สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดนางรมสีทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) และ เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*)

T043976

นาย สุขวสันต์ ต่ายทอง
นางสาว สุจฉวี อรุณรัศมี

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43976
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

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

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาวิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Genetic Systems of *Pleurotus citrinopileatus*

And

P. sajor-caju

Mr. Sukwasan Taithong

Miss Sutchawee Arunrasamhee

A Special Project Submitted in Partial Fullfilment of the

Requirement for the Degree of Bachealor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดนางรมสีทอง *(Pleurotus citrinopileatus)* และเห็ดนางฟ้า *(P. sajor-caju)*

โดย นาย สุขวสันต์ ต่ายทอง รหัส 41053078

นางสาว สุจฉวี อรุณรัศมี รหัส 41053079

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ

(รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์)

_____ ลงนามกรรมการ

(ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์)

_____ ลงนามกรรมการ

(รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์รวมทั้งความรู้ที่มีค่าจนการดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณประธานคณะกรรมการและกรรมการทุกท่านที่ให้ความเอื้อเฟื้อคำแนะนำต่างๆ ขอขอบคุณศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิกที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อเห็ดทั้งสองชนิด ขอบคุณ คุณพยอมและคุณประเสริฐวิทย์ แพงคำที่กรุณาให้เบิกยืมอุปกรณ์การทดลอง ขอบคุณพี่นักศึกษาปริญญาโทห้องเห็ดราทุกๆ คนที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ เรื่อง และสุดท้ายขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์รวมทั้งพี่ๆ ฝ่ายธุรการทุกคนที่ดำเนินการเกี่ยวกับเอกสารต่างๆ จนทำให้โครงงานวิจัยนี้สำเร็จเสร็จสิ้นด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญรูป	ค
สารบัญตาราง	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	19
เอกสารอ้างอิง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดนางรมสีทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) และเห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*)
โดย	นาย สุขวสันต์ ต่ายทอง รหัส 41053078
	นางสาว สุจฉวี อรุณรัศมี รหัส 41053079
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

การศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดนางรมสีทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) และเห็ดนางฟ้า (*P.sajor-caju*) ทำโดยนำเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว (ซึ่งเป็นเส้นใยประเภท monokaryon) ของเห็ดแต่ละชนิดจำนวนชนิดละ 12 สายพันธุ์ มาผสมทีละคู่แบบพบกันหมด โดยเลี้ยงในอาหาร MEA และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา 7-15 วัน เพื่อตรวจดูการเกิด clamp connection ซึ่งถ้าตรวจพบแสดงว่าคู่ผสมสายพันธุ์นั้น ๆ สามารถผสมกันได้ ผลการทดลองพบว่าเส้นใยที่เป็นสายพันธุ์เดียวกันไม่สามารถผสมกันและจากการจัดกลุ่มของเส้นใยของสายพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการผสมพันธุ์พบว่า เห็ดนางรมสีทองสามารถจัดได้ 2 กลุ่มแสดงว่าเห็ดชนิดนี้มีระบบการผสมพันธุ์แบบ bipolar heterothallism ส่วนเห็ดนางฟ้าสามารถจัดได้ 4 กลุ่มแสดงว่าเห็ดนางฟ้ามีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar heterothallism

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Genetic systems of *Pleurotus citrinopileatus* and *P. sajor-caju.*
Names of Students	Mr. Sukwasan Taithong code 41053078
	Miss Suchawee Arunrasamee code 41053079
Special Project Advisor	Associate Professor Dr. Pannee Dhitapichit
Academic Year	2001

Abstract

The studies of genetic systems of *Pleurotus citrinopileatus* and *P. sajor-caju* were carried out by crossing 12 single spore isolations (SSI) of each species of the two mushrooms in all combinations, using MEA in petridishes and incubated in the dark for 7-15 days. Clamp connections were detected as indicators of compatible matings.The results showed that compatibility did not occur in crossing of the same SSI and from the ratios of the numbers of compatible and incompatible crosses of the two species showed that *P. citrinopileatus* was bipolar heterothallism while *P. sajor-caju* was tetrapolar heterothallism.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของเห็ดนางรมสีทอง 3
รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะของเห็ดนางฟ้า 3
รูปที่ 2.3 แสดงขั้นตอนการเกิด
รูปที่ 2.3 แสดงการเกิด clamp connection 7
รูปที่ 2.4 แสดงการเจริญของเส้นใยทั้งสามระยะ 7
รูปที่ 2.5 แสดงระบบการผสมพันธุ์แบบ homothallism 9
รูปที่ 2.6 แสดงระบบการผสมพันธุ์แบบ heterothallism 9
รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะการชนกันของเส้นใยเห็ดที่ทำการทดสอบ 16
รูปที่ 4.2 แสดง clamp connection จากเส้นใยของเห็ดที่ได้ทำการ 16
ผสมสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงการควบคุมการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (Morphogenesis) 10

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงผลการผสมพันธุ์ของสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมสีทองจำนวน 12 สายพันธุ์แบบพบกันหมดทุกคู่สายพันธุ์ 17

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงผลการผสมพันธุ์ของสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวของเห็ดนางฟ้าจำนวน 12 สายพันธุ์แบบพบกันหมดทุกคู่สายพันธุ์ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

เห็ด (mushroom) เป็นเห็ดราประเภทหนึ่งที่อยู่ในดิวิชัน (division) เบสิดิโอมัยโคตา (Basidiomycota) ซึ่งประกอบด้วยเห็ดราประเภทต่างๆ เช่น เห็ด(mushroom) โบลีต (bolete) เห็ดลูกฝุ่น (puffballs) เห็ดดาวดิน (earthstars) เห็ดเขาเหม็น (stinkhorns) polypore (เห็ดที่ไม่เน่าเปื่อยง่าย) เป็นต้น

เห็ดหลายชนิดสามารถรับประทานได้ อีกทั้งยังมีรสชาติดี เช่นเห็ดกระดุมหรือเห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus* หรือ *A. brunescens*) เห็ดโคนหรือเห็ดปลวก (*Termitomyces spp.*) และบางชนิดยังมีสรรพคุณทางยาด้วย เช่น เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*)

เห็ดสกุล *Pleurotus* เป็นเห็ดที่พบได้มากมายหลายชนิด (species) ทั้งในธรรมชาติและเชิงการค้า เป็นเห็ดกลุ่มที่มีคุณค่าทางอาหารและบางชนิดมีสรรพคุณทางยา เช่นบางชนิดพบว่ามีสารต้านมะเร็ง แม้ว่าการเพาะเลี้ยงดูเหมือนจะประสบความสำเร็จแต่เนื่องจากการขาดความรู้ความเข้าใจทางด้านพันธุศาสตร์ของเห็ดรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งความรู้เกี่ยวกับระบบการผสมพันธุ์ยังไม่เป็นที่เข้าใจถ่องแท้ จึงทำให้การปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้าม (hybridization) ด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional method)ในเห็ดรา (รวมทั้งในสกุล *Pleurotus*) จึงไม่ได้ผลเต็มที่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดสองชนิดในสกุล *Pleurotus* ซึ่งได้แก่ เห็ดนางรมสีทองและเห็ดนางฟ้าเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดในสกุล *Pleurotus* ต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดนางรมสีทองและเห็ดนางฟ้า
2. เป็นแนวทางให้เกิดการศึกษาวิจัยด้านระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดและงานวิจัยด้านพันธุศาสตร์ของเห็ดราเพิ่มมากขึ้น
3. สามารถนำความรู้ที่ได้เป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์เห็ด เพื่อประโยชน์ด้านการค้าและเภสัชกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
บทตรวจเอกสาร

2.1 ลักษณะทั่วไปของเห็ดนางรมสีทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) และเห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*)

การจัดหมวดหมู่ (classification) ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* (Alexopoulos และ Mims,1979)

Kingdom.....Fungi

Division.....Basidomycota

Class.....Hymenomycetes

Order.....Agaricales

Family.....Tricholomataceae

Genus.....Pleurotus

Species..... *Pleurotu citrinopileatus*

Pleurotus sajor-caju

2.1.1 เห็ดนางรมสีทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) (รูปที่ 2.1)

เห็ดนางรมสีทองจัดเป็นเห็ดพวกทำลายเนื้อไม้ ดำรงชีพด้วยการเจริญอยู่บนซากของสิ่งมีชีวิต (saprophytic fungi) บางครั้งพบเป็นปรสิตมีการกระจายทั่วในเขตอบอุ่น และจะเกิดดอกเห็ดในช่วงฤดูใบไม้ร่วงหรือฤดูหนาวที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ดอกเห็ดจะติดกับก้านดอกคล้ายหอย ขอบหมวกเห็ดจะห้อยลง หมวกเห็ดจะแบนราบ กลางหมวกเห็ดจะมีลักษณะเว้าเป็นแอ่ง ดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-15 เซนติเมตร ดอกเห็ด (cap) จะมีสีเหลืองทอง

2.1.2 เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) (รูปที่ 2.2)

เห็ดนางฟ้าตามธรรมชาติมักเจริญตามขอนไม้ ตอไม้ผุ และเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศในประเทศไทย ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญมากที่สุดคือ 25 องศาเซลเซียส ดอกเห็ดมีสีขาวถึงเทาและมีเนื้อแน่นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-6 นิ้ว ก้านดอก (stalk) ไม่มีวงแหวนรอบก้านดอก ครีบดอก (gills) มีสีขาวยาว และเส้นใยค่อนข้างละเอียด (ปัญญา, 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1 แสดงรูปของเห็ดนางรมสีทอง

รูปที่ 2.2 แสดงรูปของเห็ดนางฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเส้นใยและการเกิดดอกเห็ด

2.2.1 ความชื้นของบรรยากาศ ในช่วงการบ่มเชื้อหรือการเดินของเส้นใยในถุงเพาะเห็ดนั้นความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศไม่มีความจำเป็นมากนัก แต่อย่างไรก็ตามควรควบคุมความชื้นให้อยู่ในช่วงร้อยละ 60-80 (Zadrazil,1978) ในช่วงที่เกิดดอกเห็ดควรมีการฉีดพ่นละอองน้ำเพื่อเพิ่มความชื้นภายในโรงเรือนวันละ 2-3 ครั้ง และความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศควรอยู่ในระดับร้อยละ 70-80(ปัญญาและกิตติพงษ์, 2537)

2.2.2 อุณหภูมิ เห็ดแต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิที่แตกต่างกัน Szabo(1981) ได้ทดลองเลี้ยงเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* 2 สายพันธุ์ จากฮังการีและจากจีนและอีกหนึ่งสายพันธุ์จากสหรัฐอเมริกา *(Pleurotus ostreatus)* ที่อุณหภูมิ –10 องศาเซลเซียสถึง 50 องศาเซลเซียส พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ เส้นใยเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเห็ดสายพันธุ์ฮังการีและอเมริการจะจำกัดอยู่ในช่วง –5 ถึง 40 องศาเซลเซียส และจากการทดลองของ Gapinski และ Ziombra (1990) โดยเลี้ยงเส้นใยในวัสดุเพาะต่างๆ เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 5 ถึง 35 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เส้นใยเจริญเร็วที่สุดคือ 25 องซาเซลเซียส ในวัสดุเพาะที่มีส่วนผสมของข้าวไรย์ ฟางและซังข้าวโพด

2.2.3 แสง การเกิดดอกเห็ดในสภาพที่มีแสงน้อยดอกจะยาวและหนาแต่ดอกจะเล็ก ถ้าการระบายอากาศไม่ดี (มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ1-2โดยปริมาตร) และปริมาณแสงที่ต่ำจะทำให้การเกิดดอกเห็ดลดลง อากาศเป็นปัจจัยที่สำคัญกว่าแสง แต่อย่างไรก็ตามผลของก๊าซต่างๆ จะไม่มีความสำคัญถ้าไม่มีแสง แสงเป็นปัจจัยที่ช่วยในการเกิดตุ่มดอกเห็ด (primodia) และอย่างน้อยเห็ดต้องได้รับแสงเป็นเวลา 15 นาทีต่อวัน ใน *Pleurotus florida* ช่วงระยะเวลาที่รับแสงและความเข้มแสงจะช่วยเพิ่มจำนวนของตุมดอกเห็ดและใน *Pleurotus ostreatus* ต้องการแสงเพื่อการเกิดดอกเห็ดที่ความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ต่อชั่วโมง (Zadrazil,1978)

2.2.4 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไนไดออกไซด์ในอากาศที่สูงจนถึงร้อยละ 28 โดยปริมาตร จะกระตุ้นการเจริญของเส้นใยของเห็ด *Pleurotus ostreatus* แต่ใน *P. eryngii* จะถูกกระตุ้นการเจริญของเส้นใยที่ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 22 โดยปริมาตร ถ้าความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 37.5 โดยปริมาตร จะทำให้การเจริญของเส้นใยของเห็ดทั้งสามลดลงประมาณร้อยละ 40 เมื่อเทียบกับก๊าซคาร์บอไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.03 ในการทดลองวัดปริมาณการเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ในวัสดุที่ใส่หัวเชื้อร้อยละ 5 และ 10 ของวัสดุที่เพาะ พบว่าหลังจากใส่หัวเชื้อได้ 3 วัน ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอไดออกไซด์จะเพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ20 โดยหัวเชื้อที่ร้อยละ10 จะให้ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะมากกว่าที่ร้อยละ 5 ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์จะเพิ่มสูงุดหลังจากต่อเชื้อได้ 4 และ 6 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นจึงลดลง การใช้หัวเชื้อร้อยละ 1 แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะค่อยไ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากต่อเชื้อได้ 20 วัน โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 30 แต่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 35 หลังจากนั้นความเข้มข้นของคาร์บอนดออกไซด์จะลดลงเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การที่ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในถึงเพาะเห็ดสูงจะช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อจุลิทรีย์อื่นๆ จะทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตหรือบางทีอาจจะตายได้ (Zadrazil, 1978)

2.2.5 ก๊าซออกซิเจน ในการเจริญของเส้นใยเห็ดนั้นต้องการทั้งคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน ถึงแม้ว่าจะต้องการออกซิเจนน้อยก็ตาม (semianaerobe) เส้นใยจะเจริญได้ดีในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนน้อย แต่ถ้าไม่มีออกซิเจนเลยจะทำให้เส้นใยชะงักการเจริญ เห็ดจะต้องการออกซิเจนในปริมาณมากในช่วงที่เกิดดอก (Zadrazil, 1978)

2.3 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเห็ดรา

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเห็ดราประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

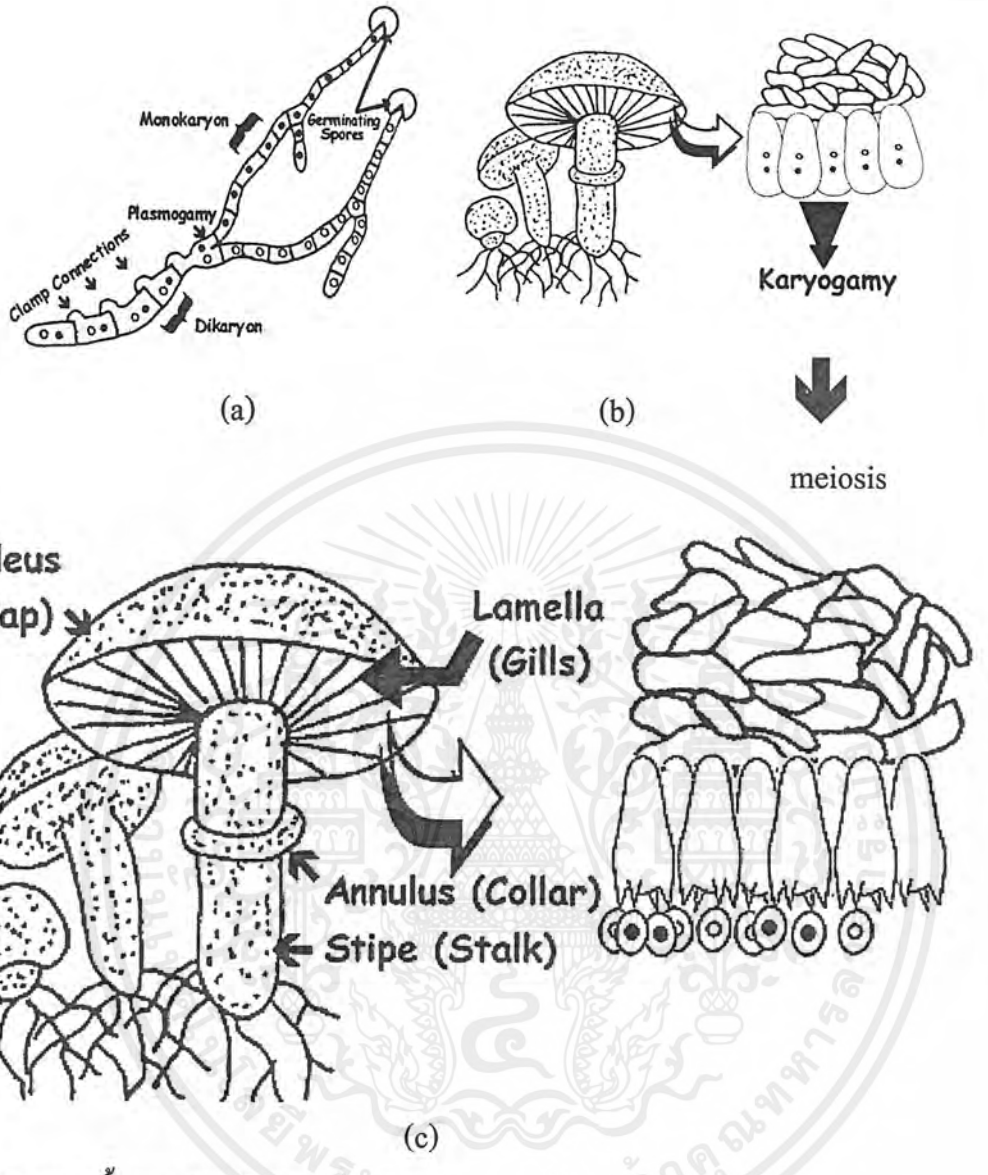
1.พลาสโมแกมมี (plasmogamy) เป็นระยะที่ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของทั้งสองคู่ผสมรวมเข้าด้วยกันภาพที่ 2.3

2.คาริโอแกมมี (karyogamy) เป็นระยะที่นิวเคลียส (nucleus) ของคู่ผสมทั้งสองมารวมตัวกันเป็นหนึ่งนิวเคลียส ทำให้มีจำนวนโครโมโซม (chromosome) เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในเห็ดราชั้นต่ำจะเกิดคาริโอแกมมีทันทีหลังจากเกิดพลาสโมแกมมี แต่ในเห็ดราชั้นสูงหลังจากเกิดพลาสโมแกมมีระยะหนึ่งก่อนเกิดคาริโอแกมมี ส่งผลให้ระยะนี้จะเห็นสองนิวเคลียสแต่มีโครโมโซมเป็นแบบแฮพลอยด์ (haploid) เรียกระยะนี้ว่าไดคาริออน (dikaryon)

3.การแบ่งเซลล์ไมโอซิส (meiosis) เป็นการลดจำนวนโครโมโซมจากดิพลอยด์ (diploid)ให้กลับเป็นโมโนพลอยด์หรือแฮพลอยด์โดยการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสได้เป็นเบสิดิโอสปอร์ 4 สปอร์ดังรูปที่ 2.5

เมื่อสปอร์เกิดการงอก (germination) จะได้เส้นใยชนิดโมโนคาริออน [monokaryon,(n)] แต่ละเซลล์ของเส้นใยจะมีเพียงหนึ่งนิวเคลียส เมื่อเส้นใยโมโนคาริออนสองเส้นที่มีเพศ (mating type) ต่างกันมาพบกันจะผสมกันและมีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสเกิดสภาวะที่เรียกว่าไดคาริออน [dikaryon,(n)] และจะมีการเจริญเติบโตพัฒนาต่อไปหลายขั้นตอนจนเป็นดอกเห็ดดังรายละเอียดต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แสดงขั้นตอนการเกิดดอกเห็ด

(a) แสดงการเกิดพลาสโมแกมมี

(b) แสดงการเกิดคาริแกมมีตามด้วยการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซีส

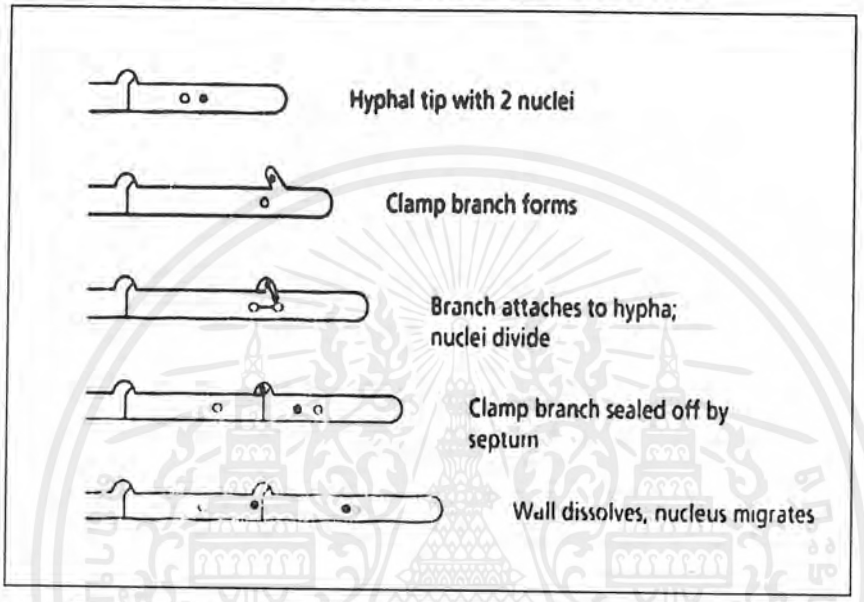
(c) แสดงการเกิดดอกเห็ด

ก. เส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) คือเส้นใยที่เกิดจากการงอกของสปอร์เดี่ยว (single spore) เส้นใยที่ได้เรียกโมโนคาริออน มีโครโมโซมเป็นแบบแฮพลอยด์ (n)

ข. เส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) เกิดจากเส้นใยปฐมภูมิ 2 เส้นที่มีเพศ (mating type) ต่างกันมาสัมผัสกันและเกิดรูปแบบการผสมพันธุ์ตามขั้นตอนดังที่ได้กล่าวข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในระยะนี้เส้นใยที่เป็นไดคาริออนจะสร้าง clamp connection ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายตะขอ โดยนิวเคลียสอันหนึ่งจะเคลื่อนที่เข้าไปในส่วนที่เป็นตะขอ จากนั้นจะแบ่งไมโตซิส (mitosis) ทั้งในนิวเคลียสที่เคลียสเคลื่อนที่และไม่ได้เคลื่อนที่ ได้เป็นอย่างละ 2 นิวเคลียส นิวเคลียสที่ได้จากการแบ่งทั้งสองจะเคลื่อนไปอยู่ปลายเซลล์ พร้อมกันนั้นจะเริ่มมีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นบริเวณส่วนตะขอและส่วนปลายของตะขอจะละลายผนังเซลล์ที่มันสัมผัส ทำให้นิวเคลียสทั้งสองไปรวมกันดังภาพที่2.3 เส้นใยที่เกิด clamp connection จะสามารถพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้



รูปที่2.4 แสดงการเกิดclamp connection (Landecker,1972)

ค. เส้นใยตติยภูมิ (tertiary mycelium) เกิดจากเส้นใยชนิดทุติยภูมิเจริญและอัดตัวแน่นและพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด (fruiting body) มีรูปร่างคล้ายร่มมีการสร้างแบสิเดียม (basidium) ซึ่งเป็นไดคาริออนเมื่อมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสจะได้แบสิดิโอสปอร์ (basidospore) 4 อันที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นโมโนพลอยด์ [monoploid,(n)]

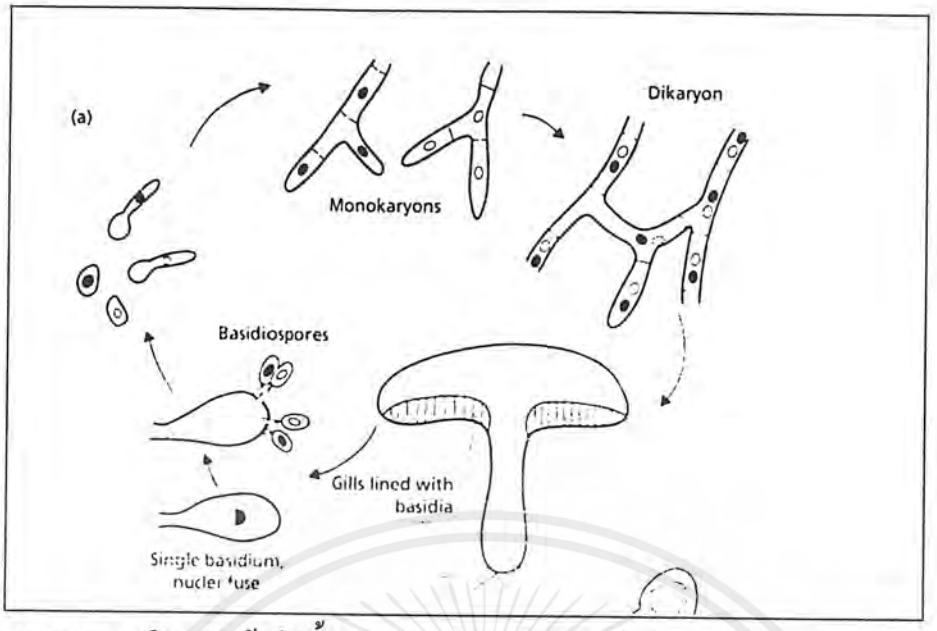
ได้มีการจัดแบ่งเห็ดราตามลักษณะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ออกเป็น 3 พวกดังนี้ (Alexopoulos และ Mims,1979)

1. hermaphroditic หมายถึงเห็ดราที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียบนธาลัส (thallus) เดียวกัน

2. dioecious หมายถึงเห็ดราที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์แยกเพศผู้หรือเพศเมียออกจากกันคือ อยู่กันคนละธาลัส

3. sexually undifferentiated หมายถึงเห็ดราที่ไม่สามารถแยกเพศได้อย่างชัดเจน ไม่แสดงออกว่าธาลัสนั้นๆ เป็นเพศผู้หรือเพศเมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 แสดงการเจริญของเส้นใยทั้งสามระยะ (Landecker,1972)

เมื่อพิจารณาถึงลักษณะความสามารถในการสืบพันธุ์แล้ว อาจแบ่งเห็ดราตามระบบการผสมพันธุ์ (genetic system)ได้เป็น 3 พวกใหญ่ๆ ดังต่อไปนี้

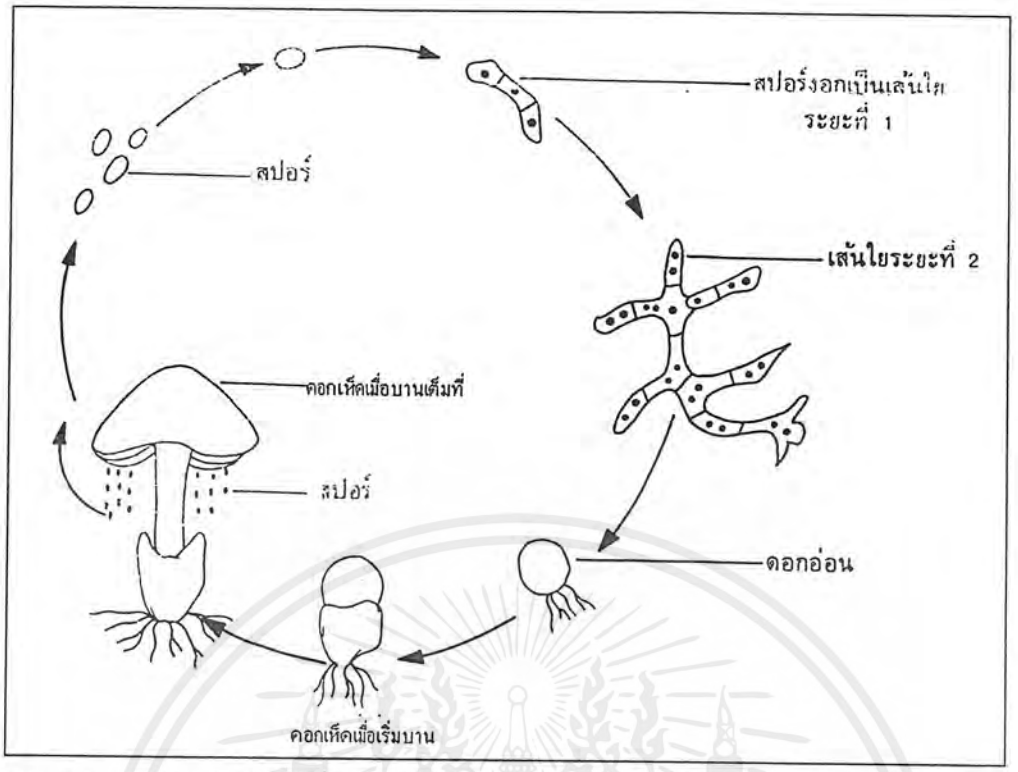
1. homothallic fungi หรือ homothallism หมายถึงเห็ดราพวกที่สามารถผสมพันธุ์กันเองภายในธาลัสเดียวกันได้ (self-fertile) ดังภาพที่ 2.4

2. heterothallic fungi หรือ heterothallism หมายถึงเห็ดราพวกที่ไม่สามารถผสมพันธุ์ในตัวเองได้ (self-sterile) การสืบพันธุ์แบบใช้เพศในเห็ดราพวกนี้จะเกิดได้ก็ต่อเมื่อมีเพศต่างกันจากธาลัสที่ต่างกัน(ภาพที่ 2.5) การผสมพันธุ์แบบนี้แบ่งย่อยออกเป็น 2 ประเภทคือ

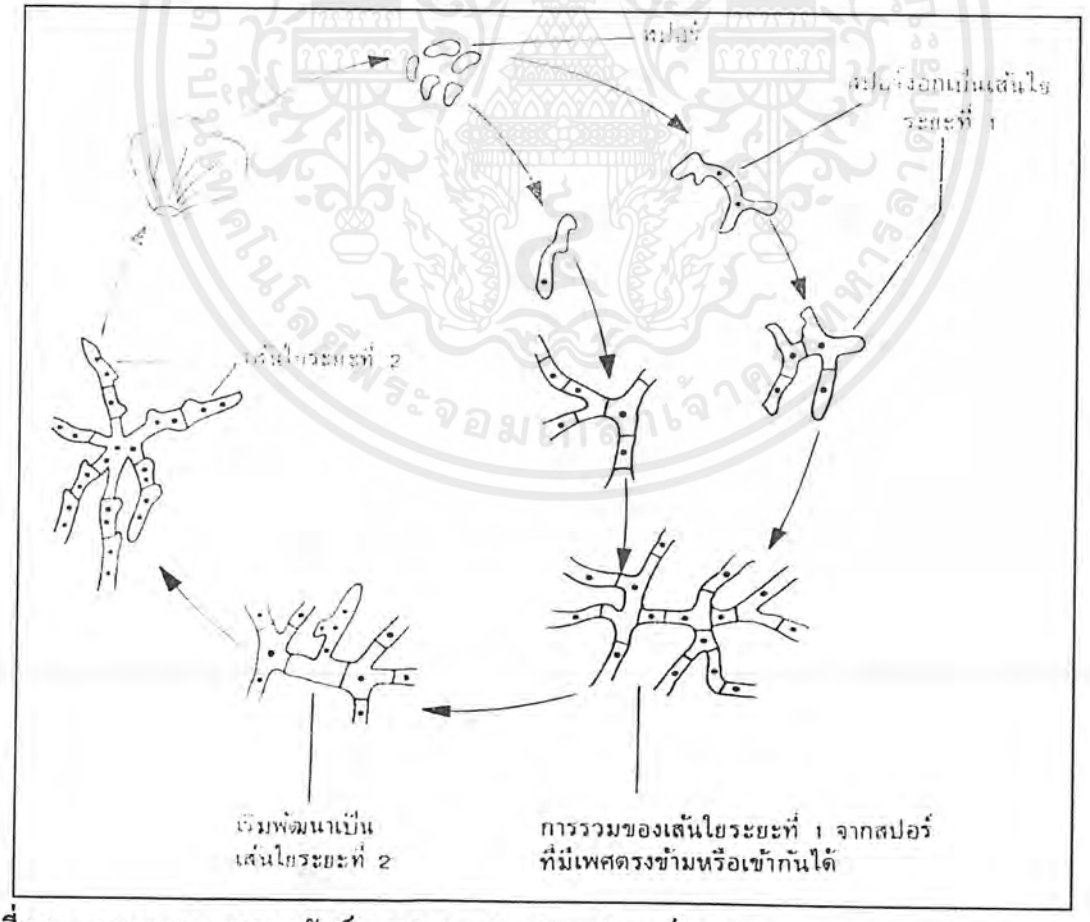
2.1 bipolar heterothallism หรือ unifactorial heterothallism เป็นระบบการสืบพันธุ์ที่มียีน (gene) หรือปัจจัย (factor) ควบคุมอยู่ 1 ยีน (1 factor) สปอร์ที่สร้างขึ้นจะมีเพศ (mating type) สองชนิด คือ A_1 และ A_2 ตัวอย่างเห็ดในกลุ่มนี้คือ *Agaricus bisporus* , *Coprinus comatus, Polyporus betulinus* และสายพันธุ์ที่มีเพศต่างกันเท่านั้นที่จะผสมพันธุ์กันได้(ดูตารางในข้อ 2.3.1)

2.2 tetrapolar heterothallism หรือ bifactorial heterothallism เป็นระบบการสืบพันธุ์ที่มียีนควบคุมอยู่ 2 ยีน คือ A และ B โดยยีนทั้งสองอยู่คนละส่วนของโครโมโซม แต่ทำงานร่วมกัน ยีน A ควบคุมการจับคู่หรือการแลกเปลี่ยนของนิวเคลียส (nuclear paring หรือ nuclear exchange)และการสร้างยีน B ควบคุมการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส (nuclear migration) และการเชื่อมข้อยึด (clamp fusion) ระหว่างเซลล์ดัง ตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 แสดงระบบการผสมพันธุ์แบบ homothallism (อนงค์,2523)



รูปที่ 2.7 แสดงระบบการผสมพันธุ์แบบ heterothallism (อนงค์,2523)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ตารางแสดงการควบคุมการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (Morphogenesis)

จีโนไทป์ (genotype)	การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา					ฟีโนไทป์ (phenotype)
	การรวมตัวของเส้นใยและการแลกเปลี่ยนนิวเคลียส	การเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส	การแบ่งตัวของนิวเคลียสทั้งสอง	การเริ่มเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์	การเชื่อมกันของข้อยึดระหว่างเซลล์	
A≠B≠	+	+	+	+	+	ไดคาริออน
A=B≠	+	+	-	-	-	มียีน A เหมือนกัน
A≠B=	+	-	+	+	-	มียีน B เหมือนกัน
A=B=	+	-	-	-	-	โมโนคาริออน

หมายเหตุ: + แทนการเกิดผลที่มีการเปลี่ยนแปลง

\- แทนผลที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ที่มา: แปลมาจาก Elliot,1994

การที่คู่ยีนหรืออัลลีล (alleles) ของยีนหรือแฟคเตอร์ A ต่างกันแต่ของ B เหมือนกัน (A≠ B=)จะเกิดการผสมติดเพียงครึ่งเดียว กล่าวคือไม่มีการย้ายนิวเคลียส มีผลทำให้ได้เส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryon) ที่ไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ โดยเซลล์ส่วนปลายของเส้นใยจะมีนิวเคลียสคู่ แต่เซลล์ที่อยู่ถัดลงมาจะมีนิวเคลียสเดี่ยวและมีข้อยึดหลอก (false clamp) ระหว่างเซลล์ คือเป็นข้อยึดระหว่างเซลล์ที่ไม่สามารถเชื่อมเซลล์ถัดจากส่วนปลายได้ ดังนั้นจึงมีการขังนิวเคลียสทุกครั้งที่มีการแบ่งตัว (ดัดแปลงจากศิริพร,2544)

ถ้าคู่ยีนของยีน A เหมือนกันแต่ของยีน B ต่างกัน(A=B≠)จะเกิดการผสมกันเพียงครึ่งเดียวเช่นกันกล่าวคือ มีการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสและมีการสร้างเส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกันที่ไม่สามารถเกิดดอกเห็ดได้ แต่จะเกิดเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสหลายอัน โดยมีผนังกั้นระหว่างเซลล์และไม่มีข้อยึดระหว่างเซลล์การทีมีการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสอย่างไม่จำกัดจึงทำให้นิวเคลียสกระจายไปทั่วเส้นใยที่จับคู่กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าคู่ยีนของยีน A และยีน B ต่างกัน (A≠B≠) จะเกิดการผสมติดซึ่งจะมีการเกิดเส้นใยนิวเคลียสคู่ ที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์สมบูรณ์ (Raper,1978) ตัวอย่างเห็ดนางรม ซึ่งมีระบบการผสมพันธุ์แบบ tetrapolar heterothallism จะผสมกันได้ต่อเมื่อคู่ผสมมีคู่ยีนของยีน A และ B ต่างกันด้วย (ดูตารางในข้อ 2.3.2)

ลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดหลายชนิดในกลุ่ม Hymenomycetes, Ustilaginales และ Holobasidiomycetes เป็นแบบ tetrapolar heterothallism เช่น *Coprinus logopus* (เห็ดน้ำหมึกชนิดหนึ่ง) และ *Schizophillum commune* (เห็ดแครงหรือเห็ดตีนตุ๊กแก) โดยมีเบสิดิโอสปอร์ 4 แบบคือ A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 และ A_2B_2 เมื่อนำเส้นใยที่เกิดจากสปอร์ ทั้ง 4 ชนิดมาผสมกันทีละคู่ ปรากฏว่าเส้นใยที่มียีน A และยีน B ต่างกัน(A≠B≠) เท่านั้นที่สามารถผสมกันได้เกิดเป็นไดคาริออนและ แต่ถ้านำเส้นใยที่มียีนเหมือนกันทั้งสองยีน (A=B=) มาผสมกันเส้นใยบริเวณที่เส้นใยมาพบกันจะเจริญทับกัน (overlap) แต่ถ้าเป็นการผสมระหว่างเส้นใยที่มียีน B เหมือนกันแต่ยีน A ต่างกัน (A≠B=) บริเวณที่พบกันมีจะมีการเจริญของเส้นใยน้อยทำให้เกิดเป็นร่องซึ่ง Papazian(1950) เรียกลักษณะนี้ว่า barrage ซึ่งเส้น ใยประเภทนี้จะพบ false clamp แต่ถ้าในกรณีที่เป็นการผสมกันระหว่างเส้นใยที่มียีน A เหมือนกันแต่ยีน B ต่างกัน(A=B≠) บริเวณที่มีการพบกันของเส้นใยจะเป็นปกติคือไม่เกิดลักษณะที่เป็นร่องแต่มี aerial hypha น้อย เมื่อส่องดูด้านล่างของโคโลนีพบว่ามีลักษณะเป็นแถบหนาตรงบริเวณที่เส้นใยมาพบกัน Papazian(1950) เรียกลักษณะนี้ว่า flat ลักษณะดังกล่าวได้มีคนนำไปวิจัยเพื่อหาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดหลายชนิด เช่น เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus)* เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju)* และ *P. sapidus* และพบว่าเห็ดทั้งสามชนิดนี้มีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar (Eugleno *et al,* 1968 , Raxon *et al,* 1977 และ Wang, S.S ,1972)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การคำนวณหาอัตราส่วนของการผสมพันธุ์

2.3.1 กรณีที่เป็นระบบ bipolar (unifactorial) heterothallism

คู่ยีน (allele)	A_1	A_2
A_1	-	+
A_2	+	-

เมื่อ + หมายถึงผสมกันได้หรือเข้ากันทางเพศได้

- หมายถึงไม่ผสมกันหรือเข้ากันไม่ได้ทางเพศ

อัตราส่วนของคู่ผสมที่เข้ากันได้ต่อคู่ผสมทั้งหมดเท่ากับ 2:4 หรือเท่ากับ 1:2 ดังนั้นถ้าผลของอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองเท่ากับ 1:2 แสดงว่าเห็ดชนิดนั้นๆ มีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ bipolar heterothallism

2.3.2 กรณีที่เป็นระบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism

Mating type	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
A_1B_1	-	-	-	+
A_1B_2	-	-	+	-
A_2B_1	-	+	-	-
A_2B_2	+	-	-	-

เมื่อ + หมายถึงผสมกันได้หรือเข้ากันทางเพศได้

- หมายถึงไม่ผสมกันหรือเข้ากันไม่ได้ทางเพศ

อัตราส่วนของคู่ผสมที่เข้ากันได้ต่อคู่ผสมทั้งหมดเท่ากับ 4:16 หรือเท่ากับ 1:4 ดังนั้นถ้าผลของอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองเท่ากับ 1:4 แสดงว่าเป็นเห็ดชนิดนั้นๆ มีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar heterothallism

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. เพื่อศึกษาถึงระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดนางรมสีทองและเห็ดนางฟ้า
2. เพื่อศึกษาว่าเห็ดในแต่ละชนิดของสกุล *Pleurotus* จำเป็นต้องมีระบบการผสมพันธุ์เหมือนกันหรือไม่

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Anderson และคณะ(1973) ศึกษาลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ด *Pleurotus ortreatus-sapidus* โดยนำเส้นใยที่มาจากสปอร์เดี่ยวจำนวน 16 สายพันธุ์ มาผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดในอาหาร MEA ตรวจดูการเกิด clamp connection ตรงบริเวณที่เส้นใยเจริญมาชนกัน จากการทดลองพบว่า *P. ortreatus-sapidus* มีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar hetero-thallism

Raper (1974) และ Raper (1976) ศึกษาลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ด *Agaricus bisporus* โดยนำเส้นใยที่มาจากสปอร์เดี่ยว (monokaryon) จำนวน 10 สายพันธุ์มาผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมด ในจานอาหาร MEA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันแล้วตรวจดูการเกิด clamp connection จากการทดลองพบว่า *A. bisporus* มีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ bipolar heterothallism

Peterson และ Ridley (1996) ทำการศึกษาวิจัยเห็ดสกุล Pleurotus ในประเทศนิวซีแลนด์พบว่ามีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar heterothallism

วสันณ์ (2522) ศึกษาลักษณะของเห็ดตีนแรด (*Tricholoma crassum)* โดยนำเส้นใยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยวจำนวน 12 สายพันธุ์ มาผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดในจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน ตรวจดูการเกิด clamp connection จากการทดลองสามารถจัดกลุ่มเส้นใยออกเป็น 4 กลุ่ม อัตราส่วนของคู่ผสมกันได้ต่อคู่ผสมทั้งหมดเป็น 1:3 จึงสรุปได้ว่าเห็ดตีนแรดมีระบบการผสมพันธุ์แบบ tertrapolar heterothallism

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุฑามาศ และ นริศรา (2542) ศึกษาลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด (*T. crassum)* โดยนำเส้นใยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยวจำนวน 12 สายพันธุ์ มาผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดในจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน ตรวจดูการเกิด clamp connection พบว่าสามารถจัดกลุ่มเส้นใยได้เป็น 4 กลุ่ม อัตราส่วนของคู่ที่ผสมกันได้ต่อคู่ผสมทั้งหมดเป็น 1:3 จึงสรุปได้ว่าเห็ดตีนแรดมีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar heterithallim

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 การแยกสปอร์เดี่ยว(single spore isolation)

นำสปอร์พิมพ์ (spore-print) จากเห็ดทั้งสองชนิด ที่อยู่บนกระดาษกรองขนาดประมาณ 0.5x0.5 (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) มาทำ spore suspension แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^{-1},10^{-2},10^{-3} ,10^{-4} และ 10^{-5}เท่า และนำมาทำเทคนิค spread plate ลงบนอาหาร PDA หรือ MEA ใน จานเลี้ยงเชื้อ (petridish) ที่ความเข้มข้นละ 5 จาน นำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 วัน ถ้าพบว่ามีสปอร์เดี่ยวงอก germ tube ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1 เซนติเมตร (หรือเมื่อเห็นว่าเริ่มงอกก็ใช้ได้เลย) จากนั้นนำสปอร์ที่งอกออกมาเลี้ยงใน PDA slant หรือ MEA slant ทำเช่นนี้ประมาณ 30 สปอร์(แต่ละสปอร์ที่แยกออกมาจะเจริญต่อไปได้เป็นสายพันธุ์สปอร์เดี่ยว) ทำการติดฉลาก (label) แต่ละสายพันธุ์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญเต็ม slant แล้วจึงทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ลงในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อนำมาขยายปริมาณเชื้อและทำการตรวจสอบแต่ละสายพันธุ์ว่ามี clamp connection หรือไม่ ถ้ามี clamp connection หมายความว่าสายพันธุ์ดังกล่าวไม่ใช่โมโนคาริออน ให้ทิ้งไปและทำการคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ไม่มี clamp connection เพื่อเก็บไว้ใช้การศึกษาระบบการผสมพันธุ์ต่อไป สายพันธุ์ที่เส้นใยไม่มี clamp connection เป็นสายพันธุ์ประเภท monokaryotic (n)

ขั้นที่ 2 การผสมพันธุ์เห็ดระหว่างสายพันธุ์ภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific hybridization)

นำแต่ละสายพันธุ์ที่แยกออกมาจากสปอร์เดี่ยวจากขั้นตอนที่ 1 มาผสมกันแบบวิธีดั้งเดิม โดยการสุ่มเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบประมาณ 12 สายพันธุ์ ทำการตัดเส้นใยของตัวอย่างคู่สายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบด้วย cock borrer แล้วนำมาวางห่างกันประมาณ 1.5 ซม. ในจานอาหาร PDA หรือ MEA บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 วัน เมื่อเส้นใยทั้งสองสายพันธุ์เจริญชนกันแล้วจึงนำเส้นใยที่บริเวณที่สัมผัสกัน(contact zone) มาตรวจหา clamp connection ภายใต้กล้องจุลทรรศ์ ถ้ามี clamp connection เกิดขึ้นแสดงว่าทั้งสองสายพันธุ์นั้นมีการผสมกันหมายถึง คู่ผสม นั้นๆ มีเพศต่างกันจึงสามารถเข้าคู่กันได้(มี sexual compatible) แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าไม่มี clamp connection แสดงว่าทั้งสองสายพันธุ์นั้นมีเพศ เหมือนกันจึงไม่สามารถเข้าคู่กันได้ (sexual incompatible) ทำการผสมพันธุ์ทุกคู่สายพันธุ์จนครบ 12 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.1-4.2)

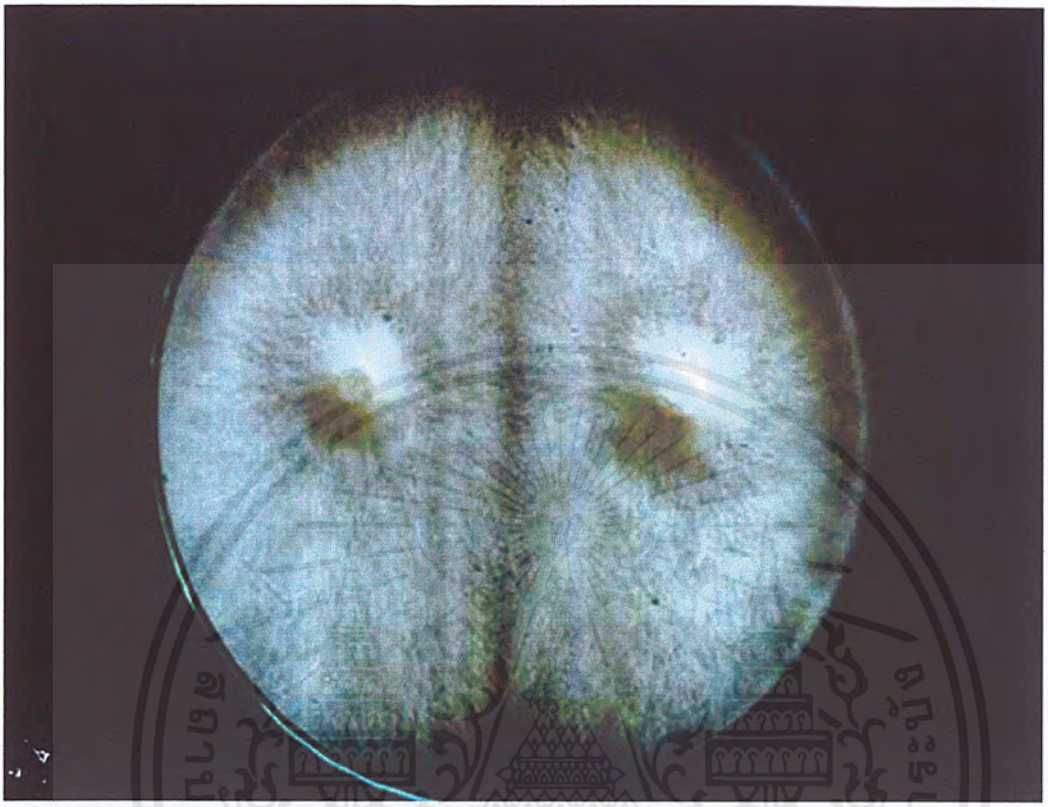
ขั้นตอนที่ 3 แปลผลการทดลองจากการผสมพันธุ์ที่ได้ ของทุกคู่สายพันธุ์และสรุปเป็นประเภทของระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดทั้ง 2 ชนิด ตามทฤษฎีของระบบการผสมพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

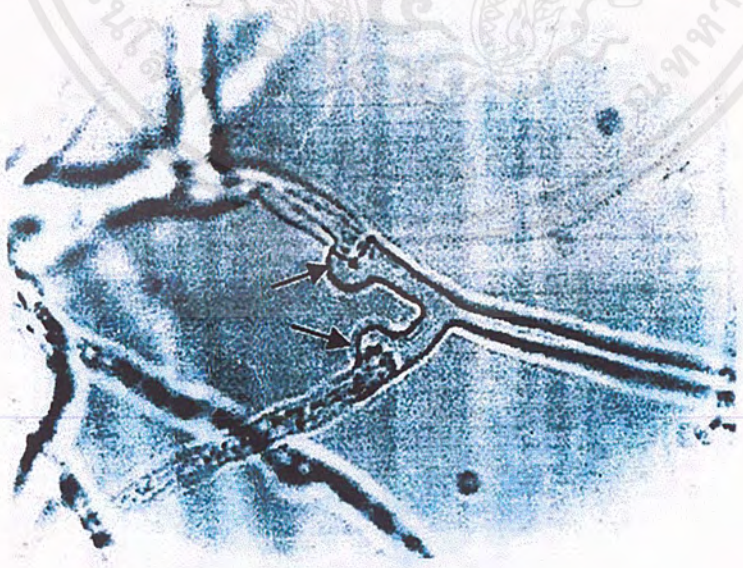
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 4

ผลการทดลอง



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะการชนกันของเส้นใยเห็ดที่ทำการทดสอบ



รูปที่ 4.2 แสดง clamp connection (ที่ลูกศรชี้) จากเส้นใยของเห็ดที่ได้ทำการผสม 2 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43976

ผลการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ ของเห็ดนางรมสีทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงผลการผสมพันธุ์ของสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมสีทองจำนวน 12 สายพันธุ์แบบพบกันหมดทุกคู่สายพันธุ์

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

เมื่อ + หมายถึงพบ clamp connection ผสมกันได้

- หมายถึงไม่พบ clamp connectionผสมกันไม่ได้

อัตราส่วนของคู่ที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อคู่ผสมทั้งหมดเท่ากับ 32:78 ดังนั้นจึงได้อัตราส่วนเท่ากับ 1:2.4 (เท่ากับ 1:2) และสามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ 1,2,4,8,10,11,12

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ 3,5,6,7,9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงผลการผสมพันธุ์ของสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวของเห็ดนางฟ้าจำนวน 12 สาย พันธุ์แบบพบกันหมดทุกคู่สายพันธุ์

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

เมื่อ + หมายถึงพบ clamp connection ผสมกันได้

- หมายถึงไม่พบ clamp connectionผสมกันไม่ได้

อัตราส่วนของคู่ที่ผสมต่อคู่ผสมทั้งหมดเท่ากับ23:78 หรือเท่ากับ 1:3.4 ซึ่งใกล้เคียงกับ 1:4 แสดงว่าเห็ดนางฟ้ามีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar heterothallism

จากการทดลองไม่สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่มที่มี mating type เป็น A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 และ A_2B_2 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองการศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดสกุล *Pleurotus* โดยการผสมพันธุ์สายพันธุ์ที่ได้จากสปอร์เดี่ยวจำนวน 12 สายพันธุ์ทีละ 1 คู่ผสมแบบพบกันหมดทุกคู่พบว่าเห็ดนางรมสีทองมีอัตราส่วนของคู่ที่ผสมกันได้ต่อคู่ผสมทั้งหมดเท่ากับ 1:2.4 แสดงว่าเห็ดนางรมสีทองมีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ bipolar hetreothallism และสำหรับเห็ดนางฟ้ามีอัตราส่วนของคู่ที่ผสมกันได้ต่อคู่ผสมทั้งหมดเท่ากับ 1:3.4 นั่นคือมีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar heterothallism เห็ดทั้งสองต่างก็อยู่ในสกุล *Pleurotus* ซึ่งจากงานวิจัยต่างประเทศที่มีรายงานว่าเห็ดหลายชนิดในสกุลนี้มีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar heterothallism ดังนั้นผลการทดลองของเห็ดนางรมสีทองจึงไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในรายงานฉบับนี้

ผลการวิจัยโดยเฉพาะของเห็ดนางฟ้าผิดพลาดมากอาจเป็นเพราะความไม่ชำนาญในการการตรวจสอบ clamp connection โดยขาดความชำนาญในการแยก true clamp ออกจาก false clamp ทำให้การบันทึกผลผิดพลาด ส่งผลให้อัตราส่วนที่ได้มีความคลาดเคลื่อน นอกจากนี้การทดลองครั้งนี้ยังไม่ได้บันทึกลักษณะความเป็น flat หรือ barrage (ในกรณีที่ไม่พบ clamp connection) ในแต่ละคู่ผสมทำให้ไม่สามารถแยกชนิดของ mating type ของเห็ดนางฟ้าได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จุฑามาศ คุณสุข และ นริศรา เลิศถวิลภักดี. 2542. ลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด. โครงงานพิเศษปริญญาตรีภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พิไลพรรณ พงษ์พูล. 2525. ราวิทยาเบื้องต้น. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 217 น.

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์. 2538. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. โรงพิมพ์ลินคอร์น. กรุงเทพฯ. 421 น.

ศิริพร เดชะอูป. 2544. การปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมโดยการผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยนิวเคลียสคู่กับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2523. เห็ดเมืองไทย. สำนักพิมพ์บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒณาพานิช จำกัด. 122 และ 123 น.

Alexopoulos, C. I. And C. W. Mims. 1979. Introductory Mycology., John Wiley and Son.,New York. 623 p.

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

Anderson, N. A., S. S. Wang. And J. W. Schwandt. 1973. The *Pleurotus astreatus-sapidus* species complex.Mycolo.65:28-35.

Deacon, J. W. 1997. Modern Mycobiology 3rd edition , p 92., Backwell Science, Ltd.

Elliot, C. G. 1994. Reproduction in Fungi, p 51., Chapman and Hall., New York.

Landecker-M. 1972. Fundamental of the Fungi, p 27., Pentice-Hall,Inc., New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Papazian, R. P. 1950. Physiology of incompatibility factors in *Schizophyllum commune*. Bot. Gaz. 112:21-39.

Petersen, R. H. and G. S. Ridley. 1996.A New Zealand *Pleurotus* with multiple-species sexual compatibility. Mycolo. 88:198-207.

Raper, C. A. 1976. Sexuality and Life-cycle of Edible, Wild *Agaricus bisporus*. J. Gen Microb. 95:54-66.

Raper, J. R. 1978. Sexuality and breeding, p 83-117. In S. T. Chang and W. A. Hays(eds). The Biology and Cultivation of Edible Mushroom. Academic Press., New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้