

การตรวจสอบลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับ  
เห็ดนางรมหัวโดยเทคนิคดีเอ็นเอ

CHARACTERIZATION OF FUSANTS BETWEEN *Pleurotus ostreatus* AND  
*P. tuberregium* BY DNA TECHNIQUES



กพ.  
พ.ศ. 2527  
2548

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 60583  
วัน,เดือน,ปี. - 3 ก.ค. 2549

1159021x  
b.....  
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
บัณฑิตวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2548

ISBN 974 - 15 - 1864 - 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**CHARACTERIZATION OF FUSANTS BETWEEN *Pleurotus ostreatus* AND  
*P. tuberregium* BY DNA TECHNIQUES**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**2005**

**ISBN 974 – 15 – 1864 - 1**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**COPYRIGHT 2005**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบลูกผสมที่เกิดจากการรวม โพรโตพลาสต์ระหว่าง เห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว โดยเทคนิคดีเอ็นเอ
นักศึกษา	นางสาว พรเพ็ญ ลูกสอน
รหัสประจำตัว	45064569
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2548
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. พรรณี จูตาทิชาติ
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร. สมศักดิ์ อภิสัทธาวิช

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว โดยใช้สายพันธุ์โมโนคาริออนที่ทราบ mating type พบว่าสามารถทำการรวมโพรโตพลาสต์ได้เฉพาะคู่เห็ดนางรมที่มี mating type เป็น  $A_1B_1$  กับเห็ดนางรมหัวที่มี mating type เป็น  $A_2B_2$  สำหรับการตรวจสอบลูกผสมของเห็ดลูกผสมที่ได้ทำโดยใช้ฐานวิทยาและเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล 3 วิธี ซึ่งได้แก่ 1) วิธี polymorphism chain reaction / restriction fragment length polymorphisms (PCR/RFLP) ของดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ intergenic spacer (IGS) ของ rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1 กับ ITS4 และ O-1 กับ LR12R 2) วิธี PCR ของ rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 กับ O-1 และ 3) วิธี sequence-related amplified polymorphism (SRAP) โดยใช้ไพรเมอร์ 6 คู่ ผลการรวมโพรโตพลาสต์ได้ฟิวชันที่ 9 สายพันธุ์ คือ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 ฟิวชันที่ได้มีฐานวิทย์คล้ายคลึงกับทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว ส่วนผลการตรวจสอบลูกผสมโดยวิธีชีววิทยาโมเลกุล วิธีที่ 1 แสดงให้เห็นว่าฟิวชันทั้งหมดมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับเห็ดนางรม และแตกต่างจากเห็ดนางรมหัว ส่วนผลจากวิธีที่ 2 พบว่าสามารถตรวจสอบความเป็นพ่อ-แม่-ลูกได้ โดยสามารถตรวจพบได้ที่ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอประมาณ 400 และ 1,600 คู่เบส และผลจากวิธีที่ 3 พบว่าคู่ไพรเมอร์ A5B4 สามารถตรวจสอบเห็ดนางรม เห็ดนางรมหัวและฟิวชันที่ได้ทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยพบว่าต่างเป็นลูกผสมที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวทั้งสิ้น แต่จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคดีเอ็นเอทั้ง 3 วิธี พบว่าฟิวชันทั้งหมดต่างมีดีเอ็นเอของเห็ดนางรมมากกว่าเห็ดนางรมหัว

<b>Thesis Title</b>	Characterization of Fusants between <i>Pleurotus ostreatus</i> and <i>P. tuberregium</i> by DNA techniques
<b>Student</b>	Miss Pornpen Luksom
<b>Student ID</b>	45064569
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Programme</b>	Biotechnology
<b>Year</b>	2005
<b>Thesis Advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Pannee Dhitaphichit
<b>Thesis Co-advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Somsak Apisitwanich

### ABSTRACT

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

The results were that, 9 fusants (OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 and OT9) were obtained and all of them had combined characteristics of both *P. ostreatus* and *P. tuberregium*.

For molecular studies, it was found that by the first method, all the 9 fusants showed the same bands as only those of *P. ostreatus* . However, the last 2 methods could proved the hybrid evidences of the 9 fusants. From all the 3 methods used the fusants were proved to be more similar to *P. ostreatus* than to *P. tuberregium*.

## กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี เนื่องจากได้รับความกรุณา การแนะนำ และคำปรึกษาในทุกด้าน อีกทั้งยังให้การอบรมดูแลช่วยเหลือด้วยการทิ้งปวง จนกระทั่งการจัดทำวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์จากอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี จูตาทิชาติ คำแนะนำต่างๆ และประสบการณ์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จักมีประโยชน์ต่อผู้วิจัยในภายหน้า ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับจากอาจารย์เป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ อภิสัทธาวิช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษางานทางด้านสถิติเอ็นเอ ตลอดจนกรุณาสละเวลาอันมีค่าให้ความช่วยเหลือในการตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์ จนสามารถทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มาลินี ดันตยาภรณ์ ประธานสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์ ที่ให้คำแนะนำด้านวิชาการต่างๆ ขอขอบพระคุณ อาจารย์อัญชลี เชียงกุล กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพนักงานทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการทำงานต่างๆ ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และภาคพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความเป็นกันเอง ให้กำลังใจตลอดจนกำลังกาย ช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้โอกาสในการศึกษาในระดับบัณฑิตเอื้อเพื่อสถานที่ตลอดจนอุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบคุณศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรุณฤกษ์ จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความช่วยเหลือในการเพาะเห็ด

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ ที่ให้ความรัก ความเข้าใจ โอกาสและกำลังใจให้บุตรคนนี้เสมอมา

คุณค่าและประโยชน์อันใดอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบอบแด่คุณพ่อและคุณแม่ผู้เป็นที่รัก

พรเพ็ญ ลูกสอน

พฤษภาคม 2548

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญภาพ.....	VIII

บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์.....	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2

บทที่ 2 บทตรวจสอบเอกสาร.....	3
2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว.....	3
2.2 โพรโตพลาสต์.....	4
2.3 ขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์.....	4
2.4 การรวมโพรโตพลาสต์.....	5
2.5 การคัดเลือกลูกผสมและการพิสูจน์ความเป็นลูกผสม.....	6
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรวมโพรโตพลาสต์.....	7
2.7 การตรวจสอบคุณภาพและการวัดปริมาณดีเอ็นเอ.....	8
2.8 Ribosomal DNA (rDNA).....	9
2.9 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	12
2.10 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction).....	17
2.11 RFLP (restriction fragment length polymorphism).....	20
2.12 SRAP (sequence-related amplified polymorphism).....	26

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการทดลอง.....	27
3.1 ชนิดของเห็ดที่ใช้ในการศึกษาวิจัย.....	27
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย.....	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งในวันเสาร์ที่รับบริการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่นับผูกพันใด ๆ ในเชิงพาณิชย์หรือการการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 สารเคมี.....	28
3.4 วิธีการวิจัย.....	30
3.4.1 การเตรียมแผ่นสปอร์พิมพ์.....	30
3.4.2 การเตรียมเส้นใยเห็ดสายพันธุ์โมโนคาร์บอน.....	30
3.4.3 การแยกโปรโตพลาสต์.....	30
3.4.4 การรวมโปรโตพลาสต์.....	31
3.4.5 การคัดเลือกลูกผสม.....	32
3.4.6 การศึกษาพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่.....	32
3.4.7 การศึกษาสายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	33
3.4.7.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....	33
3.4.7.2 การวัดปริมาณและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ.....	34
3.4.7.3 การทำปฏิกิริยา PCR.....	34
3.4.7.4 การทำ RFLP.....	37
3.4.7.5 เทคนิค SRAP.....	37
3.5 สถานที่ทำการวิจัย.....	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	40
4.1 การรวมโปรโตพลาสต์.....	40
4.2 การคัดเลือกลูกผสม.....	40
4.3 การศึกษาลักษณะของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่.....	42
4.3.1 การศึกษานาขนาดของเส้นใย.....	42
4.3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานทั้งภายนอกและภายใน.....	42
4.4 การศึกษาสายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	52
4.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โดยเทคนิคพีซีอาร์.....	52
4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใน บริเวณ IGS โดยเทคนิคพีซีอาร์.....	53
4.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในบริเวณ rDNA โดยเทคนิคพีซีอาร์.....	53
4.4.4 ผลของ PCR/RFLP ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เข้มข้นร้อยละ 2.0.....	55

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4.4 ผลของ PCR/RFLP ตรวจสอบด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เข้มข้นร้อยละ 6.0.....	64
4.4.5 ผลการทำ sequence-related amplified polymorphism (SRAP).....	70
บทที่ 5 วิจัยรณผลการทดลอง.....	76
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	78
บรรณานุกรม.....	79
ภาคผนวก ก.....	83
ภาคผนวก ข.....	85
ภาคผนวก ค.....	87
ภาคผนวก ง.....	88
ภาคผนวก จ.....	91
ประวัติผู้เขียน.....	92

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) region.....	11
2.2 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ Intergenic Spacer (IGS) region.....	12
2.3 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์.....	14
2.4 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดยอะกาโรสเจล.....	14
2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายและจำนวนรอบ.....	20
2.6 ความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ที่ใช้ในเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	23
3.1 แผนผังแสดงการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว.....	31
3.2 ความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับเทคนิค SRAP.....	39
4.1 แผนผังแสดงผลการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว.....	41
4.2 การเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	44
4.3 สันฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่.....	45

# สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ภาพแสดงลักษณะของโพรโตพลาสต์ของเส้นใยเห็ดนางรม ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ) สายพันธุ์ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว.....	5
2.2 ภาพแสดงการรวมกันของโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรม ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ) กับเห็ดหอม ( <i>Lentinula edodes</i> ).....	5
2.3 ภาพการเรียงตัวของยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอบนสายดีเอ็นเอ.....	10
2.4 ภาพแสดงบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS).....	10
2.5 ภาพแสดงบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ intergenic spacer (IGS) .....	11
2.6 ภาพความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่กับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล เมื่อใช้ อะกาโรสที่มีความเข้มข้นต่างๆ.....	14
2.7 ภาพโครงสร้างทางเคมีของอะครีลาไมด์ บิสอะครีลาไมด์ และ โพลีอะครีลาไมด์เจล.....	16
2.8 ภาพการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	19
2.9 ภาพโพลีเมอร์พีซิมที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอของพีช V1 และ V2 ด้วยเอนไซม์ E ส่วนเอนไซม์ B ไม่ทำให้เกิดโพลีเมอร์พีซิม.....	21
3.1 บริเวณ ITS และ IGS ที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR.....	34
4.1 รูปแบบของลูกผสมที่อาจจะเกิดขึ้นได้จากการรวมโพรโตพลาสต์.....	41
4.2 ลักษณะโคโลนีของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ บนอาหาร MEA พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	43
4.3 ลักษณะของดอกเห็ด.....	46
4.4 ลักษณะสปอร์พิมพ์.....	47
4.5 ลักษณะคุ่มดอกบน MEB.....	48
4.6 ลักษณะไมซีเลียม.....	49
4.7 ลักษณะเบสิดิโอสปอร์.....	50
4.8 ลักษณะไฮมีเนียม.....	51
4.9 ขนาดดีเอ็นเอบริเวณ rDNA ในบริเวณ ITS โดยเทคนิคพีซีอาร์.....	52
4.10 ขนาดดีเอ็นเอบริเวณ rDNA ในบริเวณ IGS โดยเทคนิคพีซีอาร์.....	53
4.11 ขนาดดีเอ็นเอ ในบริเวณ rDNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ บนอะกาโรสเจลเข้มข้นร้อยละ 2.0....	54

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.12 ขนาดดีเอ็นเอ ในบริเวณ ITS และ IGS โดยเทคนิคพีซีอาร์ บนโพลีอะครีลาไมด์เจลเข้มข้นร้อยละ 6.0.....	55
4.13 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>DdeI</i> บนอะกาโรสเจลที่มีเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	56
4.14 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>DdeI</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	56
4.15 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	57
4.16 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	58
4.17 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HaeIII</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	59
4.18 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HaeIII</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	59
4.19 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HindIII</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	60
4.20 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HindIII</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	61
4.21 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	61
4.22 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	62
4.23 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HinfI</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	63
4.24 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HinfI</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0.....	63
4.25 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> และ <i>HindIII</i> บนอะครีลาไมด์เจลเข้มข้นร้อยละ 6.0 .....	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.26 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> และ <i>HindIII</i> บนอะครีลาไมด์เจลเข้มข้นร้อยละ 6.0.....	65
4.27 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HaeIII</i> และ <i>HinfI</i> บนอะครีลาไมด์เจลเข้มข้นร้อยละ 6.0.....	66
4.28 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HaeIII</i> และ <i>HinfI</i> บนอะครีลาไมด์เจลเข้มข้นร้อยละ 6.0.....	67
4.29 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i> และ <i>DdeI</i> บนอะครีลาไมด์เจลเข้มข้นร้อยละ 6.0.....	68
4.30 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i> และ <i>DdeI</i> บนอะครีลาไมด์เจลเข้มข้นร้อยละ 6.0.....	69
4.31 SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ A6B4.....	70
4.32 SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ A6B5.....	71
4.33 SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ A7B4.....	72
4.34 SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ A7B7.....	73
4.35 SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ A5B4.....	74
4.36 SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ A9B9.....	75

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

เห็ดในสกุล *Pleurotus* เป็นเห็ดที่พบมากชนิด (species) และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น เห็ดนางรม (*P. ostreatus*), เห็ดนางรมทอง (*P. citrinopileatus*), เห็ดนางนวล (*P. salmoneostramineus*) และเห็ดนางรมหัว (*P. tuberregium*) โดยในประเทศไทยมีการเพาะเห็ดชนิดนี้เพื่อการค้าเป็นอันดับสองรองจากเห็ดฟาง ทั้งนี้เนื่องจากเป็นเห็ดที่เพาะเลี้ยงง่ายเพราะสามารถย่อยสลายลิกนิน (lignin) และเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม การรวมโปรโตพลาสต์เป็นเทคนิคอย่างหนึ่งที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดเพื่อให้ได้เห็ดที่มีคุณสมบัติตามความต้องการ และเป็นการสร้างลูกผสม (fusant) สายพันธุ์ใหม่ที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นชุดจากเดิมที่เป็น โมโนพลอยด์ (monoploid) ให้เป็นดิพลอยด์ หรือ โพลีพลอยด์ (polyploid) ซึ่งอาจทำให้ได้ดอกเห็ดที่ใหญ่และแข็งแรงขึ้น (Peberdy *et. al.* 1976) การรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดสามารถทำได้ทั้งระหว่างเห็ดต่างสายพันธุ์ (intraspecific protoplast fusion) เห็ดต่างชนิด (interspecific protoplast fusion) และเห็ดต่างสกุล (intergeneric protoplast fusion) แต่การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดต่างสกุลนั้นจะเกิดขึ้นได้ยากกว่าการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์ เนื่องจากความสำเร็จในการรวมโปรโตพลาสต์น่าจะเกิดขึ้นได้ยากกว่าตามความใกล้ชิดมากน้อยทางพันธุกรรมของคู่เชื้อ (Anne and Peberdy. 1976) ในงานวิจัยนี้ทำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว และพิสูจน์ลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์โดยการศึกษาสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล 3 วิธี คือ 1) วิธี polymerase chain reaction / restriction fragment length polymorphisms (PCR/RFLP) ของดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ intergenic spacer (IGS) ของ rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1 กับ ITS4 และ O-1 กับ LR12R 2) วิธี PCR ของ rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ O-1 และ 3) วิธี sequence-related amplified polymorphism (SRAP)

### 1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์

- 1.2.1 ทำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว โดยใช้เส้นใยที่ทราบประเภทของ mating type ( $A_1B_1$ ,  $A_1B_2$ ,  $A_2B_1$  และ  $A_2A_2$ ) และให้ทุกคู่ mating type มีโอกาสพบกันทุกคู่ผสม
- 1.2.2 พิสูจน์ความเป็นลูกผสม โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล คือ PCR/RFLP และ SRAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1) ศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์บอนของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว ที่ทราบประเภทของ mating type ( $A_1B_1$ ,  $A_1B_2$ ,  $A_2B_1$  และ  $A_2B_2$ ) มารวมกันแบบพบกันหมดทุกคู่ผสม

2) ตรวจสอบลูกผสมโดยการศึกษาสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล 3 วิธี คือ

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

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถสร้างเห็ดลูกผสมโดยเทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์
- 2) สามารถตรวจสอบลูกผสมโดยการศึกษาสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล 3 วิธี คือ 1) PCR/RFLP 2) PCR และ 3) SRAP

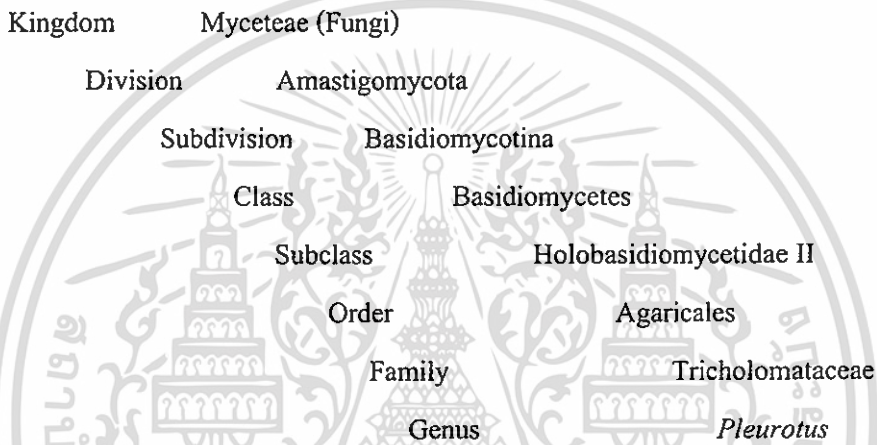
## บทที่ 2

### การตรวจเอกสาร

#### 2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางรม และเห็ดนางรมหัว

##### 2.1.1 การจัดจำแนก

เห็ดนางรม และเห็ดนางรมหัว เป็นเห็ดที่อยู่ในสกุล (genus) เดียวกันแต่ต่างชนิด (species) กัน ซึ่งสามารถจัดจำแนก (classification) ได้ดังนี้ (Alexopoulos and Mim. 1979)



ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อสามัญของเห็ด 2 ชนิดนี้มีดังต่อไปนี้

เห็ดนางรม (Oyster mushroom) : *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer

เห็ดนางรมหัว (King tuber mushroom) : *Pleurotus tuberregium* (Fr.) Singer

##### 2.1.2 ลักษณะทางชีววิทยา

เห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว เป็นเห็ดในสกุล *Pleurotus* ซึ่งเห็ดในสกุลนี้จะมีลักษณะทางลักษณะทางชีววิทยาด້ายคล้ายกัน คือ ดอกเห็ดเกิดเดี่ยวๆหรือเป็นกลุ่ม รูปทรงของดอกเห็ดคล้ายพัด (flabellate) หรือเปลือกหอย (dimidiate) ดอกเห็ดเกิดยึดติดกับวัสดุโดยมีก้านดอก (stalk, stipe) อวบน้ำอยู่บริเวณตรงกลางหรือด้านข้างของขอบหมวกดอก (cap, pileus) ผิวด้านบนของหมวกดอกอาจพบเม็ดสี (pigment) ครีบอก (gill, lamellae) เจริญแล้วแนวค้ำลงมาถึงก้าน (decurrent) เนื้อเยื่อของดอกเห็ด (context) มีความสดและอ่อนนุ่ม เส้นใยมีสีใส (hyaline) และมีผนังกัน (septum) แบบ dolipore ที่แบ่งเส้นใยเป็นช่องๆ และมีเคลมปีคอนเนคชั่น (clamp connection) ดอกเห็ดมีการสร้างสปอร์ที่บริเวณด้านข้างของครีบอกได้หมวกดอกโดยสปอร์จะมีรูปร่างยาวรี และมีสีใส สปอร์พิมพ์ (spore print) มีสีขาว สีชมพูและ สีเทา (Pegler. 1983) ส่วนสีของดอกเห็ดมีทั้งสีขาว สีชมพู สีเหลืองทองและสีเทา (Stamets. 1993) สำหรับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวมีลักษณะสำคัญดังนี้ เห็ดนางรมมีขนาดหมวกดอกเห็ดประมาณ 4-16 เซนติเมตร ผิวเรียบมีสีเทา

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือสีขาว ก้านดอกมีสีขาวถึงสีครีม สปอร์รูปทรงกระบอกและมีขนาด  $3.0-4.0 \times 9.0-11.0$  ไมครอน ส่วนสปอร์พิมพ์มีสีขาว โดยเห็ดชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดมาจากสหรัฐอเมริกาและยุโรป ซึ่งมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับเห็ดมะม่วง เห็ดขอนขาว ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ตามต้นไม้ที่เน่าเปื่อย ผุพัง ซึ่งมักจะเกิดดอกอ่อน ๆ มาบริเวณอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคในฤดูฝน แต่เห็ดนางรมสามารถเพาะให้เกิดดอกได้ตลอดทั้งปีทั้งยังเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางอาหารสูง คือประกอบไปด้วย ธาตุอาหารประเภท คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน รวมทั้งแร่ธาตุต่าง ๆ และวิตามินที่อยู่ในเห็ดนางรมหลายชนิดได้วิเคราะห์ปริมาณไกลโคซิเดส 11 ชนิดในสิ่งสกัดจากดอกเห็ดสกุลนางรม (*Pleurotus* spp.) สำหรับเห็ดนางรมหัวเป็นเห็ดเพียงชนิดเดียวที่สร้างดอกเห็ดจากโครงสร้างที่เรียกว่า สเคลอโรเทียม (sclerotium) โดยสเคลอโรเทียมมีขนาดตั้งแต่ 2-25 เซนติเมตร รูปร่างของสเคลอโรเทียมมีตั้งแต่รูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ เนื้อภายนอกมีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนภายในมีสีขาว หมวกดอกเห็ดชนิดนี้มีลักษณะที่ตรงกลางนูนเป็นช่อง (umbilicate) สปอร์มีสีขาว ขนาดประมาณ  $2.0-3.0 \times 8.0-10.0$  ไมครอน นอกจากนี้ส่วนหัวของดอกเห็ดยังมีสรรพคุณทางยา ซึ่งมักทำให้แห้งก่อนที่จะทำเป็นผงและใช้เหมือนกับยาพอกหรือคลุกเคล้าลงในซूपหรือชงแบบชา (สาทนี ซื่อตรง. 2546)

## 2.2 โพรโตพลาสต์

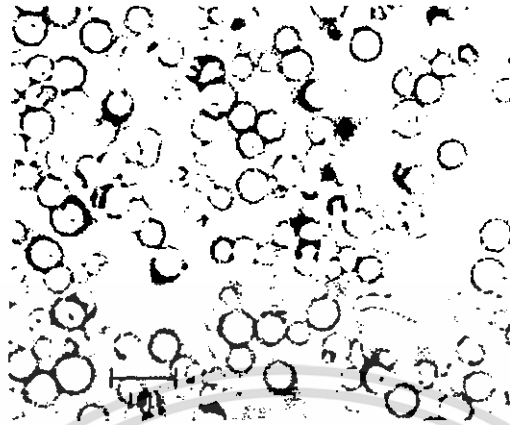
โพรโตพลาสต์ (protoplast) คือ เซลล์ปกติของสิ่งมีชีวิต (เช่น แบคทีเรีย เห็ดรา ยีสต์ และพืช) ที่อยู่ในสภาพไร้ผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งวิธีการสร้างโพรโตพลาสต์ทำโดยใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์มาย่อยเซลล์ ดังนั้นโพรโตพลาสต์จึงถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) (ภาพที่ 2.1) การรวมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ของเซลล์ 2 สายพันธุ์เข้าด้วยกันเพื่อให้เกิดเซลล์ใหม่ที่มียีนของกลุ่มสามารถรวมอยู่ในเซลล์เดียวกัน เซลล์ที่เกิดใหม่นี้มีชื่อว่า ฟิวแซนต์ (fusant) ซึ่งจะมีนิวเคลียสที่มีจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นตามจำนวนโพรโตพลาสต์ที่มารวมกัน ดังนั้นเทคนิคการรวมโพรโตพลาสต์จึงเป็นการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตนั้น เพื่อหวังว่าเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะที่ดีกว่าเซลล์พ่อแม่ ปัจจุบันมีการนำเทคนิคการรวมโพรโตพลาสต์มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต เช่น ในราจำพวก Imperfect Fungi วิธีนี้จึงมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์และการสร้างสายพันธุ์ใหม่ โดยจะทำให้ได้ลูกผสมที่มีการเพิ่มโครโมโซมเป็นชุดหรือหลายชุดในหนึ่งนิวเคลียส คือเป็นโพลีพลอยด์ (polypliod) ซึ่งอาจให้ลักษณะที่ดีกว่าเดิม (สุมาลี ซื่อตรง. 2541)

## 2.3 ขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์

การรวมโพรโตพลาสต์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. การแยกหรือเตรียมโพรโตพลาสต์ (protoplast isolation หรือ protoplast preparation) เป็นขั้นตอนของการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เป็นโพรโตพลาสต์

2. การหลอมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion) เป็นขั้นตอนที่เหนียวนำไปโพรโตพลาสต์ตั้งแต่ 2 โพรโตพลาสต์เข้ามารวมกันเป็นโพรโตพลาสต์เดี่ยว

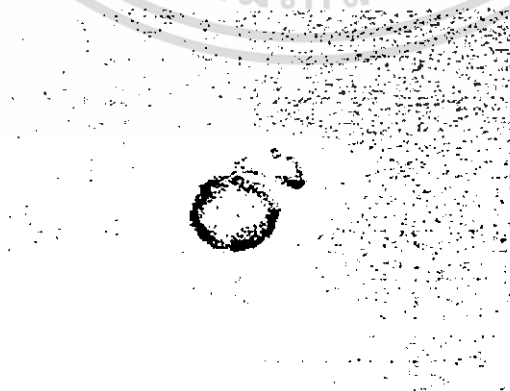


ภาพที่ 2.1 ภาพแสดงลักษณะโพรโตพลาสต์ของเส้นใยเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) สายพันธุ์ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว (จรัสรัช มั่นถาวร. 2544)

3. การเปลี่ยนโพรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ (protoplast regeneration) เนื่องจากโพรโตพลาสต์เป็นโครงสร้างที่เพิ่มจำนวนไม่ได้ จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนโพรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ปกติ โดยการทำให้โพรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ เมื่อโพรโตพลาสต์เปลี่ยนกลับเป็นเซลล์ปกติจึงสามารถเจริญเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นตัวใหม่ขึ้นมา และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

#### 2.4 การรวมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion)

การรวมโพรโตพลาสต์เป็นขั้นตอนการเหนียวนำไปโพรโตพลาสต์ตั้งแต่ 2 โพรโตพลาสต์ขึ้นไปมาหลอมรวมกันเพื่อนำสารพันธุกรรมจากแต่ละโพรโตพลาสต์เข้ามาอยู่ด้วยกัน จึงทำให้ยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจจากสายพันธุ์ต่างๆ เข้าไปอยู่รวมกันในโพรโตพลาสต์เดียวกัน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2.2 ภาพแสดงการรวมกันของโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) กับเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) (จรัสรัช มั่นถาวร. 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการรวมโพรโตพลาสต์ทำได้ 2 วิธี คือ การใช้สารเคมี และการใช้กระแสไฟฟ้า โดยวิธีการใช้สารเคมีเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากกว่าวิธีการใช้กระแสไฟฟ้า

#### 2.4.1 การใช้สารเคมี (chemical method)

สารเคมีที่นิยมใช้ในการรวมโพรโตพลาสต์ คือ สารโพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ซึ่งมีสูตรโมเลกุล ดังนี้  $\text{CH}_2\text{OH}-(\text{CH}_2-\text{OCH}_2)-\text{CH}_2-\text{OH}$  เมื่อจะใช้สารนี้ในการรวมโพรโตพลาสต์จะใช้ร่วมกับแคลเซียมไอออน ( $\text{Ca}^{2+}$ ) วิธีการนำสารโพลีเอทิลีนไกลคอลมาช่วยเหนียวนำทำให้เกิดการรวมกันของโพรโตพลาสต์นั้นริเริ่มทำโดย Kao and Michayluk (1974) ที่พบว่าสารโพลีเอทิลีนไกลคอลเป็นสารพอลิเมอร์ที่ทำให้เกิดการรวมตัวกันของโพรโตพลาสต์ (เป็น fusing agent) เนื่องจากมีพันธะอีเธอร์ (ether bond) ทำให้มีประจุไฟฟ้าเป็นลบเล็กน้อย จึงทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับประจุบวกของน้ำ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และสารอื่นๆ ที่อยู่บนผิวของโพรโตพลาสต์ ซึ่งยังผลให้เกิดการเกาะตัวกันของโพรโตพลาสต์ ส่วนแคลเซียมไอออนทำหน้าที่เชื่อมระหว่างกลุ่มของโปรตีนที่ผิวของโพรโตพลาสต์ (Anne and Peberdy. 1976) สิ่งที่ควรคำนึงถึงในการใช้โพลีเอทิลีนไกลคอลเพื่อให้ได้ผลสูงสุด คือ สภาพของน้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้น และเวลาที่ใช้ในการบ่ม

#### 2.4.2 การใช้กระแสไฟฟ้า

การรวมโพรโตพลาสต์โดยใช้กระแสไฟฟ้ามาเหนียวนำให้เกิดการรวมกันคือ electrofusion ซึ่งริเริ่มทำโดย Zimmermann and Vienlen (1982) ที่ได้ประดิษฐ์เครื่องมือที่เรียกว่า Zimmermann cell fusion system โดยอาศัยหลักการของ dielectrophoresis โดยใช้สนามไฟฟ้ากระแสสลับ (non-mogeneous AC electric field) ทำให้โพรโตพลาสต์ที่อยู่ใกล้ชิดกันมาอยู่ติดกันและเป็นสายคล้ายสายไข่มุก (pearl chaning) เมื่อเชื่อมโพรโตพลาสต์แต่ละอันแล้ว จึงใช้ไฟฟ้ากระแสตรง (DC voltage) ที่เหมาะสมผ่านเข้าไปเป็นจังหวะๆ ซึ่งจะมีผลทำให้เชื่อมเซลล์ถูกทำลายโดยอนุภาคที่อยู่ทั้งสองด้านของเชื่อมเซลล์ที่ช่วยทำให้เกิดช่องที่เชื่อมเซลล์ ทำให้โพรโตพลาสต์หลอมรวมกัน

### 2.5 การคัดเลือกลูกผสมและการพิสูจน์ความเป็นลูกผสม

การคัดเลือกลูกผสมในหีดที่ง่ายที่สุด คือ การตรวจหาแคลมป์คอนเนคชัน (clamp connection) ถ้าพบแสดงว่าสายพันธุ์นั้นน่าจะเป็นลูกผสม ซึ่งสามารถพิสูจน์ให้เห็นใจมากขึ้นโดยการเพาะให้เกิดดอกเห็ดตามด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการศึกษารูปแบบไอโซไซม์หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากเส้นใย

การคัดเลือกลูกผสมด้วยวิธีการตรวจสอบการสร้างแคลมป์คอนเนคชัน ต้องใช้เส้นใยสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นโมโนคารีออนมาทำการรวมโพรโตพลาสต์ โดยที่ถ้าเป็นลูกผสมจริงจะมีเส้นใยที่เป็นชนิดเฮเทอโรคารีออน (heterokaryon) ซึ่งสามารถสร้างแคลมป์คอนเนคชันได้

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรวมโพรโตพลาสต์

จรัสรัช มั่นถาวร (2544) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดหอม พบว่า มีเชื้อลูกผสม 5 สายพันธุ์ จากเชื้อทั้งหมด 475 สายพันธุ์ ที่แสดงความเป็นลูกผสมโดยสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราในสเตตอน (nistaton) และไอโอดีน (iodine) และเมื่อทำการวัดขนาดของเส้นใยและปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด พบว่าลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ มีขนาดของเส้นใยที่ใหญ่กว่าและมีปริมาณดีเอ็นเอที่มากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ประภัสสร โชคสวนทรัพย์ (2540) ได้ทำการผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) กับเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* (Mont.) Pegler) โดยวิธีการรวมโพรโตพลาสต์ และพบว่าได้ลูกผสม 3 สายพันธุ์ (PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub>) ที่มีขนาดและน้ำหนัก รวมทั้งปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของเส้นใยมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และเมื่อนำลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ไปเพาะเลี้ยงจนเกิดดอกในถุงขี้เลื่อย พบว่าดอกเห็ดของลูกผสม 2 สายพันธุ์ มีรูปร่างลักษณะทั้งภายนอกและภายในเป็นลักษณะผสม ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ รูปร่างลักษณะทั้งภายนอกและภายในคล้ายคลึงกับเห็ดหอม อย่างไรก็ตาม พรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา (2546) ได้ทำการตรวจสอบลูกผสม 3 สายพันธุ์นั้นจากงานของประภัสสร (PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub>) โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องบ่งชี้ทางโมเลกุล คือ การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค PCR/RFLP พบว่าขนาดดีเอ็นเอในเห็ดขอนขาวมีขนาด 730 คู่เบส ส่วนในเห็ดหอมรวมทั้งฟิวเจอร์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> มีขนาด 1,200 คู่เบส และจากการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอของ microsatellite DNA พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอของเห็ดขอนขาวและเห็ดหอมแตกต่างกันอย่างชัดเจน ส่วนในเห็ดหอมและฟิวเจอร์ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน จากการศึกษาทั้ง 2 วิธีดังกล่าวจึงแสดงว่าลูกผสมทั้ง 3 ไม่ใช่ลูกผสม แต่เป็นเห็ดหอม นอกจากนี้เขายังได้ใช้เทคนิคไอโซไซม์ พบว่าแต่ละเอนไซม์จะให้รูปแบบของไซโมแกรมที่แตกต่างกัน สามารถใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของเห็ดขอนขาว เห็ดหอมและฟิวเจอร์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> โดยเฉพาะเอนไซม์ esterase ซึ่งสามารถใช้บ่งบอกได้ว่าฟิวเจอร์ทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นลูกผสมระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวได้อย่างชัดเจน

Wang (1992) ได้ทดลองใช้โพลีเอทิลีนไกลคอลในการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) กับเห็ด *V. displasia* และเมื่อทำการคัดเลือกลูกผสมโดยใช้สีของดอกเห็ด ปริมาณของโปรตีนและกรดอะมิโนของลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ พบว่า ลูกผสมที่ได้มีปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เขายังได้ศึกษาความเป็นลูกผสมโดยการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ และพบว่าลูกผสมที่ได้มีลักษณะบางอย่างแตกต่างไปจากสายพันธุ์พ่อแม่

Takehara et al. (1993) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรม (*Pluerotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer) กับเห็ด *P. pulmonarius* (Fr.) Quel และระหว่างเห็ด *P. pulmonarius* (Fr.) Quel กับเห็ด *P. cornucopiae* (Paul.) Rolla. Var. *citrinopileatus* (Sing.) โดย Ohira ได้ใช้โพรโตพลาสต์ที่แยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยวสายพันธุ์กลายที่ต้องการสารบางชนิดในการเจริญเติบโต พบว่า ลูกผสมที่ได้จากทั้ง 2 คู่ผสม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับเห็ด *P. pulmonarius*

Homolka (1995) ได้ศึกษาถึงการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) และ *Lentinus tigrinus* ซึ่งเป็นเห็ดที่สามารถสร้างเอนไซม์กลุ่ม lignolytic ที่ย่อยสลาย lignocellulose การย่อยสลายนี้เกิดจากการรวมของเอนไซม์ที่ย่อยลิกนินและเอนไซม์ที่ย่อย polysaccharide เอนไซม์กลุ่มนี้คือ เอนไซม์แลคเคส (laccase) และ manganese peroxidase ( $MnP_2$ ) ซึ่งมีประโยชน์ในการย่อยสลายเนื้อไม้ จึงมีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ โดยการใช้เทคนิคการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *P. ostreatus* กับ *L. tigrinus* เพื่อดูการผลิตเอนไซม์แลคเคส และ  $MnP_2$  ว่ามีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นโดยพบว่าสายพันธุ์ลูกผสม F6 มีการผลิตเอนไซม์ทั้งเอนไซม์แลคเคส และ  $MnP_2$  ที่สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์พ่อแม่

Okamura และคณะ (2000) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของเห็ดกินได้ในประเทศญี่ปุ่น เพื่อให้ได้เห็ดที่นำมาประกอบอาหารในครัวเรือน เพื่อป้องกันโรค thrombosis ซึ่งโรคนี้นับเป็นสาเหตุหลักของการตายในประเทศญี่ปุ่นและประเทศทางซีกโลกตะวันตก โดยนำโพรโตพลาสต์ของเห็ดหิ่งห้อย (*Lactiporus sulphureus*) ซึ่งมีสารยับยั้งการสร้างสารทรอมบิน (anti-thrombin substance) แต่ไม่เป็นที่นิยมรับประทานเนื่องจากเห็ดชนิดนี้เป็นเห็ดที่มีเนื้อแข็งเหมือนไม้และมีการเพาะเลี้ยงที่ยาก จึงมีการพยายามพัฒนาการเพาะเลี้ยงเห็ดให้เป็นที่ยอมรับ โดยนำมาทำการรวมโพรโตพลาสต์กับเห็ด *Hypsizygus marmoreus* ซึ่งเป็นเห็ดที่มีขายทั่วไปตามท้องตลาดเป็นที่นิยมนำมารับประทานในประเทศญี่ปุ่น อีกทั้งยังเป็นเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้ง่าย ทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเห็ด *H. marmoreus* และมียับยั้งการสร้างสารทรอมบินเหมือนเห็ดหิ่งห้อยและสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย

Hanson และ Howell (2002) ใช้ *Trichoderma koningii* สายพันธุ์ G6 (ATCC MYA-298) ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ที่ปลูกฝ้ายที่มีลักษณะเป็นสารชีวภาพที่ใช้ควบคุมศัตรูพืช และ *T. virens* สายพันธุ์ Tk7 (ATCC MYA-648) ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ที่ปลูกข้าวสาลีที่คงคุณสมบัติที่ดี ใช้ในการผลิตสารชีวภาพที่ใช้ควบคุมศัตรูพืช (biocontrol) โดยการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *T. koningii* กับ *T. virens* เพื่อเพิ่มผลผลิตสารชีวภาพที่ใช้ควบคุมศัตรูพืช

## 2.7 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอทำได้พร้อมๆ กัน วิธีที่ใช้โดยทั่วไปมี 2 วิธีคือวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้ spectrophotometer หรือวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบรไมด์หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

### 2.7.1 วิธีวัดการดูดกลืนแสง

เนื่องจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร (ส่วน โปรตีนจะดูดแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 280 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาโนเมตร) ดังนั้นจึงใช้หาปริมาณของกรคนิวคลีอิกได้ โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. สามารถดูดแสงได้ค่า absorbance ที่ 260 นาโนเมตร ( $A_{260}$  หรือ  $OD_{260}$ ) เท่ากับ 1 ส่วน สารละลายอาร์เอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ดูดแสงได้  $OD_{260} = 1$  มีความเข้มข้น 40 และ 33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีนี้จะใช้ได้ดีในกรณีที่สารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ ไม่มีอาร์เอ็นเอและโอลิโกนิวคลีโอไทด์เจือปน และต้องมีปริมาณมากพอที่จะอ่านค่า OD ได้ ซึ่งอยู่ในระดับไมโครกรัม ปริมาณที่วัดได้โดยวิธีนี้จะแน่นอน และยังคงตรวจสอบคุณภาพได้ด้วย โดยเปรียบเทียบค่า  $OD_{260}$  และ  $OD_{280}$  สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วนระหว่าง  $OD_{260} / OD_{280}$  ประมาณ 1.8 ถ้าได้ค่ามากแสดงว่าอาจมีอาร์เอ็นเอปนและถ้าค่าต่ำแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล วิธีปฏิบัติคือนำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำให้เจือจางลงแล้ววัดค่า  $OD_{260} / OD_{280}$  แล้วจึงคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นที่ถูกต้อง

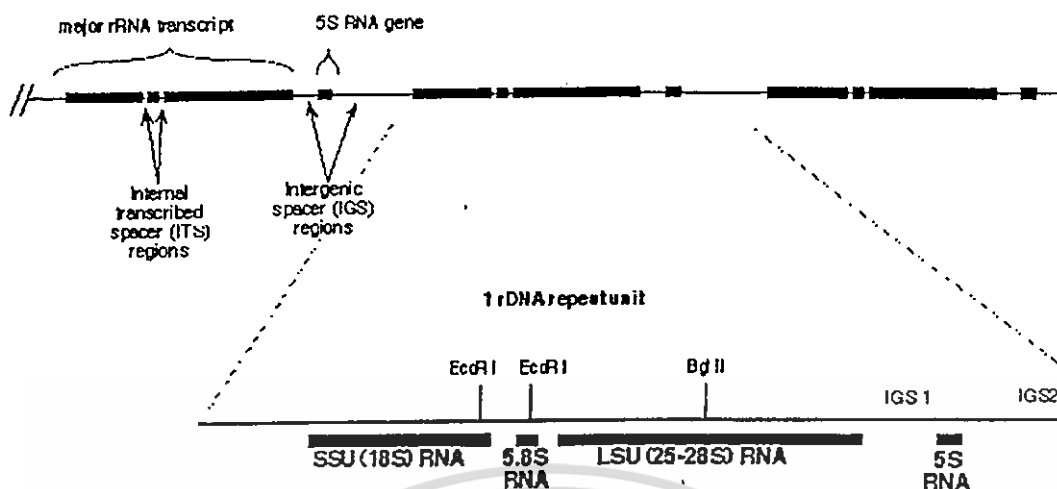
### 2.7.2 วิธีวัดการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์

วิธีวัดการเรืองแสงของเอธิเดียมโบรไมด์ทำโดยนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำอิเล็กโทรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลแล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว จะสามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้ โดยปริมาณที่ตรวจสอบได้เป็นระดับนาโนกรัม ดังนั้นกรณีที่ปริมาณดีเอ็นเอน้อยไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้จะใช้วิธีนี้ นอกจากนี้การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ด้วยการปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอ ซึ่งจะเห็นเป็นปื้นเคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอหรือไม่ และดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขนาดไหน มีการแตกหักของโมเลกุลมากเพียงใดวิธีปฏิบัติทำโดยหยอดดีเอ็นเอที่เตรียมได้ปริมาณแน่นอนลงในแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้นร้อยละ 0.8 ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดและปริมาณหลายๆ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมล. เมื่อนำไปส่องผ่านด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และเปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

## 2.8 Ribosomal DNA (rDNA) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

rDNA เป็นสายดีเอ็นเอที่มีเป็นส่วนของไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่กำหนดรหัสในการสังเคราะห์ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ ยีนนี้จะมีจำนวนซ้ำมากและชุดที่ซ้ำนี้จะอยู่ติดกันเป็นช่วงยาวและอยู่เป็นกลุ่ม เรียกว่า cluster gene ในเห็ดรา rDNA จะมียีนสำหรับการถอดรหัสให้ได้ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ เรียงลำดับจาก 18SRNA, 5.8SRNA, 25SRNA และ 5SRNA ตามลำดับ ซึ่งจะมีจำนวนชุดที่ซ้ำถึง 40-240 ชุด (ภาพที่ 2.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

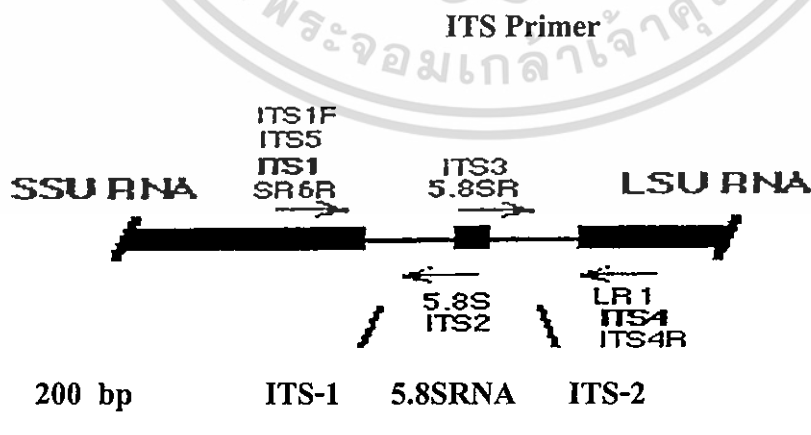


ภาพที่ 2.3 แสดงการเรียงตัวของยีนไรโบโซมอลาร์เอ็นเอบนสายดีเอ็นเอ (Vilgalys lab. 1999)

จากความก้าวหน้าทางเทคนิคอณูพันธุศาสตร์ ทำให้สามารถทราบลำดับเบสของไพรเมอร์ และบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการซึ่งสามารถแบ่งไพรเมอร์ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. small subunit RNA (17-18S) primer sequences
2. large subunit RNA (25-28S) primer sequences

3. internal transcribed spacer (ITS) region primers ในเห็ดราส่วนใหญ่จะใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์ในบริเวณ ITS นี้ เนื่องจากในบริเวณนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าในบริเวณอื่นๆ ของ rDNA จึงใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตทั้งในระดับระหว่างชนิด (interspecific) และภายในชนิด (intraspecific) ของเห็ดราได้ (ภาพที่ 2.4, ตารางที่ 2.1)



ภาพที่ 2.4 ภาพแสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) region (Vilgalys lab. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

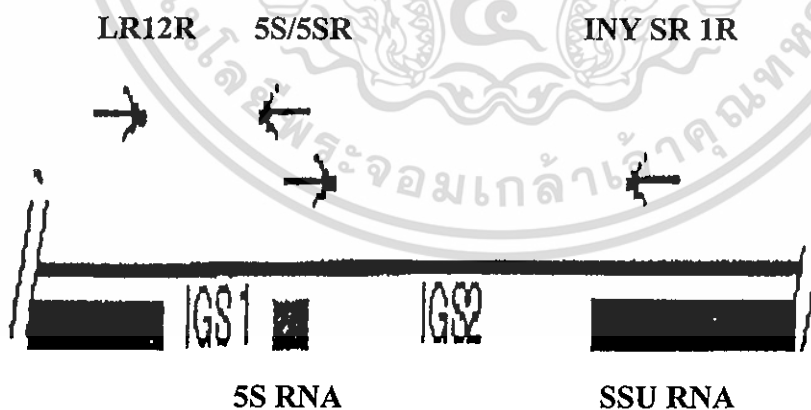
ตารางที่ 2.1 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) region (Vilgalys lab. 1999)

Primer Name	Sequence (5' → 3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG

ITS1-ITS4 เป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย white *et. al.* 1990

ITS1-F และ ITS4-B เป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย Gardes and Bruns. 1993

4. intergenic spacer (IGS) region primers ซึ่งพบใน 5S RNA primer sequences ของเห็ดราชั้นเบสิดิโอไมซิทีส ภายในบริเวณ IGS เป็นบริเวณที่ไม่มีการลอกรหัส บริเวณนี้จะมีขนาดตั้งแต่ 2 กิโลเบสขึ้นไป ดังนั้นภายในบริเวณ IGS นี้จะไม่ใช้วิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมที่สูงมากๆ (ภาพที่ 2.5, ตารางที่ 2.2)



ภาพที่ 2.5 ภาพแสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (IGS) region primers ซึ่งพบใน 5S RNA primer sequences ของเห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทีส (Vilgalys lab. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 .2 ลำดับโพลิโนวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ Intergenic Spacer (IGS) region (Vilgalys lab. 1999)

Primer Name	Sequence (5' → 3')
LR12R	GAACGCCTCTAAGTCAAATCC
InvSR1R	ACTGGCAGAATCAACCAGGTA
5SRNA	ATCAGACGGGATGCGGT
5SRNAR	ACGGCATCCCGTCTGAT

Persson และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใน *Arthrobotrys oligospora* 6 สายพันธุ์จาก 6 ประเทศโดยทำการคัดแยกเบื้องต้นด้วยสัณฐานวิทยา แล้วนำสายพันธุ์ที่แยกมาได้เหล่านั้นมาหาความสัมพันธ์โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วย่อยผลผลิต PCR ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้คือ *AluI*, *HinfI*, *RsaI* และ *TaqI* หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วพบว่า *A. oligospora* ที่ได้หลังการย่อยดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับ nematophagous fungi อื่นๆ พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันทุกสปีชีส์ โดยแต่ละสปีชีส์จะมีโพลิมอร์ฟิซึมที่มีรูปแบบเฉพาะตัวและการหารความแตกต่างโดยวิธีนี้สามารถแยกความแตกต่างได้ง่าย

## 2.9 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (สุรินทร์ ปิยะโชคมากุล. 2545)

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ก็ยังขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่างของโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้าและตัวกลางที่ใช้ด้วย

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอ (หรืออาร์เอ็นเอ) จึงมีประจุเป็นลบที่ฟอสเฟต เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ โมเลกุลดีเอ็นเอด้วย ดังต่อไปนี้

1. ขนาดโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรง (linear) เคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างที่แปรผกผันกับขนาดโมเลกุล ถ้านำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

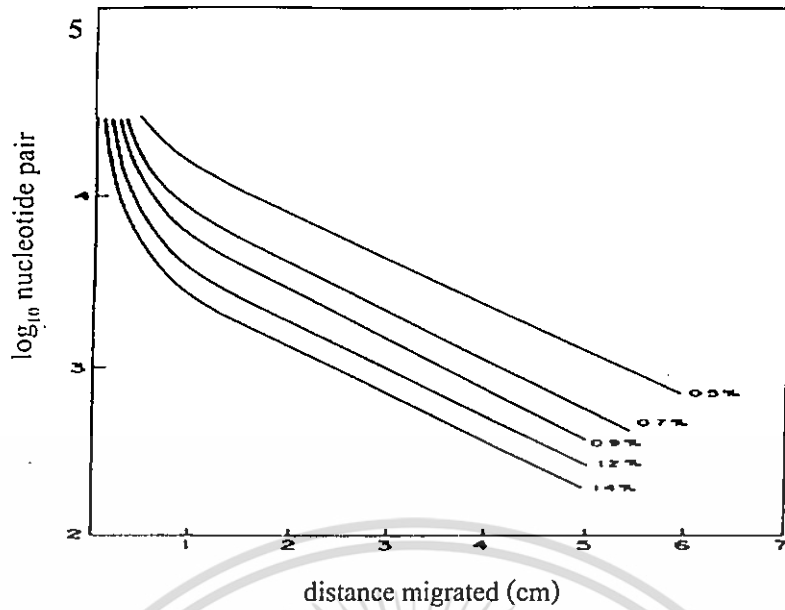
ระยะทางที่โมเลกุลเคลื่อนที่ (mobility) มาเขียนกราฟคู่กับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) จะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ (ภาพที่ 2.6) ซึ่งมีความสัมพันธ์ในลักษณะเส้นตรงอยู่ช่วงหนึ่ง ดังนั้นถ้าต้องการทราบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ สามารถทำได้โดยนำอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุลแล้ว นำมาเขียนกราฟระหว่างระยะทางที่เคลื่อนที่และ log ของน้ำหนักโมเลกุลเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน ทั้งนี้จะต้องเปรียบเทียบในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสครั้งเดียวกันเท่านั้น เนื่องจากเป็นค่าแบบสัมพัทธ์

2. รูปแบบของดีเอ็นเอ (configuration) กรณีที่ดีเอ็นเอมีขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้น ดีเอ็นเอที่มีรูปแบบเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อน (supercoil หรือ covalently closed circular) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรง และดีเอ็นเอแบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด (open circular หรือ nick circular) ซึ่งจะพบรูปแบบทั้ง 3 ของดีเอ็นเอได้ในการสกัดพลาสมิด

3. ร้อยละและชนิดของเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจล โมเลกุลของดีเอ็นเอ จะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรณีนี้อีกคือโพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) และอะกาโรสเจล (agarose gel) โดยโพลีอะครีลาไมด์เจลใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6–1,000 คู่เบส (ตารางที่ 2.3) ส่วนอะกาโรสเจลใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 100 คู่เบส จนถึงกว่า 50,000 คู่เบส (ตารางที่ 2.4)

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้า ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสนี้ ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไป ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้าแยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอที่ได้จะไม่คมชัดเพราะเกิดการแพร่ (diffusion) ของดีเอ็นเอ

5. บัฟเฟอร์ (buffer) ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TAE (Tris-acetate, EDTA), TBE (Tris-borate, EDTA) และ TPE (Tris-phosphate, EDTA) ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน TBE นิยมใช้ที่มีความเข้มข้น 0.5 เท่า ใช้แยกดีเอ็นเอได้ดี มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ (buffering capacity) ได้ดี แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับอะกาโรสได้ จึงไม่เหมาะถ้าต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก TAE ใช้ได้ทั่วไปและใช้ได้ดี ในกรณีที่ต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก แต่มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ จึงไม่ควรใช้ในกรณีที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเวลานานมากหรือควรให้มีการหมุนเวียนของบัฟเฟอร์ (recirculation) ส่วน TBE มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอได้เร็ว แต่ไม่เหมาะถ้ามีการสกัดดีเอ็นเอจากเจลและตกตะกอนด้วยเอธานอล เพราะจะเกิดการตกตะกอนของฟอสเฟตด้วย การเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง



ภาพที่ 2.6 ภาพความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่กับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล เมื่อใช้ อะกาโรสที่มีความเข้มข้นต่างๆ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

ตารางที่ 2.3 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดยโพลีอะครีลาไมด์เจล (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

ความเข้มข้นของเจล (ร้อยละ) (ใช้อะครีลาไมด์ : บิสอะครีลาไมด์ = 29:1)	ขนาดที่เหมาะสมในการแยก (คู่เบส)
3.5	100 – 1,000
5.0	80 – 500
8.0	60 – 400
12.0	40 – 200
20.0	6 – 100

ตารางที่ 2.4 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดยอะกาโรสเจล (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

ความเข้มข้นของเจล (ร้อยละ)	ขนาดที่เหมาะสมในการแยก (คู่เบส)
0.3	5,000 – 60,000
0.6	1,000 – 20,000
0.7	800 – 10,000
0.9	500 – 7,000
1.2	400 – 6,000
1.5	200 – 4,000
2.0	100 – 3,000

### อะกาโรสเจล (agarose gel)

อะกาโรสเจลเป็นโพลีเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3, 6-anhydrogalactose แยกได้จากวุ้น (agar) เนื่องจากอะกาโรสจับตัวกับสารต่างๆ ได้น้อยมาก จึงนิยมใช้เป็นตัวกลางในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส การแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยทั่วไปจะใช้อะกาโรสเจลเป็นส่วนใหญ่เพราะมีช่วงที่ใช้ได้มากกว่า การเตรียมทำได้ง่ายกว่าและไม่มีอันตรายเมื่อเทียบกับโพลีอะครีลาไมด์ การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสมักทำในแนวราบ (horizontal gel)

### โพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel)

โพลีอะครีลาไมด์เจล เกิดจากการรวมตัวของอะครีลาไมด์ (acrylamide) และบิสอะครีลาไมด์ ( $N',N'$ -methylene bisacrylamide หรือเรียกสั้นๆ ว่า bisacrylamide) โมเลกุลเดี่ยวมารวมตัวกันเกิดเป็นโพลีเมอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นร่างแห (ภาพที่ 2.7) เป็นโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี จึงมีความสม่ำเสมอควบคุมขนาดได้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีใด มีความใส มีความคงตัวของ pH อุณหภูมิ และมี ionic strength กว้าง สามารถปรับขนาดของช่องในโพลีเมอร์ได้จึงเหมาะสมสำหรับเป็นตัวกลางในการแยกโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอ

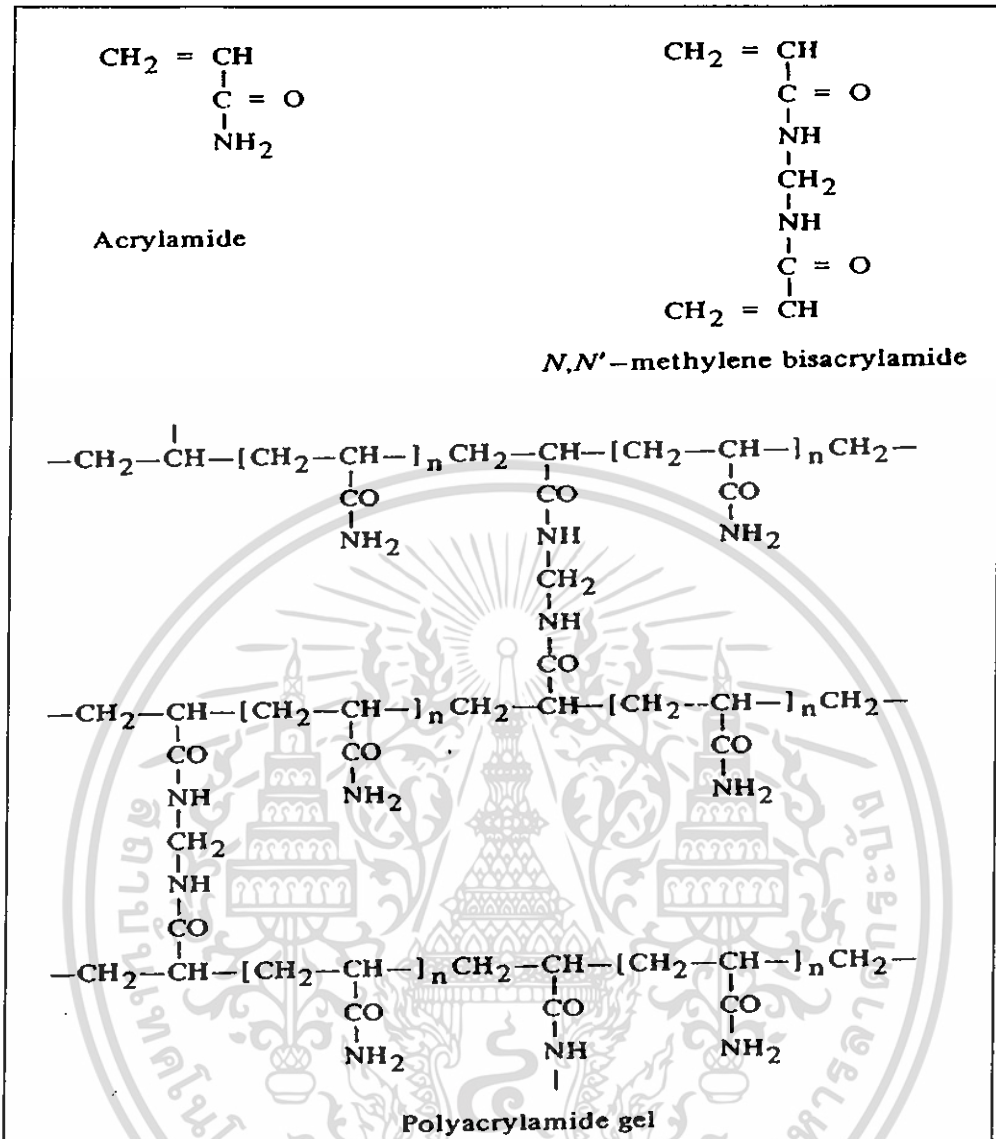
อะครีลาไมด์เป็น โมเลกุลพื้นฐานในเจล โดยมีบิสอะครีลาไมด์เป็นตัวเชื่อมต่อโมเลกุลทั้งหมดให้ประสานกันเป็นร่างแห (crosslinking agent) ดังนั้นขนาดของช่อง (pore size) จึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะครีลาไมด์และเปอร์เซ็นต์บิสอะครีลาไมด์ที่มีในเจลทั้งหมด การบอกความเข้มข้นของเจลจึงมี 2 ค่าคือ

1. ร้อยละ T (total) = ร้อยละความเข้มข้นของโมเลกุลเดี่ยวทั้งหมดของ อะครีลาไมด์ + บิสอะครีลาไมด์
2. ร้อยละ C (crosslinker) = ร้อยละความเข้มข้นของบิสอะครีลาไมด์เทียบกับความเข้มข้นของโมเลกุลเดี่ยวทั้งหมด

การเพิ่มความเข้มข้นของบิสอะครีลาไมด์ ขนาดของช่องจะเล็กลง และจะเล็กที่สุดเมื่อ C มีค่าเท่ากับร้อยละ 5 ถ้าเพิ่มค่า C จะได้ร่างแหขนาดใหญ่และช่องจะกว้างขึ้น เช่น เมื่อใช้เจลที่มีความเข้มข้น T เท่ากับร้อยละ 5 และ C เท่ากับร้อยละ 5 จะได้ช่องเจลที่มีช่องขนาดประมาณ 20 นาโนเมตร แต่ถ้าใช้เจลที่มีความเข้มข้น T เท่ากับร้อยละ 5 และ C เท่ากับร้อยละ 30-50 จะได้เจลที่มีช่องขนาดประมาณ 500-600 นาโนเมตร ถ้าเตรียมโพลีอะครีลาไมด์โดยไม่ใส่บิสอะครีลาไมด์จะได้โพลีเมอร์ที่เป็นสายยาวเท่านั้น ไม่เกิดเป็นเจลเพียงแต่ได้สารละลายเหนียวเท่านั้นเรียกว่า linear polyacrylamide

การจับตัวของโพลีเมอร์ (polymerization) ของอะครีลาไมด์และบิสอะครีลาไมด์เริ่มต้นโดยการเตรียมสารแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) หรือไรโบฟลาวิน (riboflavin) หรือใส่  $N,N,N',N'$ -tetramethylethylenediamine (TEMED) หรือ 3'-dimethylamino-propionitrile (DMAPN) เพื่อเร่งให้เกิดปฏิกิริยาการจับตัวเป็นโพลีเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.7 ภาพโครงสร้างทางเคมีของอะครีลาไมด์ บิสอะครีลาไมด์ และโพลีอะครีลาไมด์เจล (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล, 2545)

ระบบแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตและ TEMED, TEMED จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) จากแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ทำให้เกิดการเริ่มต้นปฏิกิริยาการจับตัวของอะครีลาไมด์และบิสอะครีลาไมด์เป็นโพลีเมอร์ ดังนั้นถ้าเพิ่มปริมาณ TEMED หรือแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต จะเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการจับตัวเป็นโพลีอะครีลาไมด์

ระบบไรโบฟลาวินและ TEMED อาศัยแสงเพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยาการจับตัวเป็นโพลีเมอร์โดยไรโบฟลาวิน โดยไรโบฟลาวินจะสลายตัวเกิดเป็นอนุมูลอิสระเมื่อได้รับแสงจึงทำให้เกิดการจับตัวของอะครีลาไมด์และบิสอะครีลาไมด์เป็นโพลีเมอร์ได้โดยไม่จำเป็นต้องมี TEMED แต่ถ้ามี TEMED ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีกว่าและได้เจลที่สม่ำเสมอกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาการจับตัวเป็น โพลีเมอร์จะเกิดได้ช้าหรือไม่เกิดเลยถ้าค่าพีเอชต่ำและปฏิกิริยายังถูกยับยั้งด้วยออกซิเจนด้วย ดังนั้นบางครั้งจึงต้องกำจัดออกซิเจนก่อน โดยใช้มีมูดอากาศออก (degas) ก่อนที่จะเติม TEMED และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตหรือโรโบฟลาวิน

อะครีลาไมด์และบิสอะครีลาไมด์โมเลกุลเดี่ยว เป็นสารที่เป็นพิษและสามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ จึงควรสวมถุงมือขณะปฏิบัติงาน โพลีอะครีลาไมด์เจลใช้ได้ทั้งในแบบ native gel เพื่อใช้แยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ตามธรรมชาติ และใช้ในแบบ denaturing gel เพื่อแยกโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ผ่านการทำให้เสียสภาพแล้ว โดยการเติมยูเรีย (urea) ลงไปในเจลให้มีความเข้มข้น 7-8 โมลาร์ ทั้ง native gel และ denaturing gel มีวิธีเตรียมเหมือนกัน ต่างกันเฉพาะการเติมหรือไม่เติมยูเรียเท่านั้น

## 2.10 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ PCR (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อนและสามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปทำโคลนนิ่ง (cloning) การทำ PCR คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ซ้ำกันหลายๆ รอบเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณแบบ exponential

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ (primer) 2 ชนิดที่มีเบสคู่สม (complement) กับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากันซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโพลีเปปไทด์สายสั้นๆ ที่เรียกว่า โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ซึ่งทั่วไปมีความยาวประมาณ 18-30 เบส ดังนั้นข้อกำหนดในการทำ PCR คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจจะทราบทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลาย เพื่อนำวิธีการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป ทำให้บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น และมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลายของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง

ขั้นตอนการทำ PCR เริ่มจากการนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (ไพรเมอร์) ทั้งสองชนิด บัฟเฟอร์ และ dNTP (deoxy nucleotide triphosphate) ใส่รวมกับดีเอ็นเอที่สกัดได้ (genomic DNA) ดีเอ็นเอต้นแบบจะแยกเป็นสายเดี่ยวเมื่อได้รับความร้อน ต่อไปลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์เกิดเบสคู่สมกับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส พร้อมทั้งใส่เอนไซม์ลงไปจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ขั้นตอนต่อไปจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นรอบที่ 2 ดังนั้น ถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายๆ รอบ จำนวนผลผลิต PCR (PCR product) จะคำนวณได้เท่ากับ  $2^n$  ( $n$  = จำนวนรอบของปฏิกิริยา) ถ้าปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์

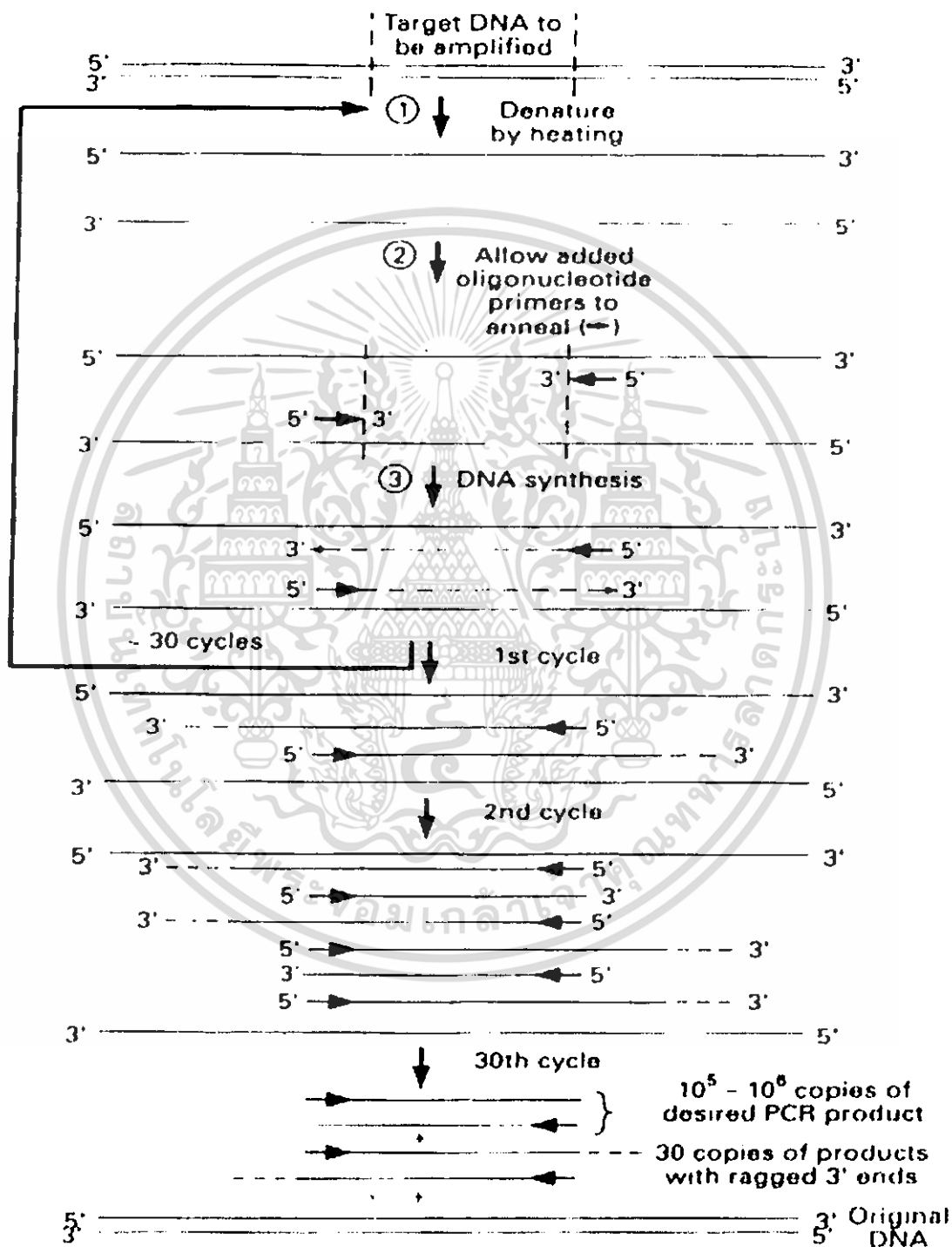
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปด และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การนำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสไปใช้จะต้องคำนึงถึงสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดของปฏิกิริยาจากองค์ประกอบดังต่อไปนี้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

1. ไพรเมอร์เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้น มีความยาวประมาณ 18-30 เบส มีการเรียงลำดับเบสเป็นคู่สมกับ 3'-end และ 5'-end ของดีเอ็นเอต้นแบบ และควรมีปริมาณ G+C ใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการขยาย ซึ่งควรมีปริมาณระหว่างร้อยละ 50 – 60
  2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase ควรอยู่ในช่วง 0.5 – 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์มากเกินไปจะทำให้เกิดการสะสมของ nonspecific background แต่ถ้าความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิตที่ต้องการในปริมาณน้อย อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase อยู่ระหว่าง 75 – 80 องศาเซลเซียส
  3. ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน (magnesium ion) ควรอยู่ระหว่าง 0.5 – 2.5 มิลลิโมลาร์ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อปรากฏการณ์ต่างๆ ดังนี้
    - 3.1 การเกิดการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ
    - 3.2 อุณหภูมิที่ทำให้การแยกออกจากกันของดีเอ็นเอต้นแบบ
    - 3.3 ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
    - 3.4 ความจำเพาะของผลผลิตจากดีเอ็นเอต้นแบบ
    - 3.5 ความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์
  4. ความเข้มข้นของ dNTP ปกติควรอยู่ระหว่าง 50 – 200 ไมโครโมลาร์ ที่พีเอช 7.0 ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดควรสมดุลกันอย่างพอเหมาะ เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ได้ผลผลิตสูง มีความถูกต้อง และไม่เกิดความผิดพลาดในการเรียงลำดับเบสคู่สม
  5. บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ประกอบด้วยสารต่อไปนี้
    - 5.1 Tris-HCl 10-15 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 8.3 – 8.8 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
    - 5.2 KCl 50 มิลลิโมลาร์ เพื่อเร่งการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ
    - 5.3 เจลาติน และ bovine serum albumin (BSA) ซึ่งมีคุณสมบัติในการรักษาความคงสภาพของเอนไซม์
  6. สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอน
    - 6.1 Denaturation เป็นขั้นตอนในการแยกดีเอ็นเอต้นแบบให้เกิดเป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 90-95 องศาเซลเซียส
    - 6.2 Annealing เป็นขั้นตอนในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านขั้นตอน denaturation มาแล้ว อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50- 60 องศาเซลเซียส
    - 6.3 Extention เป็นขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยต่อปลายกับไพรเมอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 72 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase (ภาพที่ 2.8) (วัชร อัดถทิพพหลกุล และ มนตรี อัดถทิพพหลกุล. 2539)
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพียงครั้งเดียวเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายที่เหมาะสมกับจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (ตารางที่ 2.5)



ภาพที่ 2.8 ภาพแสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (สุรินทร์ ปิยะโชคณา กุล. 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายกับจำนวนรอบ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล.2545)

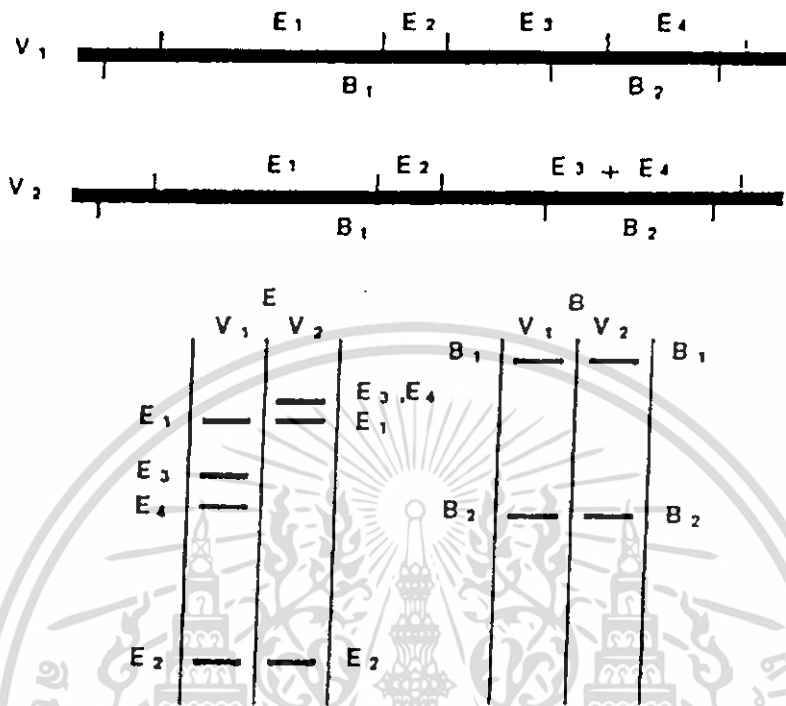
ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	จำนวนรอบ
$3.0 \times 10^5$	25 – 30
$1.5 \times 10^4$	30 – 35
$1.0 \times 10^3$	35 – 40
50	40 – 45

## 2.11 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

RFLP หมายถึงความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เนื่องจากการตรวจสอบในระดับโปรตีนทำได้ไม่กว้างขวางเท่าที่ควร จึงมีการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะเวลาเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน ส่วนของดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลบางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรีย โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่คงที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่ หรือเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือจากต่างโครโมโซม (transposition) วิธีที่ง่ายกว่านี้ คือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้น มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น

เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียและจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสจำเพาะ เรียกว่าตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมาย โมเลกุลหนึ่งจะได้อินดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากแหล่งต่างกันและมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปหรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำมาตัดเอนไซม์

ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่าเกิด polymorphism หรือมี RFLP (ภาพที่ 2.9)



ภาพที่ 2.9 ภาพโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอของพืช V1 และ V2 ด้วยเอนไซม์ E ส่วนเอนไซม์ B ไม่ทำให้เกิดโพลีมอร์ฟิซึม (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545)

การทำ RFLP ทำได้โดยเริ่มจากการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เอนไซม์ประเภทนี้จะสามารถจดจำลำดับเบสบนดีเอ็นเอที่จำเพาะและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นๆ หลังจากนั้นจึงทำการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งได้ถูกตัดโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นเจล จะได้แถบย่อยๆ มากมายทำให้ไม่สามารถแยกแถบย่อยแต่ละแถบได้ จึงต้องทำการย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลมาไว้บนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) ต่อจากนั้นจึงนำไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจโดยนำไปจับคู่ (hybridize) กับโพรบ (probe) ซึ่งอาจจะเป็นดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ ปกติแล้วเทคนิค RFLP สามารถตรวจสอบได้กับทุกส่วนของสิ่งมีชีวิต และชนิดของโพรบที่มีจำนวนไม่จำกัด แต่วิธีการจะยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง

ปัจจุบันได้มีการประยุกต์วิธี RFLP ให้ง่ายขึ้นโดยไม่ต้องทำขั้นตอนการทำ hybridization โดยการนำเทคนิคพีซีอาร์ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีลำดับที่ต้องการศึกษาแล้วจึงนำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (เทคนิค PCR/RFLP) ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธีนี้

เอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นเอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรีย ปัจจุบันสามารถแยกได้มากกว่า 400 ชนิด ทำหน้าที่ในการป้องกันดีเอ็นเอแปลกปลอมที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะมีความจำเพาะต่อเบสบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอเพื่อป้องกันการย่อยตัวเอง การเรียกชื่อเอนไซม์จะใช้ระบบ 3 ตัวอักษร ตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่ซึ่งเป็นตัวอักษรแรกของชื่อสกุล ตัวที่ 2 และ 3 เป็นตัวพิมพ์เล็กซึ่งเป็น 2 ตัวอักษรแรกของชื่อชนิด ส่วนตัวเลขโรมันจะบอกถึงลำดับของเอนไซม์ (ที่อาจมากกว่า 1 ชนิด) ที่แยกจากแบคทีเรียตัวนั้นๆ

อาจแบ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะออกเป็น 3 ประเภท ดังต่อไปนี้

ประเภทที่ 1 เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยการทำงาน 2 อย่าง คือ การตัดจำเพาะ (restriction) และ การปรับปรุงแก้ไข (modification) ซึ่งการปรับปรุงแก้ไขจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์เมทิลเลส (methylase) โดยการเติมหมู่เมทิล (methyl) ลงที่เบสอะดีนีน (adenine หรือ A) หรือเบสไซโตซีน (cytosine หรือ C) บนดีเอ็นเอ เพื่อป้องกันการตัดจำเพาะ ในการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะต้องการ ATP (Adenine triphosphate), S-adenosyl methionine และ แมกนีเซียม โดยจดจำเบสบนดีเอ็นเอที่ไม่ถูกเติมหมู่เมทิลและจะย่อยดีเอ็นเอในตำแหน่งถัดจากเบสที่เอนไซม์จดจำอย่างไม่จำเพาะเจาะจง

ประเภทที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่มีการจดจำลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอจำนวน 4 ถึง 8 เบส ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน ส่วนใหญ่ทางพันธุวิศวกรรมจะใช้นิยมใช้เอนไซม์ประเภทนี้การตัดเอนไซม์ประเภทนี้จะมี 3 ลักษณะ ดังต่อไปนี้

1. การตัดจากปลาย 5' ไป 3' ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียว เช่น *EcoRI*
2. การตัดจากปลาย 3' ไป 5' ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียว เช่น *PstI*
3. การตัดในลักษณะตรง ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายทู่ เช่น *SmaI*

ประเภทที่ 3 เป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะคล้ายกับประเภทที่ 1 ต่างกันตรงที่เอนไซม์ชนิดที่ 3 จะตัดดีเอ็นเอตำแหน่งเบสที่ถัดจากตำแหน่งเบสที่จดจำอย่างจำเพาะเจาะจง

เอนไซม์ตัดจำเพาะจะมีประสิทธิภาพการทำงานสูง และไวต่ออุณหภูมิ ดังนั้นจึงต้องทำการเก็บเอนไซม์เหล่านี้ในอุณหภูมิต่างๆ เช่นที่ -20 องศาเซลเซียสซึ่งปกติที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สารละลายในเอนไซม์จะแข็งตัว โครงสร้างในการแข็งตัวของสารละลายจะทำให้เอนไซม์ถูกทำลายได้เมื่อนำเอนไซม์มาละลายและแช่แข็งบ่อยๆ โดยทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว การป้องกันปัญหาการเก็บรักษาเอนไซม์จึงต้องอาศัยกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งเป็นสารละลายเนื้อที่มีความหนืด การที่กลีเซอรอลเป็นสารละลายเนื้อจะทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อเอนไซม์ และยังคงรักษาสภาพของสารละลายไม่ให้แข็งตัวได้ นอกจากนี้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะขึ้นกับสภาวะของปฏิกิริยานั้นๆ ซึ่งควบคุมด้วยบัฟเฟอร์ (buffer) สามารถแบ่งชนิดเอนไซม์ที่ต้องการสภาวะเกลือแตกต่างกันเป็น 4 จำพวก คือ

1. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือมาก (high salt)
2. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือปานกลาง (medium salt)
3. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือในปริมาณต่ำ (low salt)
4. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific)

สำหรับเกลือที่ใช้สำหรับเอนไซม์ 3 จำพวกแรก คือ เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ส่วนเกลือสำหรับเอนไซม์จำพวกสุดท้าย คือ โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) (ตารางที่ 2.6)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 ความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ต่างๆ ที่ใช้ในเอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุมาลี, 2533)

บัฟเฟอร์	NaCl	Tris-HCl PH 7.5	MgCl <sub>2</sub>	DTT (mM)
low salt	0	10	10	1
medium salt	50	10	10	1
high salt	100	50	10	1
specific	KCl 120 mM	10	10	1

Henrion และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาหาความแตกต่างใน ectomycorrhizal fungi 26 สายพันธุ์ ด้วยการวิเคราะห์ rRNA gene โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR ดังขั้นตอนต่อไปนี้ 1) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ rDNA ทั้งหมดรวมทั้งดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วทำการย่อย rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *MboI*, *RsaI* และ *CfoI* 2) เพิ่มปริมาณ rDNA เฉพาะ ITS และ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วย่อยดีเอ็นเอของบริเวณ ITS และ IGS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ การวิเคราะห์ทั้งสองวิธี สามารถแยกความแตกต่างของ ectomycorrhizal fungi ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันได้ แต่ RFLP ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS จะให้ความหลากหลายมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับถิ่นที่อยู่เมื่อทดสอบด้วย RFLP/ITS

Paolocci *et. al.* (1995) ได้ศึกษารูปแบบโพลิมอร์ฟิซึมของ ribosomal DNA ในเห็ดพวก ectomycorrhiza ในกลุ่ม truffle ชนิดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ในช่วงบริเวณ ITS และ IGS ของดีเอ็นเอที่สกัดจากดอกเห็ด และยืนยันผลการทดลองโดยเทคนิค Southern จากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *EcoRI* จากนั้นใช้โพรบ ITS ของลำดับเบสจาก *Tuber brumale* ซึ่งเป็น โพรบที่จำเพาะต่อรูปแบบของดีเอ็นเอในเห็ดกลุ่มนี้ สามารถสรุปผลได้ว่า บริเวณ rDNA เป็นบริเวณที่เหมาะสมสำหรับนำมาจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตด้วยเทคนิคพีซีอาร์และ Southern

Gandeboeuf *et. al.* (1995) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดในกลุ่ม truffle ที่มีความสัมพันธ์ทางเศรษฐกิจ จำนวน 22 ตัวอย่างจาก 6 ชนิด คือ *Tuber aestivum*, *T. uncinatum*, *T. borchii*, *T. magnatum*, *T. brumale* และ *T. melanosporum* จากส่วนของเส้นใยและดอกเห็ดในประเทศอิตาลีและฝรั่งเศส โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS และ IGS แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*, *HinfI*, *RsaI* ตามลำดับ พบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดอย่างชัดเจน และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ภายในชนิด พบว่า PCR/RFLP ของบริเวณ IGS สามารถแยกความสัมพันธ์ของเห็ดชนิดเดียวกัน ซึ่งนำมาจากแหล่งต่างกันได้

Buscot และคณะ (1996) ได้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเห็ดหลายชนิดที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันจากยุโรป อเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ โดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล 2 วิธี คือ 1) เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับการใช้ในหอพักของเพื่อน เมื่อผู้เช่าเห็นใบแจ้งหนี้ขอคืนเงินค่า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ rDNA บริเวณ ITS และ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วย่อยดีเอ็นเอของ ITS และ IGS ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR/RFLP) 2) เพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR (PCR/microsatellite) Buscot และคณะ (1996) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ ITS ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3' และ 5'- TCCTCCGCTTATTATTGATATGG - 3' ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ IGS นั้นใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดเช่นกันแต่มีลำดับเบสเป็น 5'- CTGAACGCCTCTAAGTCAG- 3' และ 5'- CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT- 3' ส่วนการทำ RFLP นั้นใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ *HinfI*, *EcoRI* และ *RsaI* พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ได้ รูปแบบดีเอ็นเอของ ITS ที่ได้จะเป็นแถบเดี่ยว (single band) และสามารถชี้แยกความแตกต่างในเห็ดแต่ละสปีชีส์ได้ ส่วนดีเอ็นเอของบริเวณ IGS นั้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ข้างต้นได้ การเพิ่มปริมาณ microsatellite DNA นั้นใช้ไพรเมอร์ในปฏิกิริยา PCR เพียงชนิดเดียวโดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น (GTG)<sub>n</sub> และ (CAC)<sub>n</sub> โพลีเมอร์ฟิซิมของ microsatellite DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดสปีชีส์เดียวกันที่มีถิ่นกำเนิดห่างกันมากกว่า 200 กิโลเมตรได้

Bunyard *et. al.* (1996) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดสกุล *Agaricus* 21 ชนิด จำนวน 54 ตัวอย่าง ซึ่งนำมาจากรัฐต่างๆ ในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้หวั่น และเคนนาร์ก โดยใช้เทคนิค PCR/RFLP ของบริเวณ rDNA ไพรเมอร์ที่ใช้คือ IGS-1/5S โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 10 ตัว พบว่าเห็ด *Agaricus* สามารถถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งเห็ดชนิดเดียวกันรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

Castagna *et. al.* (1997) ใช้เทคนิค RFLP เปรียบเทียบกับ RAPD ในข้าวสาลีจากประเทศ อเมริกา ตุรกี อิหร่าน เลบานอน และอิรัก เทคนิค RFLP ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 451 แถบ จาก 80 โคลน เทคนิค RAPD ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 155 แถบจาก 29 ไพรเมอร์ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันภายในชนิด แต่แตกต่างกันระหว่างชนิดของข้าวสาลี

Nicholson *et. al.* (1997) ศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดราในสกุล *Lentinula* 4 ชนิด จำนวน 17 ตัวอย่าง จากศูนย์รวบรวมพันธุ์เห็ดในมหาวิทยาลัยแพนซิลวาเนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้เทคนิค PCR/RFLP ของบริเวณ rDNA ไพรเมอร์ที่ใช้จำนวน 8 ตัว คือ ALRO, ALR7R, LROR, LR7, LR12, M-105, M-100 และ M-205 แล้วทำการสุ่มเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 13 ชนิด พบว่าเห็ดชนิดเดียวกันจะมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่าเห็ดต่างชนิด โดยเมื่อนำเห็ดในสกุล *Lentinula* มาเปรียบเทียบกับเห็ด *Collybia dryophila*, *C. maculate*, *Clitocybula abundans* และ *Pleurotus ostreatus* พบว่าโพลีเมอร์ฟิซิมจะแตกต่างกันมาก เมื่อจัดลำดับความสัมพันธ์จะแยกออกจากเห็ดที่มาจากเห็ดที่มาจากสกุลเดียวกัน

Paull *et. al.* (1998) ศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในข้าวสาลีจากศูนย์รวบรวมพันธุ์ข้าวสาลี 124 ตัวอย่างจากออสเตรเลียและสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยใช้เทคนิค RFLP ตรวจสอบโคลนจากใบซึ่งที่ทราบตำแหน่ง และคัดเลือกจนได้ยีนโอมที่มีรูปแบบเดียวกัน เพื่อประเมิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสัมพันธ์จากค่าความคล้ายคลึงของพันธุกรรม (genetic similarity) ที่คำนวณได้จาก ข้อมูลการทำ AFLP โดยมีค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมได้ 4 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลในพันธุประวัติ

Buscot *et. al.* (2000) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเห็ดจำพวก morel ที่มีลักษณะคล้ายกัน ในวงศ์ Morchellaceae และ Helvellaceae จำนวน 22 ชนิด ซึ่งนำมาจากแหล่งที่ต่างกัน คือ อเมริกาและยุโรป โดยใช้เทคนิค PCR/RFLP ของบริเวณ ITS และ IGS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ CNL12/5SA ตามลำดับ สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้มี 3 ชนิด คือ *HinfI*, *EcoRI* และ *RsaI* พบว่าในบริเวณ ITS สามารถแยกวงศ์ Morchellaceae และ Helvellaceae ออกเป็น 5 กลุ่ม ส่วนในบริเวณ IGS จะแสดงโพลิมอร์ฟิซึมที่แตกต่างกันเฉพาะในวงศ์ Morchellaceae เท่านั้น

Hughes *et. al.* (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Collybia* 4 ชนิด จำนวน 50 ตัวอย่าง จากทวีปยุโรปและอเมริกาใน rDNA บริเวณ ITS และ LSU (large subunit RNA) โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP และใช้เอนไซม์ *HaeIII* และ *BsaHI* เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าในการทดลองครั้งนี้เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaHI* แลบดีเอ็นเอจากตัวอย่าง *C. tuberosa* จะแตกต่างจากชนิดอื่นๆ ซึ่งช่วยจัดลำดับความสัมพันธ์ของ *Collybia* ส่วนการวิเคราะห์ลำดับ ITS-5.8S-ITS2 สามารถนำมาสร้าง phylogenetic tree พบว่าในเห็ดชนิดเดียวกัน ถึงแม้จะมาจากแหล่งที่ต่างกันจะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกว่าพวกที่เป็นเห็ดต่างชนิด

Anderson *et. al.* (2001) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดราในสกุล *Pisolithus* จำนวน 53 ตัวอย่าง จากแหล่งต่างๆ ในทวีปออสเตรเลียกลาง และออสเตรเลียตะวันออก และ 2 ตัวอย่างจากทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทวีปอเมริกา ด้วยเทคนิค ITS-RFLP และ sequencing ITS พบว่า จากการใช้เทคนิค ITS-RFLP โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI*, *AluI*, *MboI* และ *TaqI* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 570, 580, 600 และ 630 คู่เบส เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย neighbour-joining สามารถแบ่งเห็ดราในสกุล *Pisolithus* ได้เป็น 4 กลุ่ม ภายใน 2 กลุ่มใหญ่ โดยภายในกลุ่มใหญ่จะมีเบสิคิโอสปอร์ที่เหมือนกัน

Stadler *et. al.* (2001) ได้ทำการศึกษา secondary metabolite ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการจัดจำแนกของเห็ดรา *Daldinia* ซึ่งในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 18S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ NS1 และ RDR116 จากนั้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* และ *TaqI* พบว่าการใช้เทคนิค PCR/RFLP ช่วยในการจัดจำแนกทั้งในระดับสกุลและชนิด ซึ่งสามารถจัดจำแนก *Daldinia* ออกเป็น 2 กลุ่ม ให้ผลในทิศทางเดียวกับการใช้ HPLC-MS ในการวิเคราะห์ secondary metabolite

Gonzales *et. al.* (2002) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดภายในสกุล *Amanita* จากประเทศสเปน จำนวน 29 ตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1F และ ITS4 จากนั้นตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *AluI*, *EcoRI*, *HinfI*, *MspI*, *TaqI* และ *HhaI* พบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 60 แลบบและ

เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbour-joining จากข้อมูลที่เหมาะสมสามารถแบ่งได้ 4 กลุ่มใหญ่ ซึ่งการจัดจำแนกนี้มีทิศทางเดียวกับการศึกษาของ Singer ในปี 1986

## 2.12 เทคนิค sequence-related amplified polymorphism (SRAP)

เทคนิค sequence-related amplified polymorphism (SRAP) เป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าเทคนิค PCR มาใช้ ซึ่งเทคนิคนี้ถูกคิดค้นและพัฒนาโดย Li and Quiros (2001) โดยการนำเอาอินทิมิกดีเอ็นเอมาทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ด้าน คือ forward primer ซึ่งมีขนาด 17 เบส ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า core sequence ซึ่งมี 14 เบส ตามด้วยเบส CCGG และเบสที่เลือกไว้แล้ว 3 เบสต่อทางปลาย 3' และ reverse primer มีขนาด 18 เบส ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า core sequence มี 15 เบส โดย 11 เบสแรกเริ่มต้นจากปลาย 5' ที่เรียกว่า filler sequence ตามด้วยเบส AATT และเบสที่เลือกไว้แล้วอีก 3 เบสต่อทางด้านปลาย 3' เมื่อนำมาทำ PCR เรียบร้อยแล้วจะทำการแยกขนาดด้วยการทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ตามด้วยทำการตรวจสอบผลโดยการทำอโตเรดิโอกราฟโดยการติดฉลากไพรเมอร์ด้วย  $^{32}\text{P}$  ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ Li and Quiros (2001) ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค SRAP marker และ AFLP marker ในการทำแผนที่ยีนเพื่อติดตามยีน *GLS-ALK* และหาลำดับเบสในลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่เป็น double haploid ของ *Brassica oleracea* L. พบว่า SRAP marker จะครอบคลุมส่วนต่างๆ ของยีนได้กว้างและเมื่อทำการทดลองซ้ำจะได้ผลคงเดิม เมื่อนำมาทำการหาแผนที่ยีนจะพบว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ของแถบที่เกิดขึ้นเป็นแบบ co-dominant ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบกว่า AFLP marker จากนั้นทำการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอไปหาลำดับเบส พบว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ของลำดับเบสที่หาได้จะมีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของยีนใน Genbank นอกจากนี้ยังนำเทคนิค SRAP ไปใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืชอื่นๆ อีก เช่น มันฝรั่ง ข้าว กระเทียม แอปเปิ้ล ผักกาดหอม กะหล่ำปลม rapeseed (*Brassica napus* L.) มะนาว และ คื่นช่าย วาริน (2545) ได้นำเทคนิค SRAP มาทำการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางกราด ยางพลวง และลูกผสม ร่วมกับการศึกษาสถาบันวิทยาพบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ได้อย่างชัดเจนคือ กลุ่มยางกราด กลุ่มยางพลวง และกลุ่มยางที่คาดว่าเป็นลูกผสม

## บทที่ 3

### วัสดุ อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 ชนิดของเห็ดที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

เห็ดที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ได้แก่ เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) และเห็ดนางรมหัว (*P. tuberregium*) โดยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรุณภูมิ

#### 3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

3.2.1 กล้องจุลทรรศน์ light microscope (optihot ; objectives : 4, 10 และ 100X ; eyepieces : model UFX-DX) จากบริษัท Olympus Optical Co. Ltd., Japan

3.2.2 เครื่องแก้วชนิดต่างๆจากบริษัท Pyrex, U.S.A.

3.2.3 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้แรงดันไอน้ำ (autoclave : model autoclave SS-325) บริษัท Tomy รุ่น 3S-325 Seiko Co.Ltd., Japan

3.2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter, Cyber Scan : model pH2000) จากบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore

3.2.5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (mettler-toledo : model PG 5002) จากบริษัท Scientific Promotion Co.Ltd ประเทศไทย

3.2.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (mettler-toledo : model AG 2047) จากบริษัท Scientific Promotion Co.Ltd ประเทศไทย

3.2.7 เครื่องเขย่า (orbital shaker, Edison : model 4230) จากบริษัท Gemmy Industrial Co.,Taiwan

3.2.8 เครื่องหมุนเหวี่ยง (refrigerated centrifuge, Sanyo : Falcon 6/300) จาก บริษัท Sanyo, Japan

3.2.9 ชุดกรองแบคทีเรีย (millipore filter) และแผ่นเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตรจากบริษัท Millipore Corporation, U.S.A.

3.2.10 ซินเตอร์กลาส ฟิวเตอร์ (sinter glass filter, DURAN) จากบริษัท Schott, Germany

3.2.11 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow, ISSCO : model HS 123) จากบริษัท Dwyer Instruments, INC. U.S.A.

3.2.12 ตู้บ่มเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated incubator, SHEL LAB : model 2020) จาก บริษัท Sheldon Manufacturing, Inc. U.S.A.

3.2.13 ตู้อบชนิดลมร้อน (hot-air oven, SHEL LAB : model 1375FX) จากบริษัท Sheldon Manufacturing, Inc. U.S.A.

3.2.14 ตู้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) จากบริษัท Gemmy Industrial Co., Taiwan เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.15 ไมโครปิเปต (micropipette) จากบริษัทกิบไทย ประเทศไทย
- 3.2.16 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) จากบริษัท Boeco, Germany
- 3.2.17 ลูกบิดแก้ว (glass bead) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.50 ซม.
- 3.2.18 เครื่องนับเซลล์ (cell counter) จากบริษัท Gemmy Industrial Co.
- 3.2.19 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จากบริษัท Memmert, Germany
- 3.2.20 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากบริษัท ซันโย ยูนิเวอร์ซัลอิเล็กทริก จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย
- 3.2.21 กล้องถ่ายรูปดิจิทัล (digital camera, digital Mavica MVC-FD73) จากบริษัท โซนี่ประเทศไทย

### 3.3 สารเคมี

#### 3.3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.3.1.1 กลูโคส (glucose) จากบริษัท Fluka, Switzerland
- 3.3.1.2 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) จากบริษัท Merck, Germany
- 3.3.1.3 เปปโตน (peptone) จากบริษัท Fluka, Switzerland
- 3.3.1.4 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) จากบริษัท Merck, Germany
- 3.3.1.5 มอลต์สกัด (malt extract) จากบริษัท Fluka, Switzerland
- 3.3.1.6 แมกนีเซียมซัลเฟตเซปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) จากบริษัท Merck, Germany
- 3.3.1.7 วุ้นผง (Agar) จากบริษัท Difco, U.S.A.
- 3.3.1.8 อาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (potato dextrose agar, PDA) จากบริษัท Difco, U.S.A.

#### 3.3.2 สารเคมีสำหรับแยกและรวมโพรโตพลาสต์

- 3.3.2.1 ซอร์บิทอล (sorbitol) จากบริษัท Sigma, Germany
- 3.3.2.2 ซูโครส (sucrose) จากบริษัท Fluka, Switzerland
- 3.3.2.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากบริษัท Merck, Germany
- 3.3.2.4 มาลิกแอนไฮไดรด์ (maleic anhydride) จากบริษัท Sigma, Germany
- 3.3.2.5 แมนนิทอล (mannitol) จากบริษัท Fluka, Switzerland
- 3.3.2.6 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) จากบริษัท Merck, Germany
- 3.3.2.7 ไลซิงเอนไซม์ (Lysing Enzyme L-1412) จากบริษัท Sigma, Germany
- 3.3.2.8 โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol-6000) จากบริษัท Sigma, Germany
- 3.3.2.9 แคลเซียมคลอไรด์ ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) จากบริษัท Merck, Germany

### 3.3.3 เอนไซม์

3.3.3.4 *Tag* DNA polymerase จาก Promega Corporation Co.Ltd., ประเทศไทย

3.3.3.5 Restriction endonuclease *EcoRI* จาก Promega Corporation Co.Ltd.,  
ประเทศไทย

3.3.3.6 Restriction endonuclease *Sau3AI* จาก Promega Corporation Co.Ltd.,  
ประเทศไทย

3.3.3.7 Restriction endonuclease *HinfI* จาก Promega Corporation Co.Ltd.,  
ประเทศไทย

3.3.3.8 Restriction endonuclease *HindIII* จาก Promega Corporation Co.Ltd.,  
ประเทศไทย

3.3.3.9 Restriction endonuclease *DdeI* จาก Promega Corporation Co.Ltd.,  
ประเทศไทย

3.3.3.10 Restriction endonuclease *HaeIII* จาก Boehringer Mannheim Biochemica.  
ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 3.3.4 เคมิภัณฑ์สำหรับการศึกษา DNA

3.3.4.4 agarose (USB., ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.3.4.5 ethidium bromide (ภาคผนวก ข)

3.3.4.6 dNTPs จาก Amersham Pharmacia Biotech, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.4.7 tracking dye (ภาคผนวก ข)

3.3.4.8 tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer) (ภาคผนวก ข)

3.3.4.9 TE- EDTA buffer (TE buffer) (ภาคผนวก ข)

3.3.4.10 extraction buffer (ภาคผนวก ข)

3.3.4.11 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) จาก TIG, ประเทศไทย

3.3.4.12 แอลกอฮอล์ร้อยละ 70

3.3.4.13 ไอโซโพรพานอล (isopropanol)

3.3.4.14 โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate)

### 3.4 วิธีการวิจัย

#### 3.4.1 การเตรียมแผ่นสปอร์พิมพ์

นำดอกเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวที่เจริญเต็มที่มาตัดส่วนก้านออก แล้วนำมาคว่ำลงบนบีกเกอร์ที่ภายในบรรจุแผ่นกระดาษกรองตัดเป็นแผ่นกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ที่ฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้ในที่ปลอดลม เป็นเวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมงหรือตลอดคืน นำหมวกเห็ดดอกแล้วปิดบีกเกอร์ด้วยกระดาษฟอยล์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จะได้สปอร์พิมพ์ที่ค่อนข้างปราศจากเชื้อบนกระดาษกรอง ซึ่งสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

#### 3.4.2 การเตรียมเส้นใยเห็ดสายพันธุ์โมโนคาริออน

นำเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาริออนของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวที่มี mating type ประเภท  $A_1B_1$ ,  $A_1B_2$ ,  $A_2B_1$  และ  $A_2B_2$  จากงานของสาทิณี (สาทิณี ชื่อตรง. 2546) มาทำการเตรียมเส้นใย โดยนำไปเลี้ยงบนอาหาร MEA (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญดีแล้วทำการตรวจการเกิดแคลมปีคอนเนกชันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่าเพื่อให้แน่ใจว่าได้เส้นใยชนิดโมโนคาริออนจริง (เส้นใยสายพันธุ์โมโนคาริออนต้องเป็นเส้นใยที่ไม่สร้างแคลมปีคอนเนกชัน)

#### 3.4.3 การแยกโพรโตพลาสต์

นำเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาริออนของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวที่ได้จากข้อ 3.4.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวมอลท์สกัด (malt extract broth) (ภาคผนวก ก) พีเอช 7.0 ปริมาตร 30 มล. (ในขวดรูปชมพู่ขนาด 150 มล.) เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเขี่ยเส้นใยเห็ดมาเลี้ยงในอาหารเหลวมอลท์สกัด พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 มล. (ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.) ที่มีลูกปัดแก้ว (glass bead, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม.) บรรจุอยู่ 20 ลูก นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อไปทำการเก็บเส้นใยโดยนำเส้นใยใส่ลงในหลอดทดลองและนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ต่อไปล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และล้างด้วยออสโมติกสตาบิไลเซอร์ (osmotic stabilizer, ซึ่งประกอบด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต 0.9 โมลาร์ ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ (sodium maleate buffer) 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 ทั้งนี้ได้ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทุกครั้งที่ล้างโพรโตพลาสต์ นำเส้นใยที่ได้มาทำการแยกโพรโตพลาสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Hashiba (1992) กล่าวคือนำเส้นใยเห็ดปริมาณ 0.3 กรัมมาบ่มด้วยสารละลายไลซิงเอนไซม์ (lysing enzyme ซึ่งเป็นชื่อทางการค้าของเอนไซม์ที่สกัดมาจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum*) ที่ความเข้มข้น 9 มก./มล. จำนวน 3 มล. โดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์ (ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) เป็นออสโมติกสตาบิไลเซอร์เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ และทำการเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการนำโพรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายไลซิงเอนไซม์มากรองแยกเอาเส้นใยออกด้วย sinter glass filter ต่อให้นำสารแขวนลอยโพรโตพลาสต์ที่เอกลำเป็นเอกลำที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รอบต่อวันที่ เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใส่ทิ้ง ทำการล้างโพรโตพลาสติกด้วยออสโมติกสเตรบิลไอเซอร์ 2 ครั้ง  
 ต่อไปทำการเจือจางให้ได้โพรโตพลาสติก  $1 \times 10^4$  โพรโตพลาสติก/มล. แล้วจึงดูดสารแขวนลอยโพรโต-  
 พลาสติกที่ผ่านการรวมกันแล้วจำนวน 0.1 มล. ไปเลี้ยงในอาหารที่ใช้สำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่  
 ของโพรโตพลาสติกซึ่งมีความเข้มข้นของวุ้นร้อยละ 3 แล้วทำการเททับด้วยอาหารชนิดเดิมที่มีความเข้มข้น  
 ของวุ้นผง 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) (ชานินทร์ พรสุริยา. 2546) ต่อไปนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศา  
 เซลเซียส ตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสติกทุกวัน เมื่อพบการเกิดโคโลนีจะทำการเก็บ  
 โคโลนีที่เจริญอยู่เดี่ยวๆ มาเลี้ยงบนอาหารผิวแข็ง MEA โดยเลี้ยง 1 โคโลนี ต่อ 1 หลอดทดลอง ทำการเก็บ  
 โคโลนีให้ได้จำนวนมากที่สุดเท่าที่ทำได้

### 3.4.5 การคัดเลือกลูกผสม

ทำการคัดเลือกลูกผสมโดยสังเกตจากการเกิดแคลมป์คอนเนกชัน ซึ่งทำโดย นำเส้นใยเห็ด  
 จากโคโลนีที่เก็บได้ภายหลังจากการรวมโพรโตพลาสติกมาทำสไลด์ด้วยวิธี wet mount แล้วตรวจการเกิด  
 แคลมป์คอนเนกชันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เลือกโคโลนีที่เกิดแคลมป์คอนเนกชันเพื่อนำไปทดสอบ  
 ความเป็นลูกผสมในข้อต่อไป

#### 3.4.5.1 การวัดการเจริญเติบโตและขนาดของเส้นใย

นำโคโลนีที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.5 มาเลี้ยงบนอาหาร MEA (ภาคผนวก ก) เป็น  
 เวลา 9 วัน ตามด้วยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (เพื่อดูการเจริญเติบโต) และขนาดเส้นใย (เพื่อดู  
 ขนาดของเส้นใยด้วยไมโครมิเตอร์) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มี eyepiece micrometer ที่เทียบค่าแล้วติด  
 ตั้งอยู่ที่เลนส์ใกล้ตา ทำการเปรียบเทียบผลการทดลองกับเส้นใยของพ่อแม่ที่เป็นโมโนคาริออน ทั้งนี้ได้ทำ  
 การวัดแบบสุ่มทั้งหมด 100 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

#### 3.4.5.2 การเพาะเห็ดลูกผสมให้เกิดดอกและการศึกษาพื้นฐานวิทยา

นำเส้นใยของลูกผสมที่เลี้ยงในอาหาร MEA pH 7.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส  
 เป็นเวลา 7 วัน มาทำการขยายปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่างที่คัมสุกแล้ว เมื่อเส้นใยเห็ดเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง  
 แล้วจะนำเมล็ดข้าวฟ่าง (ประมาณ 10 เมล็ด) ใส่ลงในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูปสำหรับเพาะเห็ด เมื่อเส้นใยเจริญ  
 เต็มก้อนขี้เลื่อยแล้วจึงทำการเปิดดอก โดยการรดน้ำทุกวันและตั้งไว้ในที่ ๆ มีแสงแดดรำไร

### 3.4.6 การศึกษาพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่

นำดอกเห็ดที่เพาะได้มาทำการศึกษาพื้นฐานวิทยา โดยบันทึกและถ่ายภาพลักษณะของ  
 ดอกเห็ด สีของสปอร์พิมพ์ รูปร่างและขนาดของสปอร์ เมสิดิโอสปอร์ รวมทั้งขนาดของขนาดเบสิดียม  
 เปรียบเทียบผลการศึกษานี้กับลักษณะของพ่อแม่ (ชานินทร์ พรสุริยา. 2546)

### 3.4.7 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

#### 3.4.7.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีที่ปรับปรุงโดย Cenis J. (1992) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

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

1. กรองเส้นใยของเห็ดด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ตามด้วยการนำเส้นใยใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มล. ประมาณ 0.1-0.3 กรัม
2. ล้างเส้นใยด้วย TE buffer นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที
3. รินสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง นำเส้นใยใส่ลงในโถงที่เย็นจัด เดิมในโตรเจนเหลวให้ท่วม บดเส้นใยให้ละเอียดอย่างรวดเร็วจนมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ถ่ายลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ ในขณะที่บดอยู่ถ้าในโตรเจนเหลวระเหยหมดให้เติมใหม่
4. เติม extraction buffer 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
6. ดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนมาใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ ผสม isopropanol ลงในหลอดในปริมาณที่เท่ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที
7. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
8. รินสารละลายส่วนใสทิ้งจะเหลือดีเอ็นเอติดอยู่ที่ก้นหลอด ล้างดีเอ็นเอด้วยเอธานอลร้อยละ 70 จากนั้นดูดเอธานอลที่เหลือทิ้ง แล้วคว่ำหลอดเซ็นตริฟิวจ์ บนกระดาษทิชชูจนกระทั่งแห้ง
9. ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer จำนวน 50 ไมโครลิตร
10. เก็บดีเอ็นเอในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้งาน

### 3.4.7.2 การวัดปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

ในการวิจัยนี้จะทำการตรวจสอบสารละลายดีเอ็นเอ 2 วิธี คือ

1. การหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอใน TE buffer มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance ; A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ถ้าค่า  $A_{260}$  มากกว่า 1.0 ให้เจือจาง สารละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงใหม่

1.2 คำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจาก  $1.0 A_{260} = 50$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ของดีเอ็นเอเกลียวคู่)

1.3 ตรวจสอบคุณภาพของกรดนิวคลีอิก โดยการหาอัตราส่วนของค่า  $A_{260} / A_{280}$  ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่าเป็นดีเอ็นเอบริสุทธิ์และเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในขั้นต่อไป ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีอาร์เอ็นเอปนในปริมาณมาก แต่ถ้าค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการศึกษา

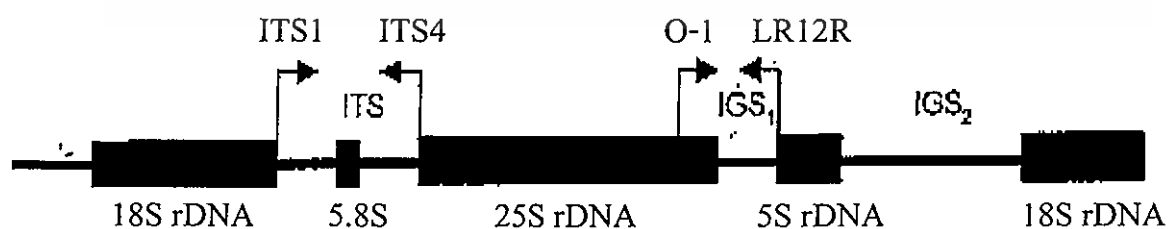
2. การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอ จะสามารถบอกถึงปริมาณของดีเอ็นเอโดยประมาณได้ นอกจากนี้ยังสามารถบอกคุณภาพได้อีกด้วย (ภาคผนวก ค)

### 3.4.7.3 การทำปฏิกิริยา PCR

#### 3.4.7.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS

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



ภาพที่ 3.1 บริเวณ ITS และ IGS ที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR (Erland และคณะ. 1994.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพ และทราบความเข้มข้นแล้วมาเติม ส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการต่อไปนี้

DNA template (50 นาโนกรัม)	5	ไมโครลิตร
Primer ITS1 (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
Primer ITS4 (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
dNTP (2 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
10 × PCR Buffer	5	ไมโครลิตร
MgCl <sub>2</sub> (25 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
Tag DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.3	ไมโครลิตร
H <sub>2</sub> O	25.7	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

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

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

#### 3.4.7.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปริมาณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ IGS

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ IGS ใช้ไพรเมอร์ 2 ตัว คือ O-1 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-AGTCCTATGGCCGTGGAT-3' และไพรเมอร์ LR12R ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA-3' (Kim *et. al.* 2001, Nicholson *et. al.* 1995) โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพ และทราบความเข้มข้นแล้วมาเติมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการดังต่อไปนี้

DNA template (50 นาโนกรัม)	5	ไมโครลิตร
Primer O-1 (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
Primer LR12R (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
dNTP (2 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
10 × PCR Buffer	5	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MgCl <sub>2</sub> (25 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
Tag DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.3	ไมโครลิตร
H <sub>2</sub> O	25.7	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

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

ขั้นที่ 1	Initial Denaturation	95°C	5 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	Denaturation	90°C	30 วินาที	} 30 รอบ
	Annealing	60°C	40 วินาที	
	Extension	72°C	2 นาที	
	ทำซ้ำ		30 รอบ	
ขั้นที่ 3	Final Extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

เมื่อจบปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซ้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ภาคผนวก ก)

#### 3.4.7.3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ O-1

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

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพ และทราบความเข้มข้นแล้วมาเติมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการต่อไปนี้

DNA template (50 นาโนกรัม)	5	ไมโครลิตร
Primer ITS1 (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
Primer O-1 (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
dNTP (2 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
10 × PCR Buffer	5	ไมโครลิตร
MgCl <sub>2</sub> (25 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
Tag DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.3	ไมโครลิตร
H <sub>2</sub> O	25.7	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร

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

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

#### 3.4.7.4.4 การทำ RFLP ของซันดีเอ็นเอจาก PCR และการตรวจสอบซันดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ในข้อ 3.4.7.3.1 และ 3.4.7.3.2 มาทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 6 ชนิด คือ *EcoRI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI* และ *Sau3AI*

การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดจะเติมสารต่างๆ ดังนี้

PCR Product	5	ไมโครลิตร
Restriction enzyme	0.5	ไมโครลิตร
Buffer	2	ไมโครลิตร
BSA	2	ไมโครลิตร
H <sub>2</sub> O	10.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นของอะกาโรสเจลร้อยละ 2.0 แล้วเชื่อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นตรวจวัดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (ภาคผนวก 3) และตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลิอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาคผนวก ง)

#### 3.4.7.5 เทคนิค SRAP (sequence-related amplified polymorphism)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Forward primer ได้แก่

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

## Reverse primer ได้แก่

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

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับเทคนิค SRAP

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1. 10X PCR buffer	2.0	1 เท่า
2. dNTP (2 mM)	2.0	0.2 mM
3. MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.0	2.5 mM
4. ดีเอ็นเอ	2.0	100 ng/20 $\mu$ l
5. Tag DNA polymerase	0.1	0.5 unit
6. Primer A	1.0	5 $\mu$ l
7. Primer B	1.0	5 $\mu$ l
8. น้ำกลั่น	9.9	-
รวม	20	

ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากันดีแล้วนำไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้

Denaturing	94 <sup>o</sup> ซ	3	นาที	1 รอบ
Denaturing	94 <sup>o</sup> ซ	1	นาที	5 รอบ
Annealing	35 <sup>o</sup> ซ	1	นาที	
Extension	72 <sup>o</sup> ซ	1	นาที	
Denaturing	94 <sup>o</sup> ซ	1	นาที	35 รอบ
Annealing	50 <sup>o</sup> ซ	1	นาที	
Extension	72 <sup>o</sup> ซ	1	นาที	
Extension	72 <sup>o</sup> ซ	5	นาที	1 รอบ

### 3.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาคชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังและห้องปฏิบัติการภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การรวมโพรโตพลาสต์

จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว โดยใช้สารละลายโพลิเอทธิลีนไกลคอล ตามด้วยการนำโพรโตพลาสต์ที่ผ่านขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์แล้วมาเลี้ยงบนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ พบว่าโพรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ และเจริญเป็นเส้นใยในวันที่ 2-5 ของการเลี้ยง และประมาณวันที่ 7-12 จะพบโคโลนีเล็กๆ บนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ โดยสามารถเก็บ โคโลนีเดียวที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว ได้ทั้งหมด 360 โคโลนี

#### 4.2 การคัดเลือกลูกผสม

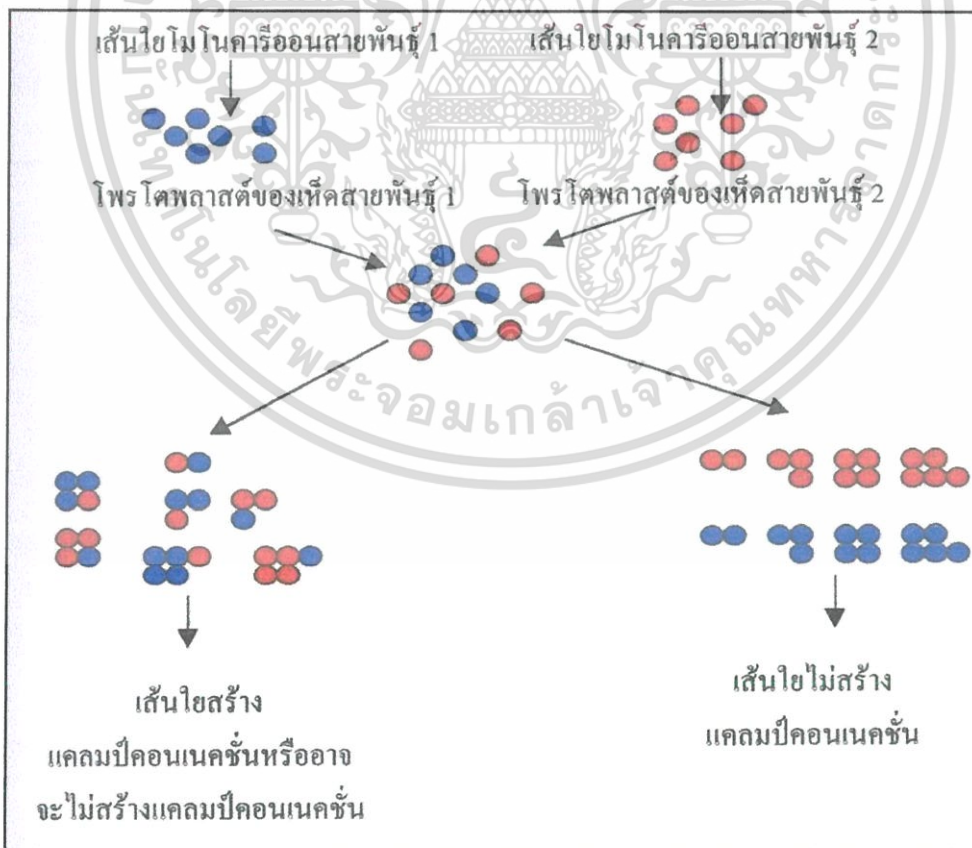
เนื่องจากการทดลองนี้โพรโตพลาสต์ที่นำมาใช้ในขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์เป็นโพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาริโออนซึ่งเจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ด ดังนั้นถ้าเกิดการรวมกันระหว่างโพรโตพลาสต์ของเห็ดชนิดเดียวกันแล้ว เมื่อโพรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญเป็นเส้นใย เส้นใยนี้จะไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน ในทางกลับกันถ้าเกิดการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดต่างชนิดกันแล้ว เมื่อโพรโตพลาสต์ลูกผสมนี้สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญเป็นเส้นใย เส้นใยนี้อาจจะสร้างหรือไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชันก็ได้ โดยถ้าเส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชันอาจเกิดเนื่องมาจากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาริโออนของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ที่นำมาผสมพันธุ์กันมีเมททิงไทป์ที่ไม่สามารถผสมกันได้ หรือเมื่อมีการผสมกันแล้วนิวเคลียสไดนิวเคลียสหนึ่งอาจสลายตัวไปทำให้เส้นใยมีสภาพเป็นแฮพลอยด์ (Gadau and Lingg. 1992) ซึ่งทำให้ไม่เกิดการสร้างแคลมป์คอนเนคชัน และในการรวมกันของโพรโตพลาสต์เมื่อใช้สารละลายโพลิเอทธิลีนไกลคอลเป็นตัวเหนียวนำนั้นอาจทำให้เกิดการรวมกันของโพรโตพลาสต์มากกว่า 2 โพรโตพลาสต์ (ภาพที่ 4.1) ซึ่งในการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว สามารถเก็บโคโลนีเดียวได้ 360 โคโลนี แต่พบว่ามี 9 โคโลนีที่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชัน ดังนั้นในการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว จึงได้ลูกผสมโดยวิธีการตรวจสอบแคลมป์คอนเนคชัน ทั้งหมด 9 สายพันธุ์ เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมที่มี mating type เป็น A<sub>1</sub>B<sub>1</sub> กับเห็ดนางรมหัวที่มี mating type เป็น A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> ลูกผสมที่ได้กำหนดชื่อเป็นฟิวแซนท์ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แผนผังแสดงการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเส้นใยสายพันธุ์โมโนคารีออนของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว ที่มี mating type ประเภท  $A_1B_1$ ,  $A_1B_2$ ,  $A_2B_1$  และ  $A_2B_2$  มารวมกันแบบพบกันหมดทุกคู่ผสม

เห็ดนางรม เห็ดนางรมหัว	$A_1B_1$	$A_1B_2$	$A_2B_1$	$A_2B_2$
$A_1B_1$	-	-	-	-
$A_1B_2$	-	-	-	-
$A_2B_1$	-	-	-	-
$A_2B_2$	+	-	-	-

+ หมายถึง เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ (พิวแซนซ์ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9)

- หมายถึง ไม่เกิดการรวมโปรโตพลาสต์



ภาพที่ 4.1 รูปแบบของลูกผสมที่อาจจะเกิดขึ้นได้จากการรวมโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

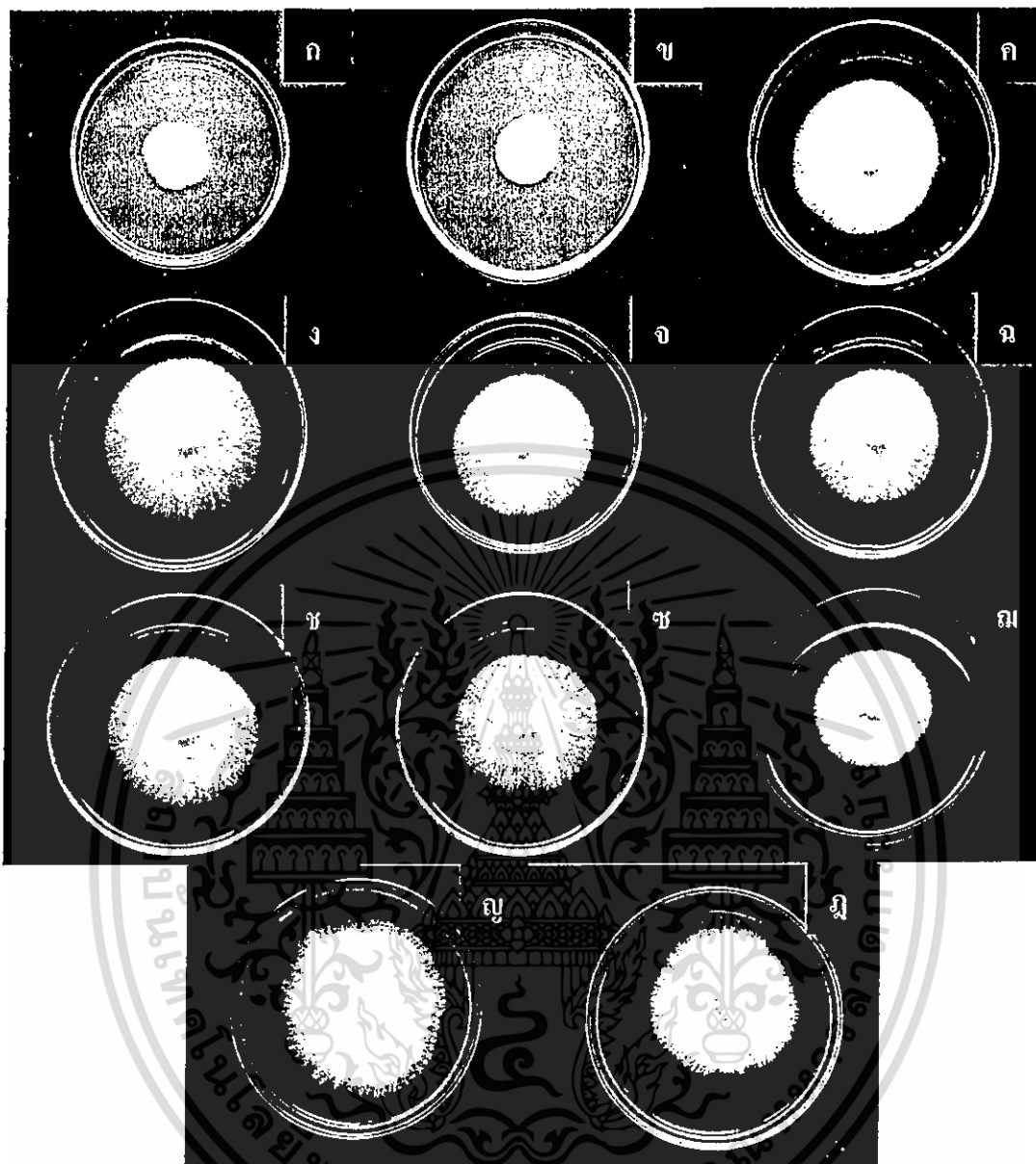
## 4.3 การศึกษาลักษณะของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่

### 4.3.1 การศึกษาขนาดของเส้นใย

จากการศึกษาขนาดของเส้นใยหัตถ์ลูกผสมเปรียบเทียบกับหัตถ์สายพันธุ์พ่อแม่ โดยเลี้ยงเส้นใยหัตถ์ลูกผสมบนอาหารมอลต์สกัดอาหาร พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการวัดขนาดของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลูกผสมระหว่างหัตถ์นางรมกับหัตถ์นางรมหัว ซึ่งได้แก่หัตถ์ลูกผสม OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 4.86, 4.78, 6.25, 5.82, 6.52, 4.42, 5.85, 6.06 และ 5.58 ไมโครเมตร ตามลำดับ ในขณะที่หัตถ์นางรมและหัตถ์นางรมหัวซึ่งเป็นหัตถ์สายพันธุ์พ่อแม่มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 3.84 และ 3.41 ไมโครเมตร ตามลำดับ

### 4.3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของหัตถ์ลูกผสม

ผลการศึกษาลักษณะการเจริญของ โคลโลนีของหัตถ์ลูกผสมเปรียบเทียบกับหัตถ์สายพันธุ์พ่อแม่ และแม่ พบว่าลูกผสมระหว่างหัตถ์นางรมกับหัตถ์นางรมทอง ซึ่งได้แก่ หัตถ์ลูกผสม OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 มีการเจริญของ โคลโลนีที่แตกต่างกัน โดยหัตถ์ลูกผสม OT3 และ OT5 มีการเจริญดีกว่าหัตถ์สายพันธุ์พ่อแม่และมีลักษณะเส้นใยคล้ายกับหัตถ์นางรม ส่วนหัตถ์ลูกผสม OT4 และ OT7 มีลักษณะเส้นใยคล้ายกับหัตถ์นางรมหัวและหัตถ์ลูกผสม OT1, OT2, OT6, OT8 และ OT9 มีการเจริญของ โคลโลนีช้ามากและมีลักษณะของเส้นใยคล้ายทั้งหัตถ์นางรมและหัตถ์นางรมหัว (ภาพที่ 4.2) เมื่อนำหัตถ์ลูกผสมทั้ง 9 สายพันธุ์ ไปเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย พบว่ามีเฉพาะลูกผสม 4 สายพันธุ์ที่สามารถเพาะให้เกิดดอกได้ คือ OT3, OT4, OT5 และ OT7 โดยมีสัณฐานวิทยาดังต่อไปนี้ หัตถ์ลูกผสม OT3, OT5 และ OT8 มีลักษณะผิวดอกคล้ายคลึงหัตถ์นางรม แต่ขนาดดอกใกล้เคียงกับหัตถ์นางรมหัว ส่วนหัตถ์ลูกผสม OT4 และ OT7 มีลักษณะผิวดอกคล้ายคลึงหัตถ์นางรมหัวแต่ขนาดดอกใกล้เคียงกับหัตถ์นางรม แต่มีสีของสปอร์พิมพ์และขนาดของสปอร์เป็นลักษณะผสมระหว่างหัตถ์นางรมและหัตถ์นางรมหัว ในขณะที่หัตถ์ลูกผสม OT1, OT2, OT6, OT7 และ OT9 ไม่สามารถเกิดดอกได้ (ภาพที่ 4.3-4.12)



ภาพที่ 4.2 ลักษณะ โคลนีย์ของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ โดยเลี้ยงบนอาหาร MEA พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน  
 ก. เห็ดนางรม      ข. เห็ดนางรมหัว      ค. เห็ดลูกผสม OT1      ง. เห็ดลูกผสม OT2  
 จ. เห็ดลูกผสม OT3      ฉ. เห็ดลูกผสม OT4      ช. เห็ดลูกผสม OT5      ฅ. เห็ดลูกผสม OT6  
 ฅ. เห็ดลูกผสม OT7      ฎ. เห็ดลูกผสม OT8      ฎ. เห็ดลูกผสม OT9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงการเจริญของเส้นใยของฟิวแซนที่ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA พีเอช 7.0 ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

คู่ผสมพันธุ์	ชนิดของเห็ด	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี
เห็ดนางรม×เห็ดนางรมหัว	เห็ดนางรม	3.750 <sup>b</sup>
	เห็ดนางรมหัว	3.392 <sup>a</sup>
	เห็ดลูกผสม OT1	6.100 <sup>f</sup>
	เห็ดลูกผสม OT2	6.484 <sup>e</sup>
	เห็ดลูกผสม OT3	5.814 <sup>c</sup>
	เห็ดลูกผสม OT4	4.846 <sup>d</sup>
	เห็ดลูกผสม OT5	6.322 <sup>e</sup>
	เห็ดลูกผสม OT6	5.728 <sup>c</sup>
	เห็ดลูกผสม OT7	4.850 <sup>d</sup>
	เห็ดลูกผสม OT8	5.672 <sup>c</sup>
	เห็ดลูกผสม OT9	4.602 <sup>c</sup>

**หมายเหตุ** เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อทำการจัดกลุ่มโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

ตารางที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของฟิวแซนท์ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 เปรียบเทียบกับเห็ดนางรม และเห็ดนางรมหัว

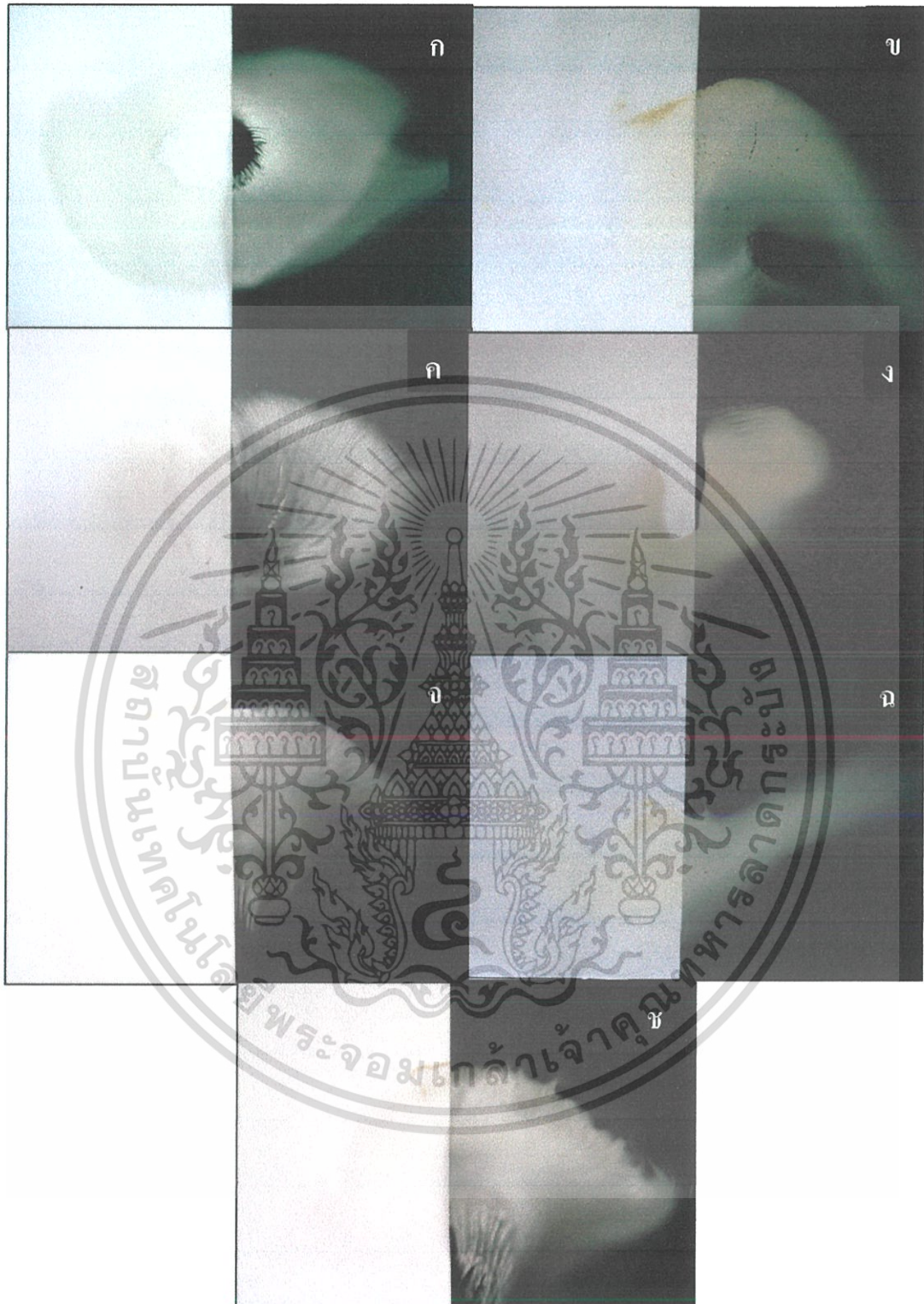
สัณฐานวิทยา	เห็ดนางรม	เห็ดนางรมหัว	ฟิวแซนท์ OT1	ฟิวแซนท์ OT2	ฟิวแซนท์ OT3	ฟิวแซนท์ OT4	ฟิวแซนท์ OT5	ฟิวแซนท์ OT6	ฟิวแซนท์ OT7	ฟิวแซนท์ OT8	ฟิวแซนท์ OT9
สีหมวกดอก	สีขาวครีม	สีน้ำตาล	ไม่เกิดดอก	ไม่เกิดดอก	สีขาวครีม	ขณะที่ยังไม่โตเต็มที่มีสีขาวเมื่อโตเต็มที่มีสีขาวอมน้ำตาล	สีขาวครีม	ไม่เกิดดอก	ขณะที่ยังไม่โตเต็มที่มีสีขาวเมื่อโตเต็มที่มีสีขาวอมน้ำตาล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



ภาพที่ 4.3 ลักษณะดอกเห็ด

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

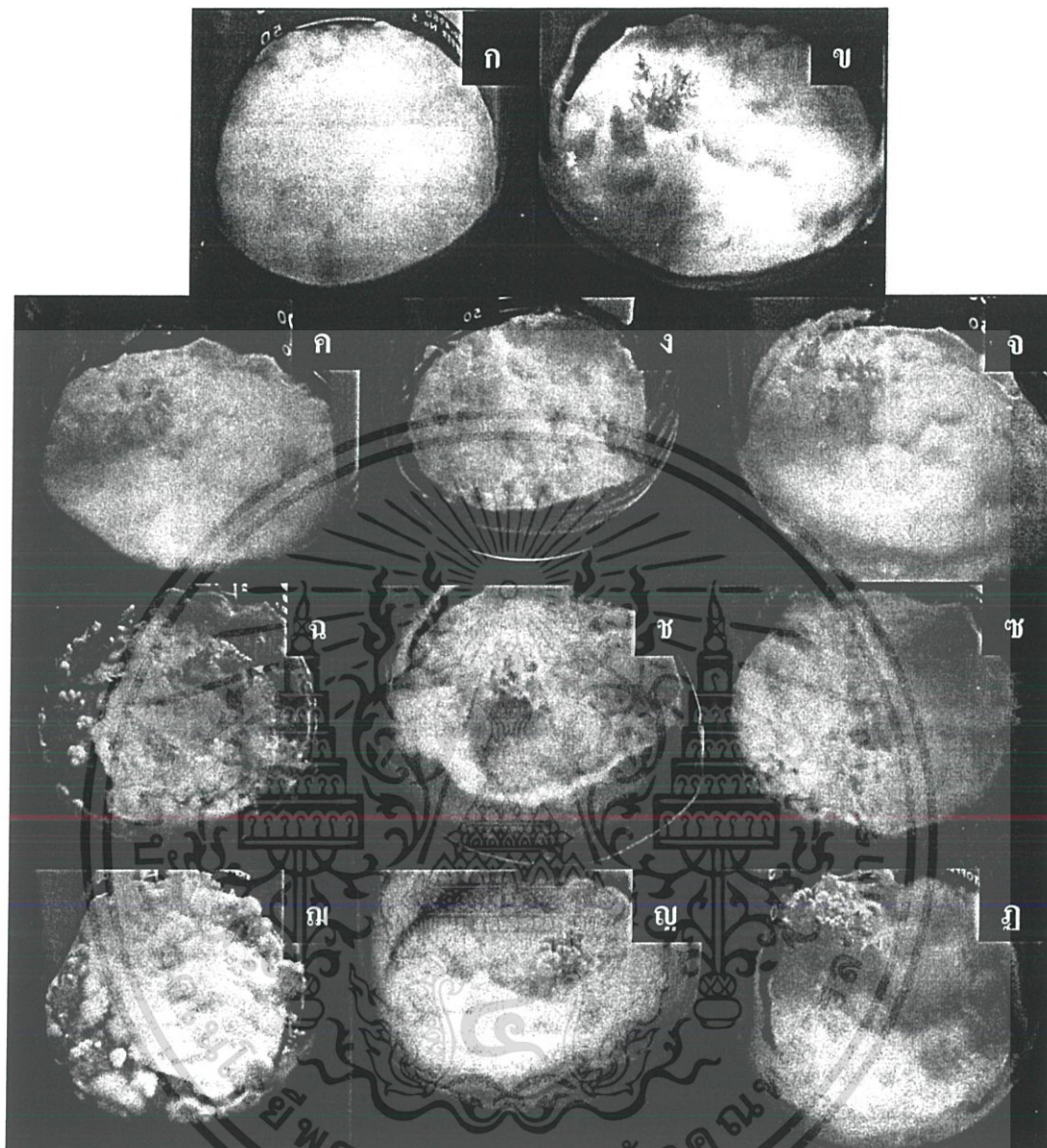
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ลักษณะสปอร์พิมพ์

- ก. เห็นนางรม      ข. เห็นนางรมหัว      ค. เห็นตุ๊กผสม OT3      ง. เห็นตุ๊กผสม OT4  
 จ. เห็นตุ๊กผสม OT5      ฉ. เห็นตุ๊กผสม OT7      ช. เห็นตุ๊กผสม OT8

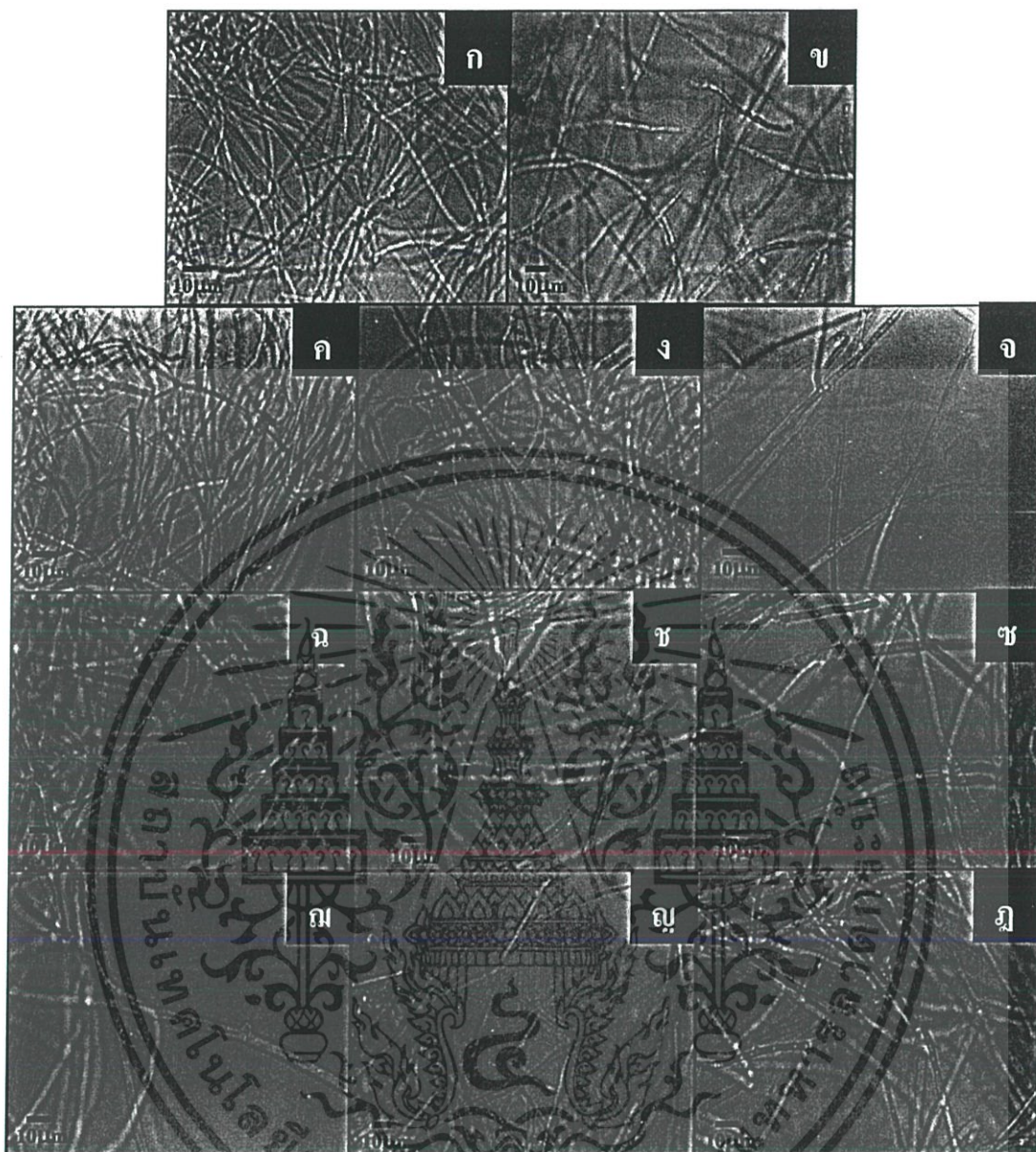
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ลักษณะตุ่มดอกบน MEB

- ก. เห็นนางรม ข. เห็นนางรมหัว ค. เห็นตุ่มผสม OT1 ง. เห็นตุ่มผสม OT2  
 จ. เห็นตุ่มผสม OT3 ฉ. เห็นตุ่มผสม OT4 ช. เห็นตุ่มผสม OT5 ซ. เห็นตุ่มผสม OT6  
 ฅ. เห็นตุ่มผสม OT7 ฅ. เห็นตุ่มผสม OT8 ญ. เห็นตุ่มผสม OT9

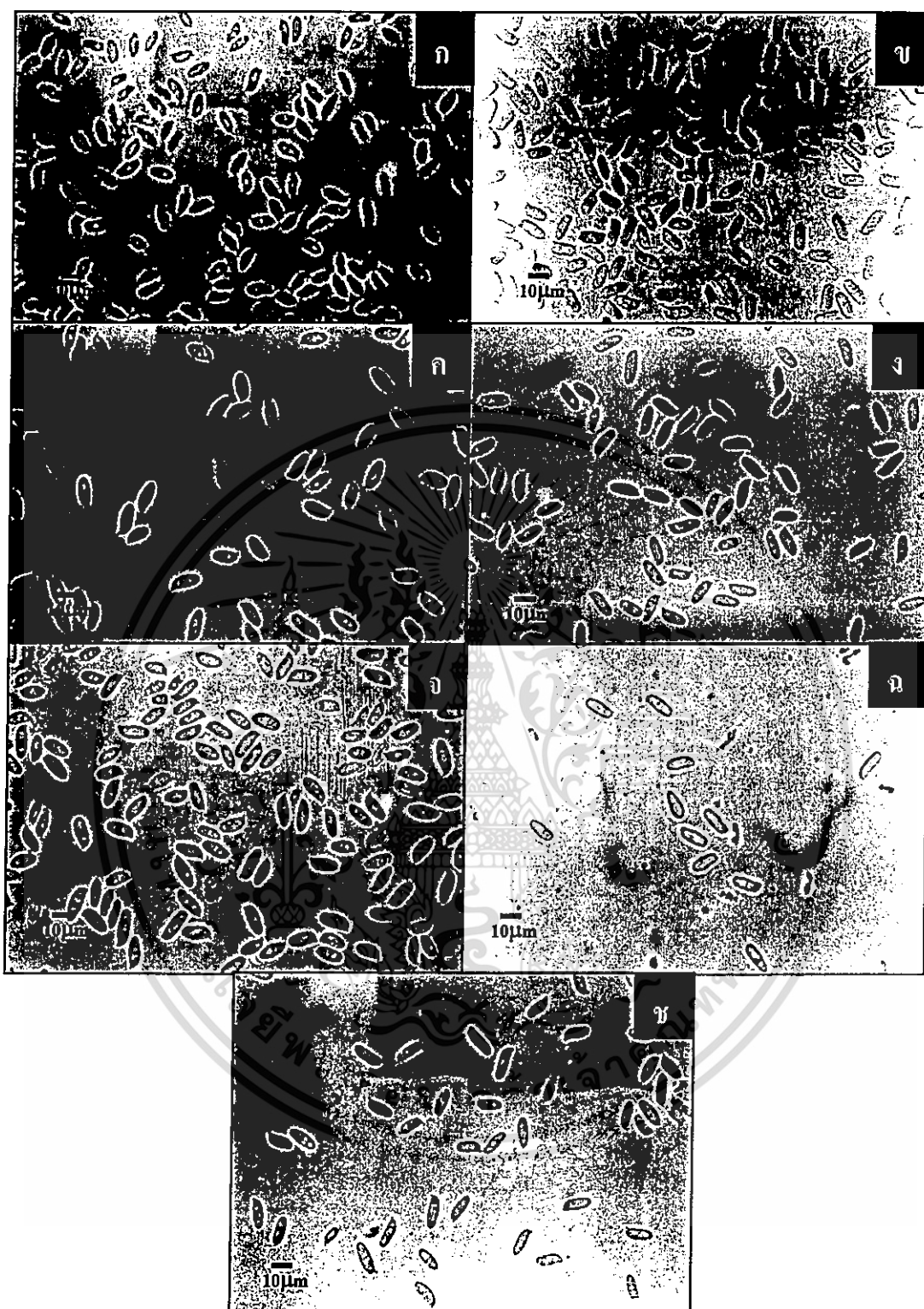
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ลักษณะของโพลิอิมิด

- ก. เห็นนางรม ข. เห็นนางรมหัว ค. เห็นดลูกผสม OT1 ง. เห็นดลูกผสม OT2  
 จ. เห็นดลูกผสม OT3 ฉ. เห็นดลูกผสม OT4 ช. เห็นดลูกผสม OT5 ซ. เห็นดลูกผสม OT6  
 ฅ. เห็นดลูกผสม OT7 ญ. เห็นดลูกผสม OT8 ฎ. เห็นดลูกผสม OT9

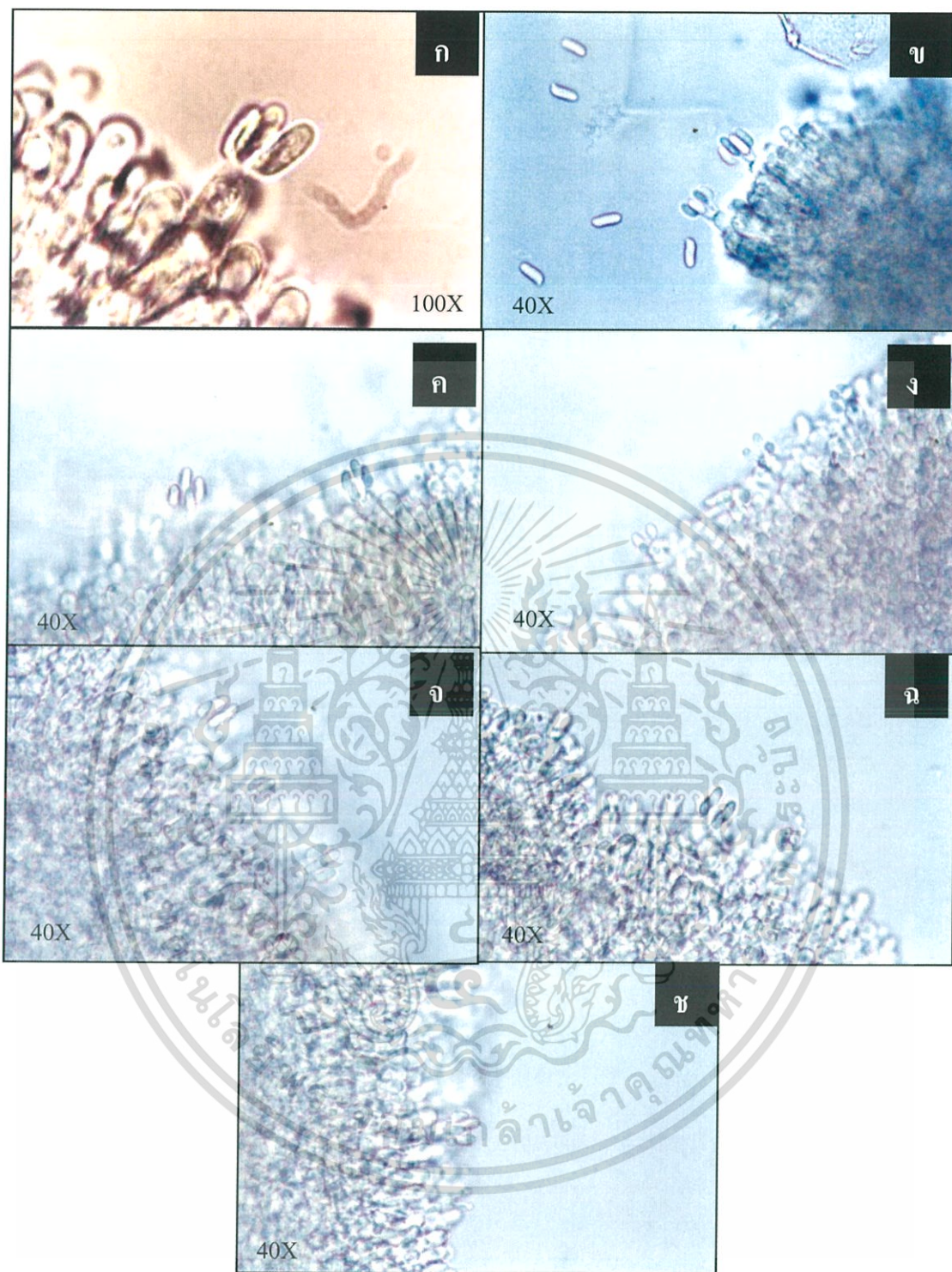
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ลักษณะของเบคทีเรียสปอร์

- ก. เห็นนางรม      ข. เห็นนางรมหัว      ค. เห็นตุ๊กผสม OT3      ง. เห็นตุ๊กผสม OT4  
 จ. เห็นตุ๊กผสม OT5      ฉ. เห็นตุ๊กผสม OT7      ช. เห็นตุ๊กผสม OT8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 ลักษณะของไข่มีเนียม

- ก. ไข่คนางรม    ข. ไข่คนางรมหัว    ค. ไข่ตุ๊กผสม OT3    ง. ไข่ตุ๊กผสม OT4  
 จ. ไข่ตุ๊กผสม OT5    ฉ. ไข่ตุ๊กผสม OT7    ช. ไข่ตุ๊กผสม OT8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4. ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์คู่ต่างๆ ให้ผลดังนี้

##### 4.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS โดยเทคนิคพีซีอาร์

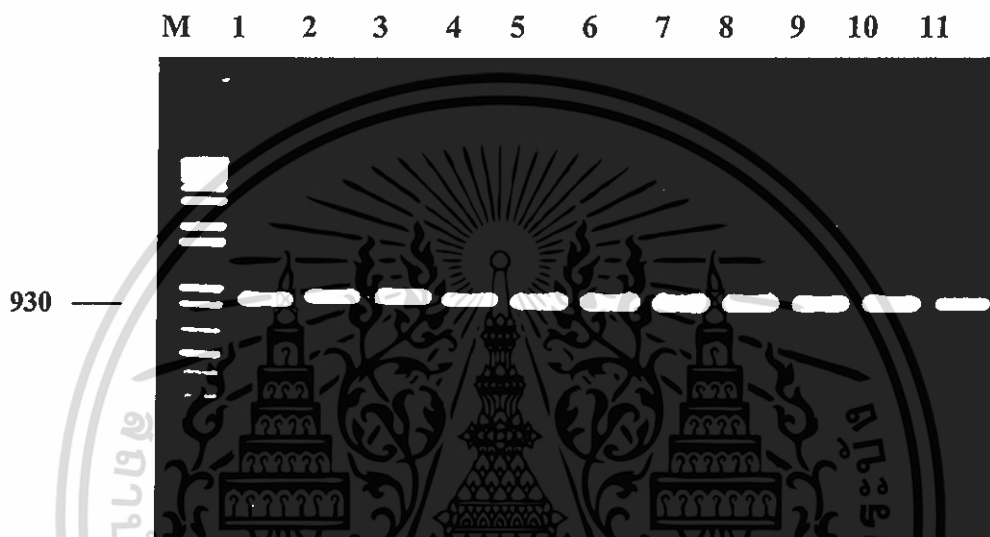
จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 ที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวโดยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ระหว่าง 18S rDNA กับ 25S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดทุกสายพันธุ์ ซึ่งมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 740 คู่เบส (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

#### 4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ IGS โดยเทคนิคพีซีอาร์

จากการศึกษาสายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 ที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว โดยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ IGS ระหว่าง 18S rDNA กับ 5S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ O-1 และ LR12R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดทุกสายพันธุ์ ซึ่งมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 930 คู่เบส (ภาพที่ 4.10)

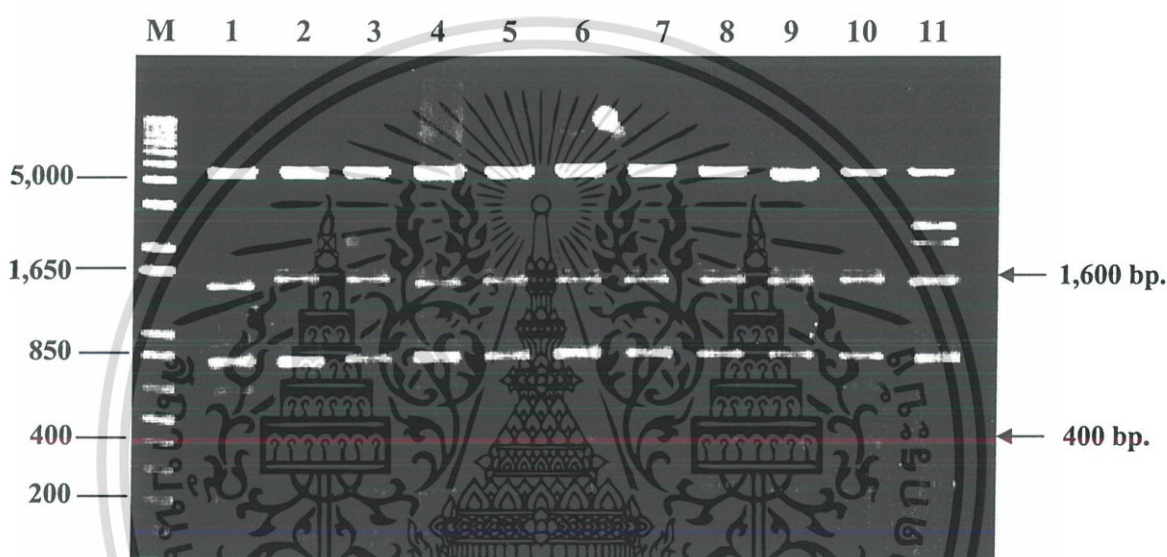


ภาพที่ 4.10 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ PO2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

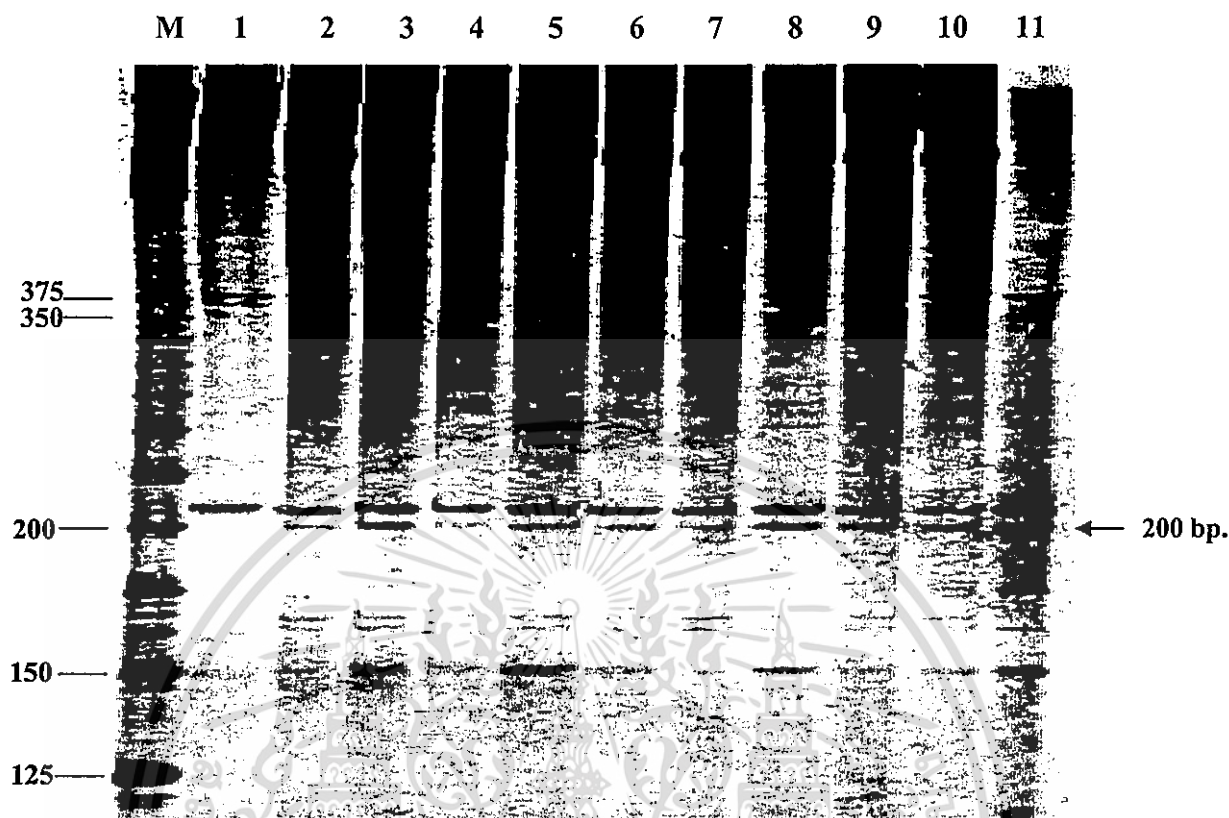
#### 4.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ O-1 โดยเทคนิคพีซีอาร์

จากการศึกษาสายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 ที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว โดยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS และ IGS ระหว่าง 18S rDNA กับ 25S rDNA ซึ่งเป็นบริเวณ ITS และ IGS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ O-1 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดทุกสายพันธุ์ และจากการวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเห็ดนางรมมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 5,000, 1,542, 850, 650, 200 และ 100 คู่เบส และฟิวแซนทั้ง 9 สายพันธุ์ พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 5,000, 1,600, 850, 650, 400, 250 และ 100 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมหัวตรวจพบขนาดดีเอ็นเอประมาณ 5,000, 3,250, 2,350, 1,600, 850, 400, 250 และ 100 คู่เบส เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คู่เบส ซึ่งพบว่าฟิวเซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ จะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบสที่เหมือนเฉพาะเห็ดนางรม และมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 และ 400 คู่เบสที่เหมือนเฉพาะเห็ดนางรมหัว (ภาพที่ 4.11) ผลจากการวิเคราะห์โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้นร้อยละ 6 ซึ่งสามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนระหว่าง 150-300 คู่เบส พบว่าแถบดีเอ็นเอของฟิวเซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ตรงกับแถบดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่ขนาดประมาณ 200 คู่เบส ซึ่งไม่พบในเห็ดนางรม (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.11 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว



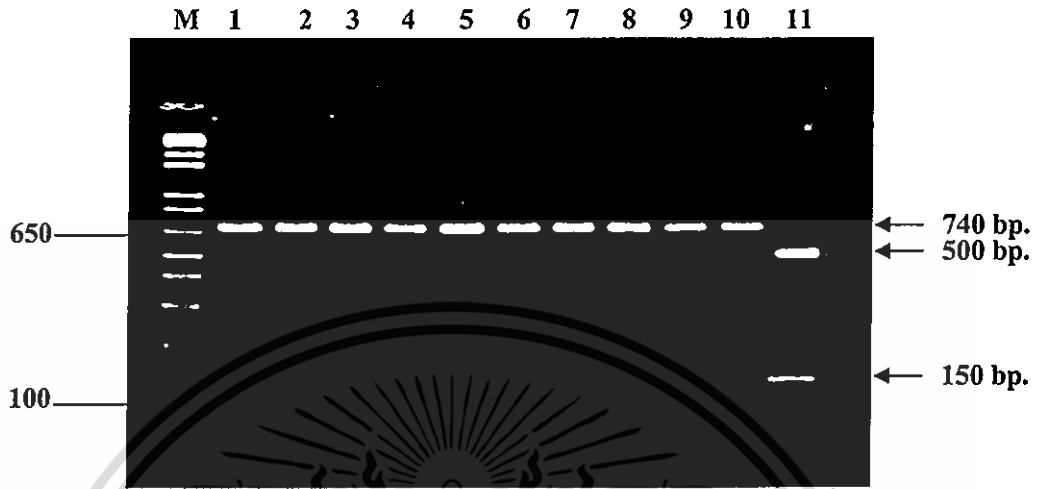
ภาพที่ 4.12 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

#### 4.4.4 ผลของการทำ PCR/RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0

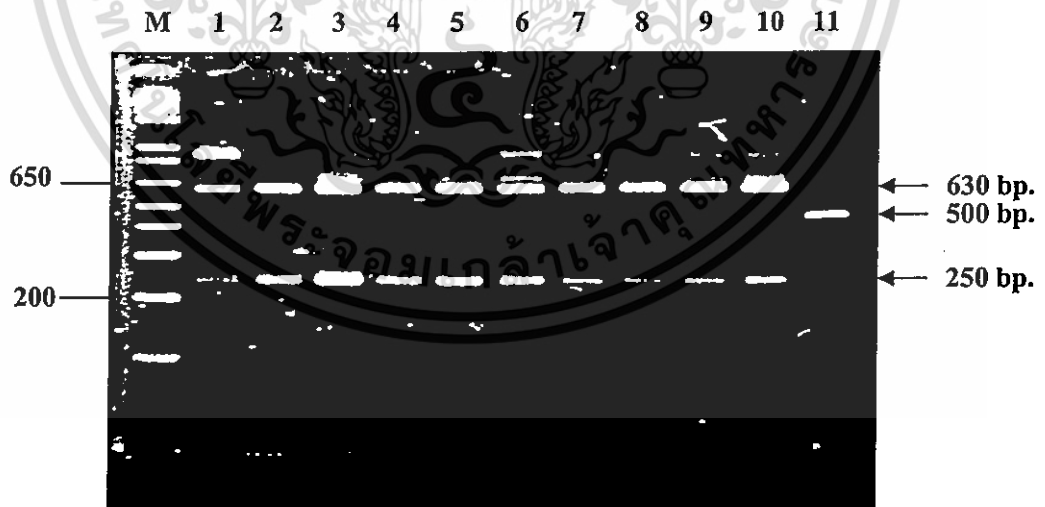
##### 4.4.4.1 ผลของ PCR/RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *DdeI*

ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *DdeI* ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรม และฟิวแซนท์ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 ที่มีขนาดประมาณ 740 คู่เบส เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR แต่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัว ได้เป็น 3 ขนาด ที่มีประมาณ 500, 150 และ 90 คู่เบส (ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 90 คู่เบสไม่สามารถตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2.0) (ภาพที่ 4.13) ส่วนในบริเวณ IGS เอนไซม์ *DdeI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรม และฟิวแซนท์ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ

OT9 ที่มีขนาดประมาณ 630, 250 และ 50 คู่เบส และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 500 และแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กๆ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ในอะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 (ภาพที่ 4.14)



ภาพที่ 4.13 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DdeI* โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

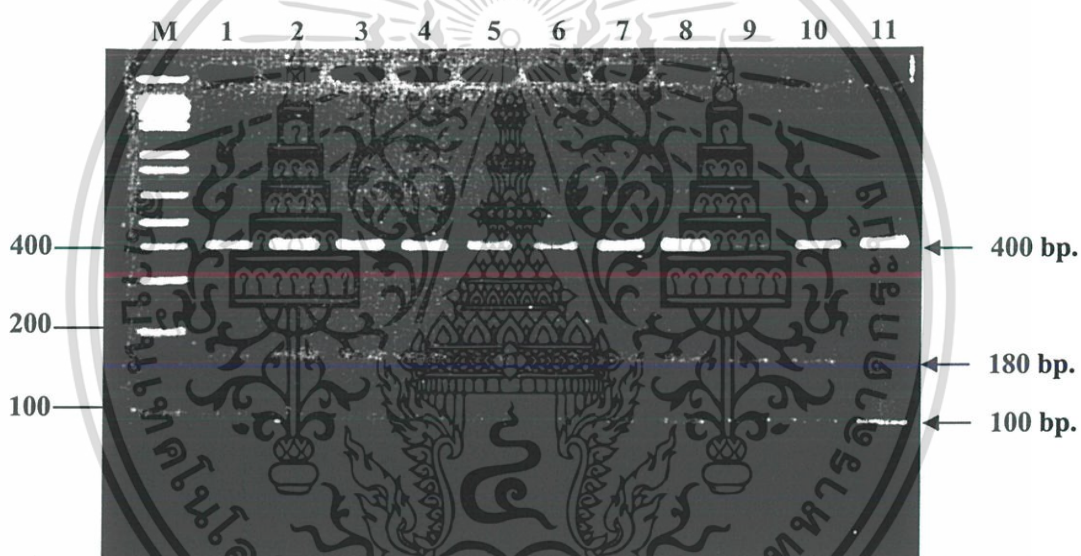


ภาพที่ 4.14 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DdeI* โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

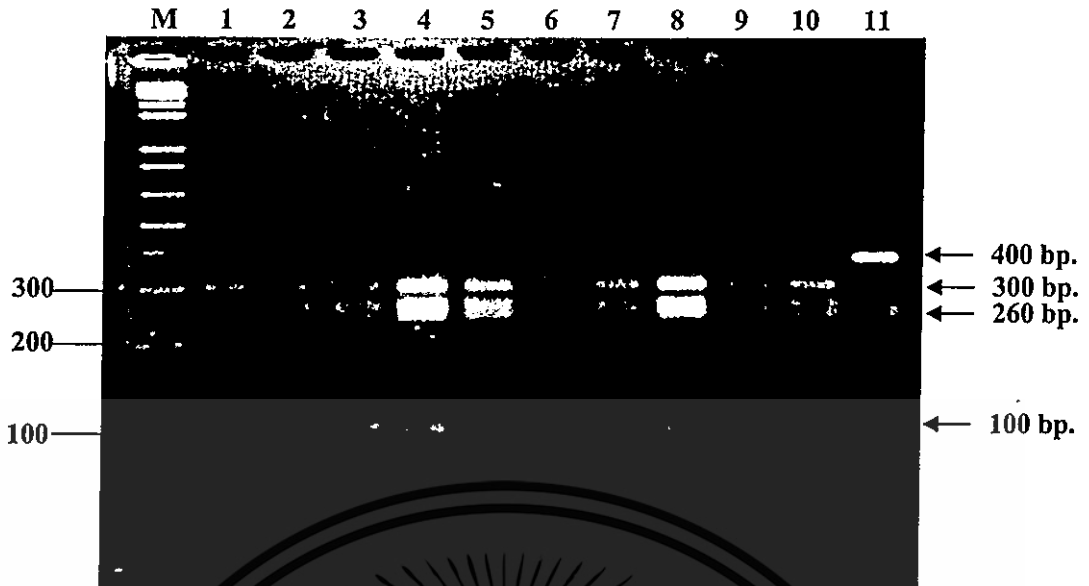
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.4.2 ผลของ PCR/RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI*

ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *Sau3AI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมและฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่มีขนาดประมาณ 400, 180, 100 และ 60 คู่เบส (ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 60 คู่เบสไม่สามารถตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2.0) และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 420, 100 และขนาดเล็กๆ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2.0 (ภาพที่ 4.15) ส่วนในบริเวณ IGS เอนไซม์ *Sau3AI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมและฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่มีขนาดประมาณ 300, 270, 260 และ 100 คู่เบส และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัว ที่มีขนาดประมาณ 400, 260 และ 70 คู่เบส (ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 70 คู่เบสไม่สามารถตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2.0) (ภาพที่ 4.16)



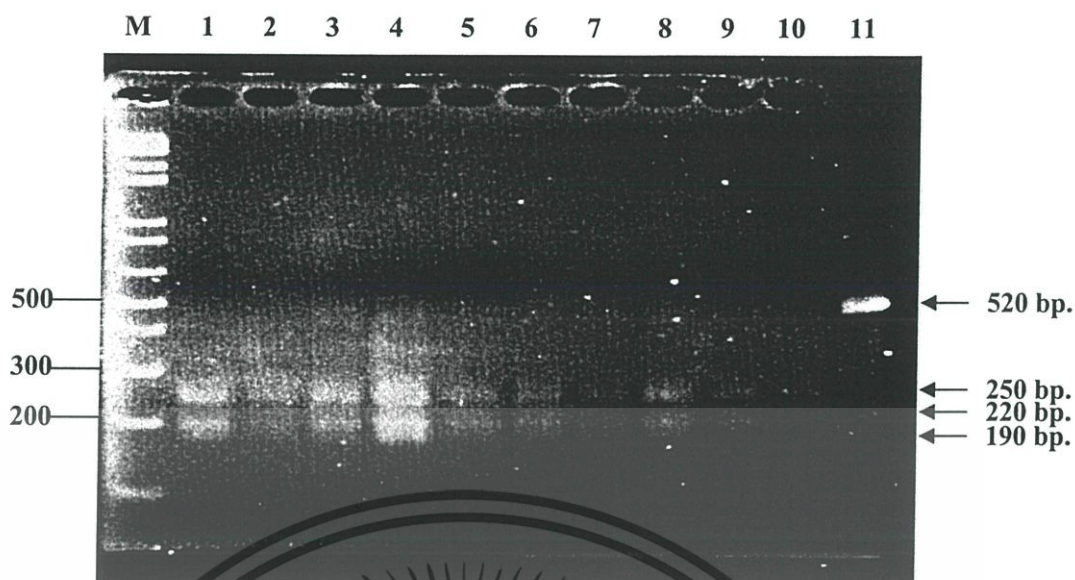
ภาพที่ 4.15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว



ภาพที่ 4.16 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

#### 4.4.4.3 ผลของ PCR/RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII*

ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *HaeIII* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมและฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่มีขนาดประมาณ 250, 210, 190 และ 90 คู่เบส (ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 90 คู่เบสไม่สามารถตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2.0) และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 520 และ 220 คู่เบส (ภาพที่ 4.17) ส่วนในบริเวณ IGS เอนไซม์ *HaeIII* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมและฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่มีขนาดประมาณ 410, 340 และ 180 คู่เบส แต่ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 930 คู่เบสของเห็ดนางรมหัวได้ (ภาพที่ 4.18)



ภาพที่ 4.17 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็นนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็นนางรมหัว



ภาพที่ 4.18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็นนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็นนางรมหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.4.4 ผลของ PCR/RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III

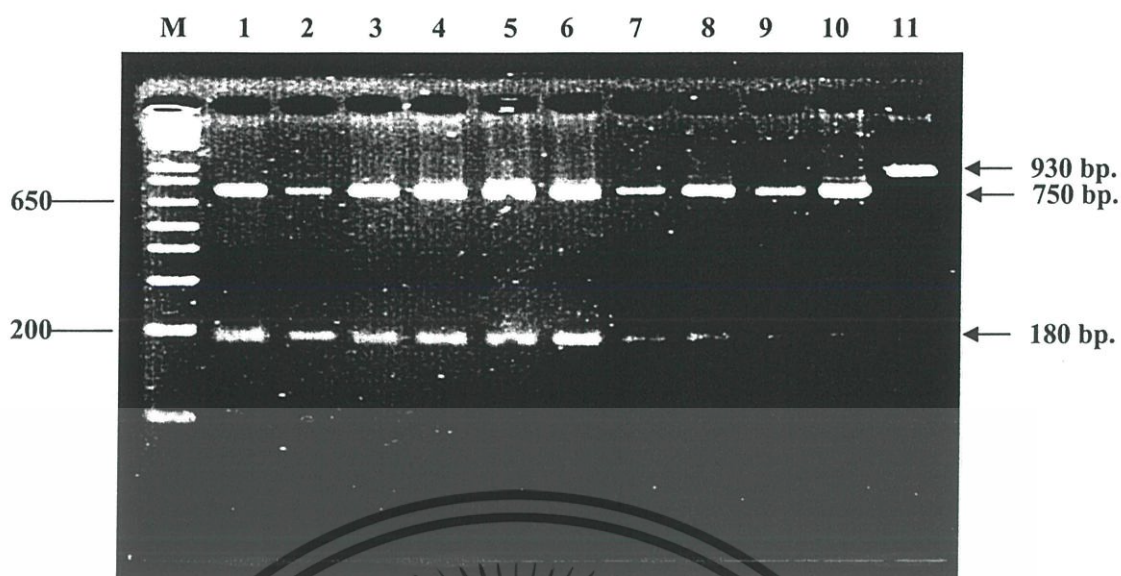
ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *Hind*III ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมฟิวแซนททั้ง 9 สายพันธุ์ และเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 740 คู่เบส เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR (ภาพที่ 4.19) ส่วนในบริเวณ IGS เอนไซม์ *Hind*III สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมและฟิวแซนททั้ง 9 สายพันธุ์ ที่มีขนาดประมาณ 750 และ 180 คู่เบส แต่ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 930 คู่เบส เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR (ภาพที่ 4.20)

#### 4.4.4.5 ผลของ PCR/RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมฟิวแซนททั้ง 9 สายพันธุ์ และเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 350, 310 และ 80 คู่เบส (ภาพที่ 4.21) ส่วนในบริเวณ IGS เอนไซม์ *Eco*RI ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดทุกสายพันธุ์ที่มีขนาดประมาณ 930 คู่เบส เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR (ภาพที่ 4.22)



ภาพที่ 4.19 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

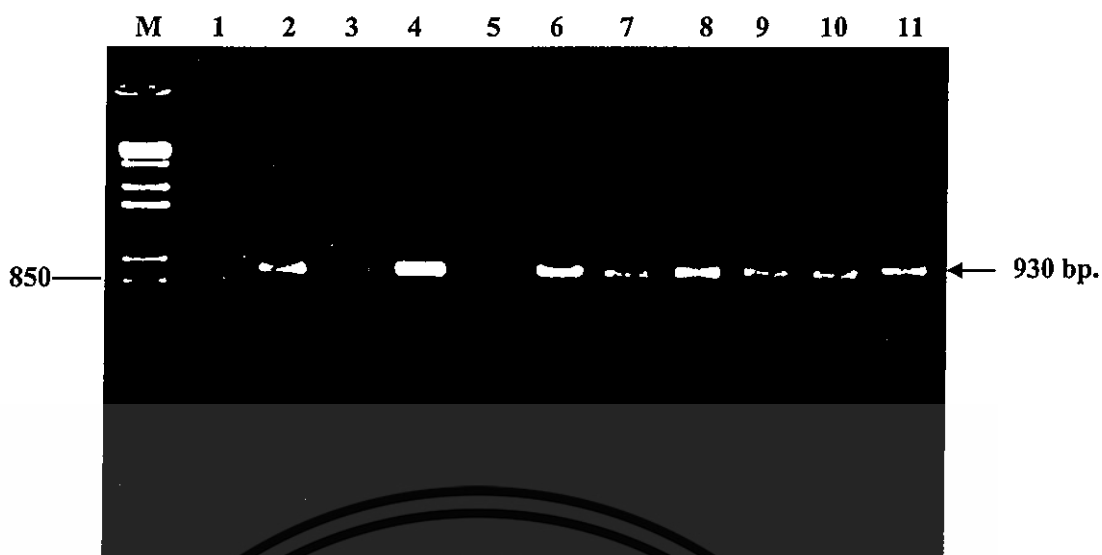


ภาพที่ 4.20 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว



ภาพที่ 4.21 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

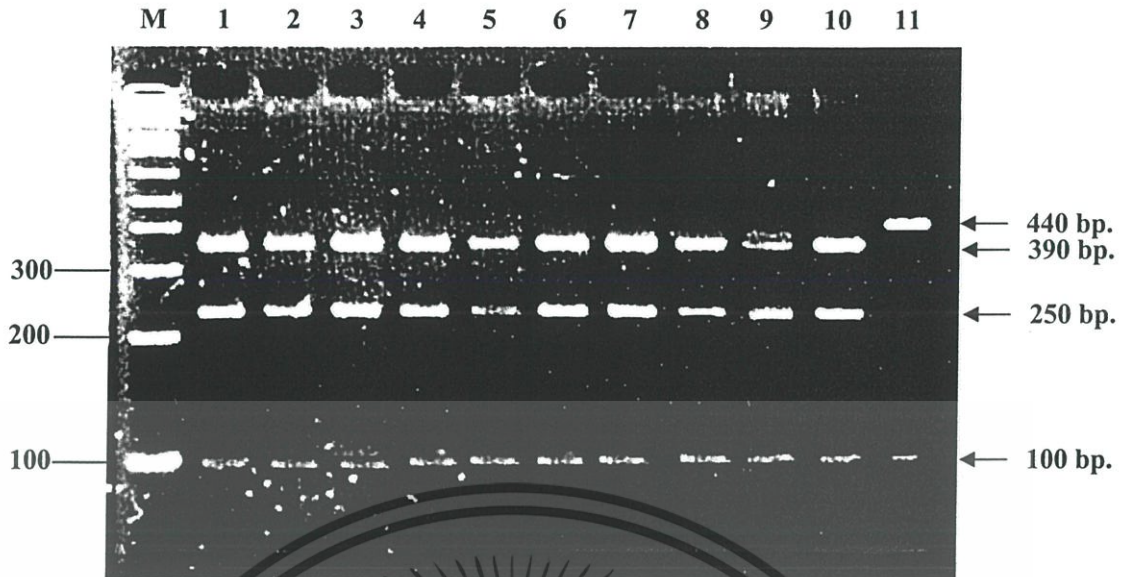
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.22 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

#### 4.4.4.6 ผลของ PCR/RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI*

ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *HinfI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมและฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่มีขนาดประมาณ 390, 250 และ 100 คู่เบส และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัว ที่มีขนาดประมาณ 440, 100 และดีเอ็นเอขนาดเล็กกว่า 100 คู่เบส ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2.0 (ภาพที่ 4.23) ส่วนในบริเวณ IGS เอนไซม์ *HinfI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมและฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่มีขนาดประมาณ 220, 200, 180, 100, 90, 80 และ 60 คู่เบส และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 350, 220 และ ดีเอ็นเอขนาดเล็กกว่า 100 คู่เบส ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบได้ในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 2.0 (ภาพที่ 4.24)



ภาพที่ 4.23 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*II โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว



ภาพที่ 4.24 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*II โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

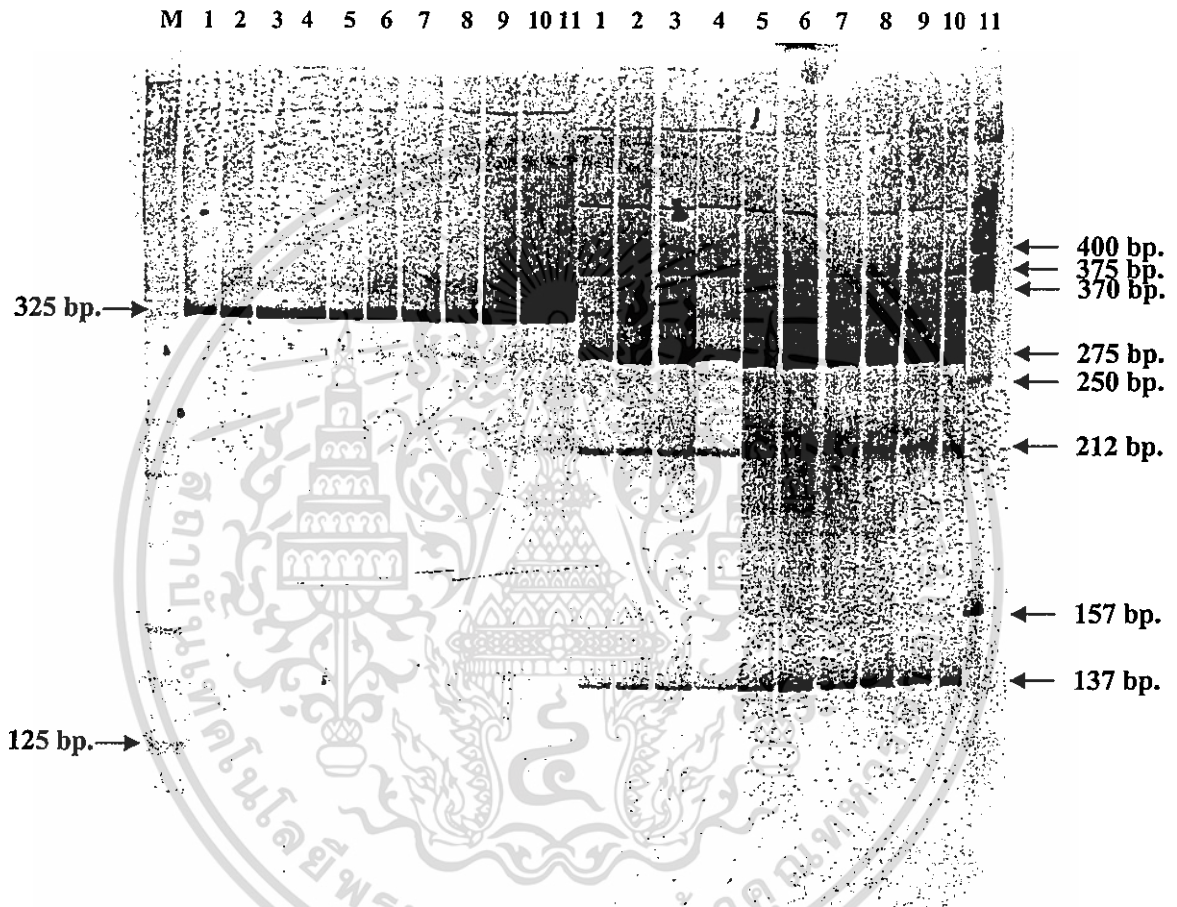
#### 4.4.5 ผลของ PCR / RFLP ของ rDNA ที่มีขนาดเล็กกว่า 400 คู่เบส โดยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตร โฟรีซิส ความเข้มข้นร้อยละ 6.0

4.4.5.1 ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *EcoRI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอและตรวจพบแถบดีเอ็นเอต่างๆ ของเห็ดนางรมและฟิวแซนทั้ง 8 สายพันธุ์ที่เหมือนกัน ที่มีขนาดประมาณ 337, 308, 168 และ 146 คู่เบส สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของฟิวแซนที่ OT4 ที่มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 350, 325, 265, 200 และ 172 และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 337, 316, 170 และ 148 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *HindIII* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรม ฟิวแซนทั้ง 9 สายพันธุ์และเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 225 คู่เบส (ภาพที่ 4.25)



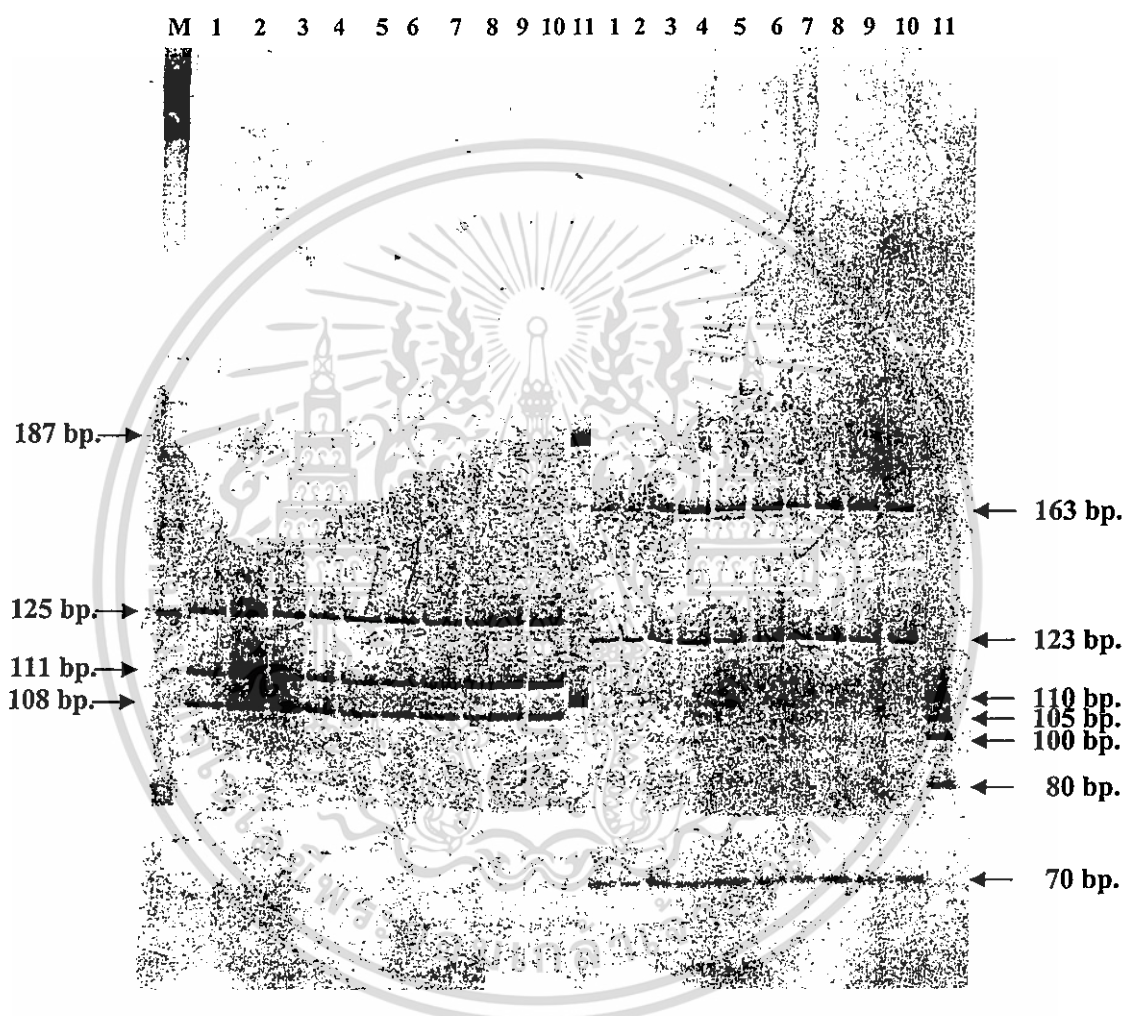
ภาพที่ 4.25 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ตามลำดับ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

4.4.5.2 ในบริเวณ IGS เอนไซม์ *EcoRI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์และเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 325 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *HindIII* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมและฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ที่มีขนาดประมาณ 375, 275, 212 และ 137 คู่เบส และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 400, 370, 250 และ 157 คู่เบส (ภาพที่ 4.26)



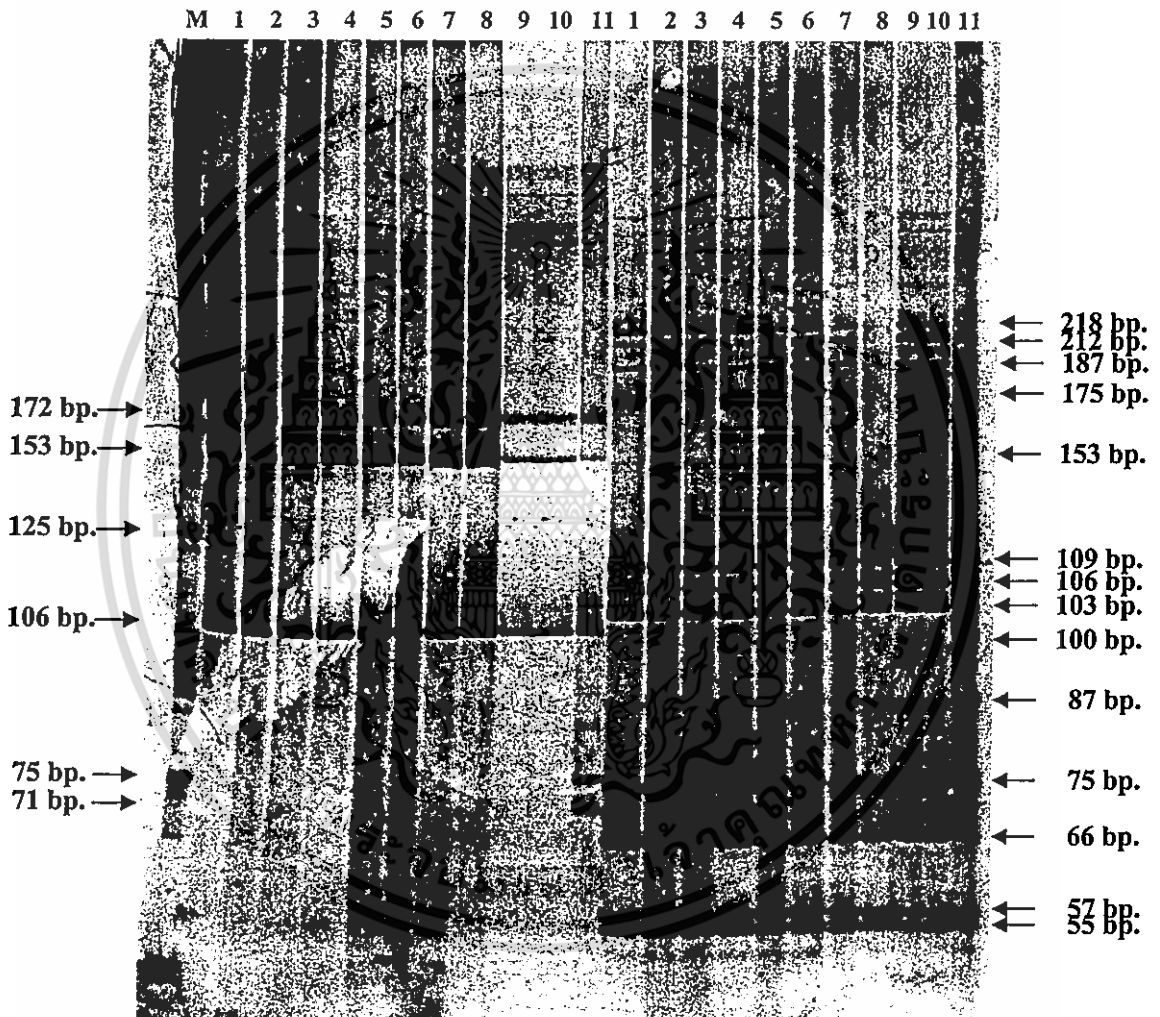
ภาพที่ 4.26 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ตามลำดับ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

4.4.5.3 ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอเห็นคนางรมและฟิวแซนที่ทั้ง 9 สายพันธุ์ที่มีขนาดประมาณ 126, 111 และ 108 คู่เบส และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็นคนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 187 และ 109 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *Hin*fi พบว่าเห็นคนางรมฟิวแซนที่ทั้ง 9 สายพันธุ์ที่มีขนาดประมาณ 163, 123 และ 70 คู่เบส และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็นคนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 110, 105, 100 และ 80 คู่เบส (ภาพที่ 4.27)



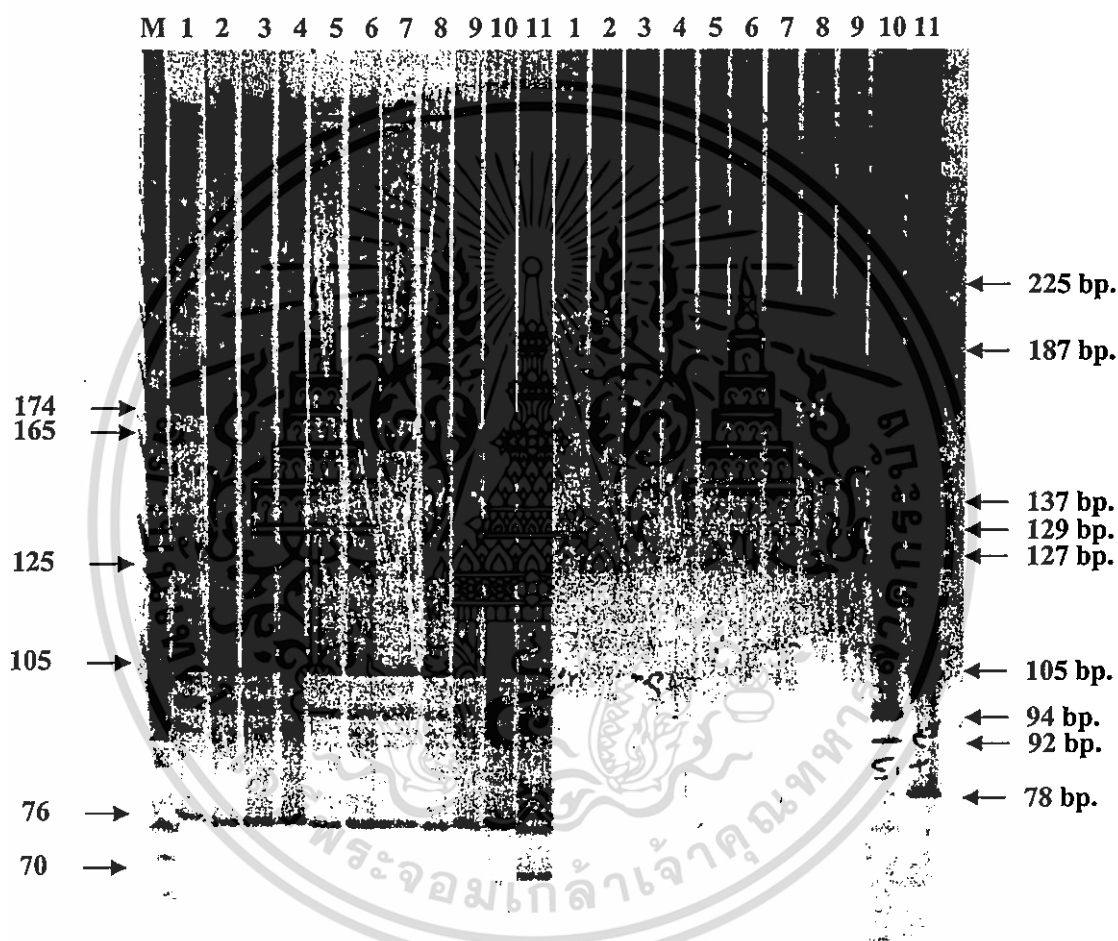
ภาพที่ 4.27 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III และ *Hin*fi ตามลำดับโดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็นคนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็นคนางรมหัว

4.4.5.4 ในบริเวณ IGS เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรม และฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ที่มีขนาดประมาณ 172, 153 และ 106 คู่เบส และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 172, 153, 106, 75 และ 71 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *Hin*fi สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรม และฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ที่มีขนาดประมาณ 218, 212, 187, 175, 109, 106, 103, 87, 75, 66, 57 และ 55 คู่เบส และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 218, 187, 175, 153, 109, 106, 103, 100, 87, 75, 66, 57 และ 55 คู่เบส (ภาพที่ 4.28)



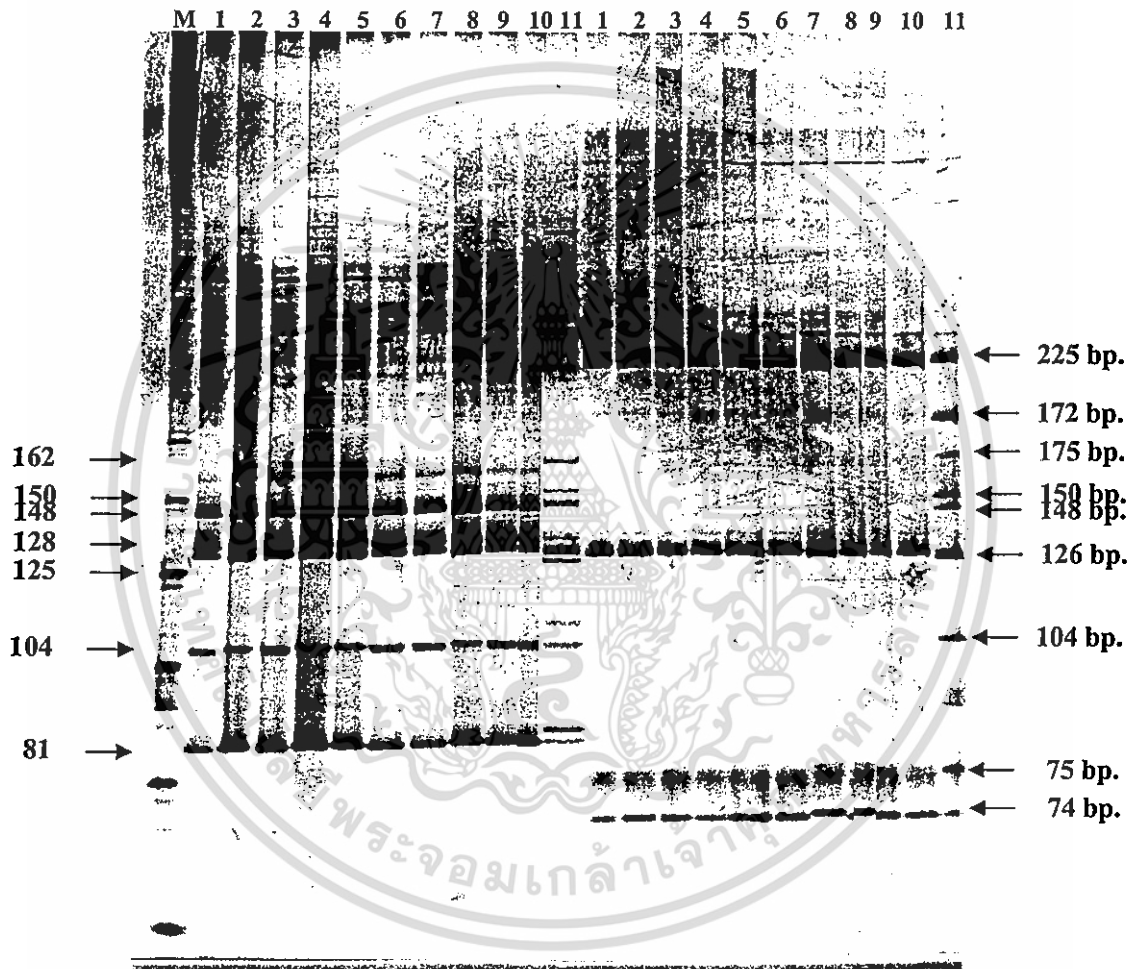
ภาพที่ 4.28 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III และ *Hin*fi ตามลำดับ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

4.4.5.5 ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *Sau3AI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอเห็นนางรมและฟิวแซนที่ทั้ง 9 สายพันธุ์ที่มีขนาดประมาณ 174, 165, 105 และ 76 คู่เบส และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 175, 79, 77, 75 และ 70 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *DdeI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมและ ฟิวแซนที่ทั้ง 8 สายพันธุ์ที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 225 คู่เบส สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของฟิวแซนที่ OT9 ที่มีขนาดประมาณ 187, 129, 94 และ 92 และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 137, 127, 105 และ 78 คู่เบส (ภาพที่ 4.29)



ภาพที่ 4.29 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* และ *DdeIII* โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

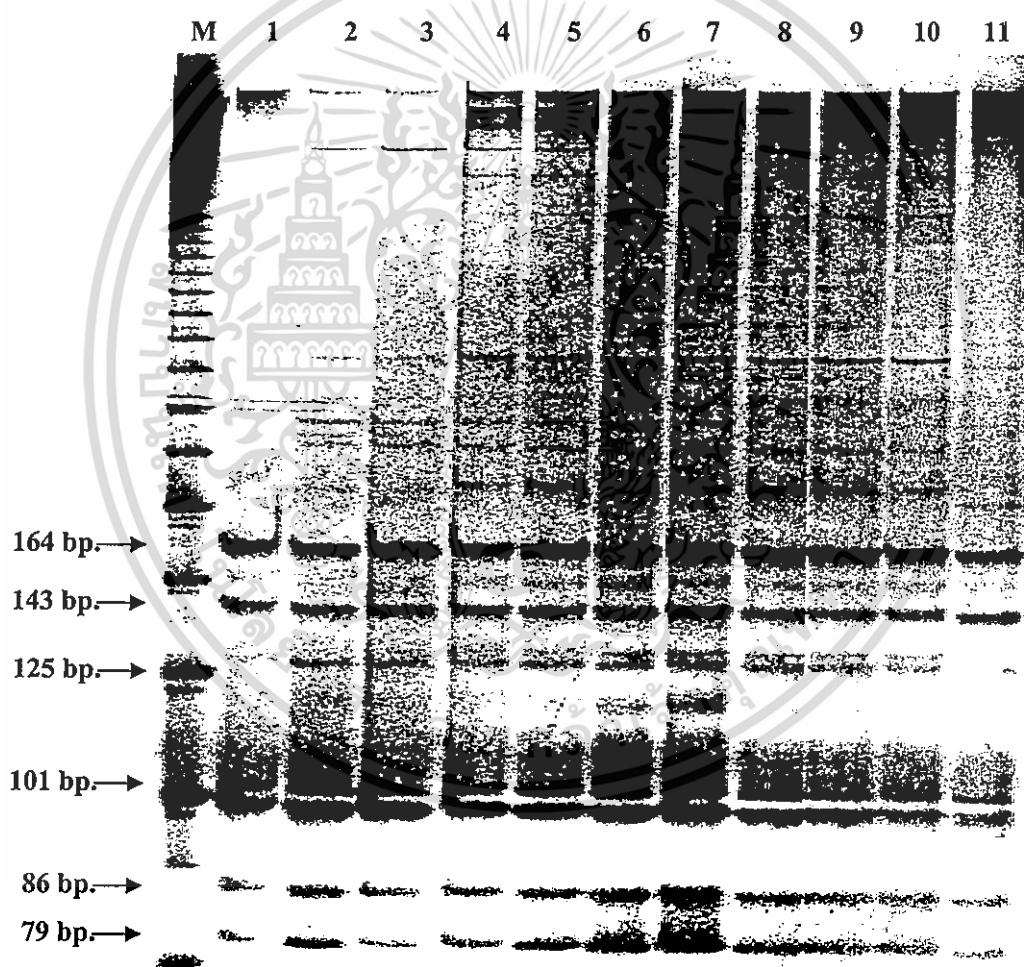
4.4.5.6 ในบริเวณ IGS เอนไซม์ *Sau3AI* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอเห็นคนวงมและพิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ที่มีขนาดประมาณ 148, 128, 127, 104 และ 81 คู่เบสและสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 162, 150, 149, 128, 127, 125, 108, 104, 82 และ 81 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *DdeIII* สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมและพิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ที่มีขนาดประมาณ 225, 127, 104, 75 และ 70 คู่เบส และสามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่มีขนาดประมาณ 225, 172, 150, 148, 126, 104, 75 และ 70 คู่เบส (ภาพที่ 4.30)



ภาพที่ 4.30 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RFLP/PCR บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* และ *DdeIII* โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

4.4.6 ผลจากการศึกษาจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 6 คู่ คือ A6B4, A6B5, A7B4, A7B7, A5B4 และ A9B9 แล้ววิเคราะห์โดยวิธีโพลีอะครีลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสความเข้มข้นร้อยละ 6.0

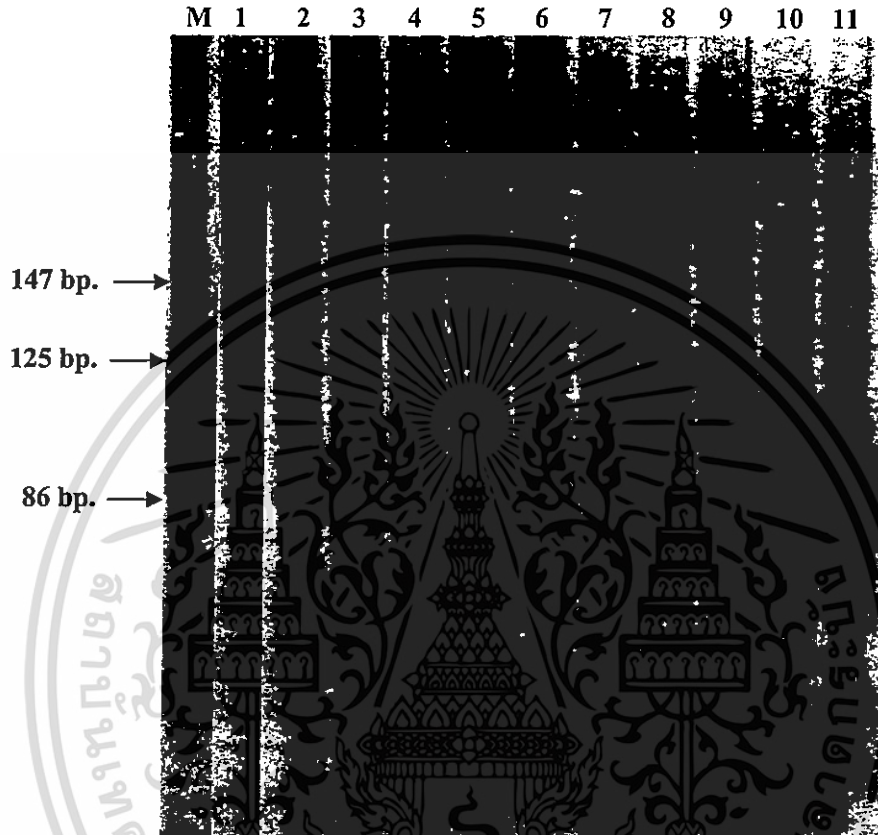
4.4.6.1 ผลจากการใช้ไพรเมอร์ A6B4 ในการตรวจสอบพิวแซนซ์ทั้ง 9 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว พบว่าเห็ดนางรมตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 164, 143, 101, 100, 86 และ 79 คู่เบส และพิวแซนซ์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 164, 143, 126, 101, 100, 86 และ 79 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมหัวตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 175, 164, 143, 126, 101, 100, 86 และ 79 คู่เบส (ภาพที่ 4.31)



ภาพที่ 4.31 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP ด้วยไพรเมอร์ A6B4 โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

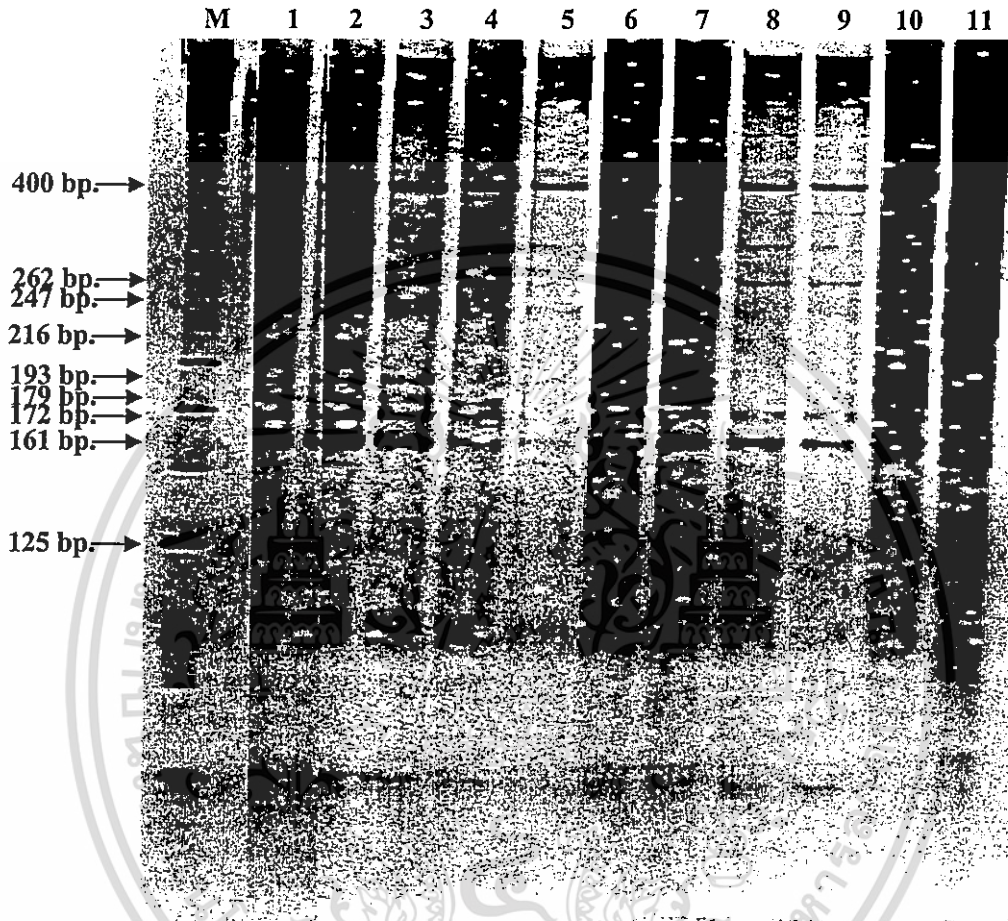
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.6.2 ผลจากการใช้ไพรเมอร์ A6B5 ในการตรวจสอบพีวแซนที่ทั้ง 9 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว พบว่าเห็ดนางรม พีวแซนที่ทั้ง 9 สายพันธุ์และเห็ดนางรมหัว ตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 147 และ 86 คู่เบส (ภาพที่ 4.32)



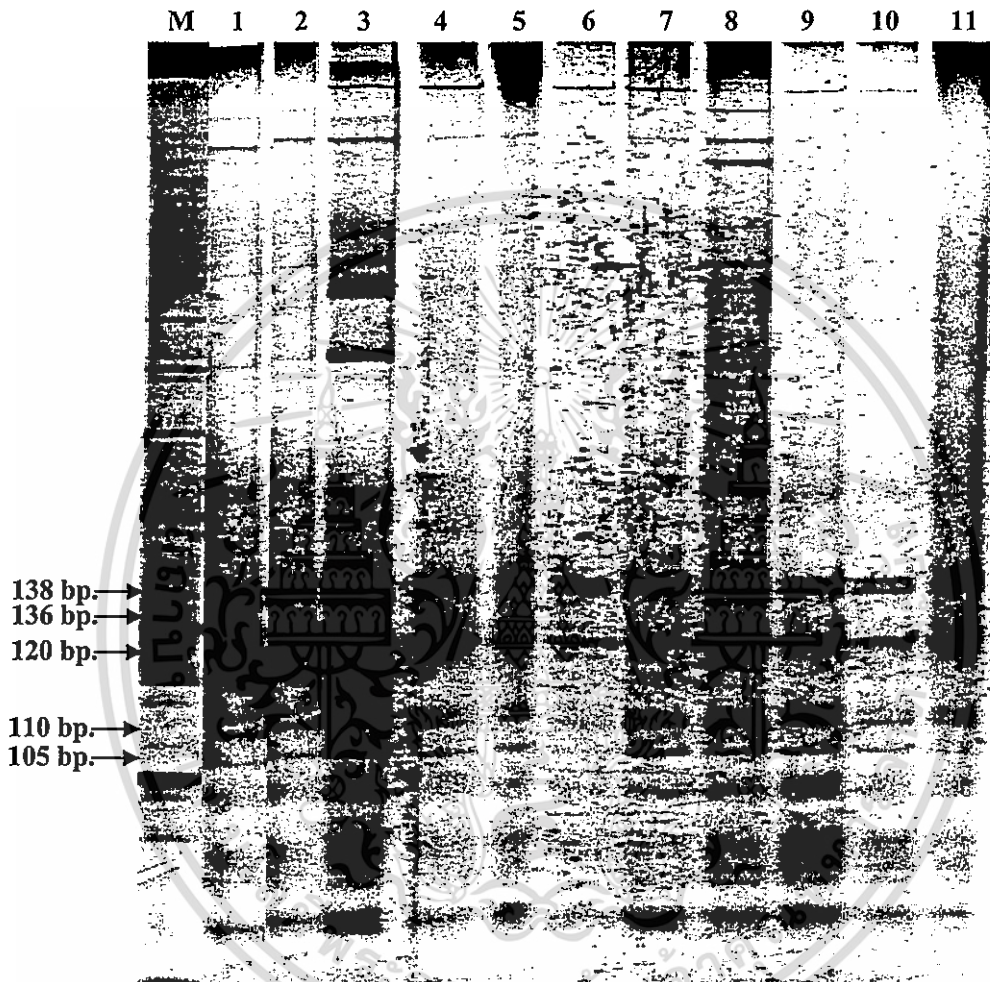
ภาพที่ 4.32 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP ด้วยไพรเมอร์ A6B5 โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

4.4.6.3 ผลจากการใช้ไพรเมอร์ A7B4 ในการตรวจสอบฟิวแซนที่ทั้ง 9 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว พบว่าเห็ดนางรมและฟิวแซนที่ทั้ง 9 สายพันธุ์ ตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 400, 262, 247, 193, 179, 172 และ 161 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมหัว ตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 400, 216, 161 และ 153 คู่เบส (ภาพที่ 4.33)



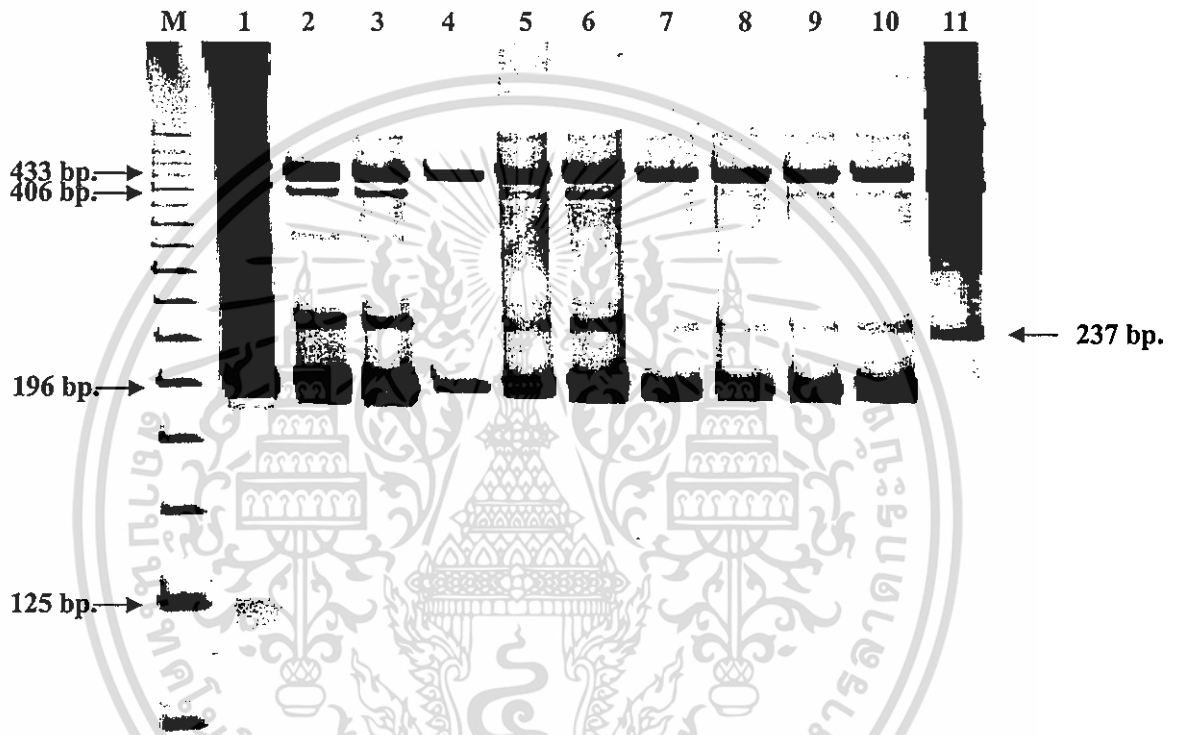
ภาพที่ 4.33 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP ด้วยไพรเมอร์ A7B4 โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

4.4.6.4 ผลจากการใช้ไพรเมอร์ A7B7 ในการตรวจสอบพีวแซนที่ทั้ง 9 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว พบว่าเห็ดนางรมและพีวแซนที่ทั้ง 9 สายพันธุ์ ตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 138, 136, 110, 105 และ 83 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมหัวตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 138, 136, 110 และ 83 คู่เบส (ภาพที่ 4.34)



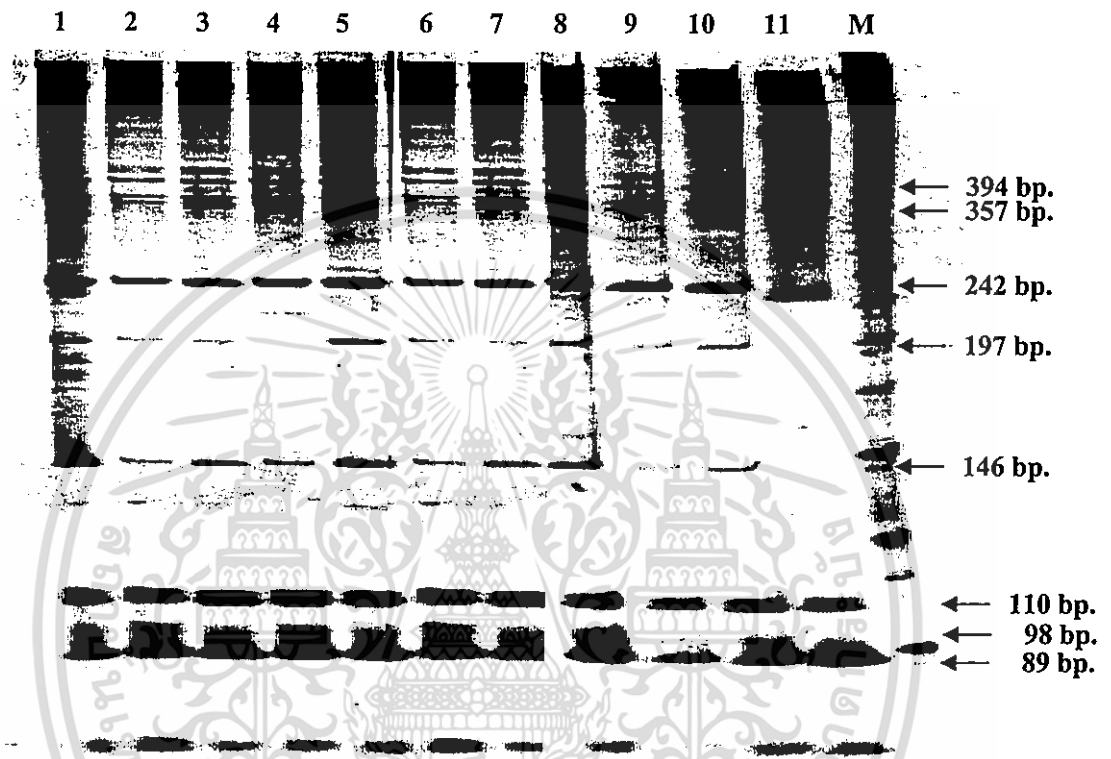
ภาพที่ 4.34 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP ด้วยไพรเมอร์ A7B7 โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

4.4.6.5 ผลจากการใช้ไพรเมอร์ A5B4 ในการตรวจสอบพิวแซนที่ทั้ง 9 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว พบว่าเห็ดนางรมตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 433, 406 และ 196 คู่เบส และพิวแซนที่ทั้ง 9 สายพันธุ์ ตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 433, 406, 237 และ 196 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมหัวตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500, 406, 275 และ 237 คู่เบส ซึ่งแถบดีเอ็นเอขนาด 237 คู่เบสนี้ตรวจพบในพิวแซนที่ แต่ตรวจไม่พบในเห็ดนางรม(ภาพที่ 4.35)



ภาพที่ 4.35 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP ด้วยไพรเมอร์ A5B4 โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

4.4.6.6 ผลจากการใช้ไพรเมอร์ A9B9 ในการตรวจสอบพิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว พบว่าเห็ดนางรมและพิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 394, 357, 242, 197, 146, 110, 98 และ 89 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมหัว ตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 357, 229, 110, 98 และ 89 คู่เบส (ภาพที่ 4.36)



ภาพที่ 4.36 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP ด้วยไพรเมอร์ A9B9 โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว โดยใช้สายพันธุ์โมโนคาร์บอนที่ทราบ mating type พบว่าสามารถทำการรวมโพรโตพลาสต์ได้เฉพาะคู่เห็ดนางรมที่มี mating type เป็น  $A_1B_1$  กับเห็ดนางรมหัวที่มี mating type เป็น  $A_2B_2$  สำหรับการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟิวชันท์ ทำโดยการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล 3 วิธี คือ 1) วิธี polymerase chain reaction / restriction fragment length polymorphisms (PCR/RFLP) ของดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ intergenic spacer (IGS) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1 กับ ITS4 และ O-1 กับ LR12R 2) วิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ O-1 และ 3) วิธี sequence-related amplified polymorphism (SRAP)

ผลการศึกษาพบว่าจากการรวมโพรโตพลาสต์ได้ฟิวชันท์ 9 สายพันธุ์ คือ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 ฟิวชันท์ที่ได้มีสัณฐานวิทยาเหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว และการตรวจสอบลูกผสมจาก rDNA โดยการเพิ่มจำนวนชุดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ของเห็ดนางรม เห็ดนางรมหัว และฟิวชันท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ พบว่ามีขนาดดีเอ็นเอ 740 และ 930 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งการพิจารณาจาก PCR/RFLP ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR เป็นวิธีที่นิยมใช้หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเห็ดราอย่างแพร่หลาย (Henrion และคณะ. 1992 ; Buscot และคณะ. 1996 ; Timonen และคณะ. 1997) และเมื่อนำผลผลิต PCR มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 6 ชนิด (*EcoRI*, *HindIII*, *HaeIII*, *HinfI*, *Sau3AI* และ *DdeI*) พบรูปแบบดีเอ็นเอของเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัวแตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดลูกผสมได้ แสดงว่าฟิวชันท์มี rDNA ของเห็ดนางรม

สำหรับการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ O-1 พบว่าขนาดของดีเอ็นเอแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัวและสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางรม ฟิวชันท์และเห็ดนางรมหัวได้ที่ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอประมาณ 1,600 คู่เบส พบว่าแถบดีเอ็นเอของฟิวชันท์ OT3 ตรงกับแถบดีเอ็นเอของเห็ดนางรม ส่วนแถบดีเอ็นเอของฟิวชันท์ที่เหลือ (OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9) ตรงกับแถบดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัว นอกจากนี้ที่แถบดีเอ็นเอประมาณ 400 คู่เบส พบว่าเกิดแถบเฉพาะนางรมหัวและฟิวชันท์เท่านั้น แสดงว่าฟิวชันท์ทั้งหมดเป็นลูกผสมระหว่างการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว ซึ่งสามารถยืนยันได้จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค sequence-related amplified

polymorphism (SRAP) ด้วยคู่ไพรเมอร์ A5B4 ที่ตำแหน่งประมาณ 237 คู่เบส ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอในเห็ดนางรมหัวและฟิวแซนธ์ แต่ไม่ตรวจพบในเห็ดนางรม

จากผลการทดลองด้วยวิธีการเทคนิคทางชีวโมเลกุลส่วนใหญ่ พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอของฟิวแซนธ์ที่ได้มีความเหมือนเห็ดนางรมมากกว่าเห็ดนางรมหัว ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่าเห็ดลูกผสมที่เป็น heterokaryon เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ที่เป็นแบบ somatogamy ไม่ได้เกิดจากการรวมกันของเซลล์สืบพันธุ์ ทำให้เกิดกลุ่มเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียสที่ประกอบด้วยนิวเคลียสของเห็ดนางรม และเห็ดนางรมหัวมาอยู่รวมกัน เมื่อเจริญเป็นเส้นใยหนึ่งเส้น (hyphae) ภายในเส้นใยจะมีโครงสร้างของผนังขวาง (septum) ชนิด dolipore ซึ่งมีลักษณะคล้ายโดนัทหรือพระจันทร์เสี้ยว ใกล้จุดศูนย์กลางของผนังขวางจะมี perforated membrane ที่มีชื่อว่า septal pore cap ซึ่งพัฒนามาจาก endoplasmic reticulum โดยมีลักษณะเป็นแผ่นขนานไปกับผนังขวางทั้งสองด้าน รูปบน perforated membrane นี้สามารถเปิดขยายหรือหดแคบลงได้ เพื่อควบคุมการไหลผ่านของไซโทพลาสซึมและออร์แกเนลล์ต่างๆ จากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งยกเว้นนิวเคลียส แต่บางครั้งนิวเคลียสก็สามารถผ่านไปอีกเซลล์หนึ่งได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าในฟิวแซนธ์ทั้ง 9 สายพันธุ์จะเกิดการไหลเวียนของไซโทพลาสซึมรวมทั้งนิวเคลียสของทั้งเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัวที่ไม่เท่ากัน นอกจากนี้ในสถานะที่เพาะเห็ดในการทดลอง เห็ดนางรมหัวซึ่งเป็นเห็ดที่มีการเจริญเติบโตช้ากว่าเห็ดนางรม ดังนั้นเห็ดนางรมหัวจึงใช้เวลาในการแบ่งนิวเคลียสนานกว่าเห็ดนางรม จึงทำให้ลูกผสมมีดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวน้อยกว่าของเห็ดนางรม ซึ่งส่งผลให้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสม รูปแบบดีเอ็นเอของฟิวแซนธ์ส่วนใหญ่จึงเหมือนเห็ดนางรมมากกว่าเห็ดนางรมหัว

## บทที่ 6

# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

### สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อพิจารณาจากการเจริญเติบโตของเส้นใย และสีฐานของดอกเห็ด พบว่าฟิวแซนท์ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 คล้ายคลึงทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว
2. ผลของ PCR/RFLP บริเวณ ITS และ IGS ของ rDNA แสดงให้เห็นว่าฟิวแซนท์ทั้งหมดเหมือนกับเห็ดนางรม และแตกต่างจากเห็ดนางรมหัว
3. ผลจากการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ O-1 พบว่าสามารถตรวจสอบเห็ดนางรม เห็ดนางรมหัวและฟิวแซนท์ได้ที่ตำแหน่งประมาณ 400 และ 1,600 คู่เบส
4. จากการตรวจสอบด้วยวิธี SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ 6 คู่ พบว่าคู่ไพรเมอร์ A5B4 สามารถตรวจสอบเห็ดนางรม เห็ดนางรมหัวและฟิวแซนท์ได้
5. ฟิวแซนท์ที่ได้ทั้ง 9 สายพันธุ์ ต่างก็เป็นลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวทั้งสิ้น และจากการตรวจสอบด้วยเทคนิคดีเอ็นเอทั้ง 3 วิธีดังกล่าว พบว่าฟิวแซนท์ทั้งหมดมีดีเอ็นเอของเห็ดนางรมมากกว่าเห็ดนางรมหัว

### ข้อเสนอแนะ

1. หลังจากทำการรวมโพรโตพลาสต์สำเร็จ ควรมีการตรวจสอบความคงตัวของพันธุกรรมของฟิวแซนท์ที่ได้ โดยติดตามการเจริญเติบโตลดจนการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม
2. ควรทำการตรวจสอบที่ละเอียดโดยการใช้เทคนิค sequencing ของแถบดีเอ็นเอเพื่อให้ทราบชนิดลำดับเบสของทั้งสายพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสม

## บรรณานุกรม

- จรัสรัช มั่นถาวร. 2544. การสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) โดยการรวมโพรโตพลาสต์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จิราพร นิลฉวี. 2546. การศึกษาลักษณะวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus* โดยเทคนิค PCR/RFLP. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชนินันท์ พรสุริยา. 2546. การศึกษาปัจจัยในการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดกินได้บางชนิดชนิดในสกุล *Pleurotus*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ประภัสสร โชคสวนทรัพย์. 2540. การผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- พรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา. 2546. การตรวจสอบลูกผสมสามสายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมเซลล์ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวโดยการใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วัชร อัดถทิพพหลกุล และ มนตรี อัดถทิพพหลกุล. 2539. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology. กรุงเทพมหานคร : คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วีรวัดน์ กนกนุเคราะห์. 2534. การปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดฟางโดยการรวม (*Volvariella volvacea*) โพรโตพลาสต์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สาวตรี ลิมทอง. 2536. โพรโตพลาสต์ฟิวชั่นของจุลินทรีย์. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุมาลี พิษญากร. 2541. เห็ดโคนและลูกผสมฟิวแอสนท์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

- สาทิณี ซื่อตรง. 2546. การศึกษาระบบ Mating Type ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Alexopoulos, C. J. and Mins, C. W. 1979. *Introductory Mycology*. 3<sup>rd</sup> ed. New York : John Wiley & Sons.
- Anne, J. and Peberdy, J.F. 1976. "Induce Fusion of Fungus Protoplast Following Treatment with Polyethylene Glycol." *J. of Gen Microbial*. 92 : 413-417.
- Atlas, R. M. 1993. *Handbook of Microbiological Media*. Florida : CRC Press, INC.
- Anderson, I. C. *et. al.* 2001. "ITS-RFLP and ITS sequence diversity in *Pisolithus* from central and eastern Australian sclerophyll forests." *Myco. Res.* 105(11) : 1304-1312.
- Bunyard, B. A. *et. al.* 1996. "Phylogeny of the Genus *Agaricus* inferred from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA." **Fungal Genetic : Principles and Practices**. New York : Marcel Dekker.
- Buscot, F. *et. al.* 2000. "DNA Polymorphism in Morels : PCR/RFLP Analsis of the Ribosomal DNA Spacers and Microsatellite-Primer PCR." *Myco. Res.* 10(1) : 63-71.
- Clen, M. *et. al.* 2001. "Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* forests and plantation." *Myco. Res.* 105(2) : 138-149.
- Castagna, R., S. Gnocchi, M. Perenzin and M. Heum. 1977. Genetic variability of the wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94:424-430.
- Corner, E. J. H. 1981. "The Agaric Genera *Lentinus*, *Pinus* and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species." *Beihefte Zur Nova Hedwigia*. : 69 : 1-169.
- Gadau, M. E. and Lingg, A. J. 1992. "Protoplast Fusion in Fungi." 101-128. In Arora, D. K., Elander, R. P. and Mukerji, K. G. *Handbook of Applied Mycology Volume 4 : Fungal Biotechnology*. New York : Marcel Dekker, INC.

- Gandeboeuf, D. *et. al.* 1995. "Molecular identification of *Tuber* species and isolates by PCR-based techniques." 151-160. in Stocchi, V. *et. al.* **Biotechnology of ectomycorrhizae.** New York : Plenum Press.
- Gonzales, V. *et. al.* 2002. "Molecular typing of Spanish species of *Amanita* by restriction analysis of the ITS region of the DNA." **Myco. Res.** 106(8) : 903-910.
- Hanson, L. E. and Howell, C. R. 2002. "Biocontrol Efficiency and Other Characteristics of Protoplast Fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*" **Mycology Research** 106(3) : 321-328.
- Hashiba, T. 1992. "Isolation of Fungal Protoplasts" 129-149. In Arora, D. K., Elander, R. P. and Mukerji, K. G. **Handbook of Applied Mycology Volume 4 : Fungal Biotechnology.** New York : Marcel Dekker, INC.
- Henrion, B. *et. al.* 1992. "Rapid Identification of Genetic Variation of Ectomycorrhizal Fungi by Amplification of Ribosomal RNA Genes" **New Phytol.** 122 : 289-298.
- Hilber, O. 1982. "Die Gattung *Pleurotus*." **Bibliotheca Mycologica.** 87 : 1-448.
- Hughes, K. W. *et. al.* 1998. "DNA sequence and RFLP analysis of *Pleurotopsis longinqua* from three disjunct populations." **Mycologia.** 90(4) : 595-600.
- Hughes, K. W. *et. al.* 2001. "Intragenic phylogeny of *Collybia sp. str.* Based on sequence of ribosomal ITS and LSU regions." **Myco. Res.** 105(2) : 164-172.
- Kao, K. N. and Michayluk, M. R. 1974. "A Method for High-Frequency Intergeneric Fusion of Plant Protoplasts." **Planta.** 115 : 355-367.
- Kim, M. *et.al.* 2001 "Use of flow cytometry, fluorescence microscopy, and PCR-based techniques to assess intraspecific and interspecific mating of *Armillaria* species" **Mycol. Res.** 105(2) : 153-163.
- Li, G. and C. F. Quiros. 2001. Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP), a new marker system base on a simple PCR reaction : Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theor. Appl. Genet.** 103 : 455 ; 461.
- Nicholson, M.S. *et.al.* 1997. "Phylogeny of the genus *Lentinula* based on ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism analysis." **Mycologia.** 89(3) : 400-407.
- Okamura, T., Takeno, T., Dohi, M., Yasumasa, I., Hayashi, T., Toyoda, M., Noda, H., Fukuda, S., Horie, N. and Ohsugi, M. 2000. "Development of Mushrooms for Thrombosis

- Prevention by Protoplast Fusion.” **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 89(5) : 474-478.
- Paolocci. *et. al.* 1995. “The polymorphism of the rDNA region typing ascocarp and ectomycorrhizae of truffle species.” 171-184. in Stocchi, V. *et. al.* **Biotechnology of ectomycorrhizae**. New York : Plenum Press.
- Paull, J.G., K.J. Chalwer, A. Karakousis, J.M. Krestchmer, S. Manning and P. Langride. 1998. Genetic diversity in Australlian wheat varieties and breeding material base on RFLP data. *Thero. Appl. Genet.* 96:435-446.
- Peberdy, J. F. 1976. “Isolation and Properties of Protoplasts from Filamentous Fungi.” 39-50. In Peberdy, J.F., Rose, A. H., Rogers, H.J. and Cocking, E. C. **Microbial and Plant Protoplasts**. London : Academic Press INC.
- Pegler. 1983. “Agaric Flora of the Lesser Antilles.” Addition Series IX. London : Kew Bulletin.
- Presson, Y. *et. al.* 1996. “ Identification of Nematode-Trapping Fungi Using RFLP Analysis of the PCR-Amplified ITS Region of Ribosomal DNA.” **Mycol. Res**
- Stadler, M. *et. al.* 2001. “Secondary metabolite profiles, genetic fingerprints and taxonomy of *Daldinia* and allies.” **Mycotaxon**. 127 : 379-429.
- Stamets, P. 1993. “Growing Gourmet and Medicinal Mushroom.” 2<sup>nd</sup> ed. Hong Kong. : Ten Speed Press.
- Stamets, P. 2000. “Growing Gourmet and Medicinal Mushroom.” 1<sup>st</sup> ed. Canada. : Ten Speed Press.
- Takehara, T., Kumata, A. and Aono, S. 1993. “Interpecific Protoplast Fusion between Some Pleurotus species Using Auxotrophic Mutants.” **Mokuzai Gakkaishi**. 39(7) : 855-859.
- Timonen, S. *et. al.* 1997. “ Characterization of the Host Genotype and Fungal Diversity in Scots Pine Ectomycorrhiza from Natural Humus Microcosms using Isozyme and PCR/RFLP Analyses.” **New Phytol.** 135 : 313-323.
- Vilgalys lab. “ ribosomal DNA.” [Online]. Availble : [www. Vilgalys lab.com](http://www.Vilgalyslab.com). 1999.
- Walting, R. 1973. “Identification of the Larger Fungi-Keys”. Amersham : Hulton Educational Publications.
- Wang, F. D. 1992. “Interspecific Protoplast Fusion of Straw Mushroom and Behavior of Regeneration Strains.” **Acta-Agariculture-Shanghai**. 8(1) : 14-19.

## ภาคผนวก ก

# อาหารเลี้ยงเชื้อ สารที่ใช้ในการแยกและรวมโพรโตพลาสต์

### 1. อาหารแข็งมอลต์สกัด (MEA, malt extract agar)

น้ำตาลกลูโคส	20.0	กรัม
มอลต์สกัด	20.0	กรัม
เปปโตน	1.0	กรัม
ผงวุ้น	20.0	กรัม

ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. และ pH ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH แล้วนำไป

นึ่งฆ่าเชื้อ

### 2. อาหารเหลวมอลต์สกัด (malt extract broth)

น้ำตาลกลูโคส	20.0	กรัม
มอลต์สกัด	20.0	กรัม
เปปโตน	1.0	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มล. คนให้ส่วนประกอบทั้งหมดละลายเข้ากัน จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร. นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 3. การเตรียม sodium malate buffer (protoplast buffer) 0.05 โมลาร์

เตรียมสารละลาย ก : สารละลาย sodium malate 0.2 โมลาร์  
ละลาย NaOH 8 กรัม ผสมกับ maleic anhydride 19.6 กรัม ในน้ำกลั่น

แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.

เตรียมสารละลาย ข : สารละลาย NaOH 8 กรัม ในน้ำกลั่นแล้ว

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.

การปรับค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ให้ใช้สารละลาย ก ปริมาตร 50 มล. ผสมกับสารละลาย ข ปริมาตร X มล. (จนกระทั่งได้พีเอชที่ต้องการ) แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 200 มล.

### 4. การเตรียมมอลต์ไมติกสเตบิลไลเซอร์ (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6 โมลาร์ เตรียมโดยละลาย MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 147.84 กรัม

ในสารละลาย sodium malate buffer ปริมาตร 1,000 มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5. สารละลายไลซิ่งเอนไซม์

สารละลายไลซิ่งเอนไซม์ 9 มก./มล. เตรียมโดย ชั่งไลซิ่งเอนไซม์ 9 มก. ละลายใน ออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ 1 มล. คนให้เอนไซม์ละลาย นำไปฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองมิลลิพอร์ (millipore filter) โดยใช้ กระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร. นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 6. calcium chloride 0.05 โมลาร์

ชั่ง calcium chloride 0.7351 กรัม ละลายในสารละลาย sodium maleate buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 0.5 ปริมาตร 100 มล.

## 7. PEG (polyethylene glycol) 6000 ความเข้มข้นร้อยละ 40

ชั่ง PEG น้ำหนักโมเลกุล 6,000 หนัก 40 กรัม ละลายใน calcium chloride $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 100 มล. นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร. นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 8. อาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโตพลาสต์

แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

### 8.1 อาหารที่ใช้เลี้ยงโพรโตพลาสต์ ประกอบด้วย

มอลท์สกัด	20.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ผงวุ้น	30.0	กรัม
เพปโทน	1.0	กรัม
ซูโครส 0.6 โมลาร์	1.0	ลิตร

### 8.2 อาหารที่ใช้เทบับผิวหน้า

มอลท์สกัด	20.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ผงวุ้น	5.0	กรัม
เพปโทน	1.0	กรัม
ซูโครส 0.6 โมลาร์	1.0	ลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปต้มให้อาหารละลายเข้ากับน้ำจืดมีลักษณะใส จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร. นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารที่ใช้เทบับผิวหน้า เป็นอาหารที่เทบับลงบนสารแขวนลอยของโพรโตพลาสต์ดังนั้นต้องใช้ในสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

# การเตรียมบัฟเฟอร์และสารเคมีในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

### 1. 3 M sodium acetate, pH 5.2

ละลาย  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 408.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.2 ด้วย glacial acetic acid ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### 2. 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มล. นำไปอุ่นใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับพีเอช ให้เท่ากับ 7.2 ด้วย 1 N HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

### 3. 0.5 M EDTA

ละลาย disodium ethylene diamine tetraacetate จำนวน 186.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. ใช้ magnetic stirrer ในการหมุนเพื่อช่วยละลาย ปรับพีเอชให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH เข้มข้น (ชนิดที่เป็นเม็ด) และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### 4. 5 M NaCl

ละลาย sodium chloride 292.2 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### 5. 1 M Tris-HCl

ละลาย Tris-base 121.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับพีเอช ด้วย 1 M HCl ใน ปริมาตรดังนี้

พีเอช	7.4	7.6	8.0
HCl (มล.)	70	60	42

ขณะที่ปรับพีเอช ควรให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง เนื่องจากพีเอชของ Tris-HCl จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส pH ของสารละลายจะลดลง 0.03 ยูนิต ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### 6. Tracking dye

เตรียมจากการนำ Tris-HCl 1 โมลาร์ พีเอช 7.6 ปริมาตร 5 มล. EDTA 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 10 มล. ผง bromophenol blue 0.5 กรัม และซูโครส 40 กรัม มาผสมในน้ำกลั่น ปริมาตร 40 มล. ใช้ magnetic stirrer ในการหมุนเพื่อช่วยละลาย แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสารแต่ละตัวดังนี้ : Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช-7.6 EDTA 50 มิลลิโมลาร์ bromophenol blue ร้อยละ 0.5 และซูโครสร้อยละ 40 ตามลำดับ

#### 7. Tris-borate-EDTA (TBE buffer)

ละลาย Tris-base 54 กรัม, boric acid 27.5 กรัม และ EDTA 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0 20 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 1,000 มล.

#### 8. TE-EDTA buffer (TE buffer)

เตรียมจากการนำ 1 M Tris-HCl 1 โมลาร์ พีเอช 8.5 ปริมาตร 1 มล. ผสมกับ EDTA 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 0.2 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ได้จะมีความเข้มข้นของสารละลายเป็น Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ตามลำดับ

#### 9. extraction buffer

นำ Tris-HCl 1 โมลาร์ พีเอช 8.5 ปริมาตร 20 มล. มาผสมกับ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 NaCl 5 โมลาร์ และ SDS ร้อยละ 0.5 อย่างละ 5 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ได้จะมีความเข้มข้นของสารละลายดังต่อไปนี้ : Tris-HCl 200 มิลลิโมลาร์, NaCl 250 มิลลิโมลาร์, EDTA 25 มิลลิโมลาร์ และ SDS ร้อยละ 0.5 ตามลำดับ

## ภาคผนวก ก

### การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหิวให้เรียบร้อย
2. ชั่งผงอะกาโรส 2.0 กรัม มาเติมด้วย TBE buffer 100 มล. ในกรณีที่ต้องการเตรียมเจลร้อยละ 2.0
3. หลอมอะกาโรสเจลโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟให้ผงอะกาโรสละลายจนหมด
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนพอที่จะสามารถสัมผัสได้ แล้วเทลงในถาดที่เตรียมไว้ในข้อ 1. ให้เจลหนาประมาณ 0.5 มม. เสียบหิวลงในเจลเพื่อให้เกิดร่องสำหรับหยอดสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้ เจลแข็งตัว
5. เมื่อเจลแข็งตัวให้ค่อยๆ ดึงหิวออก นำเจลใส่ลงเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเท TBE buffer ให้ท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวเจลประมาณ 2-3 มม.
6. ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร ต่อไปหยอดลงในช่องในแผ่นเจล ให้ช่องที่ 1 เป็นช่องสำหรับการหยอด marker สำหรับเปรียบเทียบ
7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้า 60 วัตต์
8. เมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปพอประมาณ ให้ปิดเครื่อง
9. นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วถ่ายภาพ และทำการบันทึกลงแผ่นดิสก์

## ภาคผนวก ง

### การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลีอะคลีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลีอะคลีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสทำได้โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 6 ชนิด คือ *EcoRI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HindIII*, *Hinfi* และ *Sau3AI* มาเติม AFLP loading buffer (formalimide ร้อยละ 98, EDTA 10 มิลลิโมลาร์, bromphenol blue ร้อยละ 0.1, xylene cyanol ร้อยละ 0.1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตามด้วยการนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีพร้อมสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยขั้นตอนดังนี้

#### 1. การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

1.1 นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาดแล้วเช็ดด้วยเอทานอลร้อยละ 9 ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น

1.2 เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย blind silane (blind silane 1 ไมโครลิตร, glacial acetic 2.5 ไมโครลิตร และเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกระจก

1.3 กระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหุกระต่าย เช็ดให้ทั่ว ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที

1.4 นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้คงที่ สำหรับกระจกแผ่นขนาด 15 × 17 เซนติเมตร ให้ใช้เทปกาวติดกระจก 3 ด้านเพื่อไม่ให้เจลรั่วซึมออกมา ก่อนใช้คลิปหนีบอีกครั้งหนึ่ง ถ้าเป็นกระจกขนาด 20 × 40 ซม. ไม่ต้องติดเทป spacer จะใช้ขนาด 0.35-0.4 มม.

#### 2. การเตรียมโพลีอะคลีลาไมด์เจล

ใช้เจลเข้มข้นร้อยละ 6 (acrylamide gel : bisacrylamide = 19:1, ยูเรีย 7.5 โมลาร์) โดยมีส่วนผสมดังนี้

3.6 ปิดเครื่องควบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นหลังที่เป็นสีเหลืองตรง นำเจลไปข้อมสีหรือถ่าย ดีเอ็นเอลงสู่แผ่นฟิลเตอร์ต่อไป

#### 4. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีปลอดรังสี

การข้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรทมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาล้างในน้ำกลั่นนาน 3-5 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า
2. แช่แผ่นเจลในสารละลาย CTAB ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (หรือใช้น้ำกลั่นก็ได้) นาน 30 นาที เขย่าตลอดเวลา
3. นำแผ่นเจลใส่ในสารละลายแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 นาน 15 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา
4. นำแผ่นเจลมาข้อมในสารละลายซิลเวอร์ที่เตรียมขึ้นใหม่ เป็นเวลา 20 นาที (ดูวิธีเตรียมสารละลายซิลเวอร์ตอนท้ายของวิธีนี้) เขย่าอย่างสม่ำเสมอ
5. นำแผ่นเจลออกมาจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว ไม่เกิน 5 วินาที เพราะถ้าล้างนาน ซิลเวอร์จะหลุดหมด ต้องข้อมใหม่
6. ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสเขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-25 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน (developer = sodium carbonate ร้อยละ 2 และ formaldehyde ร้อยละ 0.02)
7. นำแผ่นเจลมาจุ่มน้ำอย่างรวดเร็ว
8. หยดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ในสารละลายกลีเซอรอลร้อยละ 3 นาน 30 นาที แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

#### วิธีเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 ลิตร

ชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 1.6 กรัม เติมน้ำ 994 มล. และ NaOH เข้มข้น 1 โมลาร์ 4 มล. คนให้ละลายจะได้สารละลายขุ่นสีน้ำตาล ค่อยๆ เติม liquid ammonia เข้มข้นร้อยละ 25 ปริมาตร 2 - 2.4 มล. โดยค่อยๆ เติมทีละหยด จนสารละลายใสจึงใส่เพิ่มอีก 2 หยด

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable : DIAMETER

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	4.21E-33
Corrected Model	52.80553	10	5.280553	196.5755	5.7E-70
Intercept	1505.979	1	1505.979	56062.03	4.21E-33
SPECIES	52.80553	10	5.280553	196.5755	
Error	1.18196	44	0.026863		
Total	1559.966	55			
Corrected Total	53.98749	54			

a. R Squared = .978 (Adjusted R Squared = .973)

Duncan

stain	N	Subset						
		1	2	3	4	5	6	7
PT	5	3.392						
PO	5		3.75					
OT9	5			4.602				
OT4	5				4.846			
OT7	5				4.85			
OT8	5					5.672		
OT6	5					5.728		
OT3	5					5.814		
OT1	5						6.1	
OT5	5							6.322
OT2	5							6.484
Sig.		1	1	1	0.969393	0.203281	1	0.125259

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 2.686E-02.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000 b. Alpha = .05.

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวพรเพ็ญ ลูกสอน เกิดเมื่อวันที่ 10 กันยายน 2521 ที่จังหวัดกาญจนบุรี เป็นบุตรคนที่สองของนายดำรง ลูกสอน และนางเฉลียง ลูกสอน สำเร็จการศึกษาวិทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม ปีการศึกษา 2544



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้