
$A_1B_2 X A_5B_6$ $A_1B_2 X A_5B_6$

ภาพที่ 4.46 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X ปทุมธานีดอกที่ 1
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)



$A_3B_4 X A_5B_6$ $A_3B_4 X A_5B_6$

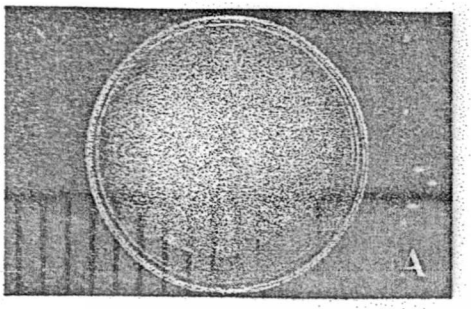
ภาพที่ 4.47 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคาม X ปทุมธานีดอกที่ 1
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)



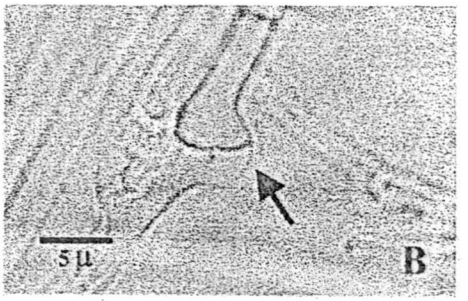
$A_1B_1 X A_6B_8$ $A_1B_1 X A_6B_8$

ภาพที่ 4.48 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X ปทุมธานีดอกที่ 2
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

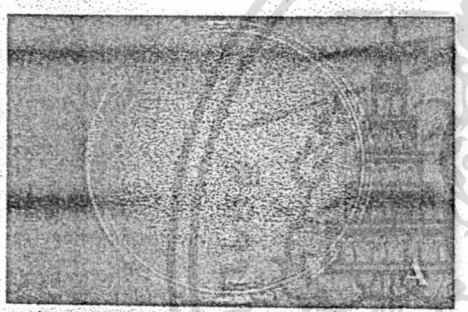


$A_1B_2 X A_6B_7$

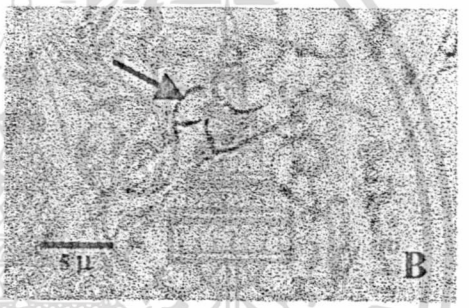


$A_1B_2 X A_6B_7$

ภาพที่ 4.49 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X ปทุมธานีดอกที่ 2
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)

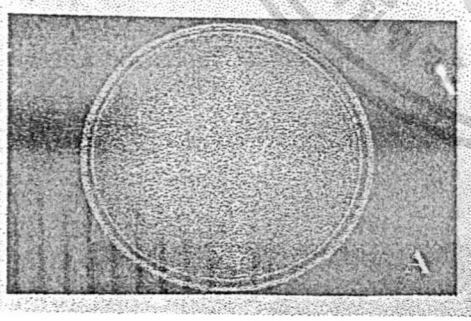


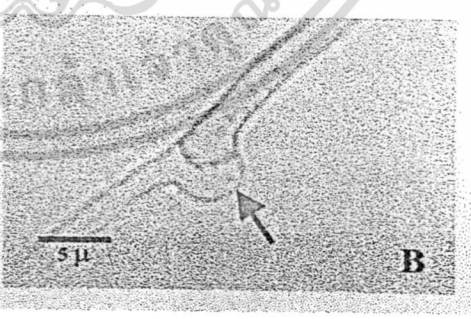
$A_3B_4 X A_6B_8$



$A_3B_4 X A_6B_8$

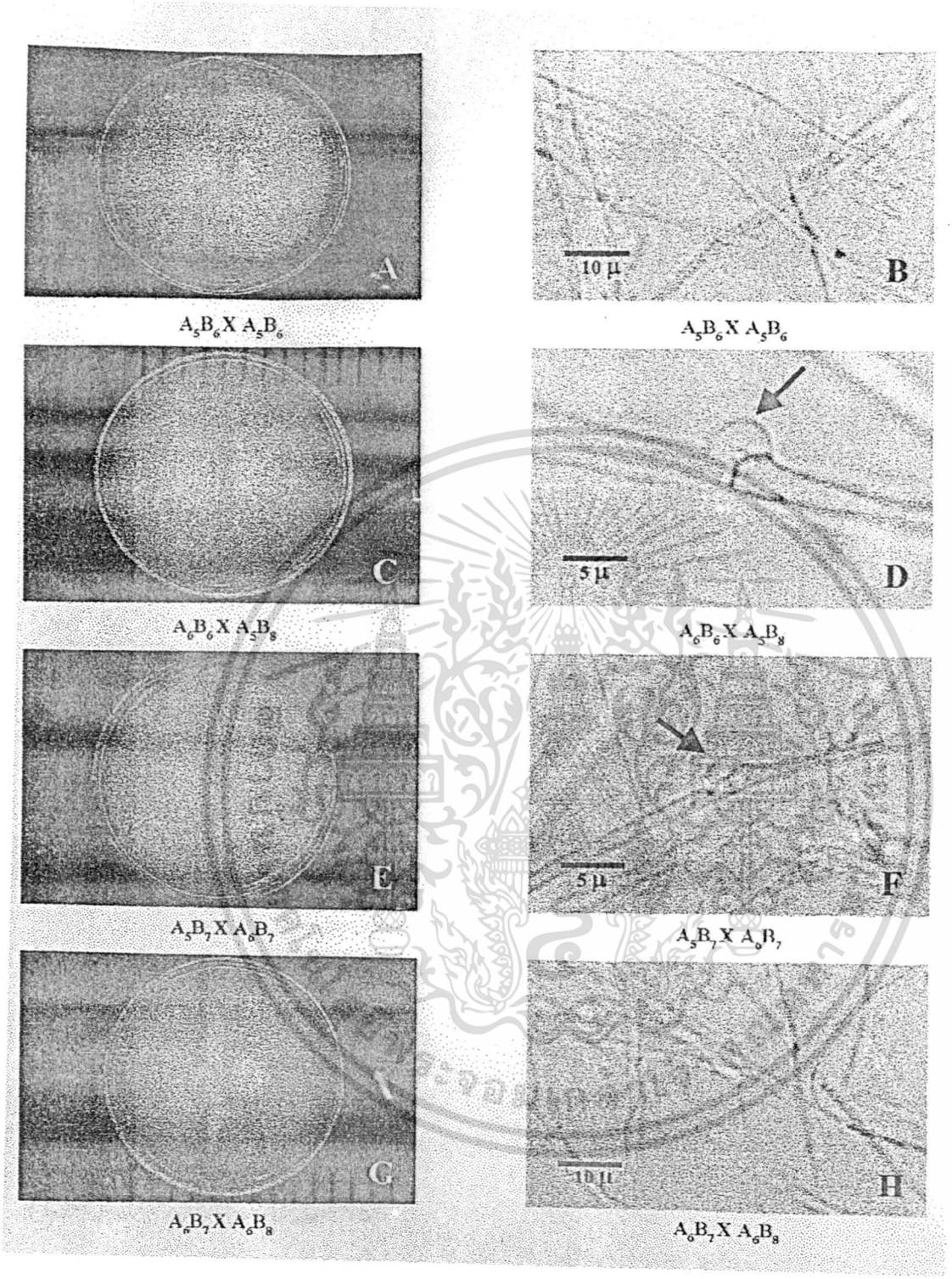
ภาพที่ 4.50 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคาม X ปทุมธานีดอกที่2
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)





ภาพที่ 4.51 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X อุบลราชธานีดอกที่ 1
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.52 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X ปทุมธานีดอกที่ 1

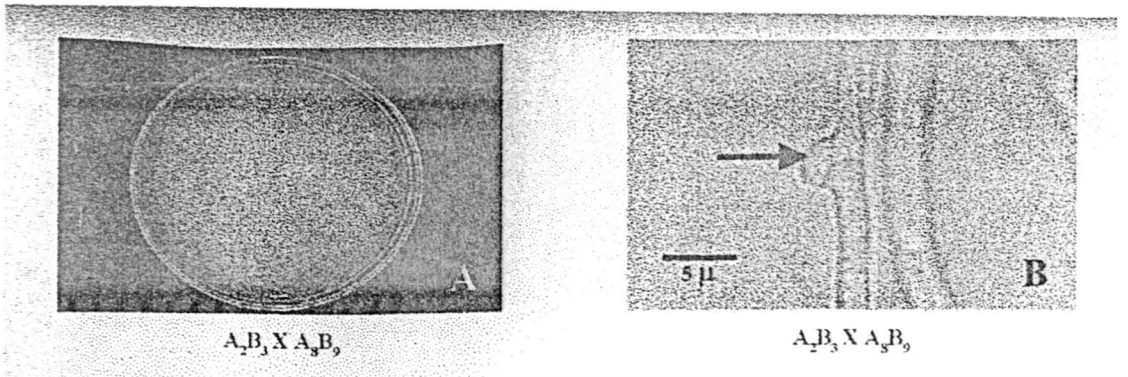
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B≠)

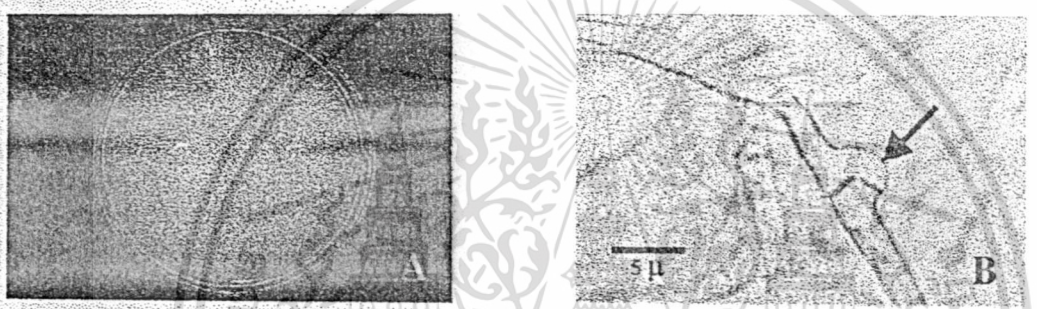
G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



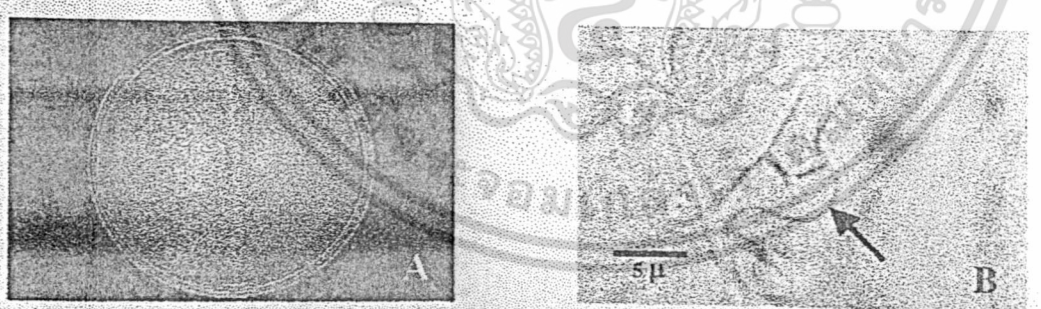
$A_2B_3 X A_3B_9$ $A_2B_3 X A_3B_9$

ภาพที่ 4.53 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X อุบลราชธานีดอกที่ 1
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)



$A_4B_4 X A_9B_9$ $A_4B_4 X A_9B_9$

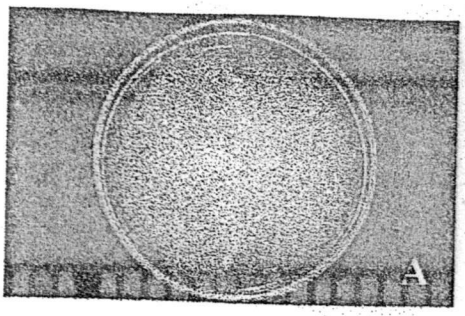
ภาพที่ 4.54 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคาม X อุบลราชธานีดอกที่ 1
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)



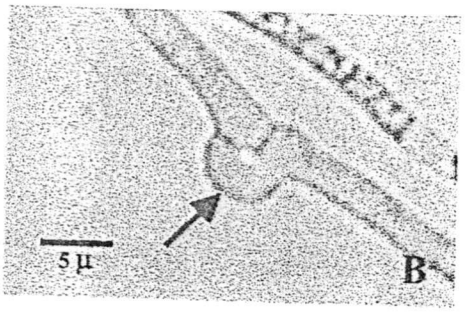
$A_4B_4 X A_9B_9$ $A_4B_4 X A_9B_9$

ภาพที่ 4.55 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัด ปทุมธานีดอกที่ 1 X อุบลราชธานีดอกที่ 1
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน ($A \neq B \neq$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



$A_6B_7 X A_{10}B_9$

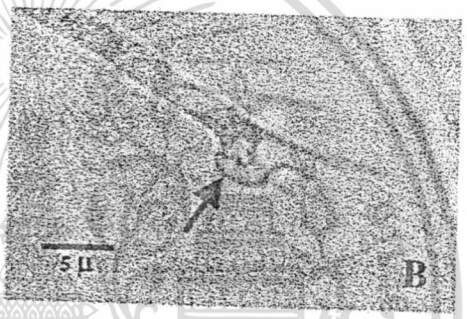


$A_6B_7 X A_{10}B_9$

ภาพที่ 4.56 การผสมพันธุ์ของเส้นใยไมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 X อุบลราชธานีดอกที่ 1

A. เส้นใยไมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)

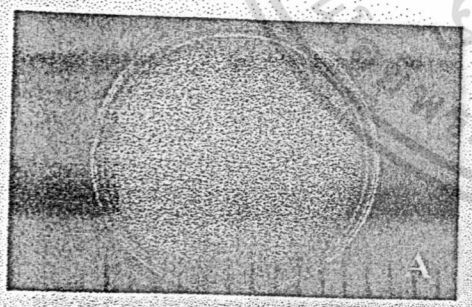
$A_6B_7 X A_{10}B_9$



$A_6B_7 X A_{10}B_9$

ภาพที่ 4.57 การผสมพันธุ์ของเส้นใยไมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X อุบลราชธานีดอกที่ 2

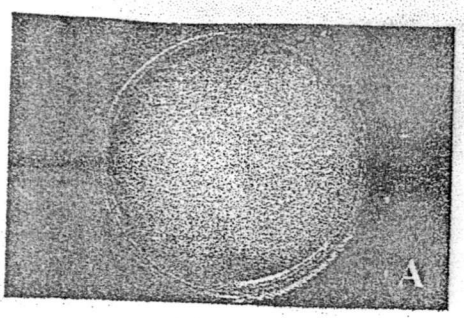
A. เส้นใยไมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)



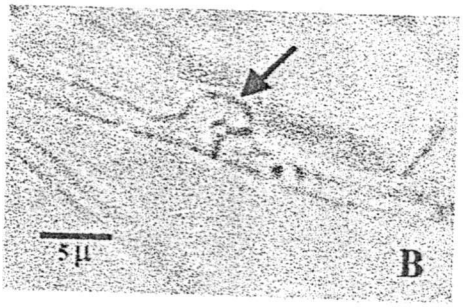
ภาพที่ 4.58 การผสมพันธุ์ของเส้นใยไมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X อุบลราชธานีดอกที่ 2

A. เส้นใยไมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน ($A \neq B \neq$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



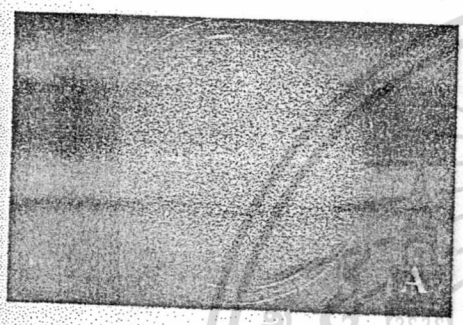
$A_4B_5 X A_8B_{10}$



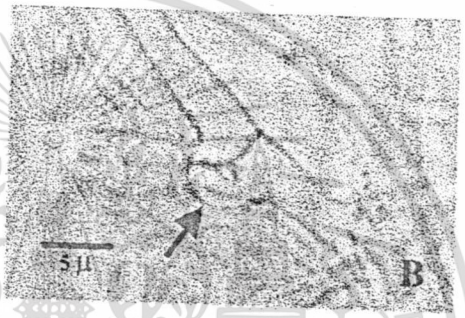
$A_4B_5 X A_8B_{10}$

ภาพที่ 4.59 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคาม X อุบลราชธานีดอกที่ 2

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)



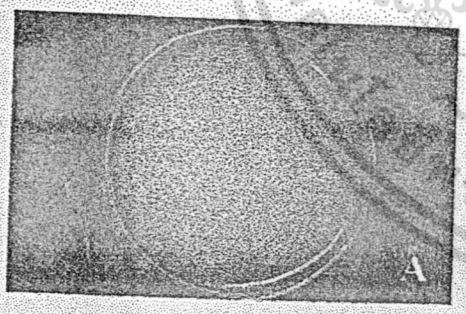
$A_6B_6 X A_9B_{10}$



$A_6B_6 X A_9B_{10}$

ภาพที่ 4.60 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X อุบลราชธานีดอกที่ 2

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)



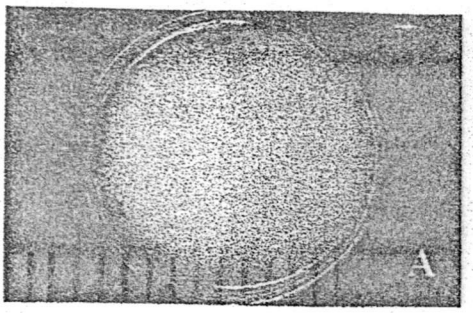
$A_6B_7 X A_8B_9$

$A_6B_7 X A_8B_9$

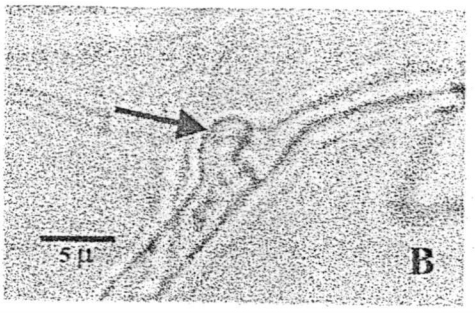
ภาพที่ 4.61 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 X อุบลราชธานีดอกที่ 2

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



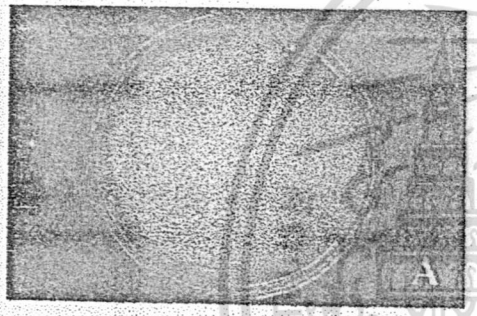
$A_2B_2 X A_{11}B_{11}$



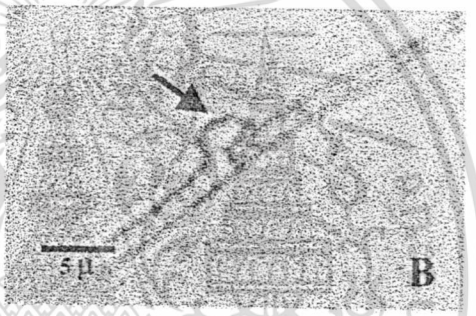
$A_2B_2 X A_{11}B_{11}$

ภาพที่ 4.62 การผสมพันธุ์ของเส้นใยไมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 1

A. เส้นใยไมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)



$A_2B_3 X A_{11}B_{12}$

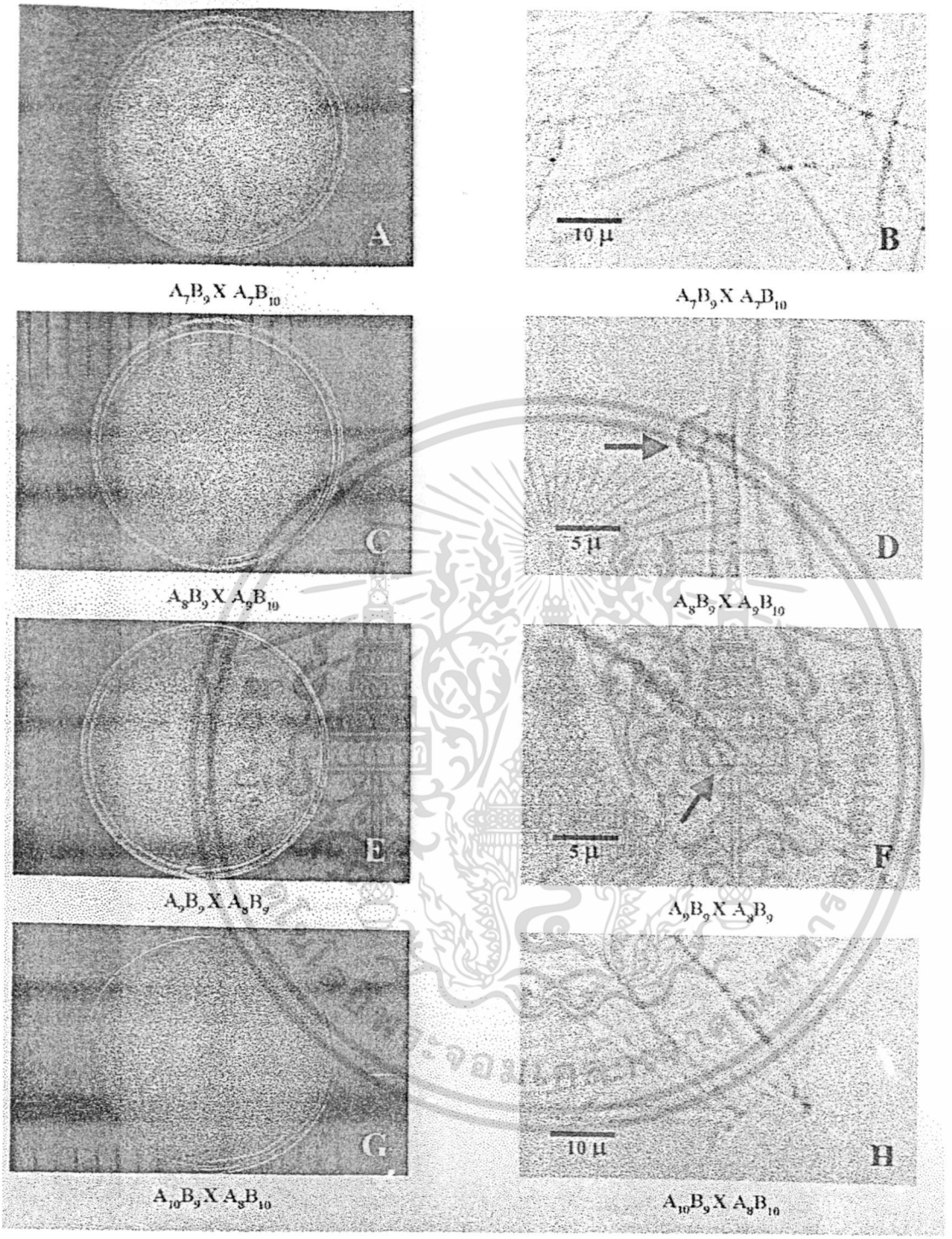


$A_2B_3 X A_{11}B_{12}$

ภาพที่ 4.63 การผสมพันธุ์ของเส้นใยไมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X นครปฐมดอกที่ 1

A. เส้นใยไมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



าพที่ 4.64 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 X อุบลราชธานีดอกที่ 2

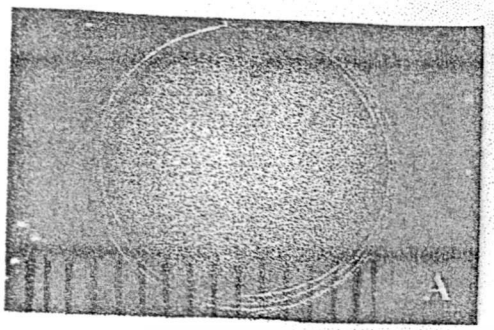
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

C. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว D. แคลมป์คอนเนคชันเจริญไม่สมบูรณ์(A≠B =)

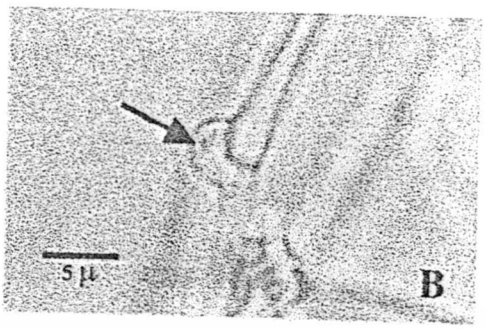
E. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ F. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B≠)

G. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ H. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน(A=B =)ภาพที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



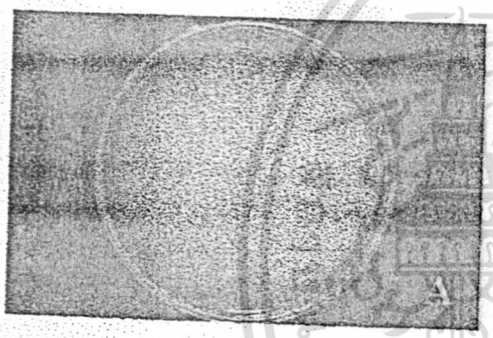
$A_4B_4 X A_{11}B_{12}$



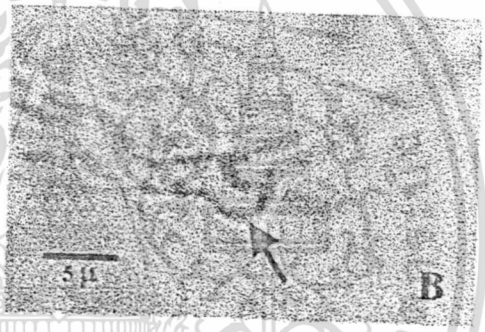
$A_4B_4 X A_{11}B_{12}$

ภาพที่ 4.65 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคาม X นครปฐมดอกที่ 1

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)



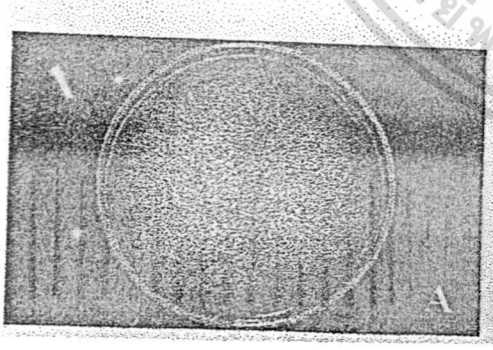
$A_6B_8 X A_{12}B_{12}$

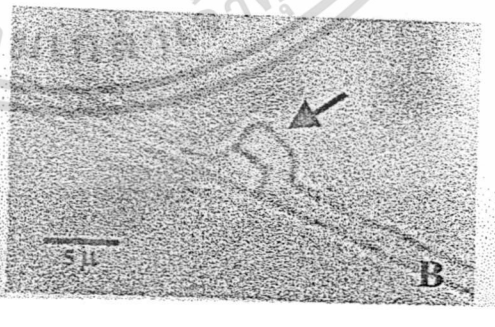


$A_6B_8 X A_{12}B_{12}$

ภาพที่ 4.66 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 1

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)

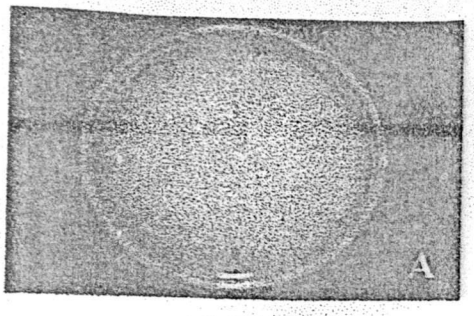




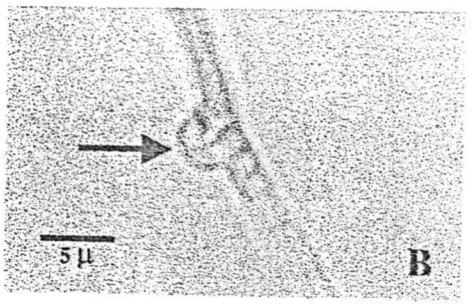
ภาพที่ 4.67 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 X นครปฐมดอกที่ 1

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



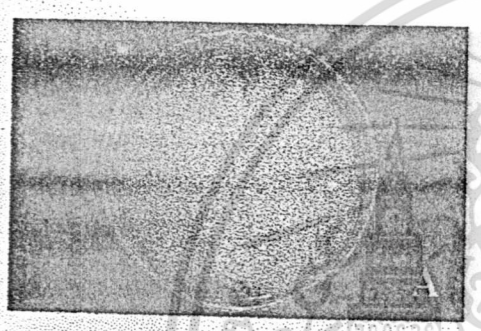
$A_9B_9 X A_{11}B_{11}$



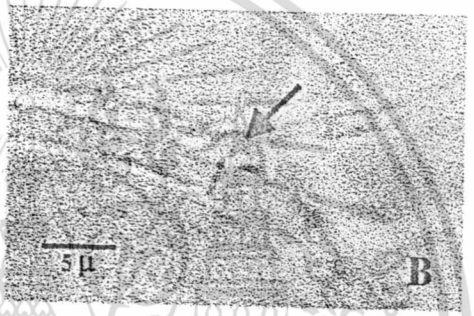
$A_9B_9 X A_{11}B_{11}$

ภาพที่ 4.68 การผสมพันธุ์ของเส้นใยไมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 1

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)



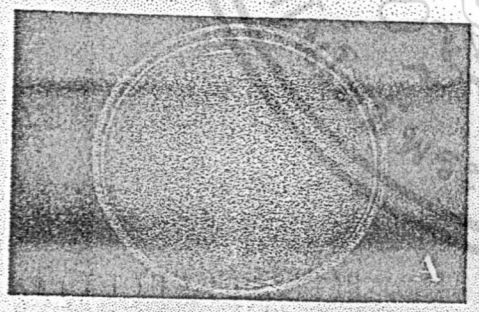
$A_7B_{10} X A_{11}B_{12}$



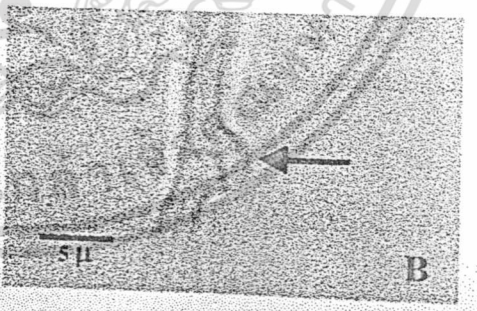
$A_7B_{10} X A_{11}B_{12}$

ภาพที่ 4.69 การผสมพันธุ์ของเส้นใยไมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 X นครปฐมดอกที่ 1

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)



$A_1B_1 X A_{13}B_{12}$

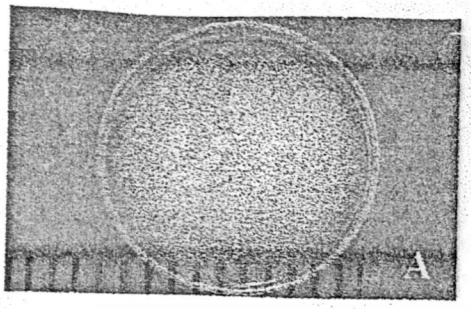


$A_1B_1 X A_{13}B_{12}$

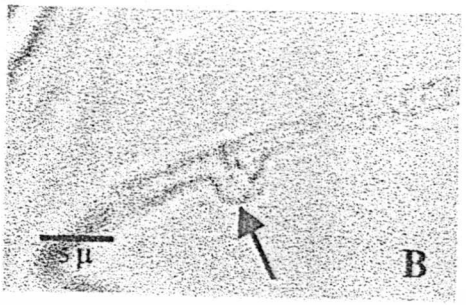
ภาพที่ 4.70 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 2

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



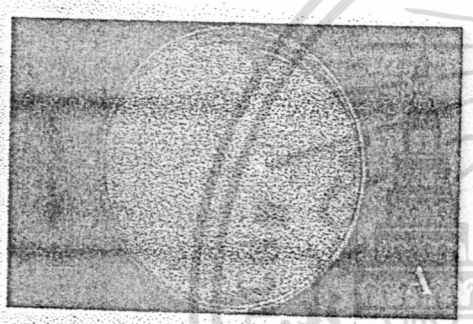
$A_2B_3 X A_{13}B_{12}$



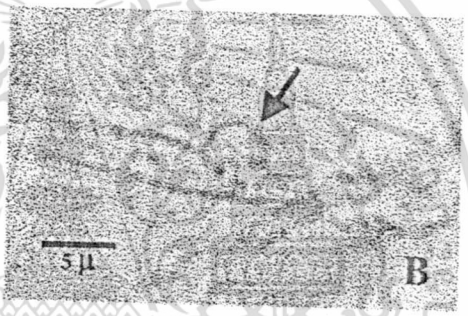
$A_2B_3 X A_{13}B_{12}$

ภาพที่ 4.71 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X นครปฐมดอกที่ 2

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)



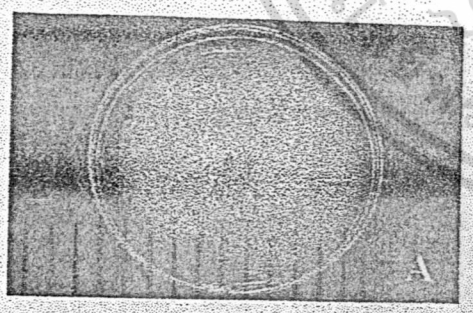
$A_3B_5 X A_{13}B_{13}$



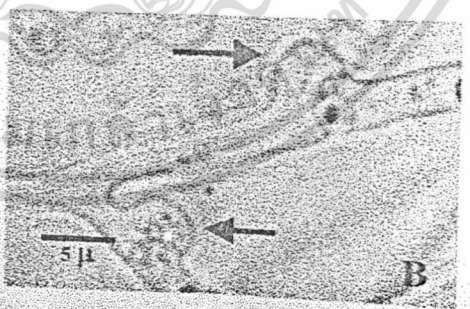
$A_3B_5 X A_{13}B_{13}$

ภาพที่ 4.72 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคาม X นครปฐมดอกที่ 2

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)



$A_5B_7 X A_{11}B_{13}$

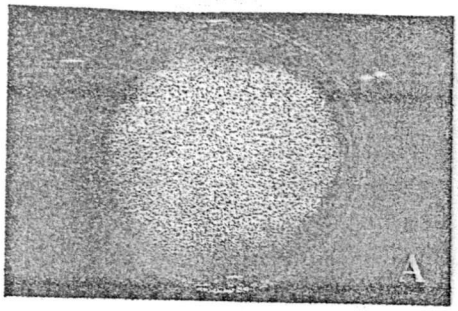


$A_5B_7 X A_{11}B_{13}$

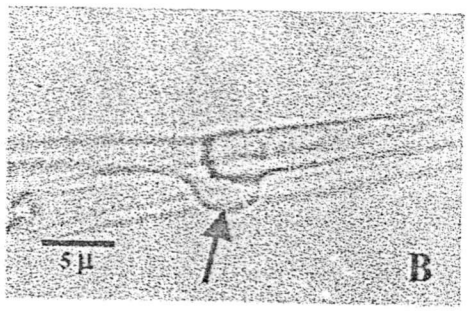
ภาพที่ 4.73 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 2

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

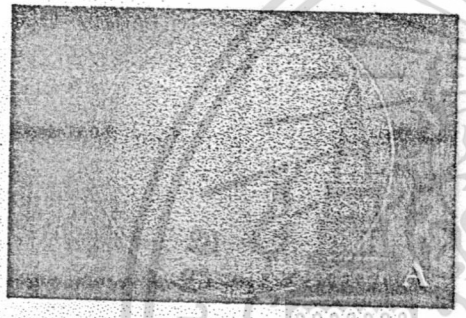


$A_6B_7X\,A_{13}B_{14}$

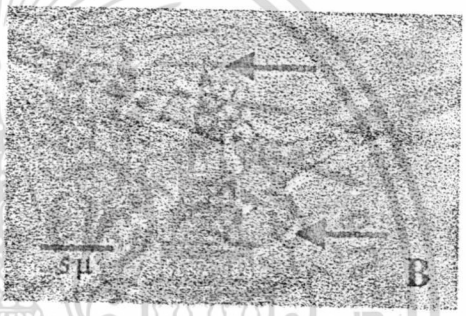


$A_6B_7X\,A_{13}B_{14}$

ภาพที่ 4.74 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 2
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)

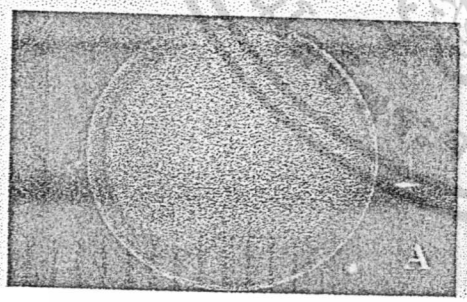


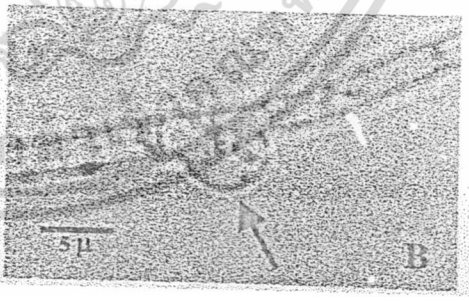
$A_{10}B_9X\,A_{13}B_{13}$



$A_{10}B_9X\,A_{13}B_{13}$

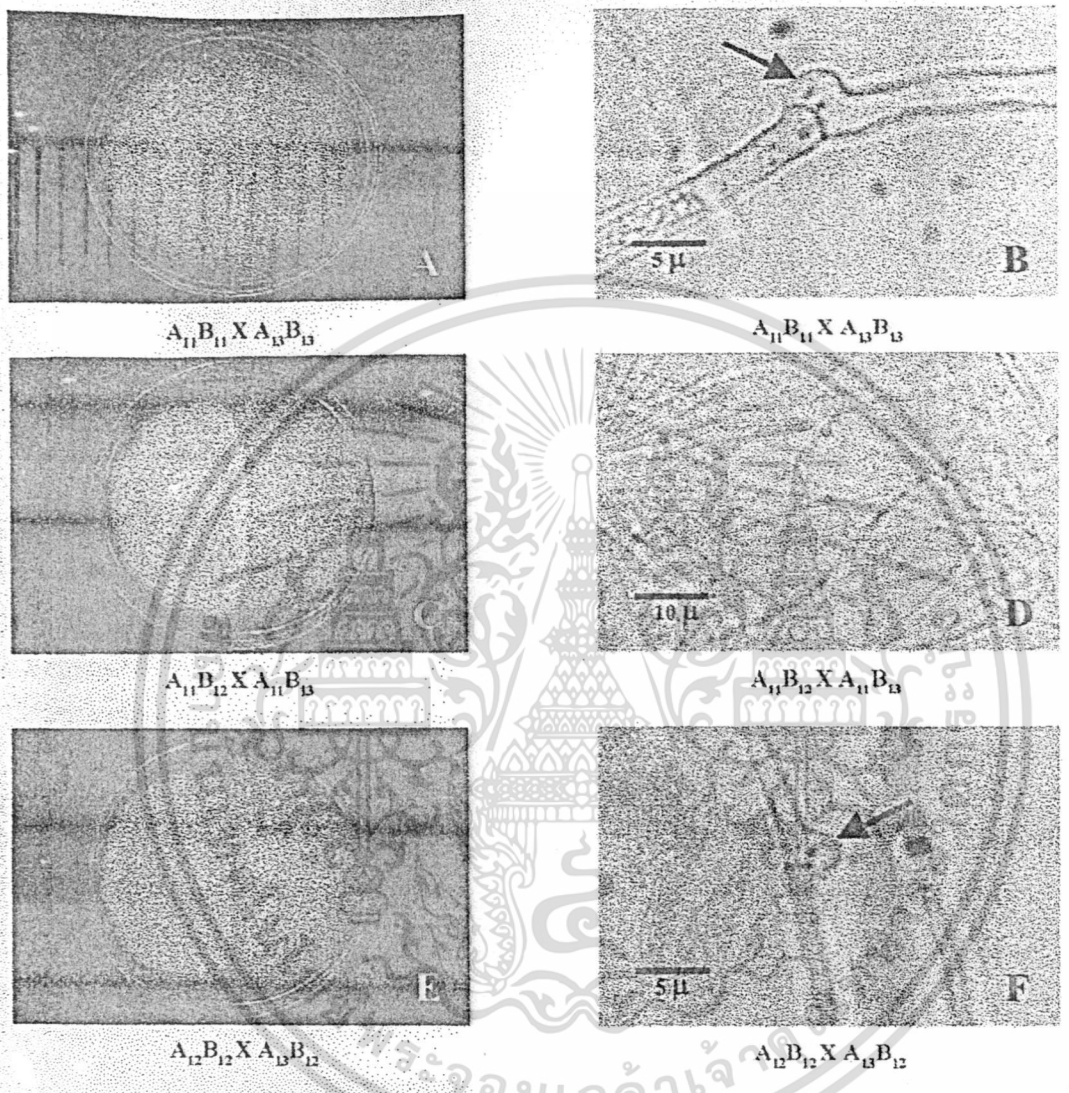
ภาพที่ 4.75 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 2
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)





ภาพที่ 4.76 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 X นครปฐมดอกที่ 2
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน ($A \neq B \neq$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



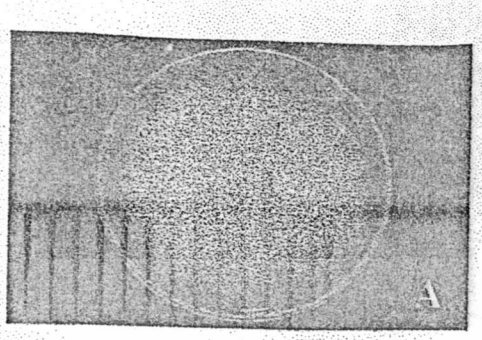
ภาพที่ 4.77 การผสมพันธุ์ของเส้นใยไมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 X นครปฐมดอกที่ 2

A. เส้นใยไมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)

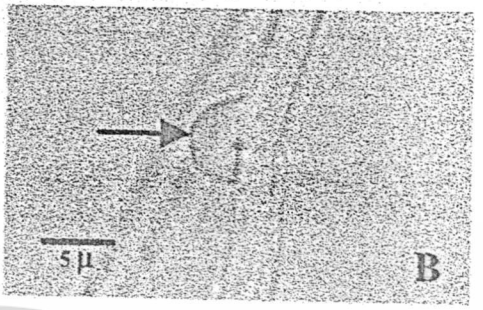
C. เส้นใยไมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ D. เส้นใยไม่สร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น ($A = B \neq$)

E. เส้นใยไมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้กึ่งเดียว F. แคลมป์ คอนเนคชั่นเจริญไม่สมบูรณ์ ($A \neq B =$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



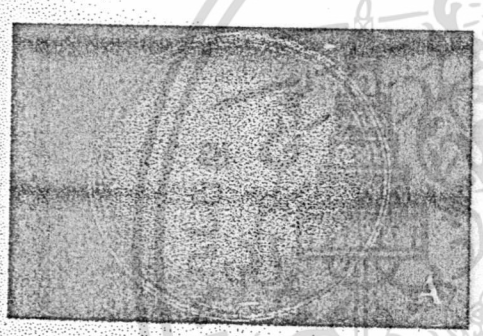
$A_1B_1 X A_{14}B_{15}$



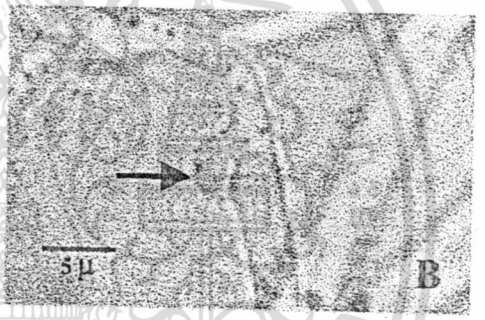
$A_1B_1 X A_{14}B_{15}$

ภาพที่ 4.78 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 1 X ศรีสะเกษ

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)



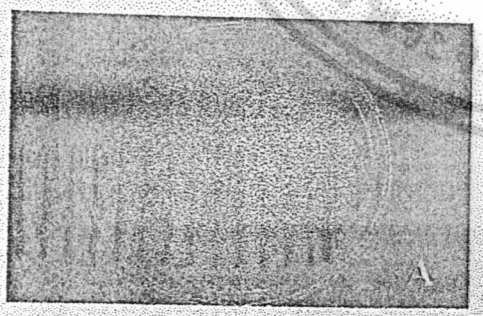
$A_1B_2 X A_{15}B_{15}$



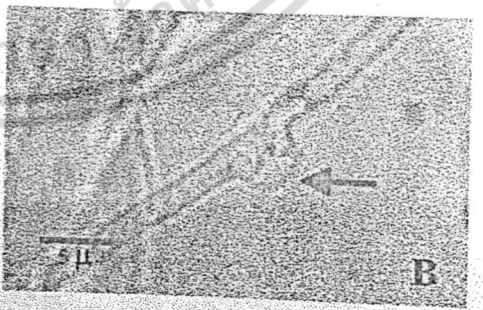
$A_1B_2 X A_{15}B_{15}$

ภาพที่ 4.79 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดสกลนครดอกที่ 2 X ศรีสะเกษ

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)



$A_3B_4 X A_{15}B_{16}$

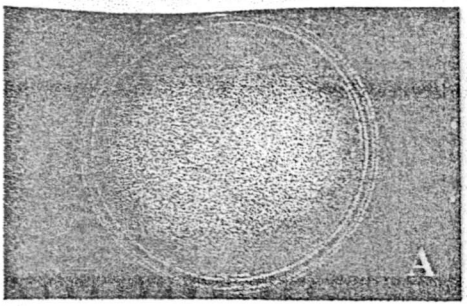


$A_3B_4 X A_{15}B_{16}$

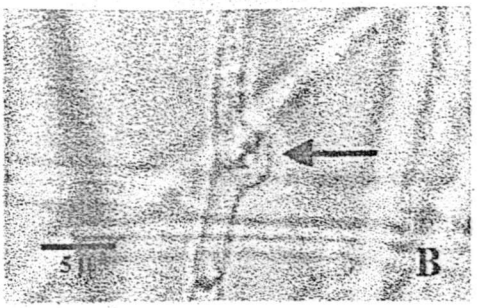
ภาพที่ 4.80 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม X ศรีสะเกษ

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน ($A \neq B \neq$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

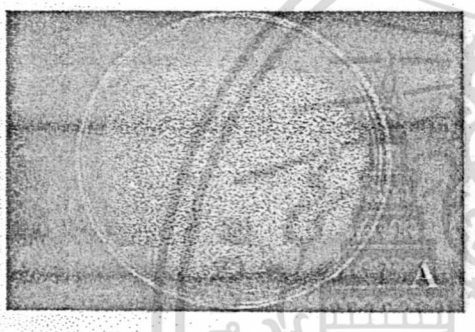


$A_5B_6 X A_{15}B_{15}$

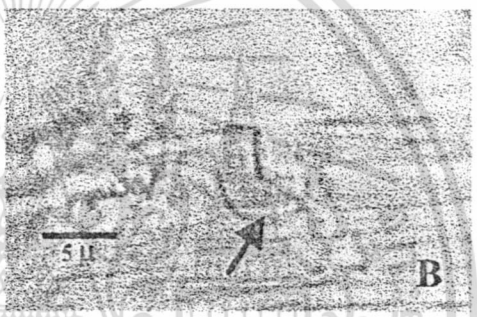


$A_5B_6 X A_{15}B_{15}$

ภาพที่ 4.81 แสดงการผสมพันธุ์ของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวจากดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X ศรีสะเกษ
A. เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)

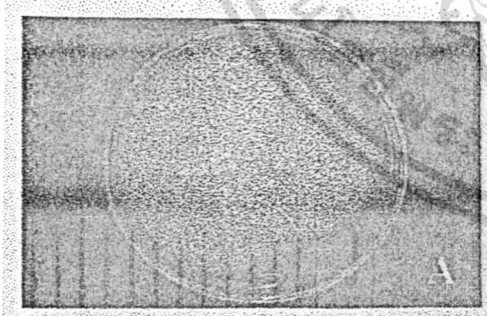


$A_6B_8 X A_{15}B_{16}$

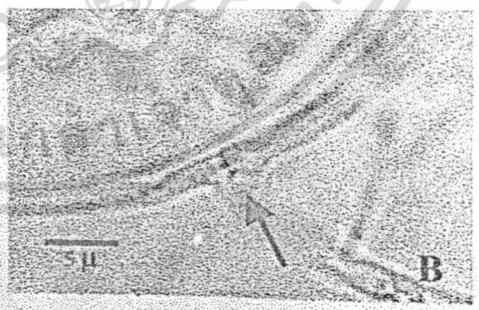


$A_6B_8 X A_{15}B_{16}$

ภาพที่ 4.82 แสดงการผสมพันธุ์ของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวจากดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 X ศรีสะเกษ
A. เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น ($A \neq B \neq$)



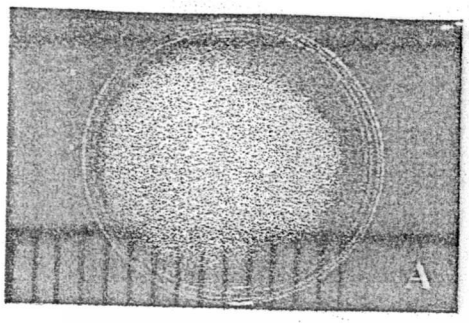
$A_7B_9 X A_{16}B_{16}$



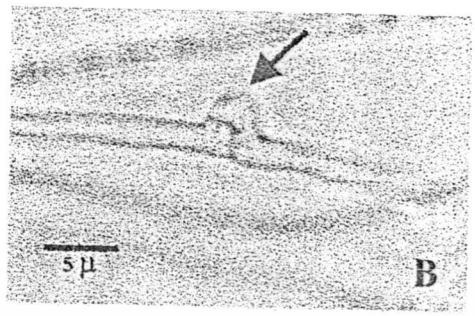
$A_7B_9 X A_{16}B_{16}$

ภาพที่ 4.83 แสดงการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 1 X ศรีสะเกษ
A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน ($A \neq B \neq$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



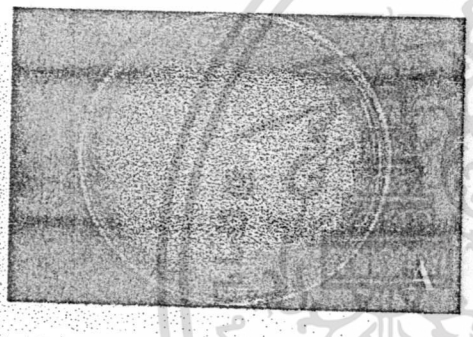
A_7B_{10} X $A_{15}B_{15}$



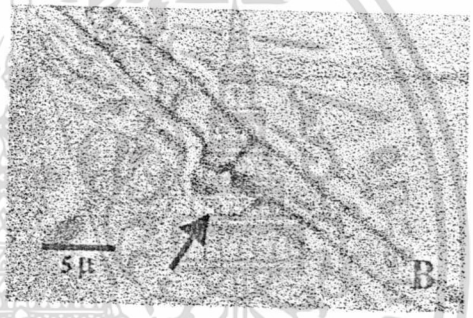
A_7B_{10} X $A_{15}B_{15}$

ภาพที่ 4.84 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีดอกที่ 2 X ศรีสะเกษ

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)



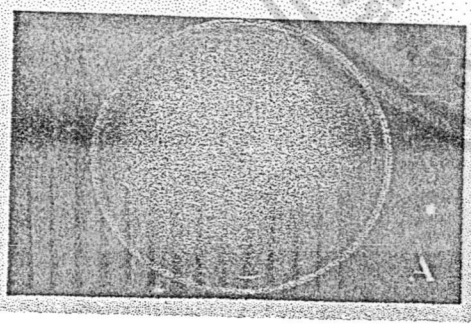
$A_{11}B_{11}$ X $A_{15}B_{16}$

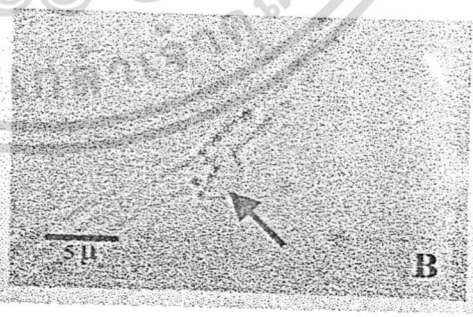


$A_{11}B_{11}$ X $A_{15}B_{16}$

ภาพที่ 4.85 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 X ศรีสะเกษ

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์ คอนเนคชั่น (A ≠ B ≠)





ภาพที่ 4.86 การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดนครปฐมดอกที่ 2 X ศรีสะเกษ

A. เส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันได้ B. แคลมป์คอนเนคชัน (A≠B≠)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาอัตราการเจริญของเส้นใยโมโนคาริออนซึ่งได้จากดอกเห็ดทั้งหมด 10 ดอก จากจังหวัดปทุมธานี นครปฐม อุบลราชธานี และสกลนคร จังหวัดละ 2 ดอก และ จังหวัดมหาสารคามและศรีสะเกษ จังหวัดละ 1 ดอก เส้นใยโมโนคาริออนแต่ละไอโซเลทจากดอกเห็ดทั้ง 10 ดอก มีอัตราการเจริญเติบโตและลักษณะของเส้นใยแตกต่างกัน โดยเส้นใยโมโนคาริออนที่มีอัตราการเจริญต่ำ เมื่อดูเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยจะมีลักษณะหงิกงอ ส่วนเส้นใยที่มีอัตราการเจริญสูงจะมีลักษณะเส้นใย 2 แบบ คือ เส้นใยที่เดินเรียบ ๆ และเส้นใยที่มีลักษณะฟู ซึ่งเส้นใยทั้ง 2 แบบเมื่อดูเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยจะมีลักษณะผิวเรียบ เส้นใยตรงหรือโค้งเล็กน้อย ไม่หงิกงอ และสอดคล้องกับรายงานของปัญญาโพธิ์ฐิติรัตน์ (2537) ที่กล่าวว่าเส้นใยที่เดินเรียบๆ จะเจริญเร็วกว่าเส้นใยที่มีลักษณะขาวฟู เพราะฉะนั้นในการขยายพันธุ์จึงใช้เส้นใยที่เดินเรียบ ๆ เพราะเส้นใยจะเดินเต็มก้อนได้เร็วกว่า

ผลการศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด โดยการนำเส้นใยโมโนคาริออนอย่างน้อย 12 ไอโซเลทผสมภายในดอกเดียวกันทีละคู่แบบพบกันหมด เมื่อตรวจการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่นและลักษณะของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกัน พบว่าเห็ดตีนแรดทุกจังหวัดมีรูปแบบการผสมพันธุ์ 4 แบบ คือ

1. เส้นใยผสมพันธุ์กันได้และมีการสร้างแคลมป์
2. เส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเป็นร่อง (barrage) และมีการสร้างแคลมป์ คอน เนคชั่นที่เจริญไม่สมบูรณ์
3. เส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเหลื่อมซ้อนกัน (overlap) และไม่มีการสร้าง แคลมป์ คอนเนคชั่น 4. เส้นใยบริเวณ ที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเป็นแถบหนา (flat) และไม่มีการสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น

จากการตรวจการเกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น แล้วนำมาหาอัตราส่วนของคู่ที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมด พบว่าเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 1 นครปฐมดอกที่ 1 อุบลราชธานีดอกที่ 1 สกลนครดอกที่ 1 และศรีสะเกษ มีอัตราส่วนของคู่ที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดเท่ากับ 1 : 4 แต่มีเส้นใยโมโนคาริออนจากดอกเห็ดบางดอกมีอัตราส่วนของคู่ที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดไม่เท่ากับ 1 : 4แต่ใกล้เคียงกับ 1 : 4 ได้แก่ เส้นใย โมโนคาริออนจากดอกเห็ดจังหวัดปทุมธานีดอกที่ 2 นครปฐมดอกที่ 2 อุบลราชธานีดอกที่ 2 สกลนครดอกที่ 2 และเมื่อผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนภายในดอกเดียวกันทีละคู่แบบพบกันหมดแล้ว เกิดรูปแบบการผสมพันธุ์ได้ 4 แบบดังกล่าวข้างต้น เนื่องจาก

1. ถ้าเส้นใยโมโนคาริออ นที่ผสมพันธุ์กันได้ เนื่องจากเส้นใยโมโนคาริออนที่เป็นคู่ผสมพันธุ์มียีนควบคุมคู่ผสมพันธุ์แตกต่างกันทั้งโลกัส A และโลกัส B ($A_1B_1XA_2B_2$ หรือ $A_1B_2XA_2B_1$) ทำให้มีกระบวนเกิดเส้นใยทุติยภูมิอย่างสมบูรณ์ คือ มีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายตะขอ มีการแบ่งนิวเคลียส มีการสลายผนังเซลล์ของโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายตะขอรวมกับเส้นใยเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ถ้าเส้นใยโมโนคาริออนผสมพันธุ์กันไม่ได้ ซึ่งเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเป็นร่องลึกหรือ barrage และเกิดโครงสร้างของแคลมป์ คอนเนคชั่นที่เจริญไม่สมบูรณ์ เนื่องจากเส้นใยโมโนคาริออนที่เป็นคู่ผสมพันธุ์มียีนควบคุมคู่ผสมพันธุ์ที่โลกัส A ต่างกันแต่โลกัส B เหมือนกัน ($A_1B_1X A_2B_1$ หรือ $A_1B_2XA_2B_2$: common B) ทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายตะขอและมีการแบ่งนิวเคลียส แต่ไม่มีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสและการสลายผนังเซลล์ของโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายตะขอรวมกับเส้นใยเดิม จึงเห็นเส้นใยมีลักษณะที่เรียกว่า false-clamp connection หรือ pseudoclamp connection

3. ถ้าเส้นใยโมโนคาริออ นผสมพันธุ์กันไม่ได้ ซึ่งเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะเป็นแถบหนาหรือ flat และเส้นใยไม่เกิดแคลมป์ คอนเนคชั่น เนื่องจากเส้นใยโมโนคาริออนที่เป็นคู่ผสมพันธุ์มียีนควบคุมคู่ผสมพันธุ์ที่โลกัส A เหมือนกันแต่โลกัส B ต่างกัน ($A_1B_1X A_1B_2$ หรือ $A_2B_2X A_2B_1$: common A) ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส แต่ไม่เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายตะขอและการแบ่งนิวเคลียส

4. ถ้าเส้นใยโมโนคาริออ นผสมพันธุ์กันไม่ได้ ซึ่งเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันมีลักษณะซ้อนทับกัน เนื่องจากเส้นใยโมโนคาริออนที่เป็นคู่ผสมพันธุ์มียีนควบคุมคู่ผสมพันธุ์เหมือนกันทั้งโลกัส A และโลกัส B ($A_1B_1X A_1B_1$ หรือ $A_2B_2X A_2B_2$) ทำให้ไม่เกิดแคลมป์ คอนเนคชั่นและกระบวนการเกิดเส้นใยทุติยภูมิ ซึ่งลักษณะการผสมพันธุ์ทั้งหมดสอดคล้องกับการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนของ *Schizophyllum commune* (Papazian. 1950) *Pleurotus sajor-caju* (Raxon and Jong. 1977)

เห็ดส่วนใหญ่ในคลาสไฮมีโนไมซีเทสมีการผสมพันธุ์แบบเฮเทอโรทัลลิก โดยเห็ดที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบไบโพลาร์หรือมีอัตราส่วนคู่ผสมพันธุ์ได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดเท่ากับ 1 : 2 มีประมาณ 39 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเห็ดที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์หรือมีอัตราส่วนคู่ผสมพันธุ์ได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดเท่ากับ 1 : 4 มีถึง 61 เปอร์เซ็นต์ (Kniep. 1920) และจากการศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดในทุกจังหวัดนั้น พบว่ามีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ โดยเห็ดชนิดนี้สามารถผสมพันธุ์กันได้ เมื่อสปอร์ตกในที่ที่เหมาะสมต่อการเจริญก็จะงอกเป็นเส้นใยโมโนคาริออน ถ้าเส้นใยโมโนคาริออนมีเมทิ่งไทป์ต่างกัน ($A\neq B\neq$) ก็จะสามารถผสมพันธุ์กันได้เกิดเป็นเส้นใยไดคาริออนและเจริญเป็นดอกเห็ดต่อไป ทำให้เห็ดสามารถสืบพันธุ์และดำรงชีวิตต่อไป โดยจะไม่เกิดการสูญพันธุ์

สำหรับการศึกษาหาจำนวนมัลทิเพิลอัลลีล จากการนำเส้นใยโมโนคาริออนที่เป็นตัวแทนกลุ่มของเมทิ่งไทป์ A_1B_1 A_1B_2 A_2B_2 และ A_2B_1 ของแต่ละดอก ทั้งหมด 10 ดอก (40 ไอโซเลท) ทำการผสมข้ามดอกทีละคู่แบบพบกันหมด พบว่าเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมได้มีจำนวนอัลลีลที่โลกัส A และ โลกัส B เท่ากับ 16 อัลลีล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาจำนวนมัลทิเพิลอัลลีลของเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมได้จากจังหวัดต่างๆนี้ พบว่ามีบางไอโซเลทที่มียีโนไทป์เหมือนกัน ได้แก่

1. จังหวัดสกลนคร ไอโซเลทที่ 4 ของดอกที่ 1 กับไอโซเลทที่ 1 ของดอกที่ 2 มียีโนไทป์ A_1B_2 ไอโซเลทที่ 2 ของดอกที่ 1 กับไอโซเลทที่ 2 ของดอกที่ 2 มียีโนไทป์ A_2B_2 และ ไอโซเลทที่ 4 ของดอกที่ 1 กับไอโซเลทที่ 1 ของดอกที่ 2 มียีโนไทป์ A_1B_1

2. จังหวัดปทุมธานี ไอโซเลทที่ 1 ของดอกที่ 1 กับไอโซเลทที่ 1 ของดอกที่ 2 มียีโนไทป์ A_5B_6 และไอโซเลทที่ 4 ของดอกที่ 1 กับไอโซเลทที่ 4 ของดอกที่ 2 มียีโนไทป์ A_6B_7

3. จังหวัดอุบลราชธานี ไอโซเลทที่ 2 ของดอกที่ 1 กับไอโซเลทที่ 3 ของดอกที่ 2 มียีโนไทป์ A_9B_9

ซึ่งจะเห็นได้ว่าไอโซเลทที่ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ (overlap) และมียีโนไทป์เหมือนกันนั้น เกิดจากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนภายในจังหวัดเดียวกัน ซึ่งการเก็บดอกเห็ดตีนแรดของจังหวัดสกลนคร ปทุมธานี และจังหวัดอุบลราชธานีนั้นได้เก็บจากบริเวณที่ใกล้เคียงกัน โดยห่างกันไม่เกิน 1 กิโลเมตร ทำให้มีโอกาสที่ดอกเห็ดที่เก็บมานั้นเกิดมาจากดอกเห็ดดอกเดียวกัน จึงทำให้เส้นใยโมโนคาริออนมียีโนไทป์เหมือนกันได้ แต่สำหรับการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนระหว่างเห็ดตีนแรดจากจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 กับดอกที่ 2 ไม่มีไอโซเลทที่มียีโนไทป์เหมือนกันนั้น เนื่องจากในการเก็บตัวอย่างเห็ดตีนแรดของจังหวัดนครปฐมดอกที่ 1 และดอกที่ 2 ได้จากการเก็บคนละครั้งกันทำให้โอกาสที่ดอกเห็ดทั้งสองจะเกิดจากเห็ดดอกเดียวกันนั้นเป็นไปได้ยาก จึงทำให้เส้นใยโมโนคาริออนมียีโนไทป์ไม่เหมือนกัน

การหาจำนวนมัลทิเพิลอัลลีล ที่มีจำนวนอัลลีลที่โลกัส A และโลกัส B เท่ากับ 16 อัลลีลที่แตกต่างกันนั้น ขึ้นอยู่กับจำนวนตัวอย่างของดอกเห็ดที่นำมาศึกษา ซึ่งจากการทดลองได้ศึกษาจากดอกเห็ดเพียง 10 ดอกเท่านั้น โดยถ้าศึกษาจากดอกเห็ดจำนวนมากกว่านี้ก็มีโอกาสที่จะพบว่าเห็ดตีนแรดมีจำนวนอัลลีลเพิ่มขึ้นได้ เช่น ในการศึกษาจำนวนมัลทิเพิลอัลลีลจาก *P. ostreatus* จำนวน 8 ดอก พบว่ามีจำนวนอัลลีลที่โลกัส A และโลกัส B เท่ากับ 13 อัลลีล (Kay and Vilgalys. 1992) แต่เมื่อเพิ่มจำนวนดอกเห็ดที่นำมาศึกษาเป็น 12 ดอก พบว่ามีจำนวน อัลลีลเพิ่มขึ้นคือ มีจำนวนอัลลีลที่โลกัส A 17 อัลลีลและโลกัส B เท่ากับ 20 อัลลีล (Eugenio and Anderson. 1968) นอกจากนี้จำนวนอัลลีลที่แตกต่างกันแสดงว่ามีการกระจายตัวของลักษณะพันธุกรรม โดยดอกเห็ดที่เก็บจากบริเวณใกล้เคียงกันหรือจังหวัดเดียวกันจะมีการกระจายตัวน้อยกว่าดอกเห็ดตีนแรดที่เก็บจากต่างจังหวัดกัน ซึ่งในการกระจายตัวของอัลลีลจะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการแพร่กระจายของสปอร์ในแต่ละพื้นที่ ดังรายงานของ Raper *et al.* (1958) และ Ullrich and Raper (1974) และจากการที่ดอกเห็ดมีอัลลีลที่แตกต่างกันจึงทำให้เกิดความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งจะเห็นได้ว่าเส้นใยจากดอกเห็ดตีนแรดส่วนใหญ่จากทุกจังหวัดสามารถผสมพันธุ์กันได้ ซึ่งจะนำประโยชน์นี้ไปใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. เส้นใยโมโนคาริออน 138 ตัวอย่าง มีการเจริญของเส้นใยสูงสุดในวันที่ 21 และเจริญได้ดีในอาหารเหลวพีดีวายบี

2. รูปแบบเอนไซม์อิเล็กโตรฟอริซิสของเอนไซม์ 8 ชนิด จาก 11 ชนิดคือ G6PD PGD ADH LDH MDH LAC EST AKP สามารถนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.00 และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA พบว่า สามารถจัดกลุ่มเส้นใยเห็ด 2 กลุ่มชัดเจน และสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เส้นใยเห็ดจากจังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม และ อุบลราชธานี

กลุ่มที่ 2 เส้นใยเห็ดจากจังหวัดสกลนคร อุบลราชธานี ศรีษะเกษตำบลโพนข่าและวังหิน โดยเส้นใยจากจังหวัดอุบลราชธานีแทรกอยู่ในกลุ่มเส้นใยทั้งสองกลุ่ม ผลการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ชี้ให้เห็นว่า เส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้ เส้นใยของเห็ดจังหวัดนี้สามารถเกิดตุ่มดอกในอาหารข้าวฟ่าง และเส้นใยจากจังหวัดมหาสารคามเกิดตุ่มดอกในอาหารเหลวพีดีวายบี

3. เมื่อศึกษาเพิ่มเติม โดยเพิ่มตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดจากภาคกลาง 2 จังหวัดคือฟาร์มเห็ดอรัญญิก (กรุงเทพฯ) ปทุมธานี และภาคตะวันออกเฉียงเหนืออีก 2 จังหวัด คือ ร้อยเอ็ด บุรีรัมย์ ยังคงพบว่าตัวอย่างเห็ดทั้งหมดรวม 9 จังหวัด ยังคงเจริญเติบโตดีในอาหารเหลวพีดีวายบี

4. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการของCenis (1992) ได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้เส้นใย 1 กรัม แถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจนพอสมควร

5. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอทั้งสองบริเวณ คือ บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 ที่มีลำดับเบสเป็น 5′-TCCGTAGGCCGTGGAT-3′และITS4 ที่มีลำดับเบสเป็น 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′ ได้ดีเอ็นเอขนาด 741 คู่เบส

6. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ด้วยไพรเมอร์สองชนิด คือไพรเมอร์ O1 ที่มีลำดับเบสเป็น 5′-AGTCCTATGGCCGTGGAT-3′ และ ไพรเมอร์ LR12R ที่มีลำดับเบสเป็น 5′-CTGAACGCCCTCTAAGTCAGAA-3′ ได้ดีเอ็นเอขนาด 933 คู่เบส

7. สามารถหาความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ย่อยโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Hind*III *Hinf*I *Dde*I และ *Hae*III เมื่อนำผลมาวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี UPGMA ในโปรแกรม WinBoot พบว่า สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม 1 ประกอบด้วยเห็ดตีนแรดจาก 9 จังหวัด

กลุ่ม 2 ประกอบด้วยเห็ดนางฟ้าที่นำมาทดลองเปรียบเทียบ

โดยกลุ่มที่ 1 สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ

กลุ่ม I ประกอบด้วย เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม อุบลราชธานี ศรีสะเกษ นครราชสีมา ร้อยเอ็ด และสกลนคร

กลุ่ม II ประกอบด้วย เห็ดตีนแรดจากฟาร์มเห็ดอรัญญิก และ จังหวัดปทุมธานี

กลุ่ม III ประกอบด้วย เห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์

8. ภาพเดนโดรแกรมที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 1.000 - 0.8 ในการแยกกลุ่ม I และกลุ่ม II ออกจากกลุ่ม III มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.8 และในการแยกกลุ่ม I ออกจากกลุ่ม II มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.94

9. ผลของการจัดกลุ่มนั้นสอดคล้องกับสภาพภูมิศาสตร์ในแต่ละภาคของประเทศไทย ที่เห็ดตีนแรดเจริญเติบโต ยกเว้นเห็ดตีนแรดจากจังหวัดบุรีรัมย์ที่ถูกจัดในกลุ่มที่แตกต่างออกไป ชี้ให้เห็นว่า เห็ดตีนแรดจากจังหวัดนี้ มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่าเห็ดตีนแรดของจังหวัดอื่นๆ

10. จากการคัดเลือกเส้นใยโมโนคาริออนที่มีการเจริญเติบโตดี มาศึกษาระบบการผสมพันธุ์ พบว่าเห็ดตีนแรดทุกจังหวัด มีระบบการผสมพันธุ์แบบเททระโพลาร์ เฮเทอโรทัลลิก เส้นใยโมโนคาริออนที่สามารถผสมพันธุ์กันได้และเกิดดอกเห็ด ต้องเป็นเส้นใยที่มีเมททิงไทป์ที่โลกัส A และ B ต่างกัน ($A \neq B \neq$)

11. เมื่อศึกษาหาจำนวนมัลทิเพิลอัลลีล โดยนำเส้นใยของแต่ละจังหวัดมาผสมพันธุ์กัน พบว่า สามารถผสมพันธุ์กันได้ทุกจังหวัด โดยพบจำนวนมัลทิเพิลอัลลีลที่โลกัส A และ B เท่ากับ 16 อัลลีล

ข้อเสนอแนะ

1. ควรขยายพื้นที่การเก็บเห็ดตีนแรดในภาคต่างๆ เช่นภาคเหนือ, ภาคใต้, ภาคตะวันออก เพื่อ ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดได้กว้างมากขึ้น ทำให้สามารถทราบลักษณะพันธุกรรมที่ดีเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

2. การศึกษาในระดับโมเลกุล ควรเพิ่มชนิดของไพรเมอร์ในการขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณอื่นๆ ของยีน rRNA ในเห็ดตีนแรดเพื่อศึกษาถึงความผันแปรทางพันธุกรรม

3. ควรเพิ่มชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะให้มากขึ้นกว่าเดิม เพื่อจะได้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายเพิ่มขึ้น เมื่อนำแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ จะช่วยจัดกลุ่มตัวอย่างเห็ดได้ชัดเจนกว่านี้

4. เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์อื่นๆ เช่น RAPD, sequencing, microsatellite, minisatellite สามารถนำมาใช้ในการศึกษาเพิ่มเติมและเปรียบเทียบผลกับ PCR – RFLP จะทำให้ได้ข้อมูลที่แสดงถึงการจัดกลุ่มและสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเห็ดตีนแรดในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปสรรคในการทำวิจัย

1. ในการเก็บตัวอย่างเห็ดจากธรรมชาติ มักเก็บได้ในช่วงฤดูฝน ในกรณีที่เก็บตัวอย่างมาแล้ว เมื่อทำการทดลอง เส้นใยไม่เจริญเติบโต หรือตายไป ทำให้เกิดความล่าช้าในการเก็บตัวอย่างใหม่
2. เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ ต้องใช้สารเคมี เอนไซม์ที่มีราคาแพง ทำให้การใช้จ่ายในส่วนนี้สูง และไม่คล่องตัว
3. การเพาะเห็ดในถุงเพื่อเปิดดอก ยังทำได้ไม่สะดวก เนื่องจากไม่มีบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม จำเป็นจะต้องขอความอนุเคราะห์จากหน่วยงานอื่นๆ เพื่อศึกษาในส่วนนี้ต่อไป

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2529. "เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย." กรุงเทพฯ. ศิริธรรมการพิมพ์.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2538. "อาหารจากเห็ด (คำแนะนำที่ 169)." กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. อัดสำเนา.

ขนิษฐา พรเจริญโรจน์. 2543. "การปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยการผสมพันธุ์." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ฐิติพร อำพนพิบูล. (2544). "แบบแผนไอโซไซม์ของเห็ดฟาง." ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์.

ชัชฎาพร อินทำมา. 2538. "การศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาและไอโซไซม์ของเห็ดโคน *Termitomyces spp.*" วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. แผนกพฤกษศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชาญยุทธ์ ภานุทัต นงนุช แตงทรัพย์ และ สวัสดิ์ เชียงแข็ง. 2543. การศึกษาการเพาะเห็ดตีนแรดร่วมกับการปลูกผัก. ปริญญานิพนธ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณรงค์ มีนะนันท์. 2501. "การศึกษาทดลองเพาะเลี้ยงเห็ดใหญ่ (*Tricholoma* sp.)." วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี คณะกสิกรรมและสัตวบาล, มหาวิทยาลัยเกษตรสาสตร์ กรุงเทพฯ.

ดวงพร วรสุนทโรสถ. 2530. **การใช้เอนไซม์ในพืชทางการเกษตร.** วิทยาศาสตร์. 41(7) : 1-9.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2519. **เห็ดวิทยา.** 1 (1) :20-25.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ.2529. **การเพาะเห็ดบางชนิดในประเทศไทย.**กรุงเทพฯ.อักษรสยามการพิมพ์.

เทพบุตร ดีรักษา ประพิณศรา สอนเล็ก และแสงชัยศรีประโดน. 2540. "การศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อทดสอบความเป็นพ่อ แม่ ลูก ระหว่างลูกผสมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว." ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์,สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นพรัตน์ จินดาวงษ์. 2543. "การใช้เทคนิคทางเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici.* และจุลินทรีย์ต่อต้าน และการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศโดยชีววิธี." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช.บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2532. **จุลชีววิทยา เล่ม 2.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

เบญจมาภรณ์ บุนนาค. 2544. "แบบแผนไอโซไซม์ในเห็ดนางฟ้า." ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์.

ปัญญา โพธิ์ฐติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538. **เทคโนโลยีการเพาะเห็ด.** ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539. "การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ลักษณะทางงสันฐานวิทยา สรีรวิทยา และผลผลิตของเห็ดนางฟ้าเห็ด นางฟ้าภูฐาน และ เห็ดนางรมสีเทา."วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พันทวี ภักดีดินแดน และคณะ. 2517."ศึกษาวิธีเพาะเห็ดตีนแรด." **รายงานผลการค้นคว้าวิจัยประจำปี 2517**. กองวิจัยโรคพืช. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

พันทวี ภักดีดินแดน และคณะ. 2518. "ทดลองการเพาะเห็ดตีนแรด (Tricholoma sp.)." **รายงานผลการวิจัยประจำปี 2518-2519**. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

พันทวี ภักดีดินแดน. 2518-2519. "การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการเพาะเห็ดตีนแรด." **วารสารเห็ดสยาม** 2 (1-2) : 35-43.

พิสวรรณ เจียมสมบัติ. 2531. "อิเล็กโตรโฟรีซิส". **เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการเทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซิสในการจัดจำแนกพันธุ์พืช**. 18-22 กรกฎาคม 2531. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. หน้า 1-31.

วสันณ์ เพชรรัตน์ และวิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2530b. "การงอก basodiospore ของเห็ดตีนแรด". **วารสารโรคพืช** 7 : 14-29.

วสันณ์ เพชรรัตน์ และวิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2530c. "ลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด." **วารสารโรคพืช** 7 : 30-43.

วีระนีย์ ศรีพรมสุข. 2542. "การใช้เทคนิคทางเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสเพื่อจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum spp.* และการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงโดยชีววิธี" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช.บัณฑิตวิทยาลัย,สถานับเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วันดี ยินดียั่งยืน. 2533. "สหสัมพันธุ์ระหว่างไอโซไซม์กับความสามารถในการเกิดดอกของสายสัมพันธ์ลูกผสมเห็ดหอม(*Lentinula edodes*)."วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ..

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. **คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ**. โรงพิมพ์สาธารณสุขอาเซี่ยน.หน้า 4.1-4.29.

ศิริพร สิทธิประณีตใ 2531. **พันธุวิศวกรรม ปฏิบัติการเบื้องต้น**. กรุงเทพฯ. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย.

ศิริวรรณ สุทธิจิตต์และไมตรี สุทธิจิตต์. 2545. "เห็ดสมุนไพร : จากอดีต สู่ปัจจุบันและอนาคต." **เห็ดไทย**. 1-11.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศรินทร์ทิพย์ งามรัตนวงศ์. 2544. "แบบแผนของไอโซไซม์ในเห็ดขี้ควาย." ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร, มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์.

ศุภชัย สุทราภา. 2520-2521. "เห็ดตีนแรด." **วารสารเห็ดสยาม.** 3 : 36-39.

ส่องแสง วิงวาท. 2544. "การศึกษาการแปรผันไอโซไซม์ในเห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum*) สายพันธุ์." ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำเภา ภัทรเกษวิทย์ เสียงทอง นุตาลัย และ ศิริพงศ์ บุญหลง. 2514. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเพาะเห็ดตีนแรด. **เกษตรสาร** 4(3) : 219-223.

สุภาภรณ์ จาริยุวัฒน์. 2541. "การใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์และการศึกษาความแตกต่างของไอโซไซม์จากเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถานับเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง. 25-30.

สุรินทร์ ปียชคณากุล. 2543. . **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อภัสสรา ชมิดท์. 2538. **เทคนิคอิเล็กโทรฟอริซิส.** คณะแพทย์ศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2530. **เห็ดเมืองไทย.** กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด.

Adaskveg, J.E. and Gilbertson. 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.

Alexopoulos,C.J. and Mim, C.W. 1976. **Introductory Mycology.** New York. : John Wiley and Sons.

Allendorf, F.W., Mitchell,N., Ryman,N., and Stahl, G.1977. "Isozyme loci in brown trout (Salmotrutta L.) : detection and interpretation from population data." **Heredities** 86 : 179-190.

Altomare, C. et. al. 1997. "Taxonomic relationships among the toxigenic species *Fusarium acuminatum, F. sporotrichioides* and *F. tricinctum* by isozyme analysis and RAPD assay." **Can. J. Bot.** 75 : 1674-1684.

Anderson, J. B. and Robert C. Ullrich. 1979. "Biological Species of *Armillaria mellea* in North America." **Mycologia.** 41 : 402-414.

Anderson, J. B. and Stasovski, E. 1992. "Molecular phylogeny of nothern hemisphere pecies of *Armillaria.*" **Mycologia** 84: 505-516.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anderson, I.C, *et al.* 2001. " ITS-RFLP aand ITS sequence diversity in *Pisolithus* from central and estern Australian sclerophyll forests." **Micological Research.** 105(11) : 1304-1312.

Anderson, N. *et al.* 1991. "The Number and distribution of incompatibility factors in natural populations of *Pleurotus sapidus*." **Can. J. Bot.** 69 : 2187-2191.

Arora, D.K. *et al.* 1996. "PCR- based molecular discrimination of *Verticillium chlamydosporium* isolates." **Mycologia Research.** 100(7) : 801-809.

Avise, J.C. 1994. Molecular Markers. Natural History and Evolutioon. USA : Chapman and Hall, Inc.

Barnett, H.L. 1937. "Studies on the sexuality of the Heterobasideae." **Mycologia.** 29 : 626- 649.

Begeron, D. 2002. " Implications of molecular characters for the phylogeny of the genus Entyloma. " **Mycological Research.** 106(12) : 1392-1399.

Bos,Cees J. 1998. **Fungal Genetics.** New York : Marcel Dekker,Inc.

Bournival, B.L. and S.S. Korban. 1987. "Electrophoretic analysis of genetic variability." **Apply. Sci. Hort.** 31 : 233-243.

Bradford, M.M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quatities of protien utilizing the principle of protien-dry binding." **Anal. Biochem.** 72 : 248-254.

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

Breuil, Colette. 2003. **Life-cycle Basidiomycete.** [Online]. Availble : http://www.wood.ubc.ca/programmes/courses/basilife.jpg.

Brown, Jr.,T.S. and W, Merrill. 1973. "Germination of basidiospores of *Formes applanatus*." **Phytopathology.** 63 : 547-550.

Bulmer, G.S. and E.S.Beneke. 1961. "Studies on Calvatia gigantea. 1.Germination of the basidiospore." **Mycologia.** 53 : 123-136.

Bulmer, G.S. and E.S.Beneke. 1964. "Germination of basidiospores of *Lycoperdon* spp.

Bunyard, B.A. *et al.* 1996. "Phylogeny of the genus *Agaricus* inferred from restriction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA ." Fungal Genetics and Biology. 20 : 243-253.

Burdon, J.J. and D.R. Marshall.1983. "The use of isozyme in plant disease research", pp. 401-412. In S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). "Isozyme in Plant Genetics and Breeding" Part A. Elsevier Science Pub. Amsterdam.and *Scleroderma lycoperdoides*." **Mycologia.** 56 : 70-76.

Buscot, F. *et al* . 1990. "DNA polymorphism in morel : PCR-RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellites-primed PCR." **Micological Research.** 106(1) : 63-71.

Cenis, J.L. 1992. "Rapid extraction of Fungal for Amplification." **Nucl. Acids. Res.** 20 : 23-28.

Chang, S.T. 1972. **The Chinese mushroom.** Hongkong : The University of Hongkong.

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

Chapman, E.S. and V. Barankovich. 1979. "Germination of basidiospores and oidia of *Coprinus domesticus*." **Mycologia.** 71 : 870-873.

Chen, W. *et al* . 1999. " Phylogeny of *Ophioceras spp.* Based on morphological and molecular data ." **Mycologia.** 91(1) : 84-94.

Chiu, S. W. *et al* . 1996. " Genetic homogeneity of cultivated strains of shitake (Lentinus edodes) used in China as revealed by the polymerase chain reaction. **Mycological Research.** 100 : 1393-1399.

Clare, B.G. 1963. "Starch gel electrophoresis of protien as an aid in identifying fungi" **Nature.** 200 : 803-804.

Coates, B. S. *et al* . 2002. "Beauveria bassisna hyplotype determination based on nuclear rRNA internal transcibed spacer P CR-RFLP." **Mycological Research.**: 106(1) : 40-50.

Cochrane, V.W. 1958. **Physiology of fungi.** New York : John Wiley & Sons,Inc.

Collado, J . *et al* . 2002. "Monosporacus ibericus sp. Nov., an endophytic ascomycetes from plants on saline soils, with observations on the position of the genus based on sequence analysis of the 18S rDNA. " **Mycological Research.** 106(1) :; 118-127.

Cubeta, M. A. *et al.* 1991. " Characterization of anastomosis groups of binucleates *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gene." **Phytopathology.** 81 : 1395-1400.

D' Acry. *et al.* 2001. **Clamp connection.** [Online]. Availble : http://www.wood.ubc.ca/programmes/courses/basilife.jpg

DeLorenzo, R. J. and F. H. Ruddle. 1969. "Genetic control of two electrophoretic variants of glucosephosphate isomerase in the mouse (*Mus musculus*)" **Biochem. Gen.** 3: 151-162.

Doong, J – Y H. and Y. T. Kiang. 1987. "Inheritance of aconitase isozyme in soybean. **Genome.** 29 : 713-717.

Diez, J. *et al* . 2002. "Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert trufflies(*Terfezia* and *Tirmania*) , host specifity and edaphic tolerance." **Mycologia.** 94(2) : 247-259

Dorrance, A. F. et. al. 1999. "Comparison of *Stenocarpella maydis* Isolates for Isozyme and cultural Characteristics." **Plant Dis.** 83 : 675-680.

Dresler – Nurmi, A. *et al* . 1999. "Grouping of lignin degradation corticoid fungi based on RFLP analysis of 18S rDNA ITS region".**Mycological Research** 103(8) : 990-996.

Duchesne, L.C. and Anderson, J.B. 1990. "Location and direction of trascription of the 5S rRNA gene in *Armillaria*." **Mycological Research.** 94 : 266-269.

Edel, V. *et al* . 1996. " Evauation of restrictionn analysis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA for theb identification of *Fusarium* species." **Mycological Research.** 101(2) : 179-187.

Eggertson, E. 1953. An estimate of the number of alleles at the loci for heterothallism in a local concentration of *Polyporus obtusus* Berk. **Canadian Journal Botany.** 31 : 750-759.

Elliott, Charles G. 1994. **Reproduction in Fungi.** London : Chapman & Hall.

Erland, S. *et al* . 1994. "Identification of the Ectomycorrhizal Basidiomycetes *Tylospora fibrillosa* Donk by RFLP analysis of the PCR- Amplified ITS and IGS Region of Ribosomal DNA." **New Phytologist.** 126 : 525-532.

Esser, Karl and Kuenen,Rudolf. 1967. **Genetics of Fungi.** Germany : Springer-Verlag Berlin.

Eugenio, Cesaria P. and Neil A. Anderson. 1968. "The genetics and Cultivation of *Pleurotus ostreatus*." **Mycologia.** 60 : 627-634.

Evers, D. C., and Ross, I. K. 1983. "Isozyme Patterns and Morphogenesis in higher

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Basidiomycetes." **Exp. Mycol.** 7 : 9-16. Fox, Hilary M. *et al.* 1994. "Mating-Type Incompatibility between Commercial Strains of *Lentinula edodes*. **Experimental Mycology.** 18 : . 95-102.

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

Fries, N. 1954. "On spore germination of certain Gasteromycetes and mycorrhiza forming Hymenomycetes." **Review of Applied Mycology.** 22 : 398.

Frizzi, G. et. al. 2001. "Intraspecific isozyme variability in Italian populations of the white bruffle *Tuber magnatum*." **Mycol. Res.** 105(3) :365-369.

Fukuda, M. and Tokimoto, K. 1991. "Variation of Isozyme Pattern in the Natural Population of *Lentinus edodes*." **Proc. Japan Acad.** 67 : 43-47.

Gaitan, A. *et al*. 2002. " Genetic variability of *Beauveria bassiana* assciated with the coffee Berry Borer *Hypothenemus hampel* and other insects." **Mycological Research.** 106(11) : 1307-1314.

Gardes, M. *et al* . 1991. "Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA . **Can, J. Bot.** 69 : 189-190.

Gardes, M. and Bruns, T.D. 1993. "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts." **Molecular Ecology.** 2 : 138-149.

Glen, M *et al* . 2001. "Specificity, sensitivity and discrimination of primer for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhiza fungi in Eucalyptus forests and plaantations." **Mycological Research.** 150 : 138-149.

Gomes, E. A. *et al* . 1999. "Molecular characterization of *Pisolithus spp.* Isolated by rDNA PCR-RFLP." **Mycorrhiza.** 1999(8) : 197-202.

Guillemette, J.G. aand Lewis, P.N. 1983. "Detection of subnanogram quantities of DNA and RNA on native and denaturing polyacrylamide and agarose gels by silver staing. **Electrophoresis.**" 4 : 92-94.

Gupta, J.S. 1981. **Textbook of Fungi.** New Delhi : Oxford & IBH Pulishing Co.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Harrington, T.C. and Wingfield.B. D. 1995. "A PCR-based on identification method for species of *Armillaria* ". **Mycologia.** 87(2) : 280-288.

Harry, H. and hopkinson, D. A. 1976. Handbook of isozyme Electrophoresis in human. MRC Human Biochemical Genetics Unit Galton Laboratory University College London.

Havens, P. 1976. "Coparative zone electrophoresis and mating experiments in the Taxonomy of Mucor Hiemalis." **Mycotaxon.** 4(1) : 218-232.

Hedges, S.B. 1992. "The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap p value in phylogenetic studies ". **Mol. Biol.** 9 : 366-369.

Hibbert, D.S. *et al* . 1995. " Phylogenetic diversity in Shitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences." **Mycologia.** 67 : 1181-1186.

Hung, Ching-Yoan and Kenneth Wells. 1975. "Genetic control of compatibility in *Myxarium nucleatum*." **Mycologia.** 67 : 1181-1186.

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

Ito, Y. and Yanagi, S. O. "Discrimination of Basidiomycetes species and strains by Random Amplified Polymorphic DNA." (online) Available : http://ss.Jircas.attrc.go.jpp/engpage/jarq/33-3/rto/ito.htm.2002.

Jensen, A.B. and Eienberg, J. 2001. "Genetic variation with in the insect pathogenic genus *Entomophthora*, focusing on the *E. muscae* complex, using PCR-RFLP of the ITSII aand the LSU rDNA." **Mycological Research.** 105 (3) : 307-312.

Justin, P. J. et. al. 2002. "Genetic variability of mutant stains of *Pleurotus citinopileatus* based on isozyme electrophoresis. **Mushroom Research.** 9 : 79-84.

Kasiamdari, R.S. *et al* . 2002. "Identification of binucleate *Rhizoctonia* as a contaminant in pot culture of arbuscular mycorrhizal fungi and development of a PCR-based method of detection" **Mycological Research.**(12) : 1417-1426.

Kaul, T.N. 1997. **Introduction to Mushroom Science(Systematics).** India : Science

Kaur, M.J. and T.N. Lakhanpaul. 1995. " Effect of nutrient element vitamins and growth regulator on the vegetative growth *Lentinula edodes*." **Mushroom Research.** 4 : 11-14.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kay, E. and Vilgalys,R. 1992. "Spatial distribution and genetic relationships among *Pleurotus ostreatus*." **Mycologia.** 84 : 173-182.

Kessler, G.A. 1983. ClassII restriction endonuclease. Pp 225- 279 in : Cytogenetics G. Obe and A, Basler(eds), Spring-Verlag. Berlin.

Kile, G.A. 1983. "Identification of genotypes and the clonal development of *Armillaria Luteobubalina* Watling & Kile in eucalypt forests." **Aust. J. Bot.** 31 : 657-671.

Kohn, L.M. 1992. "Developing new characters for fungal systematic : An experimertal approch for determining the rank resolution" **Mycologia.** 84(2) : 139-153.

Koltin,Y. 1978. **Genetic structure of incompatibility factor.** New York : Academic Press.

Korhonen, K. 1978. "Interfertility and clonal size in the *Armillaria lariellamellea* complex." **Karstenia.** 18 : 31-42.

Kretzer, A. *et al* . 1996. "Internal transcribed spacer sequence from 38 recognized species of *Suillus sensu lato* : phylogenetic and taxonomic implications." **Mycologia.** 88(5) : 776-785.

Kulkami, R. K. et. al. 1986. "Genetic diversity between isolates *of Pleurotus ostreatus* as revealed by isozyme analysis." **Mycrobiology.** 171-181.

Labarere, J. and Iracabal, B. 1993. "Comparison of Polymorphism and Phenetic Variability and Determined by the Study of Hydrolases and Oxioreductases in Two Cultivated Mushrooms, *Agaricus bisporus* and *Pleurotus cornucopiae*." **Exp. Mycol.** 17 : 90-102.

Laday, M. et. al. 2000 "Isozyme evidence for two groups of Fusarium graminearum." Mycol. **Res.** 104(7) : 788-793.

Laroche, A. *et al* . 1995. "Grouping and identification of low temperature basidiomycetes using mating , RAPD and RFLP analyses," **Mycological Research.** 99(3) : 297-310.

Lickey, E.B. *et al* .2002. "Biogeographical patterns in *Artomyces pyxidatus*". **Mycologia.** 94(3) : 461-471.

Linn, S and L. M. Harrison. 1987. " The mating system of the fairy ring fungus *Maramius oreades* and the genetic relationship of fairy ring ." **Can. J. Bot.** 66 : 1111-1115.

Magae, Y. et. al. 1990. " Enzymes of strains of *Pleurotus* species (Basidiomycetes) compared by electrophoresis." **J. Gen. Appl. Microbiol.** 36 : 69-80.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mallett, K.I. and L.M.Harrison. 1987. "The mating system of the fairy ring fungus *Maramius oreades* and the genetic relationship of fairy ring." **Canadian Journal Botany.** 66 : 1111-1115.

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

Matsumoto,T. and Fukumasa –mnakai, Y. 1995. "Mitochondria DNA restriction fragment length polymorphisms and phenetic relationships in natural populations of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus.*" **Mycological Research.** 99(5) " 562-566.

Matsumoto,T. et. al. 1995. " Isozyme variation and genetic relatedness among natural populations of *Pleurotus ostreatus.*" **J. Gen. Appl. Microbiol.** 41 : 487-497.

May, B. and Royse, D. 1982. " Confirmation of Crosses between Lines of *Agaricus brunnescens* by Isozyme Analysis." **Exp. Mycol.** 6 : 283-292.

May, B. et. al. 1979. "Joint segregation of biochemical loci in Salmonidae: results from experiments with Salvelinus and review of the literature on other species." **J. Fish. Res. Board Canad.**, 36 :1114-1128.

Mennendez, R. A. et. al. 1986. "Protein and isozyme electrophoresis and isoelectric focusing for the characterization of apple clones." 29 : 211-220.

Meselson, M. and Yaun, R. 1968. " DNA restrivtion enzyme from *E. coli* . " **Nature.** 217 : 1110 -1114

Miller, Robert E. 1971. "Evidence of sexuality in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus.*" **Mycologia.** 63 : 630-634.

Miles, P.G. 1993. **Biological background for mushroom breeding. Genetics and Breeding of edible mushroom.** Philadepha.

Mill, S. D. et. al. 1991. "Taxonomic structure of *Phytopthora crytogea* and *P. drechsleri* based on osizyme and mitochondrial DNA analysis." **Mycol. Res.** 95(1) :31-48.

Moncalvo, J.M. *et al* . "The Agaricales : Molecular systematics and Evolution of Mushroom."(on line) Availabl:www.kumc.edu/research/fgsc/asilomar/evopop.html.1996.

Nei, M. 1972. "Genetic distance between population." **Amer. Naturalist.**, 106 : 283-292.

Nei, M. and Li, W.H. 1979. "Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. Proceeding of the National Academy of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

science". 76 : 5269-5273.

Nelson, K., R. J. Baker and R. L. Honeycutt. 1987. "Mitochondrial and protein differentiation between cytotype of the white footed mouse, *Peromyscus leucopus*. **Envolution.** 41(4) : 845-872.

Nisikado, Y and K.Kimura. 1951. "Principles of artificial propagation of *Tricholoma conglobatum*(Vitt.)Sacc. 1. Germination of the spores and cutural character of the fungus mycelium." **Review of Applied Mycology.** 30 : 97.

Oudemans, P. and Coffey, M. D. 1991. "Isozyme comparison within and among worldwide source of three morphologically distinct species of *Phytophthora*." **Mycol. Research.** 95 (1) : 19-30.

Papazian, H.P. 1950. "Physiology of the Incompatibility factors in *Schizophyllum commune*." **Batanical Gazette.** 112(2) : 143-163.

Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhmme, L. Catalan and L. Britton-Davidian. Practical isozyme genetics. (**English Edition Ellis Horwood Limited Publishers Chichester**, 1988.)

Patino, B. *et al* . 2002. "Characterization and detection of Fumonisin producing strains of *Fusarium verticillioidies*, ." 322. In Vannacci G. *and Sarrocco,S.6th* European conference on Fungal Genetics. Italy.

Petersen, Ronald H. 1992. "Futher Notes on Mating Systems in *Melanotus*." **Mycotaxon.** XLV : 331.341.

Pilotti, Carmel A. *et al.* 2002. "Sexuality and interactions of monokaryotic and dikaryotic mycelia of *Ganoderma boninense*." **Mycological Reseach.** 106 : 1315-1322.

Prillinger, H. and H.P. Molitoris. 1978. "Genetic analysis in wood decaying fungi" **Physiol. Plant** . 46: 265-277.

Rajiv K. Kulkarni. et. al. 1986. " Genetic diversity between isolates of *Pleurotus ostreatus* as revealed by Isozyme Analysis." **Mycobiol.** :171-181.

Ramos, A et. al. 2000. "Isozyme analysis of different species of the genus Saccobolus (Ascomycetes, Pezizales)." **Mycotaxan.** LXXIV(2) : 447-462.

Raper, J.R. 1966. **Genetics of sexuality in higher fungi.** New York : Ronald Press.

Raper, Carlene A. 1972. "Genetic analysis of life cycle of *Agaricus bisporus*." **Mycologia.** 64 : 1088-1117.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Raper, Carlene A. 1976. "Sexuality and Life-cycle of the Edible, Wild *Agaricus bitorquis*." **Journal of General Microbiology.** 95 : 54-66.

Raper, Carlene A. *et al.* 1958. "The number and distribution of incompatibility factors in *Schizophyllum*." **The American Naturalist.** 865 : 221-232.

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

Rizzo, David M. *et al.* 1995. "Sexuality and somatic incompatibility in *Phellinus gilvus*. **Mycologia.** 87(6) : 805-820.

Robert, J.R. 1984. Restriction and modification enzymes and their recognition sequence." **Nucleic Acid Res.** 12 : 167-204.

Roshal, J.Y. 1950. Incompatibility factors in population of *Schizophyllum commune*." Thesis Univ. of Chicago(III.,USA)

Roy, A. and Samajpati,N. 1981. "Edible mushroom of West Bengal : VIII *Tricholoma crassum*(Berk.)Sacc. A New Indian Edible Mushroom." **Muhroom News letter For Tropics.** 1 : 18-20.

Roger, J. S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. Pp. 145-153. **Studies in genetics.** 7213. 354p.

Rohlf, F. J. 1997. NTSYSpc : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.00. Exeter Software, New York.

Romesburg, H. C. 1990. Claster Analysis for Researchers. Hrieger Publishing company. Malabar, Florida.

Roux, P. and Labarare, J. 1990. " Isozyme characterization of Dikaryotic Strains of the Edible Basidiomycete *Agaricus bitorquis*(Quel.) Sacc. (Syn. *Agaricus edulis*)." **Exp. Mycol.** 14 :101-112.

Roux, P. and Labarare, J. 1991. "Determination of genes and subunit composition of three isozyme activities in *Agaricus bitorquis*." **Mycol. Res.** 93(7) : 851-860.

Royse, D.J., and May, B., 1982a. "Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens.* " **Mycologia.** 74 : 93-102.

Royse, D.J., and May, B., 1982b. "Genetic relatedness and its application in selective breeding of Agaricus brunnescens." **Mycologia.** 74 : 569-575.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Saghai-Maroof, M.A. *et al*. 1984. Fungal DNA Isolation. MSU – DOE plant Research Laboratory Press, Michigan.

Sambrook, J. *et al*. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2 nd ed. Cold Spring Habor Laboratory, Newyork.

Schmidt, O. and Mareth,U. 2000. "Species – specific PCR primers in the rDNA – ITS region as a diagnostic tool for *Serpula lacrymans*." **Mycological Research.** 14(1) : 69-72.

Sierra, A.P. 1999. Investication of a PCR- based method for the routine identification of British *Armillaria sp.* Mycological Research. 105(10) : 1182-1190.

Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, Sanfrancisco. 573p.

Sokal, R. R. and C. D. Michener. 1958. A statistic method for evaluating systematic relationships. **Univ. of Kansas Sci. Bul.** 28 : 1409-1438.

Sokal, R. R. and P. H. A. Sneath. 1963. **Principles of Numerical Taxonomy.** Freeman, Sanfrancisco. 350pp. isozymes in the ectomycocorrhizal fungus *Suillus tomentosus*."

Southern, E.M. 1975 . "Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 : 503-517.

Strachan,T. 1992. The Human Genome. Bios Scientific Publisher, Oxford.

Tokimoto, K *et al.* 1973. Incompatibility factors in the natural population of *Lentiula edodes* in Japan." **Tottori Mycol. Inst. Jpn.** 10 : 371-376.

Tuohy, J. et al. 2002. " Molecular studies of the net and spot form of Drechslera teres On barley." 433. In Vannacci, G. and Sarrocco, S 6th. Europian Conferrnce on Fungal Genetics.

Ullrich, Robert C. 1973. "Sexuality, Incompatibility, and Intersterility in the biology of the *Sistotrema brinkmannii* agrregate." Mycologia. 65 : 1234-1249.

Ullrich, R.C. and J.R.Raper. 1974. "Number and distribution of bipolar incompatibility factors in *Sistrema brinkmannii*." **Am. Nat.** 108 : 507-518.

Vagvolgyi, C., Papp, T., Z. and T.J. Michailides. 1996. Isozyme variation among isolate of *Mucor piriformis*. **Mycologia.** 88 : 602-607.

Veldman, G.M. et al . 1981. The primary and secondary structure of yeast 26SrRNA. **Nucl. Acids. Res.** 9 : 6935-6952.

Vinnere, O. *et al*. 2002. "The causal agent of anthracnose of *Rhododendron* in

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sweden and Latvia." **Mycological Research.** 106(1) : 60-69

Walker, Glenn R. *et al.* 1994. "The mating system of *Melanotus textilis*. **Mycologia.** 86 : 209-211.

Welden, A.L and Joan W. Bennett. 1973. "The Cutural Characteristics and Mating-type Behavior in *Podoscypha multizonata* and *P. ravevelii*." **Mycologia.** 65 : 203-207.

Weir, A. and Blackwell, M. 2001. " Molecular data support the Laboulbeniomycetes. **Mycological Research.** 105(10) : 1182- 1190.

Weir, B. S. 1989. Building trees with DNA sequences. **Biometric Bulletin.** 6: 21-23.

White, T. J. *et al* . 1990. "Amplication and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." In PCR protocols : a quide to method and applications. San Diego : Acadermic Press.

Whitehouse, H.L.K. 1949. "Multiple-allelomorph heterothallism in the fungi." **New Phytologist.** 48 : 212-244.

Witthuhn, R.C. *et al* . 1999. " PCR – based on identification and phylogeny of species of Ceratocystis sensu stricto. " **Mycological Research.** 103(6) : 743-749.

Zervakis, G. et. al. 1994. " Genetic variability and systematic of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis." **Mycol.Res.** 98(3) : 329-341.

Zervakis, Georgios and Balis Constantinos. 1995. "Incompatibility alleles and mating behaviour between and with *Pleurotus* species." **Science and Cultivation of Edible Fungi.** 53-62.

Zervakis, J. and Labarare, J. 1992. "Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns." **J. General Microbiol.** 138 : 635-645.

Zhu, H,. Higginbotham, K. O., and Dancik, B. P. 1988. "Intraspecific genetic variability of **Can. J. Bot.** 66 :588-594. Publishers,Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหารที่ใช้

1.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ประกอบด้วย (ปริมาตร 1 ลิตร)

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม

1.2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDYB ประกอบด้วย (ปริมาตร 1 ลิตร)

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
yeast extract	5	กรัม

1.3 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ CYM ประกอบด้วย (ปริมาตร 1 ลิตร)

กลูโคส	20	กรัม
bactopeptone	2	กรัม
yeast extract	2	กรัม
$MgSo_4 .7H_2O$	0.5	กรัม
KH_2PO_4	0.46	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม

1.4 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MYGประกอบด้วย (ปริมาตร 1 ลิตร)

Malt extract	20	กรัม
yeast extract	2	กรัม
glucose	20	กรัม

1.5 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB ประกอบด้วย (ปริมาตร 1 ลิตร)

Malt extract	20	กรัมต่อลิตร
Glucose	20	กรัมต่อลิตร
Peptone	1	กรัมต่อลิตร

2. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (1976)

วิธีการเตรียม Bradford dye (5X)

ละลายสี comassie Blue G-250 100มิลลิกรัมใน เอธานอล 50 มิลลิลิตร แล้วเติมด้วย phosphoric acid (85%) 100มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บน้ำสีที่ได้ใส่ขวดแก้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิเคราะห์

1. ทำการเจือจางสี Bradford dye ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน สี : น้ำ เท่ากับ 1 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

2. นำสีที่ได้จากข้อ 1 ใส่ลงในหลอดทดลองที่สะอาด หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายตัวอย่าง 50.0 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองข้อที่ 2 ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที

4. นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

5. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย bovine serum albumin ความเข้มข้น 0 25 50 100 150 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 2-4 เขียนกราฟระหว่าง OD และความเข้มข้นของ bovine serum albumin

3. การย้อมสีเอนไซม์ (Pasteur และคณะ, 1988)

1. Esterase (EST) (ประเสริฐ, 2539)

$$\alpha\text{-napthyl ester} \xrightarrow{\text{EST}} \alpha\text{-napthol} + \text{salt}$$

$$\alpha\text{-napthol} + \text{Fast blue RR salt} \longrightarrow \text{เกิดเป็นสารสีน้ำตาลดำ}$$

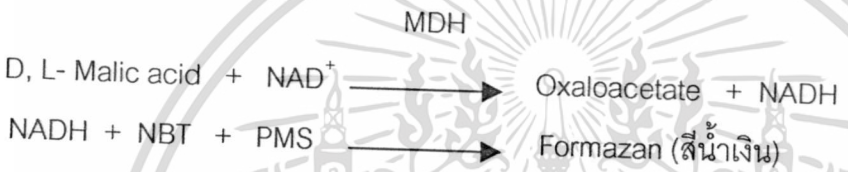
2. Glucose-6-phosphase Dehydrogenase (G6PD)

$$\text{D-Glucose-6-phosphase} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G6PD}} \text{6-phosphoglucotate} + \text{NADH}$$

$$\text{NADPH} + \text{NBT และ PMS} \longrightarrow \text{Formazan (สีน้ำเงิน)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Malate dehydrogenase (MDH)



4. Phosphogluconate dehydrogenase (PGD)

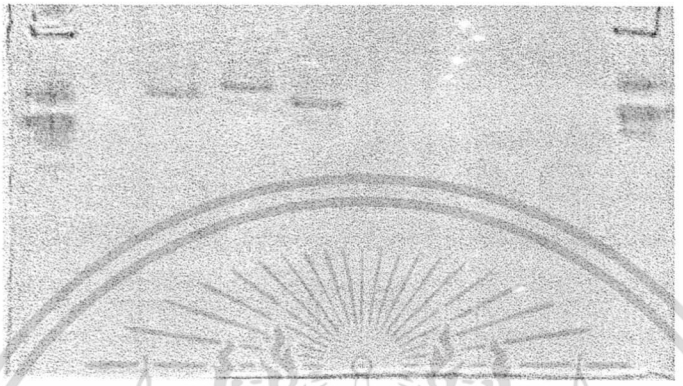
ไม่พบแถบเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Lactate dehydrogenase (LDH)

$$\text{L-Lactate} + NAD^{+} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Pyruvate} + NADH$$

$$NADH + NBT + PMS \longrightarrow \text{Formazan (สีน้ำเงิน)}$$



6. Leucine aminopeptidase (LAP)

$$\text{L-Leucyl-Naphthylamide} \xrightarrow{\text{LAP}} \text{L-Leucine} + \text{Naphthol}$$

$$\text{Naphthol} + \text{Black K salt} \longrightarrow \text{สารสีม่วง}$$

ไม่พบแถบเอนไซม์

7. Acid phosphates(ACP)

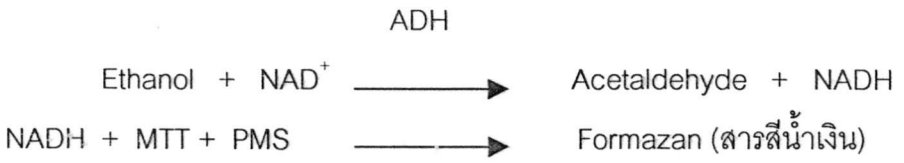
$$\alpha\text{-naphthyl phosphate} \xrightarrow{\text{ACP}} \alpha\text{-naphthol} + \text{Phosphate}$$

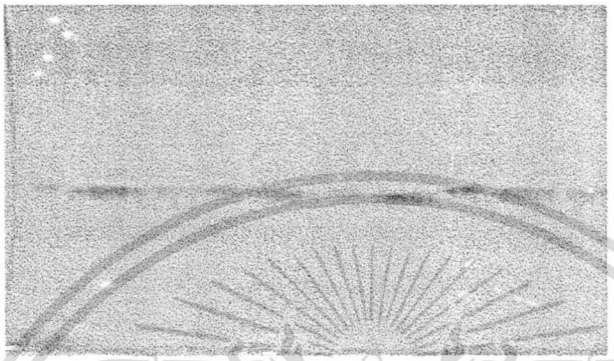
$$\alpha\text{-naphthol} + \text{Fast Blue BB} \longrightarrow \text{สารสีน้ำตาล}$$

ไม่พบแถบเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. Alcohol dehydrogenase (ADH)





9. Alkaline phosphatase (AKP)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

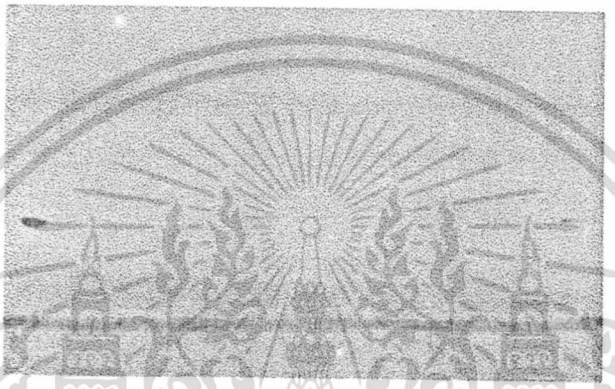
10 Isocitate dehydrogenase (IDH)

$$\text{Isocitric acid} + NADP^{+} \xrightarrow{IDH} \text{2-Oxoglutarate} + NADPH$$

$$NADPH + NBT + PMS \longrightarrow \text{Formazan (สารสีน้ำเงิน)}$$

พบแถบน้อยมาก

11. Laccase



4. การเตรียม stock สารละลายสำหรับงานอิเล็คโทรโฟรีซิสชนิดอะคริลาไมด์เจล

Electode buffer (running buffer) : Tris-glycine (pH 8.3)

Glycine	7.2	กรัม
Tris base	1.5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตรด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตรและปรับ pH ให้ได้ 8.3

Gel buffer

Sol^{n} A Acrylamide stock

Acrylamide	30	กรัม
N, N' –methylene bisacrylamide	0.8	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatmam N0.1 เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (จะเก็บไว้ใช้ได้ภายใน 1 เดือนหลังจากที่เตรียม)

Sol^{n} B Stacking Gel Buffer : Tris-HCl (pH 6.8)

Tris base	6.0	กรัม
HCl 1 N	48	มิลลิลิตร

ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตรและปรับ pH ให้ได้ 6.8

Sol^{n} C Seperating Gel Buffer (Resolving gel buffer) : Tris-HCl (pH 8.8)

Tris base	36.3	กรัม
HCl 1 N	48	มิลลิลิตร

ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร และปรับพีเอชให้ได้ 8.8

Sol^{n} D สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) 10 เปอร์เซ็นต์

ละลาย Ammonium persulfate 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร (สารนี้ควรเตรียมก่อนที่จะใช้ทุกครั้ง)

Sol^{n} E N, N, N', N'-Tetramethylenediamine (TEMED)

Stock sample buffer (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ดและ สรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536)

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.2	มิลลิลิตร
Glycine	1.0	มิลลิลิตร
0.5 % Bromophenol Blue (w/v)	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4.8	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 อัตราส่วนการเตรียมเจล 7.5 % และ 4.0 %

Sol^n	7.5% (Seperating Gel)	4.0%(Stacking Gel)
A	2.5	1.3
B	2.5	-
C	-	2.5
D	70	100
E	5	2.5
น้ำกลั่น	4.85	6.1
Total	10 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร

Extraction buffer (Kulkarni *et. al.* 1986.)

ใช้ 50 mM Tris.HCl/ 1mM EDTA, pH 7.0

5 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3M Sodium acetate

ชั่ง Sodium acetate · 3 H_2O 408.1 กรัม ละลายในน้ำ 750 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid จนกระทั่งได้ pH 5.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

1M Tris – HCl

ละลาย Tris base 121.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH โดยใช้กรด HCl เข้มข้น จนกระทั่งได้ pH 7 – 8 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

TE buffer

นำ 1 M Tris – HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับ EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ,100 มิลลิลิตร

0.5 M EDTA

ละลาย disodium ethyenedianinetetraacetate ·2H_2O 186.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer หมุนช่วยละลาย ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Extraction buffer

นำ 1 M Tris HCl ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 1 mM EDTA 5 มิลลิลิตร pH 8.0 5 M NaCl 5 มิลลิลิตร และ 0.5 % SDS 5มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

5 M NaCl

ละลาย sodiumchloride 292.2 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave

5 X TBE

ละลาย Tris – base 54 กรัม, boric acid 27.5 กรัม และ 0.5 mM EDTA 20 มิลลิลิตร pH 8.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

6 Primer

ตาราง 2 ลำดับเบสไพรเมอร์ที่นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเห็ดตีนแรด

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
ITS1	5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3'
ITS4	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'
O1	5' - AGTCCTATGGCCGTGGAT - 3'
LR12R	5' - CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA - 3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ชนิดและแหล่งที่มาของเห็ดที่นำมาศึกษา

ตารางที่ 3 ชนิดและแหล่งที่มาของเห็ดที่นำมาศึกษา

ลำดับ	ชื่อชนิด
1	เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม
2	เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี
3	เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ
4	เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา
5	เห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด
6	เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร
7	เห็ดตีนแรดศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอรัญญิก
8	เห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี
9	เห็ดนางฟ้า
10	เห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะผลทางสถิติ

1. **ผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.05 จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดตีนแรด 5 จังหวัดสำหรับการศึกษาไอโซไซม์อิเล็กโตรฟอริซิส**

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของวันที่มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุดของเส้นใยโมโนคารีออนจังหวัดศรีษะเกษ

วันที่ทำการเลี้ยงเส้นใย	7	14	21	28
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.043^{c}	0.330^{b}	0.406^{a}	0.328^{b}

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของวันที่มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุดของเส้นใยโมโนคารีออนจังหวัดอุบลราชธานี

วันที่ทำการเลี้ยงเส้นใย	7	14	21	28
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.122^{d}	0.304^{b}	0.334^{a}	0.261^{c}

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของวันที่มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุดของเส้นใยโมโนคารีออนจังหวัดมหาสารคาม

วันที่ทำการเลี้ยงเส้นใย	7	14	21	28
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.156^{c}	0.377^{a}	0.403^{a}	0.268^{b}

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของวันที่มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุดของเส้นใยโมโนคารีออนจังหวัดนครราชสีมา

วันที่ทำการเลี้ยงเส้นใย	7	14	21	28
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.103^{c}	0.404^{ab}	0.412^{a}	0.384^{b}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของวันที่มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุดของเส้นใยโมโนคารี
อนจังหวัดสกลนคร

นที่ทำการเลี้ยงเส้นใย	7	14	21	28
ำหนักแห้ง (กรัม)	0.048^{c}	0.145^{b}	0.201^{a}	0.197^{a}

ารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของ เส้นใยโมโน
ารีออนของจังหวัดศรีษะเกษ

นิดของอาหาร	PDYB	CYM	MYG	PDB
าหนักแห้ง (กรัม)	0.403^{a}	0.357^{b}	0.373^{ab}	0.356^{b}

ารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโน
ารีออนของจังหวัดอุบลราชธานี

นิดของอาหาร	PDYB	CYM	MYG	PDB
าหนักแห้ง (กรัม)	0.371^{a}	0.261^{bc}	0.336^{a}	0.250^{c}

ารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโน
ารีออนของจังหวัดมหาสารคาม

นิดของอาหาร	PDYB	CYM	MYG	PDB
าหนักแห้ง (กรัม)	0.382^{a}	0.326^{b}	0.331^{ab}	0.305^{b}

ารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโน
ารีออนของจังหวัดนครราชสีมา

นิดของอาหาร	PDYB	CYM	MYG	PDB
าหนักแห้ง (กรัม)	0.408^{a}	0.368^{b}	0.369^{b}	0.351^{b}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโม
นคารีออนของจังหวัดสกลนคร

นิดของอาหาร	PDYB	CYM	MYG	PDB
ำหนักแห้ง (กรัม)	0.311[a]	0.158[b]	0.213[b]	0.133[b]

ารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคา
ออนในจังหวัดศรีษะเกษ

ุณหภูมิ	20°C	25°C	30°C	35°C
ำหนักแห้ง (กรัม)	0.013[c]	0.411[a]	0.384[b]	0.014[c]

ารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคา
ออนในจังหวัดอุบลราชธานี

ุณหภูมิ	20°C	25°C	30°C	35°C
ำหนักแห้ง (กรัม)	0.013[c]	0.411[a]	0.384[b]	0.014[c]

ารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคา
ออนในจังหวัดมหาสารคาม

ุณหภูมิ	20°C	25°C	30°C	35°C
ำหนักแห้ง (กรัม)	0.015[b]	0.439[a]	0.379[a]	0.014[b]

ารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคา
ออนในจังหวัดนครราชสีมา

อุณหภูมิ	20°C	25°C	30°C	35°C
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.030[c]	0.443[b]	0.381[a]	0.016[c]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคา
ออนในจังหวัดสกลนคร

ณหภูมิ	20°C	25°C	30°C	35°C
าหนักแห้ง (กรัม)	0.024[b]	0.422[a]	0.418[a]	0.012[b]

กำหนดให้

ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ

ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

. **ผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT จากการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ด 9 งหวัดในอาหารเหลว 5 ชนิด**

ารางที่16 ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลวทั้ง 5 ชนิดต่อ น้ำหนักแห้งของเส้นใย
เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ

อาหาร	ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์			
	1	2	3	4
พีดีบี	0.181860d			
ซีวายเอ็ม		0.262980c		
เอ็มอีบี		0.284460c		
เอ็มวายจี			0.347620b	
พีดีวายบี				0.411300a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 17 ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม

อาหาร	ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์		
	1	2	3
พีดีบี	0.060760c		
เอ็มอีบี	0.076260bc	0.076260b	
ซีวายเอ็ม	0.89040abc	0.089040abc	0.089040abc
เอ็มวายจี		0.097540ab	0.097540ab
พีดีวายบี			0.115340a

ตารางที่ 18 ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด

อาหาร	ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์		
	1	2	3
พีดีบี	0.242840d		
เอ็มอีบี	0.266880c		
ซีวายเอ็ม		0.350100b	
เอ็มวายจี		0.419860ab	0.419860ab
พีดีวายบี			0.459760a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 19 ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี

อาหาร	ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์			
	1	2	3	4
พีดีบี	0.012700d			
เอ็มวายจี		0.091620c		
ซีวายเอ็ม			0.299800b	
เอ็มอีบี			0.307620b	
พีดีวายบี				0.430820a

ตารางที่ 20 ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา

อาหาร	ความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์	
	1	2
พีดีบี	0.179200b	
ซีวายเอ็ม	0.194220b	
เอ็มอีบี	0.217800b	
เอ็มวายจี		0.322720a
พีดีวายบี		0.332320a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 21 ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี

อาหาร	ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์			
	1	2	3	4
พีดีบี	0.192460d			
ซีวายเอ็ม		0.319420c		
เอ็มอีบี			0.391660b	
เอ็มวายจี			0.424680ab	0.424680ab
พีดีวายบี				0.479360a

ตารางที่ 22 ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร

อาหาร	ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์		
	1	2	3
พีดีบี	0.181400c		
ซีวายเอ็ม		0.272060b	
เอ็มวายจี			0.333800a
พีดีวายบี			0.347760a
เอ็มอีบี			0.386840a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 23 ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์

อาหาร	ความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์	
	1	2
พีดีบี	0.089820b	
ซีวายเอ็ม		0.176400a
เอ็มอีบี		0.179760a
เอ็มวายจี		0.197900a
พีดีวายบี		0.237880a

ตารางที่ 24 ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรดศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอรัญญิก

อาหาร	ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์		
	1	2	3
พีดีบี	0.258920d		
ซีวายเอ็ม	0.308260c		
เอ็มวายจี		0.395420b	
เอ็มอีบี		0.434720ab	0.434720ab
พีดีวายบี			0.471960a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ผลในโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ตารางที่ 1 การ score รูปแบบแถบไอโซไซม์ของตัวอย่างทั้งหมด 138 จากเอนไซม์ 11 ชนิด

ตัวอย่าง	PGD		AKP									G6PD							
	1	2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8
M4	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M5	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M7	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M10	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M12	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
M13	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M14	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
M15	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M17	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0
M18	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
M19	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M21	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
M22	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M23	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M24	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
M25	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
M26	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M27	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
M28	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
M29	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
M30	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

โดยแทนค่า "0" คือ ปรากฏแถบไอโซไซม์ และ "1" คือ ไม่ปรากฏแถบไอโซไซม์

ตารางที่ 1 (ต่อ) การ score รูปแบบแถบไอโซไซม์ของตัวอย่างทั้งหมด 138 จากเอนไซม์ 11 ชนิด

ตัวอย่าง	G6PD		ADH							LDH								MDH	
	9	10	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2
M4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
M10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M12	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M14	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M15	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
M17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M18	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M19	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M21	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M22	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M23	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M24	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
M25	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M26	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
M27	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
M28	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M29	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M30	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1

โดยแทนค่า "0" คือ ปรากฏแถบไอโซไซม์ และ "1" คือ ไม่ปรากฏแถบไอโซไซม์

ตารางที่ 1 (ต่อ) การ score รูปแบบแถบไอโซไซม์ของตัวอย่างทั้งหมด 138 จากเอนไซม์ 11 ชนิด

ตัวอย่าง	MDH											Laccase							
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	4	5	6	7	8
M4	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M5	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M7	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M10	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M12	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
M13	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
M14	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M15	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
M17	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
M18	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
M19	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
M21	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
M22	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	.0	0	0	0
M23	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
M24	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
M25	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
M26	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M27	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
M28	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M29	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M30	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

โดยแทนค่า "0" คือ ปรากฏแถบไอโซไซม์ และ "1" คือ ไม่ปรากฏแถบไอโซไซม์

ตารางที่ 1 (ต่อ) การ score รูปแบบแถบไอโซไซม์ของตัวอย่างทั้งหมด 138 จากเอนไซม์ 11 ชนิด

ตัวอย่าง	Laccase			EST																			
	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
M4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
M5	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
M7	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
M10	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
M12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
M13	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
M14	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
M15	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
M17	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
M18	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M19	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
M21	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
M23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
M24	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
M25	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
M26	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M27	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M28	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1
M29	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1
M30	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1

โดยแทนค่า "0" คือ ปรากฏแถบไอโซไซม์ และ "1" คือ ไม่ปรากฏแถบไอโซไซม์

ตารางที่ 2 ค่า Similality Index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpc 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
M4	1																						
M5	0.86	1																					
M7	0.8	0.91	1																				
M10	0.87	0.93	0.9	1																			
M12	0.85	0.81	0.82	0.82	1																		
M13	0.9	0.86	0.8	0.85	0.82	1																	
M14	0.85	0.93	0.87	0.92	0.87	0.85	1																
M15	0.86	0.9	0.84	0.86	0.79	0.91	0.86	1															
M17	0.91	0.8	0.76	0.84	0.81	0.86	0.81	0.8	1														
M18	0.82	0.86	0.8	0.85	0.82	0.82	0.87	0.81	0.86	1													
M19	0.9	0.89	0.82	0.87	0.87	0.95	0.9	0.86	0.86	0.87	1												
M21	0.9	0.89	0.82	0.9	0.82	0.82	0.87	0.84	0.86	0.87	0.85	1											
M22	0.92	0.89	0.82	0.9	0.87	0.9	0.9	0.84	0.91	0.9	0.95	0.9	1										
M23	0.92	0.89	0.82	0.9	0.87	0.9	0.9	0.84	0.91	0.9	0.95	0.9	1	1									
M24	0.82	0.79	0.8	0.8	0.85	0.82	0.78	0.76	0.81	0.82	0.85	0.78	0.85	0.85	1								
M25	0.81	0.75	0.76	0.79	0.79	0.84	0.76	0.75	0.82	0.76	0.84	0.79	0.84	0.84	0.81	1							
M26	0.79	0.82	0.89	0.81	0.84	0.76	0.81	0.8	0.78	0.84	0.81	0.84	0.84	0.84	0.79	0.8	1						
M27	0.79	0.8	0.86	0.81	0.84	0.79	0.79	0.8	0.75	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.82	0.92	1					
M28	0.79	0.82	0.81	0.81	0.79	0.81	0.84	0.75	0.75	0.79	0.86	0.79	0.84	0.84	0.79	0.8	0.8	0.78	1				
M29	0.79	0.78	0.79	0.81	0.79	0.79	0.79	0.73	0.78	0.76	0.84	0.79	0.84	0.84	0.79	0.9	0.82	0.85	0.87	1			
M30	0.85	0.81	0.8	0.82	0.8	0.87	0.82	0.81	0.84	0.8	0.87	0.8	0.87	0.87	0.8	0.86	0.81	0.79	0.91	0.91	1		
M31	0.8	0.81	0.82	0.82	0.85	0.78	0.82	0.76	0.79	0.82	0.82	0.82	0.85	0.85	0.8	0.86	0.89	0.91	0.81	0.91	0.82	1	
M32	0.75	0.79	0.78	0.78	0.8	0.78	0.78	0.76	0.71	0.8	0.8	0.78	0.8	0.8	0.8	0.79	0.84	0.91	0.81	0.84	0.8	0.9	1

ตารางที่ 2 (ต่อ) ค่า Similarity index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpc 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
M34	0.74	0.73	0.79	0.74	0.81	0.74	0.79	0.75	0.73	0.74	0.74	0.76	0.76	0.76	0.74	0.82	0.85	0.87	0.8	0.82	0.79	0.86	0.84
M35	0.78	0.74	0.75	0.75	0.85	0.75	0.8	0.69	0.81	0.8	0.8	0.75	0.82	0.82	0.78	0.81	0.79	0.81	0.81	0.81	0.78	0.85	0.8
M36	0.82	0.89	0.87	0.9	0.82	0.8	0.9	0.81	0.84	0.87	0.85	0.85	0.87	0.87	0.78	0.81	0.84	0.81	0.86	0.84	0.87	0.85	0.8
M37	0.78	0.81	0.8	0.8	0.85	0.75	0.87	0.74	0.79	0.85	0.8	0.8	0.82	0.82	0.75	0.74	0.81	0.79	0.86	0.76	0.8	0.82	0.8
M38	0.8	0.79	0.8	0.82	0.85	0.73	0.85	0.71	0.81	0.85	0.78	0.85	0.82	0.82	0.8	0.74	0.81	0.79	0.79	0.76	0.78	0.8	0.75
M39	0.86	0.8	0.81	0.84	0.86	0.84	0.79	0.78	0.82	0.76	0.86	0.81	0.89	0.89	0.86	0.9	0.85	0.92	0.8	0.9	0.84	0.91	0.89
M40	0.84	0.78	0.79	0.81	0.81	0.76	0.79	0.8	0.7	0.76	0.81	0.81	0.86	0.86	0.79	0.87	0.82	0.85	0.83	0.87	0.81	0.89	0.84
M41	0.75	0.74	0.75	0.78	0.75	0.78	0.73	0.71	0.76	0.75	0.8	0.73	0.78	0.78	0.75	0.84	0.76	0.84	0.84	0.89	0.82	0.82	0.82
M42	0.85	0.84	0.85	0.87	0.85	0.78	0.85	0.76	0.81	0.82	0.82	0.87	0.87	0.87	0.8	0.89	0.89	0.91	0.84	0.91	0.85	0.95	0.87
M43	0.69	0.7	0.69	0.67	0.69	0.67	0.69	0.63	0.65	0.64	0.71	0.69	0.69	0.69	0.71	0.73	0.7	0.68	0.75	0.75	0.71	0.71	0.69
M44	0.71	0.7	0.71	0.69	0.71	0.69	0.71	0.65	0.68	0.67	0.74	0.71	0.71	0.71	0.71	0.78	0.73	0.73	0.78	0.8	0.74	0.76	0.74
M45	0.8	0.79	0.8	0.8	0.85	0.8	0.85	0.71	0.76	0.75	0.85	0.78	0.82	0.82	0.78	0.89	0.81	0.84	0.84	0.89	0.82	0.87	0.8
M46	0.76	0.78	0.81	0.79	0.86	0.76	0.84	0.7	0.73	0.74	0.81	0.76	0.79	0.79	0.74	0.85	0.8	0.82	0.8	0.85	0.79	0.86	0.79
M47	0.82	0.84	0.8	0.85	0.85	0.87	0.87	0.81	0.79	0.8	0.9	0.8	0.85	0.85	0.82	0.76	0.76	0.79	0.86	0.84	0.85	0.78	0.8
M48	0.73	0.69	0.68	0.68	0.73	0.78	0.7	0.76	0.67	0.65	0.73	0.68	0.68	0.68	0.73	0.71	0.67	0.69	0.74	0.71	0.75	0.68	0.68
M49	0.73	0.76	0.75	0.75	0.8	0.7	0.8	0.74	0.69	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.71	0.76	0.74	0.76	0.74	0.73	0.78	0.73
N3	0.73	0.7	0.71	0.71	0.79	0.76	0.74	0.73	0.75	0.71	0.74	0.67	0.71	0.71	0.74	0.78	0.73	0.8	0.7	0.78	0.76	0.81	0.81
N5	0.73	0.67	0.68	0.68	0.78	0.73	0.73	0.67	0.71	0.68	0.73	0.68	0.73	0.73	0.73	0.79	0.74	0.76	0.71	0.79	0.78	0.82	0.78
N6	0.78	0.71	0.75	0.73	0.82	0.78	0.75	0.74	0.74	0.73	0.75	0.73	0.75	0.75	0.78	0.74	0.79	0.81	0.71	0.74	0.78	0.8	0.82
N7	0.79	0.73	0.74	0.74	0.84	0.79	0.76	0.75	0.75	0.74	0.76	0.74	0.76	0.76	0.79	0.8	0.8	0.87	0.73	0.8	0.79	0.86	0.89
N8	0.73	0.69	0.68	0.65	0.7	0.73	0.65	0.71	0.71	0.73	0.7	0.68	0.7	0.7	0.73	0.67	0.69	0.74	0.69	0.67	0.73	0.73	0.78
N10	0.68	0.67	0.7	0.68	0.73	0.73	0.7	0.69	0.64	0.6	0.7	0.6	0.65	0.65	0.65	0.74	0.67	0.74	0.64	0.71	0.7	0.75	0.73
N12	0.79	0.78	0.76	0.74	0.81	0.79	0.76	0.78	0.73	0.69	0.76	0.71	0.74	0.74	0.79	0.7	0.73	0.73	0.68	0.68	0.74	0.74	0.71

ตารางที่ 2 (ต่อ) ค่า Similarity index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpc 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
N16	0.75	0.74	0.75	0.75	0.8	0.75	0.78	0.71	0.74	0.73	0.75	0.7	0.73	0.73	0.73	0.79	0.74	0.81	0.71	0.76	0.73	0.82	0.8
N18	0.76	0.73	0.74	0.74	0.81	0.79	0.76	0.75	0.78	0.74	0.76	0.69	0.74	0.74	0.74	0.8	0.75	0.72	0.7	0.78	0.76	0.84	0.81
N21	0.71	0.7	0.71	0.71	0.81	0.74	0.74	0.67	0.73	0.74	0.76	0.69	0.74	0.74	0.76	0.78	0.75	0.82	0.73	0.8	0.74	0.84	0.84
N22	0.67	0.6	0.64	0.59	0.67	0.64	0.59	0.65	0.7	0.64	0.62	0.64	0.62	0.62	0.64	0.68	0.68	0.75	0.6	0.63	0.62	0.71	0.74
N23	0.7	0.67	0.68	0.65	0.75	0.73	0.68	0.69	0.71	0.7	0.68	0.68	0.68	0.68	0.73	0.74	0.74	0.79	0.64	0.71	0.7	0.78	0.8
N26	0.74	0.75	0.76	0.74	0.81	0.69	0.79	0.65	0.75	0.79	0.74	0.76	0.76	0.76	0.74	0.75	0.8	0.8	0.75	0.78	0.74	0.84	0.81
N33	0.78	0.74	0.68	0.73	0.78	0.85	0.78	0.79	0.79	0.78	0.8	0.73	0.78	0.78	0.7	0.69	0.67	0.69	0.71	0.64	0.73	0.7	0.73
N35	0.75	0.69	0.7	0.7	0.8	0.8	0.73	0.74	0.76	0.73	0.75	0.7	0.73	0.73	0.73	0.79	0.71	0.79	0.67	0.74	0.73	0.8	0.78
N39	0.76	0.73	0.74	0.74	0.81	0.79	0.76	0.75	0.78	0.74	0.76	0.69	0.74	0.74	0.74	0.78	0.73	0.8	0.68	0.75	0.74	0.81	0.79
U4	0.75	0.74	0.8	0.75	0.82	0.7	0.8	0.71	0.69	0.75	0.75	0.78	0.75	0.75	0.73	0.74	0.84	0.89	0.74	0.76	0.7	0.85	0.82
U7	0.74	0.7	0.71	0.71	0.74	0.67	0.74	0.7	0.75	0.71	0.67	0.71	0.71	0.71	0.67	0.75	0.75	0.78	0.65	0.75	0.74	0.81	0.74
U8	0.7	0.67	0.7	0.68	0.68	0.7	0.68	0.69	0.67	0.65	0.65	0.7	0.63	0.63	0.6	0.74	0.69	0.78	0.67	0.71	0.7	0.73	0.75
U9	0.78	0.71	0.73	0.73	0.78	0.73	0.73	0.74	0.71	0.7	0.7	0.75	0.73	0.73	0.7	0.76	0.79	0.86	0.67	0.76	0.75	0.82	0.85
U11	0.76	0.73	0.74	0.74	0.79	0.67	0.76	0.68	0.73	0.76	0.71	0.79	0.74	0.74	0.69	0.75	0.8	0.85	0.73	0.78	0.71	0.84	0.81
U12	0.75	0.69	0.7	0.7	0.75	0.7	0.7	0.71	0.74	0.73	0.68	0.73	0.7	0.7	0.68	0.74	0.76	0.84	0.64	0.74	0.73	0.8	0.82
U16	0.81	0.8	0.84	0.81	0.84	0.74	0.84	0.78	0.78	0.79	0.79	0.81	0.79	0.79	0.74	0.75	0.82	0.82	0.8	0.78	0.79	0.79	0.74
U20	0.76	0.75	0.79	0.76	0.79	0.69	0.79	0.73	0.73	0.74	0.74	0.76	0.74	0.74	0.69	0.78	0.8	0.85	0.75	0.8	0.74	0.81	0.76
Un1	0.67	0.68	0.67	0.71	0.69	0.64	0.71	0.63	0.7	0.74	0.67	0.71	0.69	0.69	0.67	0.65	0.68	0.65	0.63	0.63	0.62	0.67	0.64
Un4	0.65	0.67	0.65	0.7	0.68	0.68	0.7	0.62	0.64	0.65	0.7	0.68	0.68	0.68	0.65	0.71	0.64	0.64	0.64	0.69	0.63	0.68	0.6
Un5	0.68	0.69	0.7	0.73	0.7	0.68	0.73	0.69	0.67	0.68	0.7	0.7	0.7	0.7	0.68	0.71	0.71	0.69	0.64	0.69	0.63	0.7	0.63
Un6	0.67	0.68	0.69	0.71	0.69	0.67	0.71	0.65	0.65	0.67	0.69	0.69	0.69	0.69	0.67	0.7	0.68	0.68	0.63	0.68	0.62	0.69	0.62
Un12	0.67	0.65	0.64	0.71	0.67	0.64	0.69	0.63	0.7	0.69	0.67	0.69	0.69	0.69	0.62	0.68	0.65	0.6	0.58	0.63	0.59	0.64	0.54
Un42	0.69	0.73	0.79	0.74	0.74	0.69	0.76	0.7	0.68	0.71	0.71	0.74	0.71	0.71	0.71	0.82	0.8	0.82	0.73	0.78	0.71	0.81	0.74

ตารางที่ 2 (ต่อ) ค่า Similarity index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpc 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
Un43	0.73	0.76	0.75	0.80	0.73	0.73	0.80	0.71	0.71	0.73	0.75	0.78	0.75	0.75	0.70	0.74	0.74	0.74	0.71	0.74	0.70	0.75	0.70
Un46	0.71	0.75	0.79	0.76	0.74	0.71	0.79	0.73	0.70	0.71	0.74	0.76	0.74	0.74	0.71	0.78	0.78	0.8	0.73	0.78	0.71	0.79	0.74
Un34	0.80	0.81	0.73	0.8	0.78	0.78	0.82	0.76	0.76	0.78	0.80	0.82	0.82	0.75	0.71	0.71	0.69	0.74	0.69	0.73	0.73	0.70	0.71
Un36	0.69	0.70	0.67	0.69	0.69	0.64	0.69	0.65	0.70	0.71	0.67	0.74	0.69	0.69	0.67	0.65	0.68	0.65	0.65	0.68	0.64	0.74	0.67
Un37	0.75	0.76	0.73	0.75	0.78	0.70	0.78	0.71	0.71	0.73	0.73	0.80	0.75	0.75	0.70	0.71	0.74	0.71	0.69	0.71	0.68	0.80	0.70
Un38	0.68	0.69	0.68	0.68	0.73	0.63	0.70	0.64	0.64	0.65	0.65	0.73	0.68	0.68	0.68	0.71	0.71	0.71	0.69	0.71	0.68	0.78	0.73
Un39	0.78	0.79	0.75	0.78	0.80	0.70	0.80	0.71	0.74	0.75	0.75	0.80	0.78	0.78	0.75	0.71	0.76	0.74	0.74	0.74	0.73	0.80	0.75
Un47	0.73	0.71	0.65	0.73	0.73	0.68	0.73	0.67	0.69	0.68	0.70	0.75	0.73	0.73	0.68	0.69	0.67	0.67	0.64	0.67	0.63	0.73	0.68
Un48	0.76	0.80	0.71	0.81	0.71	0.74	0.81	0.75	0.73	0.74	0.76	0.81	0.79	0.79	0.67	0.73	0.70	0.68	0.70	0.70	0.71	0.71	0.67
Un49	0.73	0.76	0.68	0.78	0.68	0.70	0.75	0.69	0.69	0.70	0.75	0.75	0.75	0.75	0.63	0.69	0.67	0.64	0.69	0.69	0.70	0.68	0.63
Un26	0.65	0.75	0.71	0.76	0.71	0.71	0.79	0.68	0.73	0.79	0.76	0.71	0.74	0.74	0.69	0.68	0.68	0.65	0.73	0.68	0.71	0.67	0.64
Un27	0.70	0.74	0.73	0.78	0.70	0.70	0.78	0.69	0.74	0.78	0.73	0.75	0.73	0.73	0.70	0.71	0.71	0.69	0.69	0.69	0.68	0.70	0.65
Un28	0.71	0.75	0.74	0.79	0.74	0.71	0.79	0.70	0.70	0.71	0.76	0.74	0.74	0.74	0.69	0.70	0.75	0.70	0.73	0.73	0.71	0.71	0.67
Un29	0.59	0.63	0.62	0.67	0.62	0.62	0.67	0.60	0.63	0.64	0.64	0.64	0.62	0.62	0.57	0.63	0.63	0.60	0.60	0.63	0.59	0.64	0.59
Un30	0.62	0.65	0.64	0.69	0.64	0.64	0.69	0.63	0.65	0.67	0.67	0.67	0.64	0.64	0.59	0.65	0.65	0.63	0.63	0.65	0.62	0.64	0.59
Un31	0.73	0.76	0.75	0.80	0.73	0.70	0.80	0.69	0.76	0.78	0.75	0.75	0.75	0.75	0.70	0.71	0.74	0.74	0.71	0.74	0.70	0.75	0.70
Un32	0.75	0.79	0.73	0.80	0.75	0.70	0.80	0.71	0.71	0.73	0.75	0.78	0.75	0.75	0.70	0.71	0.71	0.71	0.71	0.74	0.70	0.75	0.70
Un33	0.75	0.81	0.75	0.80	0.73	0.78	0.80	0.79	0.74	0.75	0.75	0.78	0.75	0.75	0.70	0.69	0.69	0.69	0.71	0.69	0.73	0.70	0.68
Un50	0.69	0.70	0.74	0.71	0.74	0.69	0.74	0.68	0.75	0.71	0.71	0.74	0.71	0.71	0.69	0.70	0.73	0.70	0.68	0.70	0.67	0.71	0.64
Un51	0.71	0.73	0.67	0.74	0.69	0.69	0.71	0.68	0.73	0.76	0.71	0.74	0.71	0.71	0.74	0.68	0.63	0.6	0.65	0.65	0.64	0.67	0.59
Un52	0.71	0.73	0.69	0.74	0.74	0.71	0.76	0.68	0.7	0.71	0.74	0.74	0.76	0.76	0.69	0.68	0.70	0.68	0.68	0.65	0.67	0.71	0.69
Un10	0.69	0.70	0.71	0.74	0.74	0.64	0.74	0.63	0.75	0.74	0.69	0.74	0.71	0.71	0.69	0.65	0.73	0.70	0.68	0.68	0.67	0.74	0.69
Un8	0.68	0.71	0.70	0.75	0.68	0.65	0.75	0.64	0.71	0.75	0.70	0.70	0.70	0.70	0.68	0.67	0.69	0.67	0.67	0.67	0.65	0.68	0.63

ตารางที่ 2 (ต่อ) ค่า Similarity index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpc 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
Un53	0.75	0.76	0.75	0.78	0.78	0.68	0.78	0.69	0.76	0.78	0.73	0.78	0.75	0.75	0.73	0.69	0.76	0.74	0.71	0.71	0.7	0.78	0.73
K6	0.7	0.71	0.7	0.73	0.7	0.63	0.73	0.64	0.71	0.73	0.68	0.73	0.7	0.7	0.68	0.67	0.71	0.71	0.67	0.69	0.65	0.73	0.68
K7	0.7	0.71	0.68	0.73	0.7	0.65	0.73	0.67	0.67	0.68	0.68	0.75	0.7	0.7	0.65	0.67	0.69	0.69	0.64	0.67	0.63	0.7	0.68
K9	0.71	0.7	0.69	0.69	0.69	0.64	0.71	0.63	0.73	0.71	0.69	0.71	0.71	0.71	0.69	0.7	0.7	0.73	0.68	0.73	0.67	0.74	0.69
K12	0.68	0.69	0.65	0.7	0.68	0.6	0.7	0.62	0.69	0.73	0.65	0.7	0.68	0.68	0.65	0.67	0.67	0.69	0.62	0.67	0.6	0.7	0.65
K13	0.68	0.67	0.65	0.65	0.68	0.63	0.68	0.64	0.69	0.68	0.63	0.7	0.65	0.65	0.63	0.67	0.67	0.67	0.62	0.64	0.63	0.68	0.65
K14	0.68	0.67	0.63	0.68	0.65	0.6	0.68	0.62	0.69	0.68	0.63	0.68	0.65	0.65	0.6	0.62	0.64	0.64	0.59	0.62	0.6	0.65	0.63
K20	0.65	0.69	0.65	0.7	0.65	0.6	0.68	0.62	0.67	0.68	0.63	0.68	0.65	0.65	0.63	0.59	0.64	0.67	0.59	0.62	0.58	0.65	0.65
K34	0.68	0.69	0.65	0.7	0.68	0.6	0.7	0.62	0.69	0.7	0.65	0.7	0.68	0.68	0.63	0.62	0.67	0.67	0.62	0.64	0.6	0.68	0.65
Kn11	0.63	0.62	0.58	0.63	0.6	0.58	0.63	0.59	0.64	0.65	0.58	0.65	0.6	0.6	0.58	0.59	0.59	0.57	0.54	0.54	0.56	0.58	0.56
Kn12	0.65	0.67	0.63	0.68	0.65	0.6	0.68	0.62	0.67	0.68	0.63	0.7	0.65	0.65	0.6	0.62	0.67	0.64	0.62	0.62	0.6	0.65	0.6
Kn13	0.64	0.68	0.64	0.69	0.64	0.62	0.69	0.63	0.65	0.69	0.64	0.69	0.64	0.64	0.62	0.63	0.63	0.6	0.6	0.6	0.59	0.62	0.57
Kn14	0.64	0.63	0.59	0.64	0.59	0.59	0.64	0.6	0.65	0.67	0.59	0.67	0.62	0.62	0.59	0.6	0.6	0.58	0.56	0.56	0.57	0.59	0.57
Kn15	0.68	0.74	0.68	0.73	0.65	0.68	0.75	0.69	0.71	0.73	0.7	0.75	0.7	0.7	0.63	0.62	0.64	0.62	0.62	0.67	0.65	0.63	0.6
Kn16	0.69	0.75	0.69	0.73	0.67	0.69	0.78	0.7	0.7	0.74	0.71	0.74	0.71	0.71	0.64	0.63	0.65	0.63	0.68	0.63	0.67	0.64	0.62
Kn17	0.64	0.68	0.64	0.69	0.62	0.62	0.69	0.63	0.65	0.69	0.64	0.69	0.64	0.64	0.62	0.63	0.63	0.6	0.6	0.6	0.59	0.62	0.57
Kn19	0.71	0.75	0.69	0.74	0.67	0.69	0.76	0.7	0.73	0.74	0.71	0.71	0.71	0.71	0.64	0.63	0.65	0.63	0.68	0.63	0.69	0.64	0.62
Kn20	0.68	0.69	0.65	0.7	0.68	0.6	0.7	0.62	0.69	0.7	0.65	0.7	0.68	0.68	0.63	0.59	0.67	0.64	0.62	0.62	0.6	0.65	0.63
Kn21	0.68	0.69	0.65	0.7	0.68	0.6	0.7	0.62	0.69	0.7	0.65	0.7	0.68	0.68	0.63	0.59	0.67	0.64	0.62	0.62	0.6	0.65	0.63
Kn22	0.71	0.7	0.67	0.71	0.67	0.67	0.71	0.65	0.73	0.71	0.69	0.74	0.71	0.71	0.67	0.65	0.68	0.65	0.65	0.65	0.64	0.67	0.62
Kn23	0.68	0.69	0.65	0.7	0.68	0.63	0.7	0.64	0.64	0.65	0.65	0.73	0.68	0.68	0.63	0.62	0.67	0.64	0.62	0.62	0.6	0.65	0.63
Kn24	0.7	0.67	0.63	0.68	0.63	0.65	0.68	0.64	0.71	0.68	0.65	0.7	0.68	0.68	0.63	0.67	0.64	0.64	0.62	0.64	0.63	0.65	0.6
Kn28	0.7	0.71	0.68	0.73	0.7	0.63	0.73	0.64	0.71	0.73	0.68	0.73	0.7	0.7	0.65	0.62	0.69	0.67	0.64	0.64	0.63	0.68	0.63

ตารางที่ 2 (ต่อ) ค่า Similarity index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpc 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
Kn30	0.71	0.7	0.67	0.71	0.67	0.67	0.71	0.65	0.73	0.71	0.69	0.74	0.71	0.71	0.67	0.65	0.68	0.65	0.65	0.65	0.64	0.67	0.62
Kn33	0.68	0.67	0.63	0.68	0.65	0.63	0.68	0.64	0.69	0.68	0.63	0.7	0.65	0.65	0.6	0.62	0.64	0.62	0.59	0.59	0.6	0.63	0.6
SP6	0.68	0.67	0.7	0.65	0.7	0.63	0.68	0.64	0.69	0.68	0.65	0.68	0.65	0.65	0.65	0.74	0.74	0.76	0.69	0.74	0.7	0.78	0.73
SP27	0.78	0.76	0.7	0.78	0.73	0.7	0.78	0.71	0.79	0.78	0.73	0.78	0.75	0.75	0.7	0.69	0.71	0.69	0.69	0.69	0.7	0.75	0.7
SP32	0.74	0.73	0.69	0.74	0.71	0.69	0.74	0.68	0.75	0.74	0.71	0.74	0.71	0.71	0.67	0.68	0.7	0.68	0.68	0.68	0.69	0.71	0.67
SP33	0.71	0.73	0.69	0.74	0.71	0.67	0.74	0.65	0.73	0.74	0.71	0.74	0.71	0.71	0.64	0.7	0.7	0.73	0.65	0.7	0.64	0.76	0.69
SP36	0.71	0.73	0.69	0.74	0.69	0.71	0.71	0.7	0.73	0.71	0.69	0.74	0.69	0.69	0.67	0.68	0.68	0.68	0.65	0.65	0.67	0.69	0.67
SP41	0.73	0.74	0.7	0.75	0.7	0.7	0.73	0.71	0.74	0.73	0.68	0.75	0.7	0.7	0.68	0.69	0.69	0.71	0.64	0.67	0.65	0.73	0.7
SP42	0.71	0.73	0.69	0.74	0.71	0.67	0.74	0.65	0.73	0.74	0.71	0.74	0.71	0.71	0.67	0.68	0.7	0.7	0.68	0.7	0.7	0.74	0.69
SP43	0.73	0.74	0.7	0.75	0.73	0.7	0.75	0.69	0.69	0.7	0.73	0.78	0.73	0.73	0.68	0.71	0.71	0.71	0.69	0.71	0.68	0.75	0.7
SP3	0.69	0.7	0.69	0.71	0.67	0.69	0.69	0.7	0.7	0.69	0.67	0.71	0.67	0.67	0.64	0.68	0.68	0.7	0.63	0.65	0.64	0.69	0.67
SP5	0.71	0.73	0.69	0.74	0.71	0.67	0.74	0.65	0.73	0.74	0.71	0.74	0.71	0.71	0.67	0.68	0.7	0.7	0.68	0.7	0.67	0.74	0.69
SP7	0.73	0.74	0.7	0.75	0.73	0.68	0.75	0.67	0.74	0.75	0.73	0.75	0.73	0.73	0.68	0.67	0.71	0.69	0.69	0.69	0.68	0.73	0.68
SP8	0.74	0.75	0.74	0.74	0.76	0.67	0.76	0.68	0.75	0.76	0.71	0.76	0.74	0.74	0.71	0.73	0.75	0.78	0.7	0.65	0.69	0.81	0.76
SP26	0.79	0.78	0.74	0.79	0.76	0.71	0.79	0.73	0.75	0.74	0.74	0.79	0.76	0.76	0.69	0.73	0.75	0.75	0.68	0.7	0.69	0.79	0.71
SP30	0.7	0.71	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.69	0.71	0.7	0.68	0.73	0.68	0.68	0.68	0.74	0.69	0.74	0.67	0.71	0.68	0.75	0.73
SP31	0.73	0.74	0.7	0.75	0.73	0.68	0.75	0.67	0.74	0.75	0.73	0.75	0.73	0.73	0.68	0.69	0.71	0.71	0.69	0.71	0.68	0.75	0.7
SP40	0.75	0.74	0.75	0.78	0.75	0.7	0.78	0.71	0.79	0.78	0.73	0.75	0.75	0.75	0.7	0.69	0.76	0.74	0.69	0.69	0.7	0.75	0.7
SP2	0.74	0.75	0.71	0.76	0.71	0.71	0.74	0.73	0.75	0.74	0.69	0.76	0.71	0.71	0.69	0.68	0.7	0.7	0.65	0.65	0.67	0.71	0.69
SP38	0.71	0.73	0.69	0.74	0.71	0.69	0.74	0.68	0.73	0.74	0.71	0.76	0.71	0.71	0.67	0.68	0.7	0.68	0.68	0.68	0.67	0.71	0.67
SV3	0.73	0.71	0.7	0.7	0.73	0.68	0.73	0.67	0.74	0.73	0.7	0.73	0.7	0.7	0.68	0.69	0.71	0.69	0.69	0.69	0.7	0.73	0.68
SV7	0.74	0.75	0.74	0.74	0.74	0.71	0.74	0.73	0.75	0.74	0.69	0.76	0.71	0.71	0.71	0.7	0.73	0.73	0.68	0.68	0.69	0.74	0.71
SV8	0.74	0.7	0.67	0.71	0.71	0.69	0.71	0.68	0.73	0.69	0.69	0.73	0.71	0.71	0.67	0.68	0.68	0.65	0.65	0.63	0.64	0.69	0.64

ตารางที่ 3 แถบดีเอ็นเอจากเทคนิค PCR - RFLP โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1-4 กำหนดสัญลักษณ์ 1 กรณีที่พบแถบดีเอ็นเอและกำหนดสัญลักษณ์ 0 กรณีที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

Enzyme / Sample	*Dde* I (bp)				*Hae* III (bp)					*Hin* fI(bp)				*Hind* III (bp)			
	661	324	229	135	588	398	174	155	126	324	209	186	132	741	490	295	135
1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
3	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
4	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
5	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
6	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
7	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
8	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
9	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1
10	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1

ตารางที่ 4 แถบดีเอ็นเอจากเทคนิค PCR - RFLP โดยไพรเมอร์ O1-LR12R กำหนดสัญลักษณ์ 1 กรณีที่พบแถบดีเอ็นเอ และกำหนดสัญลักษณ์ 0 กรณีที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

Enzyme / Sample	Dde I (bp)				Hae III (bp)					Hinf I (bp)				Hind III (bp)			
	537	427	209	155	602	398	316	234	186	417	169	132	83	676	617	339	170
1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
2	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
3	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
4	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
5	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
6	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
7	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
8	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
9	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1
10	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0

ตารางที่ 5 ค่า Similarity Index จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1-4

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.000									
2	0.714	1.000								
3	0.714	1.000	1.000							
4	0.714	1.000	1.000	1.000						
5	0.565	0.789	0.789	0.789	1.000					
6	0.714	1.000	1.000	1.000	0.789	1.000				
7	0.667	0.941	0.941	0.941	0.737	0.941	1.000			
8	0.522	0.737	0.737	0.737	0.941	0.737	0.778	1.000		
9	0.226	0.241	0.241	0.241	0.161	0.241	0.250	0.667	1.000	
10	0.583	0.565	0.565	0.565	0.714	0.565	0.522	0.667	2.667	1.000

* หมายเลขแสดงชนิดของเห็ดตีนแรดในตารางภาคผนวก

ตารางที่ 6 ค่า Similarity Index จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ O1 – LR12R

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.000									
2	0.833	1.000								
3	0.833	1.000	1.000							
4	0.833	1.000	1.000	1.000						
5	0.722	0.882	0.882	0.822	1.000					
6	0.833	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000				
7	0.800	0.970	0.970	0.970	0.848	0.970	1.000			
8	0.686	0.848	0.848	0.848	0.970	0.848	0.875	1.000		
9	0.368	0.389	0.389	0.389	0.278	0.389	0.400	0.286	1.000	
10	0.737	0.722	0.722	0.722	0.833	0.722	0.686	0.800	0.421	1.000

* หมายเลขแสดงชนิดของเห็ดตีนแรดในตาราง

ตารางที่ 7 ค่า Similarity Index ของแถบดีเอ็นเอเห็ดตีนแรด

* หมายเลขแสดงชนิดของเห็ดตีนแรดในตารางภาคผนวก

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.000									
2	0.824	1.000								
3	0.824	1.000	1.000							
4	0.824	1.000	1.000	1.000						
5	0.706	0.882	0.882	0.882	1.000					
6	0.824	1.000	1.000	1.000	0.882	1.000				
7	0.794	0.971	0.971	0.971	0.853	0.971	1.000			
8	0.676	0.853	0.853	0.853	0.971	0.853	0.882	1.000		
9	0.294	0.353	0.353	0.353	0.235	0.353	0.382	0.265	1.000	
10	0.706	0.706	0.706	0.706	0.824	0.706	0.676	0.794	0.353	1.000

ประวัตินักวิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

ชื่อ	นางสาวมาลินี ตันติยาภรณ์
ตำแหน่ง	รองศาสตราจารย์
คุณวุฒิ	วท.บ. (พฤกษศาสตร์)
	วท.ม. (การสอนชีววิทยา)
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
	ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520.
โทรศัพท์	0-2326-4339-53 ต่อ 329
โทรสาร	0-2326-4354
ความชำนาญ	Cluster analysis and genetic variation of *Tricholoma crassum*

2. ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ	นางสาวพรทิพย์ ภูมิแกดำ
คุณวุฒิ	วท.บ. (เกษตรศาสตร์)
	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สถานที่ทำงาน	บริษัทอายิโน๊ะโมโต๊ะจำกัด
ความชำนาญ	Isozyme electrophoresis of mushroom

3. ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ	นางสาวณัฐภรณ์ เวียนงาม
คุณวุฒิ	วท.บ. (เกษตรศาสตร์)
	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สถานที่ทำงาน	ศูนย์พันธุวิศวกรรม
ความชำนาญ	PCR- RFLP technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ นางสาวนุสรา เพิงใหญ่

คุณวุฒิ วท.บ. (ชีววิทยา)

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ความชำนาญ Mating System and incompatible alleles of Mushrom

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้