สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด

(Tricholoma crassum)

T 035866

น.ส.จุฑามาศ คุณสุข

น.ส.นริสรา เลิศถวิลภักดี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2542

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 35866
วัน, เดือน, ปี 7 มิ.ย. 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sexual Incompatibility of *Tricholoma crassum*

Miss Jutamart Khunsook

Miss Narisara Lertthawinphakdee

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ : ลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็นตีนแรด *(Tricholoma crassum)*

โดย : น.ส. จุฑามาศ คุณสุข

น.ส. นริสรา เลิศถวิลภักดี

ภาควิชา : ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. มาลินี ตันติยาภรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์บัณฑิต

(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) ประธานกรรมการ

(ผศ.มาลินี ตันติยาภรณ์) กรรมการ

(ดร.อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด *Tricholoma crassum*
นักศึกษา	นางสาว จุฑามาศ คุณสุข
	นางสาว นริสรา เลิศถวิลภักดี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. มาลินี ตันติยาภรณ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2542

บทคัดย่อ

ในการศึกษาลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด ได้นำเส้นใยเดี่ยว (monokaryon)จำนวน 12 isolates มาผสมทีละคู่แบบพบกันหมดโดยเลือกแต่ละคู่ วางให้ห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นตรวจดูการเกิด clamp connection ตรงบริเวณที่เส้นใยเจริญมาพบกัน การทดลอง พบว่าเส้นใย isolates เดียวกันไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ และสามารถจัดกลุ่มเส้นใยออกเป็น 4 กลุ่ม จาก isolates ทั้งหมด 12 isolates ที่ตรวจสอบ เมื่อนำตัวแทนกลุ่มใน 4 กลุ่ม มาผสมพันธุ์กันทีละคู่แบบพบกันหมด พบว่าอัตราส่วนของการผสมพันธุ์กันได้ และการผสมพันธุ์ไม่ได้ เป็น 1:3 การทดลองข้างต้น แสดงว่าลักษณะการผสมพันธุ์ของ เห็ดตีนแรด เป็นแบบ เฮทเทอโรทัลลิก (heterothallic) และยีนที่ควบคุมการผสมพันธุ์มีแนวโน้มที่จะเป็นแบบ tetrapolar.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spacial Project Title	Sexual Incompatibility of *Tricholoma crassum*
Name	Miss jutamas kunsuk Miss narisara lerdtawinpakdee
Spacial Project Advisor	Miss malinee tantiyaporn
Department	Applied Biology
Academic Year	1999

Abstract

The twelve monokaryotic isolate were placed in pairs about 2 cm. apart in all possible combination. They were left till resultant colonies overgrown the space between the inocular and developed a contract zone. Pairing were score as compatible if presence of clamp connection could be observed on the hyphae. From the result, compatibility per incompatibility is 1:3 so the mating experiment for this fungus was heterothallic and gene that control sexual is trend to tetrapolar.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก ผศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาทางด้านวิชาการและการวิจัย รวมทั้งการเรียบเรียงปัญหาพิเศษ จนทำให้การทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี. จึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ มา ณ ที่นี้

นางสาว จุฑามาศ คุณสุข

นางสาว นิสรา เลิศถาวิลภักดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข

กิตติกรรมประกาศ ค

สารบัญ ง

สารบัญตาราง จ

สารบัญภาพ ฉ

บทที่

1. บทนำ 1

2.บทตรวจเอกสาร 2

3.วิธีการทดลอง 16

4.ผลการทดลอง 17

5. สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ 20

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. 21

ภาคผนวก ข. 23

บรรณานุกรม 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. การผสมพันธุ์แบบพบกันหมด ระหว่าง 6 homokaryotic isolate ของเห็ดตีนแรด บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีระยะเวลาในการincubate 15 วัน. 17

2. การผสมพันธุ์ระหว่าง homokaryotic isolate ของเห็ดตีนแรดที่จัดอยู่ในกลุ่มต่างกัน 4 isolates กับพวกที่ยังไม่ได้จัดกลุ่มอีก 6 isolate บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีระยะเวลา ในการ Incubate 15 วัน 18

3. การผสมพันธุ์แบบพบกันหมด ระหว่าง 6 homokaryotic isolate ของเห็ดตีนแรด ซึ่งแต่ละ isolate จัดอยู่ในกลุ่มต่างกันบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีระยะเวลา Incubate 15 วัน 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

1. การเกิด clamp connection 8

2. เส้นใยโมโนคาริออนและไดคาริออนในเห็ด *Corprinus radiadus* 9

3. การรวมตัวของเส้นใยที่พัฒนาเป็นดอกเห็ด 10

4. ชีพจักรของเห็ดที่เป็นโฮโมทัลลิก 12

5. ชีพจักรของเห็ดที่เป็นเฮทเทอโรทัลลิก 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเห็ดตีนแรดได้เริ่มทำมาตั้งแต่ปี 2493 (อนงค์ จันทร์ศรีกุล,2530) โดย อาจารย์ ก่าน ชลวิจารณ์ ผู้ศึกษาค้นคว้าการเพาะเห็ดฟาง. ในปัจจุบันมีการค้นคว้าเกี่ยวกับเห็ดกว้างขวางมากขึ้น. เห็ดที่รับประทานได้มีหลากหลายชนิด เห็ดที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย และ มีการเพาะปลูกเป็นการค้า ได้แก่ เห็ดแชมปิญอง เห็ดหูหนู เห็ดหอม เห็ดนางรม เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหูหนูขาวหรือเห็ดจีน และเห็ดฟาง เป็นต้น. นอกจากนี้มีเห็ดอีกหลายชนิดที่ยังมิได้มีการศึกษาอย่างจริงจัง เช่น เห็ดตีนแรด หรือเห็ดจั่น เป็นเห็ดที่สามารถรับประทานได้ ได้รับความนิยมมาก ในเรื่องรสชาติดีทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและทางภาคเหนือของประเทศไทย. เห็ดชนิดนี้มีขนาดใหญ่. สามารถออกดอกได้เมื่อทำการเพาะในโรงเรือน พบได้ทั่วไปในฤดูฝน ขึ้นได้ในที่โล่งแจ้งหรือบริเวณที่มีต้นไม้ปกคลุม นอกเหนือจากขนาดใหญ่แล้วยังมีรสหวานและกลิ่นหอม นำมาเพาะออกดอกได้ในโรงเรือน. ขณะเป็นเห็ดสดสามารถเก็บไว้ได้นาน จึงเป็นเห็ดที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเส้นใย ชีพจักร และการผสมพันธุ์.

การศึกษาในครั้งนี้ จะเป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด ทำให้สามารถคัดแยกกลุ่มของคู่ผสมพันธุ์ของเส้นใยที่มีจีนคู่ผสมพันธุ์ที่เหมือนกันและแตกต่างกัน เพื่อใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกเส้นใยที่สามารถนำไปผสมพันธุ์ให้เกิดดอกเห็ดได้ เมื่อนำไปเพาะในโรงเรือนเพื่อการผลิตในเชิงการค้า นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยคุณลักษณะอื่นๆ ของเส้นใยทั้งทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล และพันธุศาสตร์วิศวกรรมต่อไปในอนาคต เพื่อการปรับปรุงพันธุ์เห็ดให้มีผลผลิตดียิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวและลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษา

1. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว ทำให้สามารถคัดแยกเส้นใยโฮโมคาริออน (homokaryon) จากดอกเห็ดได้. สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเห็ดชนิดต่างๆ ได้หลายชนิด.
2. ลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกเส้นใยที่มีจีนคู่ผสมพันธุ์ ที่เมื่อนำมาผสมกันแล้ว สามารถเกิดดอกเห็ดได้ เมื่อนำมาเพาะในโรงเรือน จะได้คุณภาพ และผลผลิต ในการเกิดดอกเห็ดสม่ำเสมอ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2

การตรวจเอกสาร

เห็ดในกลุ่ม *Tricholoma* (Fr.) Quelet เป็นเห็ดในกลุ่มที่มีครีบ (gill fungi) ลักษณะที่สำคัญคือ เป็นเห็ดทรงร่มก้านดอกติดกับหมวกเห็ดตรงกลาง ครีบเห็ดติดกับก้านดอกแบบ ginuate เมื่อทำพิมพ์สปอร์ (spore print) สีของสปอร์เป็นสีขาว ในต้านอนุกรมวิธานได้มีการจัดหมวดหมู่ของ *Tricholoma* ดังนี้

(Singer,R.,1962 และ Webster, J . 1970)

Subdivision : Basidiomycotina

Class : Hymenomycetes

Order : Agaricales

Family : Tricholomataceae

Genus :*Tricholoma*

เห็ดในกลุ่มจีนัส *Tricholoma* พบมากในเขตอบอุ่น มีพบบ้างในเขตร้อน เห็ดในกลุ่มนี้ที่รับประทานได้มีหลายสปีชีส์ เช่น *T. albobrunneum*และ *T. flavovirens* ซึ่งพบในยุโรป *T. mongolicum* *T. mutsutake* ซึ่งพบในเอเชีย นอกจากนี้ยังพบเห็ดสกุลนี้ทั้งที่มีพิษ เช่น *T. pardinum* (Singer, R.1975) และชนิดที่เป็น mycorrhiza กับสนและโอ๊ก เช่น *T. flavovirens* *T. mutsutake* และ *T. flavobrunneum* (Howe,V.K.1965 และ Singer,R.1975). บางสปีชีส์ของเห็ดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะซึ่งยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *T. sapomaceum* สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ ***Candida albicans*** ***Penicillium restrictum*** และแบคทีเรียแกรมบวก (Ohara ,*et al.* 1967 และ Sasek, V. Musilek.1962).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายใต้ครีบของเห็ดสกุล *Tricholoma* จะพบ basidiospore จำนวนมาก basidiosporeของเห็ดสกุลนี้งอกได้ในอาหาร malt extract agar ที่บ่มเชื้อยีสต์ร่วมเข้าไปด้วย สปอร์ของเห็ดบริเวณผิวหน้าอาหารงอกได้ดีกว่าที่นำสปอร์ไปผสมกับอาหาร วิธีการที่ใช้ยีสต์ร่วมบ่มด้วยได้นำไปใช้กับเห็ดชนิดต่างๆ หลายชนิด. นอกจากการใช้ยีสต์ยังพบว่ารา *Torulopsia sanguinea* สามารถกระตุ้นการงอกของ basidiospore ได้ (Bulmer ,G.S *et al.*1961)

มีรายงานของ Cochrame ในปี 1958 ได้กล่าวไว้ว่าการงอกของ basidiospore ที่มียีสต์ร่วมในอาหารด้วย น่าจะเกิดจากผลของวิตามินที่ยีสต์สร้างขึ้น. ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีการทดลองที่จะใช้วิตามินชนิดต่างๆ เช่น biotin, pyredoxins, inositol และ riboflavin กระตุ้นการงอกของ basidiospore แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ (Bulmer ,G.S *et al.*1961)

ความเข้มข้นของสปอร์เป็นปัจจัยหนึ่งต่อการงอกของสปอร์ การเพาะเลี้ยงสปอร์ที่มีความเข้มข้นสูงในจานเลี้ยงเชื้อ จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์น้อยกว่าในจานเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของสปอร์ที่ต่ำกว่า เป็นการศึกษาในเห็ดฟาง (Beneke, E.S *et al.*1964 และ Chang , S.T. 1972)

อุณหภูมิและพีเอช ของอาหารมีผลต่อการงอกของสปอร์ด้วยเช่นกัน เช่น เห็ด *Tricholoma camilchutum* สามารถงอกได้ในอาหารที่มีพีเอช 4-7 (Nisikado,y *et al.*1951) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกคือ 24 องศาเซลเซียส (Tominaga,y .1965)

เห็ดตีนแรดในประเทศไทยมีชื่อสามัญเรียกต่างกันออกไปตามแต่ละท้องถิ่น ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า เห็ดตีนแรด. ทางภาคเหนือ เรียกว่าเห็ดจั่น ส่วนทางภาคกลางเรียกว่า เห็ดดับเต่าขาว (อนงค์ จันทร์ศรีกุล,2530)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็ดตีนแรดถูกจำแนกโดยใช้อนุกรมวิธาน ไว้ดังนี้ คือ

ชื่อวิทยาศาสตร์: Tricholoma crassum (Bark.) Sacc.

ชื่อสามัญ: เห็ดตีนแรด เห็ดจั่น เห็ดตับเต่าขาว

Kingdom: Fungi

Division : Amastigomycota

Subdivision: Basidiomycotina

Class: Basidiomycetes

Subclass: Holobasidiomycetidae

Order: Agaricales

Family : Tricholomataceae

Genus: Tricholoma

Species: *Crassum*

หมวกเห็ด รูปกระทะคว่ำ สีขาวหม่นหรือขาวนวล เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-15 ซม. เมื่อเป็นดอกอ่อนขอบหมวกม้วนงอลงเป็นทรงกลม. ผิวเรียบ เนื้อสีขาว หนา 1-2 ซม. **ครีบ** มีขนาดใหญ่ สีขาว เว้าลงประมาณ 1 ซม. โคนใหญ่ เป็นกระเปาะ ผิวหยาบเล็กน้อย. **สปอร์** รูปกลมรี สีขาว 6-7x 7-8 ไมโครเมตร. ผิวเรียบมีติ่งอยู่ 1 อัน เห็ดตีนแรด มีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยทั่วทุกภาค ขึ้นบนดอไม้ผุเป็นกลุ่มโคนติดกัน 5-10 ดอก เป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ รับประทานได้ รสดี

การศึกษาของเห็ดตีนแรดในประเทศไทยมีการศึกษามาตั้งแต่ปี พศ. 2501 โดย ณรงค์ มีรายงานว่า เห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดีบนอาหารชนิด corn meal agar (ณรงค์ มีนะนันท์ . 2501) ในปีพศ. 2518 พันธุ์ทวี (พันธุ์ทวี ภักดีดินแดน และเพื่อน. 2516) ศึกษาการเลี้ยงเห็ดตีนแรดบนอาหารวุ้น 24 ชนิด พบว่า เส้นใยเห็ด เจริญได้ดีบนอาหารที่มีส่วนประกอบของ wort agar 20 กรัม มันฝรั่ง 300 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

yeast extract 5 กรัม glucose 20 กรัม และ วุ้น 10 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร.

วสัณณ์ (วสัณณ์ เพชรรัตน์. 2529) ได้รายงานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสปอร์และเส้นใยของเห็ดตีนแรด พบว่า basidiospore ของเห็ดตีนแรดไม่สามารถงอกบนอาหารวุ้นที่ใช้ตัวทดสอบคือ Potatoes dextrose agar , Czapek's solution agar , Malt extract agar , water agar และ Glucose peptone agar แต่ basidiospore สามารถงอกได้บนอาหาร PDA และ Malt extract agar ที่มีเชื้อยีสต์ร่วมเจริญอยู่ด้วย ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการงอกของ basidiospore บนอาหาร PDA ที่ พีเอช 5-6 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และยีสต์ที่ใช้คือ *Saccharomyces cerevisiae*

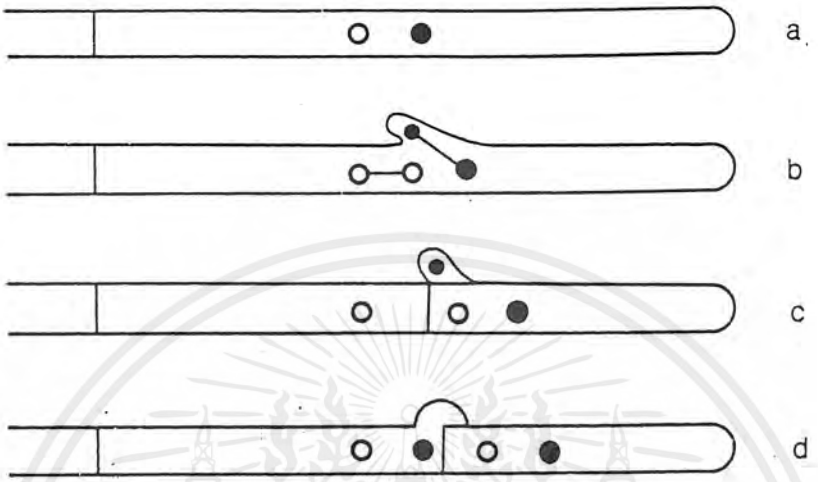
โดยทั่วไปการสืบพันธุ์ทางเพศของเชื้อราประกอบด้วยกระบวนการหลัก 3 ขั้นตอน ได้แก่ การรวมตัวของโพรโตพลาสซึม การรวมตัวของนิวเคลียส และการแบ่งนิวเคลียส ในราชั้นต่ำ การรวมตัวของนิวเคลียสเกิดขึ้นภายหลังจากการรวมตัวของโพรโตพลาสซึม แต่ในราชั้นสูงเมื่อเกิดการรวมตัวของไซโตพลาสซึมแล้ว จะยังไม่มีการรวมตัวของนิวเคลียส สภาวะการณ์เช่นนี้เรียกว่า ไดคาริออน(dikaryon).การเพาะเลี้ยงเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวทำได้กับเห็ดหลายชนิด เช่น *Coprinus cinereus* และ *Schzophyllum commune* เส้นใยที่เจริญจากสปอร์เดี่ยวจะเป็นเส้นใยชนิดโมโนคาริออน (monokaryon) ในแต่ละเซลล์ของเส้นใยมีเพียงหนึ่งนิวเคลียส . ถ้านำเส้นใยชนิดโมโนคาริออนมาผสมกันทีละคู่ เส้นใยที่มีการแตะกัน ถ้ามีการผสมกันได้ จะมีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสเข้าด้วยกัน นิวเคลียสที่มาอยู่เป็นคู่ๆ นี้ เรียกว่า ไดคาริออน เส้นใยในสภาพไดคาริออน จะมีการพัฒนาเส้นใยหลายขั้นตอน เป็นดอกเห็ด(Elliott,C.G.,1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นใยของรา มีการเจริญเติบโตเป็น 3 ระยะ ดังนี้

1. เส้นใยปฐมภูมิ (primary mycellium) เป็นเส้นใยที่เกิดจากการงอกของ basidiospore มาเป็นเส้นใยที่มีผนังขวาง(septum) กั้น แต่ละเซลล์มี 1 นิวเคลียส มีสภาพของโครโมโซมเป็น โมโนพลอยด์ (monoploid,n) หรือเป็นเส้นใย โฮโมคาริออน.
2. เส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycellium) เกิดจาก เส้นใยปฐมภูมิสองเซลล์มาแตะกัน จากนั้นไซโทพลาสซึม(cytoplasm)จากเซลล์หนึ่งจะไหลมายังอีกเซลล์หนึ่งได้เป็นเซลล์ที่มี สองนิวเคลียส แต่นิวเคลียสทั้งสองไม่รวมกัน เรียกสภาพนี้ว่า ไดคาริออน. ซึ่งการเจริญแบบนี้จะเกิด แคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายตะขอขึ้นมาโดย นิวเคลียสอันใดอันหนึ่งจะเคลื่อนเข้าไปในส่วนที่ยื่นออกมา จากนั้นนิวเคลียสที่อยู่ในเส้นใยเดิมและส่วนของตะขอ จะทำการแบ่งแยกตัวแบบไมโตซิสเป็นอย่างละ 2 นิวเคลียส. นิวเคลียสที่เกิดขึ้นใหม่จากทั้งสองจะเคลื่อนไปอยู่บริเวณปลายเซลล์ พร้อมกันนั้นจะเริ่มมีผนังเซลล์ขึ้นตรงบริเวณส่วนงอด้านในของตะขอ และส่วนปลายของตะขอจะละลายผนังเซลล์ ทำให้นิวเคลียสทั้งสองไปรวมกัน ตะขอนี้ได้กลายเป็นปุ่มนูนที่เรียกว่า แคลมป์คอนเนคชั่น(clamp connection) (รูปที่ 1 และ 2) ซึ่งเส้นใยที่เกิด แคลมป์คอนเนคชั่น จะสามารถพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้.
3. เส้นใยตติยภูมิ (tertiary mycellium) เกิดจากเส้นใยทุติยภูมิเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณมากขึ้น. มีการอัดตัวรวมกันเป็นกลุ่มก้อนเล็กๆ และเติบโตขยายขนาดเป็นตุ่มดอกเล็กๆ พัฒนาต่อไป เป็นดอกเห็ดที่มีรูปร่างคล้ายร่มมีการสร้าง เบสิเดียม แต่ละเบสิเดียมมีนิวเคลียสอยู่ 2 นิวเคลียส หรือ ไดคาริออน เมื่อนิวเคลียสทั้งสองรวมกันและแบ่งไมโอซิส จะได้ basidiospore 4 อัน จำนวนโครโมโซมเป็นโมโนพลอยด์. (รูปที่3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่1 การเกิด **clamp connection**

a. นิวเคลียสที่มีจีนคู่ผสมพันธุ์ต่างกัน 0,0

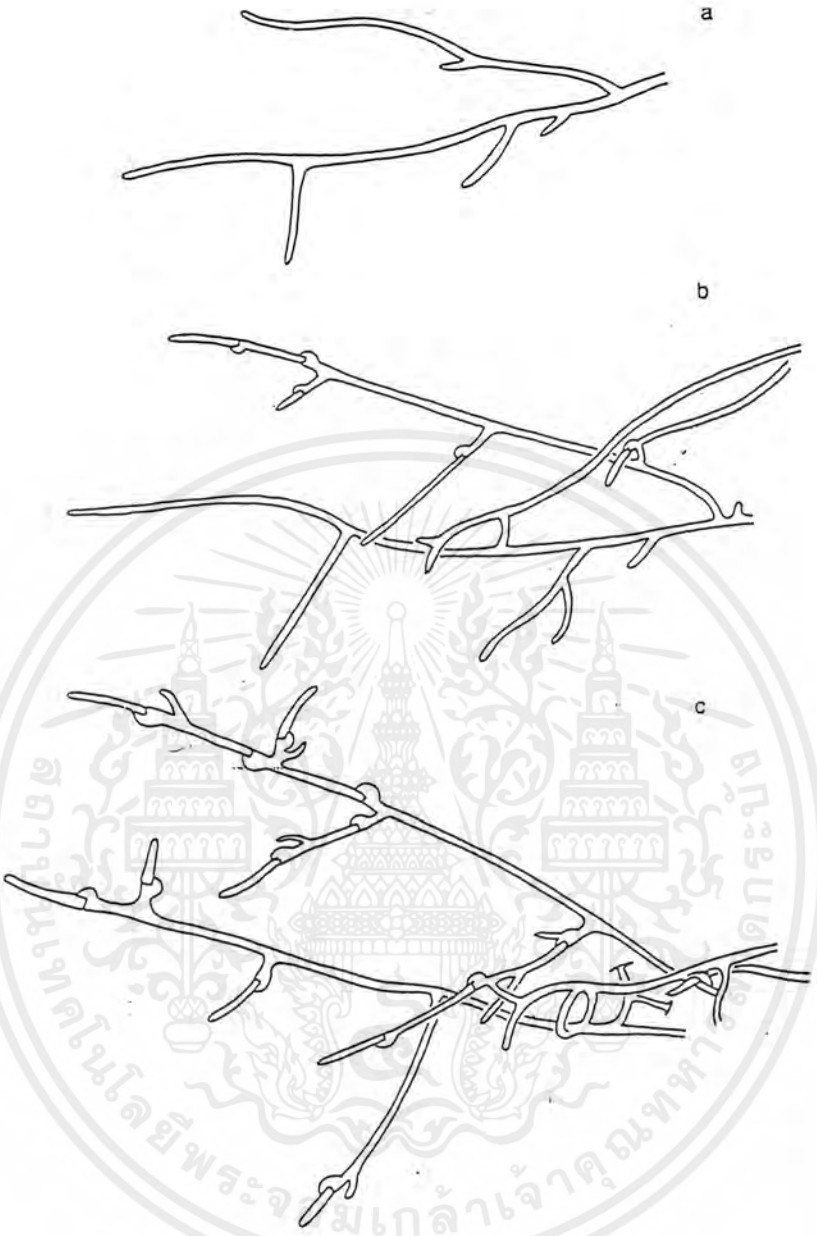
b. แต่ละนิวเคลียสมีการแบ่งแบบไมโตซิส

c. นิวเคลียสที่แบ่ง จะมีการเคลื่อนที่ไปอยู่ที่แขนงเส้นใย และมีผนังขวางขึ้น ออกไปฟอร์มเป็นรูปตะขอ

d. นิวเคลียสที่อยู่ในเซลล์รูปตะขอจะเคลื่อนมารวมกับนิวเคลียสที่มีจีนคู่ผสมพันธุ์ต่างกัน

การผสมพันธุ์ของเห็ดที่มีเพียงขั้นตอน a,b,c จะได้ false clamp connection ซึ่งไม่สามารถเจริญพัฒนาเป็นดอกเห็ดต่อไปได้ (ที่มา Elliott,C.G.1994. Reproduction in fungi , หน้า 38)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



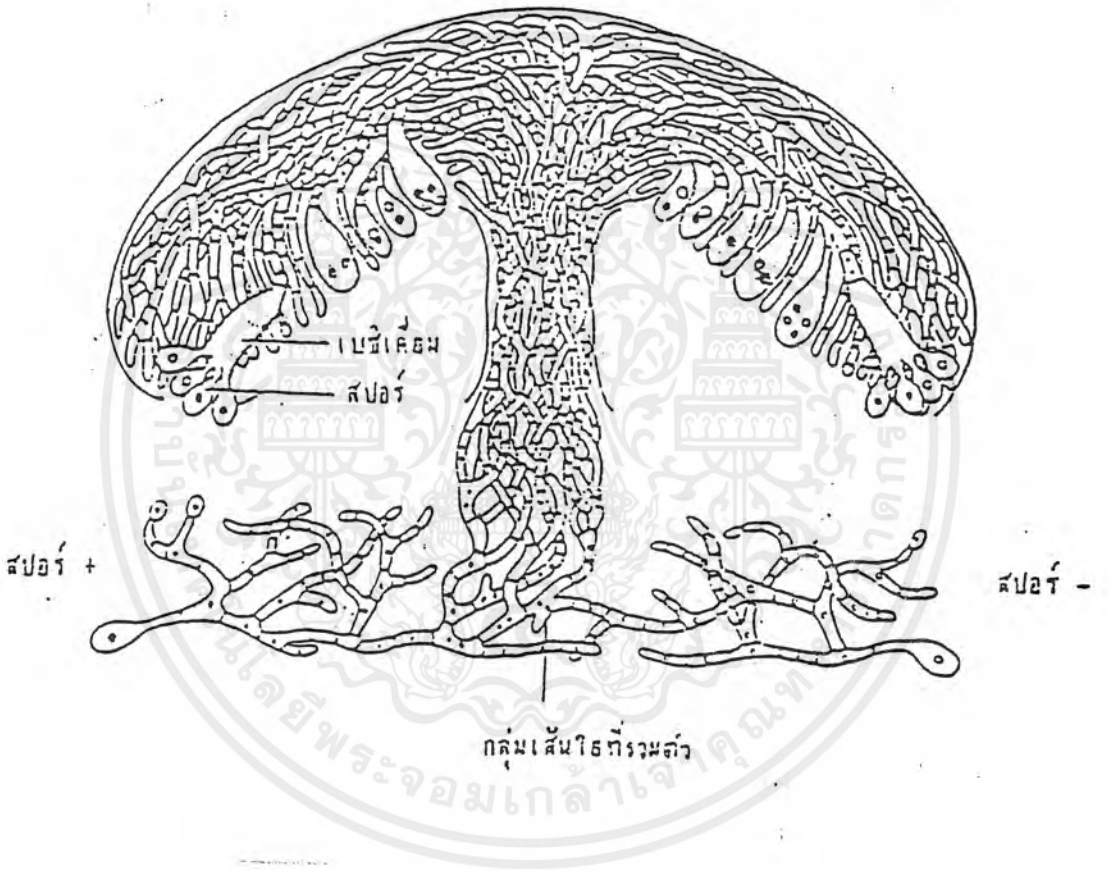
รูปที่2 เส้นใยโมโนคาริออนและไดคาริออน

ในเห็ด *Coprinus radiadus*

a. เส้นใยโมโนคาริออน

bและc. แสดงเส้นใยไดคาริออนและลักษณะของ clamp connection ที่เกิดขึ้น ภายในเส้นใย. (ที่มา Elliott,C.G.1994. Reproduction in fungi , หน้า 41)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่3 การรวมตัวของเส้นใยที่พัฒนาเป็นดอกเห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแบ่งชนิดของรา ตามความสามารถในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ สามารถแบ่งได้ 3 พวก (Alexopoulos,1962) ได้แก่ ราที่สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เพศผู้เพศเมีย ในทัลลัสเดียวกัน (hermaphodite) ราที่สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เพศเมียต่างทัลลัสกัน (dioecious) และราที่ไม่สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ได้อย่างชัดเจน (sexually undifferentiated)

สำหรับการพิจารณาเกี่ยวกับความสามารถในการผสมพันธุ์ของรา สามารถแบ่งรา ได้เป็น 3 กลุ่ม (Esser, K. *et al* 1967) ได้แก่

1. homothallic fungi (Compattible spiceis) หมายถึง ราที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งไม่สามารถผสมตัวเองได้ ภายในทัลลัสเดียวกัน (self fertile) โดยมีการรวมตัวของนิวเคลียส ที่มีจีนคู่ผสมพันธุ์ (mating types) ที่ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4)

2. heterothallic fungi (Incompattible spiceis) หมายถึง ราที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งไม่สามารถผสมตัวเองได้ (self – fertile) การสืบพันธุ์แบบใช้เพศในรากลุ่มนี้ จะเกิดขึ้นจากนิวเคลียสที่มาจากต่างทัลลัสกัน หรือ มีจีนคู่ผสมพันธุ์ ที่แตกต่างกัน (รูปที่ 5)

การผสมพันธุ์ในลักษณะดังกล่าว แบ่งย่อยเป็น 2 กลุ่ม

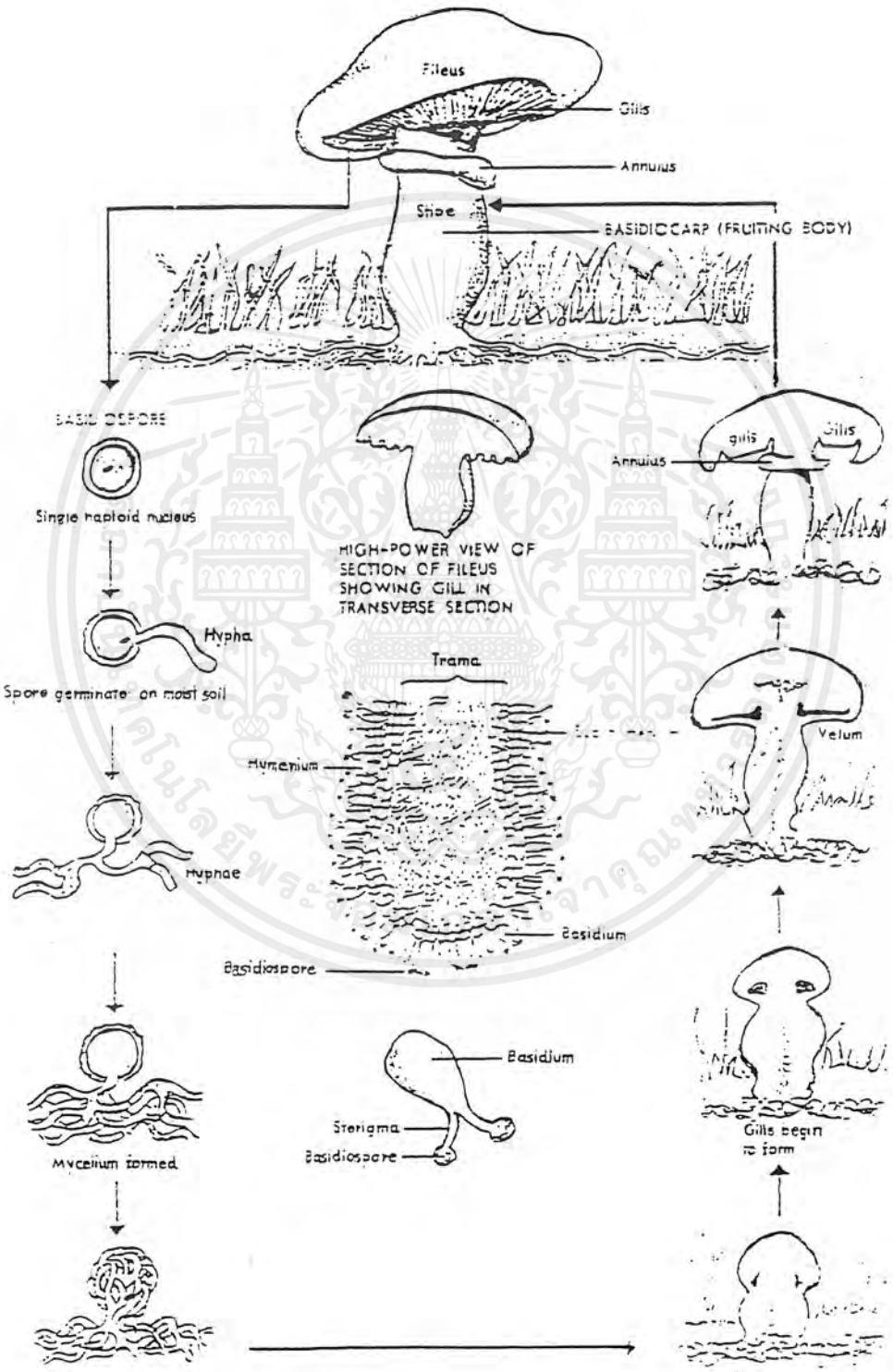
ก. bipolar heterothallic เป็นการสืบพันธุ์ที่มีจีนควบคุมอยู่ 1 ชุด (series) สปอร์ที่สร้างขึ้น จะมีจีนคู่ผสมพันธุ์ 2 ชนิด คือ A และ a

ข. tetrapolar heterothallic เป็นการสืบพันธุ์ ที่มีจีนควบคุมการผสมพันธุ์เป็น 2 ชุด คือจีน A และ B ซึ่งอยู่ต่างโครโมโซมกัน จะนั้นการแยกตัวของจีน A และ B จึงเป็นอิสระ สามารถสร้างสปอร์ที่มีจีนคู่ผสมพันธุ์ แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ A1B1 A2B2 A2B1 และ A1B2 (Esser , K *et al* . 1967 และ Raper , J.H.1966)

3. secondarily heterothallic fungi หมายถึง ราที่ทัลลัสเจริญมาจากสปอร์ ที่มีนิวเคลียส 2 อัน

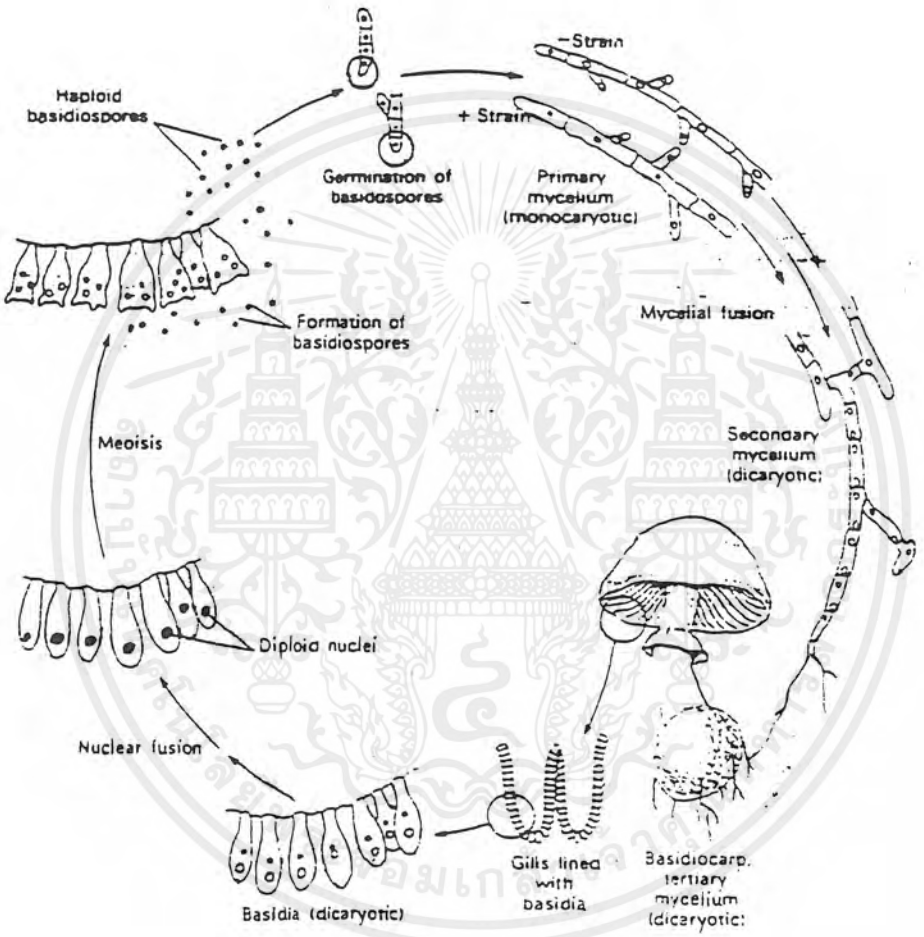
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งมีจีนคู่ผสมพันธุ์แตกต่างกัน ฉะนั้นราในกลุ่มนี้จึงสามารถสืบพันธุ์ทางเพศได้ภายในทัลลัสเดียวกัน



รูปที่ 4 ชีพจักรของเห็ดที่แบ่งโฮโมทัลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 ชีพจักรของเห็ดที่เป็น เฮเทอโรทัลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kniep (K) ได้ศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับ ลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ด ทั้งชนิดที่เป็น self – sterility และ Cross – sterility และมีรายงานไว้ว่า การนำเส้นใยจากสปอร์เดียวมาเพาะเลี้ยง จะไม่สามารถเกิด ดอกเห็ดได้ และจะไม่พบลักษณะของการเกิด clamp connection แต่ถ้านำเส้นใยจากสปอร์เดียวมาผสมรวมกัน จะเกิดการผสมพันธุ์กันได้ จะพบ clamp connection และเจริญเป็นดอกเห็ด นอกจากนี้ ยังมีรายงาน พบว่า 90 % ของเห็ด ใน Class Hymenomycetes มีการสืบพันธุ์แบบ heterothallic และ 61 % ของเห็ดในพวก heterothallic จะเป็นแบบ tetrapolar ซึ่งสร้าง basidiospore ที่มีจีนคู่ผสมพันธุ์ ต่างกัน 4 ชนิด อีก 35 % เป็นพวก bipolar ซึ่งมี basidiospore ที่แตกต่างกันได้ เพียง 2 ชนิด (Papaziane, R.P. 1950) Whitehouse และ Raper ได้แสดงรายงานลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดในกลุ่มนี้ ได้ผลคล้ายคลึงกัน โดยส่วนใหญ่ ลักษณะการผสมพันธุ์จะเป็น tetrapolar 65% และ 35 % เป็น bipolar (whitehouse ,1949 Raper 1966)

bipolar พบมาก ในราพวก Ascomycetes และ ใน Basidiomycetes โดยจะพบในกลุ่มชั้น Phragmobasidiomycetes เป็นส่วนใหญ่ และในพวกสปีชีส์ของชั้น Holobasidiomycetes จะพบ การรวมตัวของเส้นใย ที่เกิดจากจีนคู่ผสมพันธุ์ ต่างกัน มีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส เกิดลักษณะไดคาริออน ในแต่ละเซลล์ของเส้นใย เส้นใยในลักษณะนี้ จะสามารถตรวจพบ clamp connection (Esser,K *et al* 1967).

tetrapolar พบในราชั้น Holobasidiomycetes มีการศึกษาของ Raper และ Antonio ในปี 1954 และ Papazian ในปี 1956 เกี่ยวกับ incompatibility factor ของ เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*)ซึ่งรายงานว่าเห็ดชนิดนี้เป็น tetrapolar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างสปอร์ที่มี จีนคู่ผสมพันธุ์ต่างกัน 4 ชนิดนี้ มาผสมกัน ทีละคู่ ปรากฏว่า เส้นใยที่มีจีน A และ B ต่างกัน จึงจะผสมกันได้ เกิดไดคาริออน และพบ clamp connection แต่ถ้าเป็นการผสมระหว่างเส้นใย ที่มีจีน B เหมือนกัน (common-B) แต่จีน A ต่างกัน บริเวณเส้นใยที่มาพบกัน จะมีการเจริญของเส้นใยน้อย ทำให้เกิดลักษณะเป็นร่อง เรียกลักษณะนี้ว่า barrage (Papazian.1956) แต่ถ้ามีจีน A เหมือนกัน (common-A) และจีน B ต่างกัน เส้นใยเจริญ แผ่ไปตามปกติ แต่มีเส้นใยน้อย เรียกลักษณะนี้ว่า flat (Papazian.1956) ซึ่งลักษณะดังกล่าว ได้นำมาใช้ ในการกำหนดจีโนไทป์ ของจีนคู่ผสมพันธุ์ของเห็ดหลายชนิด เช่น เห็ดนางรม (*Pleurotus ostoeatus*) *P.sajor-cajn* และ *P. sapidus* และเห็ดทั้งสามชนิดนี้ พบว่าลักษณะการผสมพันธุ์ จะเป็น tetrapolar (Eugenio *et al.* 1968, Raxon *et al.*1977 และ Wang, S.S.1972)

การศึกษาในด้าน tetrapolar พบว่า จีน A มีหน้าที่ควบคุมการสร้าง clamp connection และการจับคู่ของนิวเคลียส. ส่วนจีน B ควบคุมการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส (Chang *et al.* 1971) การผสมพันธุ์ในระหว่างเส้นใย homokaryon ของเห็ด โดยมีอัตราส่วนการผสมได้ (compatibility, +) และ ผสมไม่ได้ (incompatibility, -) เป็น 6:3 หรือ 1:5 จะเป็น อัตราส่วนที่บ่งบอกถึงจีนคู่ผสมพันธุ์ เป็นแบบ tetrapolar มากกว่าจะเป็น bipolar ในทางทฤษฎีนั้นอัตราส่วนของการผสมพันธุ์กันได้ ต่อ การผสมพันธุ์กันไม่ได้ จะเป็น 1:3 ในพวก tetrapolar และมีอัตราส่วนเป็น 1:1 ในพวก bipolar (Raper .1960)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยว เพื่อให้ได้ homokaryon isolate

(วสัณ และ รักวิจัย , 2530)

1. ตัดหมวกเห็ดออกเป็นชิ้นให้มีขนาด 1X1 นิ้ว ใช้สก๊อตเทปยึดติดผิวบนหมวกเห็ดกับฝาจานแก้ว จากนั้นนำไปครอบบนบีกเกอร์ที่รองรับ basidiospore จะถูกปล่อยจาก basidium ลงสู่ตัวจาน

2. นำสปอร์ที่ได้ไปผสมกับน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปรับให้มี basidiospore suspension ในความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร โดยนับสปอร์ด้วย haemacytometer (ภาคผนวก ข)

3. inoculate bisidiospore suspension ลงบนอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) ในจานเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยวิธี spread plate นำไป incubate ไว้ให้ basidiospore งอกที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

4. ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยที่เจริญจากแต่ละ basidiospore พร้อมทั้งชิ้นวุ้นอาหาร ภายใต้กล้อง sterioscopic microscope แยกไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ในหลอดทดลอง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งแต่ละหลอดที่แยกได้นี้คือ homokaryon isolate

การศึกษาลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด

1. inoculate homokaryon isolate ทีละคู่บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อเดียวกัน ให้ inoculum ของคู่ผสมอยู่ห่างกันประมาณ 2 เซ็นติเมตร

2. นำไป incubate ไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

3. เขี่ยเส้นใยจากบริเวณที่โคโลนีของราทั้ง 2 isolate เจริญมาพบกัน นำไปตรวจดูการสร้าง clamp connection ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 4
ผลการทดลอง

ในขั้นแรกได้ทำการทดลองโดยใช้ homokaryon isolates 6 isolates คือ isolate ที่ 3 , 16 , 19 , 29 ,43 และ 50 จากที่แยกไว้ทั้งหมด 50 isolates มาผสมแบบพบกันหมดทีละคู่ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การผสมพันธุ์แบบพบกันหมดทีละคู่ระหว่าง 6 homokaryon isolates ของเห็ดตีนแรดบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีระยะเวลา incubate 15 วัน

Homokaryotic isolate	3	16	19	29	43	50
3	-	-	-	-	-	+
16	-	-	+	+	-	+
19	-	+	-	-	-	+
29	-	+	-	-	-	+
43	-	-	-	-	-	-
50	+	+	+	+	-	-

\+ = compatible สร้าง clamp connection

\- = incompatible ไม่สร้าง clamp connection

แบ่งกลุ่มได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ isolate ที่ 3 , 16

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ isolate ที่ 50

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ isolate ที่ 19 , 29

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ isolate ที่ 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35866

ตารางที่ 2 การผสมพันธุ์ระหว่าง homokaryotic isolate ของเห็ดตีนแรดที่จัดอยู่ในกลุ่มต่างกัน 4 isolates กับพวกที่ยังไม่ได้จัดกลุ่มอีก 6 isolates บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30° ซ. โดยมีระยะเวลา incubate 15 วัน

Homodaryotic isolate ที่ต่างกลุ่มกัน	homokaryotic isolate ที่ยังไม่ได้จัดกลุ่ม					
	1	2	4	5	17	22
16	-	-	-	+	+	-
29	-	-	-	-	+	-
43	+	+	-	-	-	-
50	-	+	+	-	-	-

\+ = compatible สร้าง clamp connection

\- = incompatible ไม่สร้าง clamp connection

แบ่งกลุ่มได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ isolate ที่ 1 ,2 ,3 ,16

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ isolate ที่ 50

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ isolate ที่ 19 ,29

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ isolate ที่ 4 ,5 ,17 ,22 ,43

จาก homokaryotic isolate ของเห็ดตีนแรดทั้ง 4 กลุ่ม ได้ทำการคัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาเพียงกลุ่มละ 1 isolate ซึ่งได้แก่ isolate ที่ 29 จากกลุ่มที่ 1 isolate ที่ 50 จากกลุ่มที่ 2 isolate ที่ 19 จากกลุ่มที่ 3 และ isolate ที่ 17 จากกลุ่มที่ 4 มาเพื่อผสมพันธุ์แบบพบกันหมดอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งปรากฏว่า isolate ที่ 2 สามารถผสมได้กับ isolate ที่ 50 และ isolate ที่ 19 สามารถผสมได้กับ isolate 50 ซึ่งอัตราส่วนของการผสมพันธุ์ได้กับการผสมพันธุ์ไม่ได้เท่ากับ 1 ต่อ 3 ที่แสดงแนวโน้มว่ายีนที่ควบคุมคู่ผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดเป็นแบบ tetrapolar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การผสมพันธุ์แบบพบกันหมดระหว่าง 4 homokaryotic isolate ของเห็นตีนแรดซึ่งแต่ละ isolate จัดอยู่ในกลุ่มต่างกันบนอาหารที่อุณหภูมิ 30°ซ . โดยมีระยะเวลา incubate 15 วัน

Homokaryotic isolate	2	50	19	17
2	-	+	-	-
50	+	-	+	-
19	-	+	-	-
17	-	-	-	-

\+ = compatible สร้าง clamp connection

\- = incompatible ไม่สร้าง clamp connection

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดียว เพื่อให้ได้ homokaryon isolate

เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเห็ดตีนแรดอีกวิธีหนึ่งที่นอกเหนือจากการเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อของเห็ดตามที่นิยมทำกันแล้ว ซึ่งวิธีการนี้จะเป็นการเพาะเลี้ยงจากสปอร์ของเห็ดโดยตรง จากการทดลองสามารถแยก homokaryon isolate ออกมาได้ทั้งหมด 50 isolates โดยเส้นใยที่ได้นี้จะมีโครโมโซมเป็น n และมีลักษณะของ genotype ที่เหมือนกันหมด ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ยาก ดังนั้นสามารถที่จะเก็บเส้นใยที่ได้ไว้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์เพื่อเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ต่อไปได้ และวิธีการเพาะเลี้ยงเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยวนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเห็ดชนิดอื่น ๆ ได้

การศึกษาลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด

จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า compatibility ของการผสมพันธุ์ในเห็ดตีนแรดเกิดขึ้นระหว่าง homokaryotic isolate ที่ต่าง isolate กัน แสดงว่าลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรดเป็นแบบ heterothallic และนอกจากนี้อัตราส่วนของการผสมได้ (compatibility , +) ต่อการผสมไม่ได้ (incompatibility, -) มีเพียง 4 : 12 หรือ 1 : 3 ซึ่งแสดงแนวโน้มให้เห็นว่ายีนที่ควบคุมคู่ผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar จากผลเบื้องต้นนี้เราสามารถใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาจีโนไทป์ของยีนคู่ผสมพันธุ์ในแต่ละกลุ่มต่อไปได้ โดยวิธีของ Eger(1972) และจะทำให้เราทราบว่าคู่ผสมใดที่แสดงลักษณะ flat หรือ barrage คู่ผสมที่ทราบลักษณะของ flat และ barrage จะทำให้ทราบถึงจีโนไทป์ของแต่ละกลุ่มที่คัดเลือกใช้ข้างต้น ซึ่งจะใช้เป็นข้อสนับสนุนให้ทราบว่ายีนที่ควบคุมคู่ผสมพันธุ์ของเห็ดชนิดนี้เป็น tetrapolar ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose agar)

ละลายผงอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA 36 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หรือสูตรอาหารวุ้น ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

วิธีทำ

1. นำมันฝรั่งมาปอกเปลือก แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดเท่ากับลูกเต๋า หรือมีขนาด 1x1x1 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร

2. นำมันฝรั่งมาต้มกับน้ำที่สะอาด ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ไฟอ่อน ๆ เพราะถ้าใช้ไฟแรงมันฝรั่งอาจจะเปื่อย ยุ่ย และละลายออกมาทำให้อาหารวุ้นมีลักษณะขุ่นขาว ซึ่งยากต่อการสังเกตการเดินของเส้นใยเห็ด การต้มมันฝรั่งควรใช้เวลานานประมาณ 15 นาที นับจากน้ำเดือด

3. กรองเอากากมันฝรั่งออก และให้ต้มน้ำที่สกัดจากมันฝรั่งต่อไป จากนั้นจึงเติมน้ำตาลลงไป คนจนกระทั่งน้ำตาลละลายหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ส่วนที่เป็นวุ้น นำมาผสมกับน้ำเย็นก่อน เพราะถ้าใส่ลงไปในลักษณะเป็นผงแล้วจะทำให้วุ้นจับกันเป็นก้อนได้ หลังจากที่นำวุ้นผสมกับน้ำเย็นแล้ว จึงเทใส่ลงไปในส่วนผสม พร้อมกับคนอยู่ตลอดเวลา เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารวุ้นไหม้บริเวณก้นหม้อ

5. เมื่ออาหารวุ้นละลายหมดแล้ว นำไปบรรจุลงในขวดใส่อาหาร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

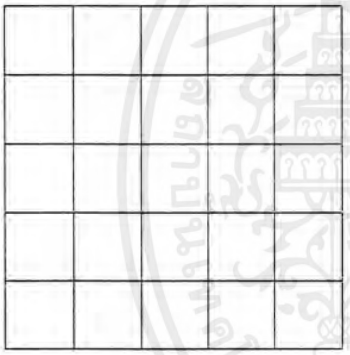
ภาคผนวก ข

การนับสปอร์ด้วย Haemacytometer

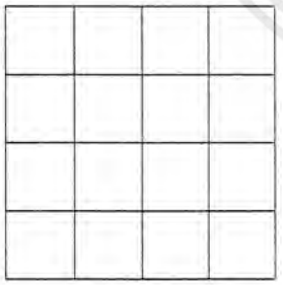
วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายสปอร์ โดยใช้ไมโครปิเปต นำมาหยดลงที่ขอบของ Haemacytometer slide ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

2. นับจำนวนสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แทนค่าลงในสูตร นำไปคำนวณซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นของสปอร์



เมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จะมีความลึก 0.1 มม.
นับ 9 ช่องใหญ่ตามแนวเส้นทแยงมุม
จากทั้งหมด 25 ช่องใหญ่



ใน 1 ช่องใหญ่แบ่งเป็น 16 ช่องเล็ก
จะนับเฉพาะสปอร์ที่อยู่ในช่องเล็กเท่านั้น
สปอร์ที่อยู่ตามแนวเส้นไม่นับ

การนับสปอร์โดยวิธีนี้ ใช้ได้ผลดีกับสารละลายที่มีจำนวนสปอร์เหมาะสม ดังนั้น ถ้าสารละลายมีจำนวนสปอร์สูง ควรทำให้เจือจางลงก่อนจึงทำการนับจำนวน ในกรณีนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณหาจำนวนสปอร์ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของสารละลายเริ่มต้นซึ่งไม่ได้ทำให้เจือจางลง จะต้องนำค่าปัจจัยการเจือจางลง (dilution factor) มาคูณด้วย

วิธีการคำนวณ

ความลึก = 0.1 มม. = 10^{-2} ซม.

พื้นที่ต่อ 1 ช่อง = 1/25x1/100 = $4x10^{-4}$ ตร.ซม.

พื้นที่ทั้งหมด 25 ช่อง = 0.01 = 10^{-2} ตร.ซม.

ปริมาตรต่อ 1 ช่อง = ความลึก x พื้นที่ 1 ช่อง

= 4×10^{-6} ลบ.ซม.

จำนวนสปอร์ที่นับได้ในทั้งหมด 9 ช่อง = $\sum X$

จำนวนเซลล์ต่อ 1 ช่องใหญ่ = $\sum X/9\ (4x10^{-6})$

ปริมาตร $4/10^6$ ลบ.ซม. มีสปอร์ = $\sum X/9$

ปริมาตร 1 ลบ.ซม. มีสปอร์ = $\sum X/9\ (10^6/4)$

จำนวนสปอร์ใน 1 ลบ.ซม. ของสารละลายเริ่มต้น = $\sum X/9\ (10^6/4)$ x dilution factor

เมื่อ X = จำนวนสปอร์ที่นับได้ในแต่ละช่องเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

1. ชมรมเห็ด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,การเพาะเห็ดตีนแรด, เห็ดที่เพาะในถุงพลาสติก, 55-56, สำนัก พิมพ์ฐานเกษตรกรรม, 2532
2. ณรงค์ มีนะนันท์, 2501 ,การศึกษาทดลองเพาะเลี้ยงเห็ดใหญ่ *Tricholoma sp.* กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี คณะกสิกรรมและสัตวบาล , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
3. ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์, เทคโนโลยีการเพาะเห็ด, 1-450, 2532
4. พันธุ์ทวี ภักดีดินแดง พิมพ์กานต์ เพิ่มศิริ และพรรณี พงษ์เขตคาม, การศึกษาและการเพาะเห็ด *Tricholoma sp.* รายงานผลการค้นคว้าวิจัยประจำปี 2516 ,กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตรและกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
5. วสันณ์ เพชรรัตน์, " I การศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการเพาะเห็ดตีนแรด; ∏ ลักษณะการสืบพันธุ์ทางเพศของเห็ดตีนแรด ", วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 116, 2529
6. อนงค์ จันทร์ศรีกุล, เห็ดเมืองไทย, ครั้งที่ 3 , บริษัท สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, 2530
7. Alexopoulos.1962.Introductory Mycology. New York : John Wiley & Sons, Inc.
8. Balmer, G.S. and E.S. Beneke.1961.Studiees on *Calvatia gigantea*.Germination of basidiospore. Mycologia 53:123-136.
9. Change, S.T. and C.K. You. 1971. *Volvariella volvacea* and its life history . Amer.J.Brt.58: 552-561.
10. Charles G. Elliott.1994.Reproduction in Fungi: 38-41.
11. Cochrane, V.W.1958. Physiology of Fungi. New York: John Wiley and Sons.
12. Elliott, C.G. 1994. Reproduction in Fungi: Genetical and physiological aspects. Chapman and Hall, London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. Esser, K. and R. Kuenen. 1967. Genetics of Fungi: Heiddbergg: Springer Verlag, Berlin.

14. Eugemio, C.P. and N.A. Andersson. 1968. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. Mycologia 60: 627-634.

15. Howe, V.R. 1965. Mycorrhizal fungi of white oak. Review of applied mycology 45: 187.

16. Nibikado, Y. and K. Kimura. 1951. Principle of artificial propagation of *Tricholoma conglobalum*. Germination of the spores and cultural character of the fungal mycelium. Review of applied mycology. 30:97.

17. Ohara, H. and M. Hamada.1967. Disappearance of bacteria from the zone of active mycorrhiza in *Tricholoma matsutabe*. Review of applied mycology.46: 274.

18. Papazian, RP. 1950. Physiology of incompatibility factor in *Schizophyllum commune*. Bot. Gaz.112 : 143-163.

19. Raper, J.R. 1960. The control of sex in fungi: Amer J. Bot. 47: 749-808.

20. Raper, J.R. and J.F. San Antonio. 1954. Heterokaryotic mutagenesis in Hymenomycelis 1. Heterokaryosis in *Schizophyllum commune*. Amer. J. Bot. 41: 69-86.

21. Raxon, J.E. and S.C. Song. 1977. Sexuality of an edible mushroom, *Pleurotus say*. Mycologia. 69 : 203-205.

22. Sasek, V. and V. Musilek. 1968. Taste antibiotic compounds from mycorrhizal basidiomycetes. Review of applied mycology 47: 1968.

23. Singer, R. 1963. Key for determination of the Agaricales Vanduz Germany: J. Cramer.

24. Singer, R. 1975. The Agaricales in modern Taxonomy. Vanduz Germany.: J. Cramer.

25. Tominaga, Y. 1965. Studies on the character of Japanese pine mushroom, Armillaria. Effect of culture material and temperature on the growth of

เอกสารนี้ [illegible] ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ [illegible] ชน์ด้านการค้า

mycelia. Review of applied mycology. 45 : 355.

26. Wang, S. S. and N. A. Anderson. 1972. A genetic analysis of sporocarp production of *Pleurotus sapidus*. Mycologia 64 : 521-528.

27. Whitehouse,I.L.K.1949.Mutiple-allemorph heterothalliom in the fungi. New Phytol.48:212:244

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้