

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดโคนน้อย (*Coprinus sp.*)



เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 67288  
วัน,เดือน,ปี..... 22 พ.ย. 2549

b. 41 24 28 9 x  
i. ....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Mating System of *Coprinus sp.***



**A Spacial project Submitted in Partial of Requirement for the Degree of  
Bechelor of science  
Department of Applied Biology  
Faculty of Science  
King Mongkut's institute of Technology Ladkrabang  
Academic Year 2005**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดโคนน้อย (*Coprinus sp.*)  
นักศึกษา นายผดุงศักดิ์ นันทิมเสง รหัสประจำตัว 45050218  
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์  
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ  
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต  
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์  
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.สุขใจ ชูจันทร์	
กรรมการ ผศ.อารี ฤทธิบุรณ์	
กรรมการ รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต	

พรรณี นพ

(.....)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดโคนน้อย ( <i>Coprinus sp.</i> )
นักศึกษา	นายผดุงศักดิ์ นันติแสง รหัสประจำตัว 45050218
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2548
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.พรรณี จูตาภิชาติ

### บทคัดย่อ

การศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดโคนน้อย (*Coprinus sp.*) ได้ทำโดยการนำเส้นใยจากสายพันธุ์สปอร์เดี่ยว จำนวน 10 สายพันธุ์ มาผสมพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม (conventional method) แบบพบกันหมดทุกคู่ในงานอาหาร PDA และทำการตรวจดูการเกิดแคลมปีคอนเนกชันในบริเวณที่เส้นใยของกลุ่มผสมมาชนกัน ซึ่งถ้าพบแคลมปีคอนเนกชันแสดงว่าเห็ดคู่หนึ่งๆผสมกันได้ ผลการตรวจแคลมปีคอนเนกชันพบว่า เห็ดโคนน้อยมีอัตราส่วนของจำนวนกลุ่มผสมพันธุ์ที่ผสมกันได้ต่อจำนวนกลุ่มผสมพันธุ์ทั้งหมดเท่ากับ  $25 : 55 = 1 : 2.2$  หรือประมาณ  $1 : 2$  จึงแสดงว่า เห็ดโคนน้อยมีประเภทของระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ bipolar (unifactorial) heterothallism

Spacial Project Title	Mating System of <i>Coprinus sp.</i>
Name	Mr Padungsak Nantisang
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2005
Spacial Project Advisor	Associate Professor Dr. Pannee Dhitaphichit

### Abstract

The study of mating system of *Coprinus sp.* was carried out by crossing each pair of the 10 single spore isolates in all combinations, on PDA in plates. Clamp connections were detected as indicators of compatible matings. The presence of clamps after mating indicates sexual compatibility. The ratio of number of compatible matings to number of total matings of *Coprinus sp.* was 25 : 55 (1 : 2.2) or about 1 : 2, indicated that *Coprinus sp.* is a bipolar (unifactorial) heterothallic species.

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.พรรณี จิตาภิชิต ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งให้การดูแลและผลักดันจนการดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณประธาน คณะกรรมการและกรรมการการสอบโครงการพิเศษทุกท่านที่ให้ความเอื้อเฟื้อแนะนำ ขอขอบคุณ กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อเห็ดโคนน้อย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องอุปกรณ์ทุกท่าน ที่ให้ความสะดวกด้านการยืมอุปกรณ์ในการทดลอง ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโท ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ โดยเฉพาะคุณพิรุฬห์พร ศรีมงคล ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง ขอขอบคุณคณะ วิทยาศาสตร์ และพี่ๆฝ่ายธุรการทุกท่านที่ดำเนินการเกี่ยวกับเอกสารต่างๆจนทำให้โครงการวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และสุดท้ายนี้ต้องขอขอบคุณคุณแม่ที่ได้หยิบยื่นทุกสิ่งทุกอย่าง ให้แก่ข้าพเจ้า

ผดุงศักดิ์ นันต์แสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
สารบัญ.....	III
สารบัญตาราง.....	IV
สารบัญภาพ.....	V
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาพิเศษ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของปัญหาพิเศษ.....	1
1.3 ขอบเขตของปัญหาพิเศษ.....	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....	3
2.1 เห็ดราในชั้นเบซิดิโอไมซีทิส ( Basidiomycetes).....	3
2.2 การสืบพันธุ์ของเห็ดราในชั้นเบซิดิโอไมซีทิส.....	6
2.3 วงจรชีวิตของเห็ดราในชั้นเบซิดิโอไมซีทิส.....	9
2.4 ประเภทของระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดรา.....	11
2.5 การคำนวณหาอัตราส่วนของการผสมพันธุ์.....	15
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	18
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	18
3.2 วิธีดำเนินงาน.....	19
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	21
บทที่ 5 สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	23
เอกสารอ้างอิง.....	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	รูปแบบที่แสดงออกเมื่อเส้นใยเกิดการชนกันระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type แบบเทตระโพลา เฮทเทอโรทาลิซิม.....	13
ตารางที่ 2.2	รูปแบบที่เข้ากันได้หรือไม่ได้ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type ชนิดต่างๆของ เห็ดราที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบไบโพลา เฮทเทอโรทาลิซิม.....	15
ตารางที่ 2.3	รูปแบบที่เข้ากันได้หรือไม่ได้ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type ชนิดต่างๆของ เห็ดราที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบเทตระโพลา เฮทเทอโรทาลิซิม.....	15
ตารางที่ 2.4	รูปแบบที่เข้ากันได้หรือไม่ได้ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type ชนิดต่างๆของ เห็ดราที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบออกตะโพลา เฮทเทอโรทาลิซิม.....	16



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 ลักษณะของไฮมีเนียมในเห็ดราชั้นเบซิไดโอไมซิทีส.....	4
ภาพที่ 2.2 ลักษณะของเบซิเดียมในเห็ดราชั้นเบซิไดโอไมซิทีส.....	5
ภาพที่ 2.3 แสดงเบซิไดโอสปอร์ในเห็ดราชั้นเบซิไดโอไมซิทีส.....	6
ภาพที่ 2.4 คลาบายโดสปอร์ในเห็ดราชั้นเบซิไดโอไมซิทีส.....	7
ภาพที่ 2.5 แสดงออยเดียมในเห็ดราชั้นเบซิไดโอไมซิทีส.....	7
ภาพที่ 2.6 แสดงคอร์เมียมในเห็ดราชั้นเบซิไดโอไมซิทีส.....	8
ภาพที่ 2.8 แคลมป์คอนเนกชันของเห็ดราชั้นเบซิไดโอไมซิทีส.....	10
ภาพที่ 2.9 ขั้นตอนของการเกิดแคลมป์คอนเนกชัน.....	10
ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะการชนกันของเส้นใยเห็ดโคนน้อย 2 สายพันธุ์ที่ทำการผสมกัน.....	21
ภาพที่ 4.2 แสดงแคลมป์คอนเนกชัน(บริเวณที่ถูกสรชี) เส้นใยของเห็ดโคนน้อย 2 สายพันธุ์ที่นำมาผสมกัน.....	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาพิเศษ

เห็ด (Mushroom) หมายถึง เห็ดราที่มีขนาดใหญ่ (macrofungi) เพราะสร้างดอกเห็ดที่มีขนาดมองเห็นได้ชัดด้วยตาเปล่า มีขนาดใหญ่เล็กแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของเห็ด เห็ดในสกุล *Coprinus* เป็นเห็ดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในหลายประเทศ ทั้งในประเทศเขตร้อนและประเทศเขตหนาว เพราะมีความสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเห็ดในเมืองไทยนั้นได้ก้าวหน้าไปมากและสามารถที่จะเพาะเห็ดได้หลายชนิด เช่น เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) เห็ดแชมปิญอง (*Agaricus brunescens*) เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) และเห็ดเป่าฮื้อ (*Pleurotus crustidiosus*)

ในอดีตการปรับปรุงพันธุ์เห็ดส่วนใหญ่จะทำได้โดยการคัดเลือกสายพันธุ์ดีที่มีอยู่ในธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงต่อ แต่ในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงโดยใช้หลักวิชาการทางพันธุศาสตร์ ซึ่งได้แก่การผสมพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional method) และการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) โดยเห็ดที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีแบบดั้งเดิมนั้น ควรมีความสามารถในการปรับตัวได้ดีในธรรมชาติ และมีฐานพันธุกรรมกว้าง เพื่อที่จะได้มีลักษณะให้เลือกมากพอสำหรับใช้เป็นคู่ผสมพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ (Raper, 1978) นอกจากนี้ยังต้องอาศัยความรู้พื้นฐานและเทคนิคต่างๆ ทางด้านพันธุศาสตร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องทราบถึงระบบการผสมพันธุ์ (mating system) หรือระบบเพศ (sexual system) ของเห็ดคู่ผสมเพื่อให้ได้ลูกผสมที่สามารถพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดที่มีลักษณะที่ดีของพันธุ์พ่อและแม่ (Miles, 1993) เห็ดโคนน้อยเป็นเห็ดที่สามารถออกดอกได้ตลอดปี การศึกษาถึงประเภทของระบบการผสมพันธุ์ จึงสามารถทำได้ง่ายและสามารถนำความรู้ที่ศึกษาได้มาเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดสกุลนี้ โดยการสร้างสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างชนิด (species) ต่างๆ

### 1.2 วัตถุประสงค์ของปัญหาพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาประเภทของระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดโคนน้อย (*Coprinus sp.*)

1.2.2 เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดสกุล *Coprinus* โดยวิธีดั้งเดิมหรือโดยการรวมโปรโตพลาสต์

### 1.3 ขอบเขตของปัญหาพิเศษ

เพื่อศึกษาถึงประเภทของระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดโคนน้อย (*Coprinus sp.*)

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงประเภทของระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดโคนน้อย (*Coprinus sp.*)
- 1.4.2 ผลการศึกษาจะเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดกินได้ในสกุล *Coprinus* และเห็ดในสกุลอื่นๆ
- 1.4.3 กระตุ้นให้เกิดความสนใจมากขึ้นในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ของเห็ดราขนาดใหญ่



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักการ

#### 2.1 เห็ดราในชั้นเบซิดิโอไมซีทิส ( Basidiomycetes)(สาทิณี, 2005)

เห็ด (Mushroom) เป็นจุลินทรีย์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่าเห็ดรา (fungi) ซึ่งประกอบด้วย เชื้อรา (mold) ยีสต์ (yeast) และเห็ด (mushroom) โดยทั่วไปมักถูกจำแนกเป็น 2 กลุ่ม ตามวิธีการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ ได้แก่ กลุ่มแรก คือ แอสโคไมซีทิส (Ascomycetes) ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 32,267 สกุล และ 264 วงศ์ ส่วนอีกกลุ่ม คือ เบซิดิโอไมซีทิส (Basidiomycetes) ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 22,244 ชนิด 1,428 สกุล และ 156 วงศ์ เห็ดราในชั้นเบซิดิโอไมซีทิสนี้เป็นกลุ่มที่มีวิวัฒนาการมากกว่าเห็ดราในชั้นแอสโคไมซีทิส (ยกเว้น ราสนิม (rust) และราเขม่าดำ (smut) เห็ดราในชั้นเบซิดิโอไมซีทิสมีการสร้างโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ที่สำคัญคือ เบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) ซึ่งสร้างบนโครงสร้างที่เรียกว่า เบซิดียม (basidium) แบ่งเห็ดราในชั้นเบซิดิโอไมซีทิสออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะโครงสร้างการสืบพันธุ์ ได้แก่ Hymenomycetes ซึ่งเป็นพวกที่มีการสร้างเบซิดียมและเบซิดิโอสปอร์แบบเปิด (exposed) เช่น *Agaricus*, *Coprinus* เป็นต้น ส่วน Gasteromycetes จะมีการสร้างเบซิดียมและเบซิดิโอสปอร์แบบปิด (enclose) ซึ่งตัวอย่างได้แก่ เห็ดลูกฟูก (เช่น puffballs, *Clavatia*) เห็ดรังนก (*Astreaus spp.*) และ *Scleroderma* เป็นต้น เบซิดิโอสปอร์ของ Hymenomycetes จะถูกปลดปล่อยออกมาจากดอกเห็ดบริเวณครีป (gills) หรือรู (pore, tube) ที่อยู่ใต้หมวกดอกเห็ด ส่วนสปอร์ของ Gasteromycetes จะอยู่ภายในดอกเห็ดจนกว่าส่วนที่ห่อหุ้มสปอร์จะหลุดออกแล้วสปอร์ก็จะหลุดออกมาเอง (พงศกร สุภการกำจร.2545) ส่วนใหญ่เห็ดราในชั้นเบซิดิโอไมซีทิสมีการดำรงชีวิตแบบซาโปรไฟต์ (saprophyte) แต่บางชนิดอยู่ร่วมกับพืชในลักษณะพึ่งพา (symbiosis) หรือในลักษณะเป็นปรสิต (parasite) ทั้งชนิดและจำนวนของเห็ดยังสามารถนำไปใช้เป็นตัวชี้ในการบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศได้

##### 2.1.1. ลักษณะ โครงสร้างภายนอกของเห็ด (Macroscopic Characteristics of Mushroom )

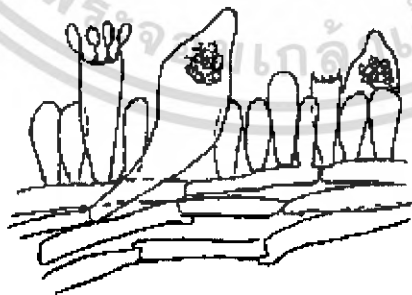
ส่วนประกอบของดอกเห็ดประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้ ก) หมวกเห็ด เป็นส่วนบนของดอกเห็ดที่เจริญเติบโตขึ้นไปในอากาศ เมื่อโตเต็มที่ทางออกคล้ายร่มหรือรูปประฆัง ผิวเรียบ ขรุขระ มีเกล็ดหรือมีขน มีสีแตกต่างกัน โดยขอบหมวกดอกอาจเรียบหรือขาดรุ่งริ่งหรือหยักเป็นคลื่น เนื้อหมวกเห็ดหนาแตกต่างกันไปตามชนิดของความรู้สึกรสจากการสัมผัสหมวกดอกที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแตกต่างกัน เห็ดบางชนิดอาจมีลักษณะเป็นผิวแห้ง ลื่นหรือหนืดๆ เห็ดบางชนิดมีของเหลวไหลซึมเป็นน้ำยาง (latex) สีขาว อาจมีสีเปลี่ยนไป เมื่อมีบาดแผลลึกขนาด ข) ครีบได้หมวกดอก เป็นแผ่นบางๆ อยู่ด้านล่างของหมวกดอกเรียงเป็นรัศมีออกรอบก้าน ครีบมีความหนาบาง และเรียงระยะถี่ห่างแตกต่างกันจำนวนครีบและความยาวแตกต่างกันในเห็ดแต่ละชนิด เห็ดบางชนิดได้หมวกดอกเห็ดแทนที่จะเป็นครีบจะเป็นรู (pore) ซึ่งเป็นรูเปิดของท่อ (tube) เรียกเห็ดประเภทนี้ว่า bolete ค) วงแหวน (annulus หรือ ring) เป็นวงแหวนหรือม่านที่ยึดก้านดอกและขอบดอกไว้เมื่อเป็นดอกอ่อน เมื่อหมวกดอกบานออกเชื้อจะขาดจากหมวกดอก คงเหลือส่วนที่ติดกับก้านเป็นวงแหวน เรียกว่า เยื่อขอบหมวก (inner veil หรือ partial veil) เมื่อดอกเห็ดโตเต็มที วงแหวนของเห็ดบางชนิดจะหลุดเป็นปลอก เห็ดหลายชนิดไม่มีวงแหวน ง) ก้านดอก (stipe หรือ stalk) มีรูปร่าง ขนาด และสีแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของเห็ด ตอนบนยึดติดกับหมวกดอกหรือยึดติดกับครีบ เห็ดบางชนิดมีผิวหนังด้านนอกของก้านขรุขระ มีขน หรือมีเกล็ด บางชนิดมีวงแหวนติดด้านบน เห็ดบางชนิดมีรูกลวงตรงกลางใหญ่หรือเล็กแล้วแต่ชนิด ก้านอาจอยู่ตรงกลางดอกเห็ดหรือเอียงไปด้านใดด้านหนึ่ง เห็ดบางชนิดไม่มีก้าน (เช่น เห็ดเหาะ) แต่บางชนิดมีก้านยาว จ) บริเวณโคนอาจมีปลอกหุ้มโคนหรือเยื่อหุ้มดอกเห็ด (volva) เป็นเนื้อเยื่อชั้นนอก เมื่อดอกเห็ดเจริญขึ้นตอนบนของเนื้อเยื่อดอกเห็ดจะแตกออกเพื่อให้หมวกดอกเห็ดและก้านยึดตัวสูงขึ้น ทำให้เยื่อหุ้มดอกเห็ดยังคงเหลือค้างไว้เป็นรูปถ้วยอยู่โคน เช่น เห็ดฟางและเห็ดระโงก (*Amanita sp.*) บางชนิดเยื่อหุ้มดอกเห็ดไม่เป็นรูปถ้วยแต่เป็นเกร็ดรอบโคนก้าน บางชนิดมีเส้นใหญ่คล้ายเส้นด้าย

## 2.1.2 โครงสร้างภายในดอกเห็ด

### 2.1.2.1 ไฮมีเนียม (hymenium)

ไฮมีเนียมคือชั้นของเนื้อเยื่อที่ทำให้กำเนิดสปอร์ของดอกเห็ดประกอบด้วย ส่วนของ สเตอริกมา (sterigma) และเบซิดิโอสปอร์



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของไฮมีเนียมในเห็ดราชั้นเบซิดิโอไมซีทิส

ที่มา : <http://sevlauqu.club.fr/images/hymenium.gif>

### 2.1.2.2 เบซิเดียมและโครงสร้างของเบซิเดียม

ส่วนใหญ่แล้วเบซิเดียมมีรูปร่างคล้ายกระบอง (club shaped) เกิดจาก ส่วนปลายของเส้นใยเหนือผนังกันที่เป็นแคลมปีคอนเนกชัน (clamp connection) โดยเบซิเดียมในระยะแรกนั้นจะมีลักษณะแคบและยาวเมื่อเจริญต่อไปจะขยายกว้างขึ้น ในขณะที่เดียวกันนิวเคลียสทั้งสองนิวเคลียสที่อยู่ภายในเบซิเดียมเกิดรวมตัวกัน คือเกิดขบวนการแคโรโอแกมี (karyogamy) ได้เป็นไซโกท (zygote) และเกิดการแบ่งตัวต่อไปแบบไมโอซิส (meiosis) ได้นิวเคลียสแบบแฮพลอยด์ (haploid) 4 อัน และที่ปลายจะไปงอก แล้วนิวเคลียสทั้ง 4 อันนี้จะไหลผ่านช่องภายในสเตอริกมาแต่ละอันเข้าไปในเบซิดิโอสปอร์แต่ละอันและท้ายที่สุดได้เป็นเซลล์แฮพลอยด์ปกติแล้วเบซิดิโอสปอร์มี 4 อัน แต่ในเห็ดราบางชนิดอาจมีน้อยกว่าหรือมากกว่าก็ได้ Hawsorth et. Al. (1995) แบ่งชนิดของเบซิเดียมตามรูปร่างเป็น 2 ชนิด คือ Holobasidium คือ เบซิเดียมที่ไม่มีการแบ่งเป็นส่วนๆ เพราะไม่มีผนังกัน และ Phragmobasidium (Heterobasidium) คือ เบซิเดียมที่มีการแบ่งเป็นหลายเซลล์โดยมีผนังกันและบางชนิดเป็นพู (lobe)



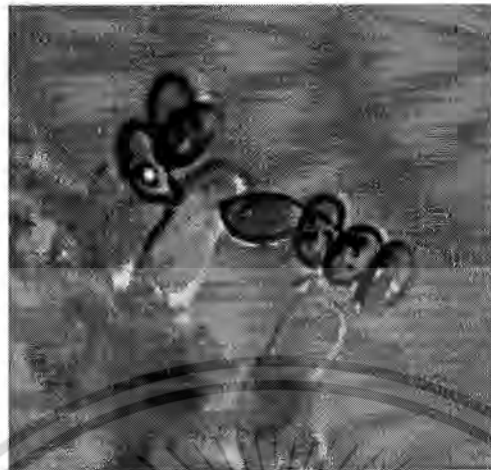
ภาพที่ 2.2 ลักษณะของเบซิเดียมในเห็ดราชั้นเบซิดิโอไมซีทิส

ที่มา : <http://botit.botany.wisc.edu/Interface/web-lessons/Diversity/fungi/Basidium.html>

### 2.1.2.3 เบซิดิโอสปอร์ (Basidiospores)

เบซิดิโอสปอร์ เป็นโครงสร้างส่วนที่เล็กที่สุดที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าโดยปกติเบซิดิโอสปอร์เป็นเซลล์เดี่ยว มีนิวเคลียสเดี่ยวและมีนิวเคลียสแบบแฮพลอยด์ ส่วนรูปร่างนั้นอาจแตกต่างกันออกไป คือ กลม รูปไข่หรือยาวเรียว ผิวสปอร์อาจเรียบ หรือไม่เรียบ โดยขรุขระเป็นหนาม อาจมีสีหรือไม่มีสีก็ได้ หากมีสี อาจเป็นสี เช่น สีขาว หรือน้ำตาล สีเหลืองหรือสีชมพู ซึ่งเมื่อเบซิดิโอสปอร์แก่จะมีหยดน้ำเกิดขึ้นที่ฐานของเบซิดิโอสปอร์ หยดน้ำนี้จะเริ่มขยายตัวขึ้นเรื่อยๆจนทำให้เบซิดิโอสปอร์ ถูกยิงหลุดออกจากสเตอริกมาหลังจากปลดปล่อยสปอร์ออกไปอาจจะแฟบลงหรืออยู่แบบเดิมก็ได้และสเตอริกมาจะไม่เกิดเบซิดิโอสปอร์

ขั้นถัดไป เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมทำให้เบซิดิโอสปอร์งอกเป็นเจอร์มิทิวปี (germ tube) ต่อไป เป็นเส้นใยต่อไป



ภาพที่ 2.3 แสดงเบซิดิโอสปอร์ในเห็ดราชั้นเบซิดิโอไมซิทีส

[http://scarab.cordley.orst.edushroomswebpagetextimagesstro\\_amb\\_micro1b.jpg](http://scarab.cordley.orst.edushroomswebpagetextimagesstro_amb_micro1b.jpg)

## 2.2 การสืบพันธุ์ของเห็ดราในชั้นเบซิดิโอไมซิทีส

เห็ดราเป็นสิ่งมีชีวิตที่ประสบความสำเร็จอย่างสูงในการปรับตัวเพื่อการดำรงเผ่าพันธุ์ เนื่องจากมีความสามารถในการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศสลับกันไป สำหรับเห็ดราชั้นเบซิดิโอไมซิทีสซึ่งเป็นเห็ดราชั้นสูงนั้นจะมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศน้อยกว่าเห็ดราอื่นๆ

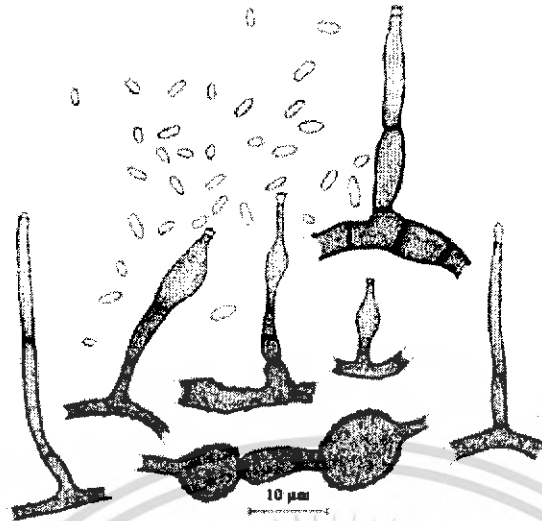
### 2.2.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

เห็ดราในชั้นเบซิดิโอไมซิทีสมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการหักของเส้นใย (fragmentation) และการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) ชนิดต่างๆเมื่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม ดังต่อไปนี้

#### 2.2.1.1 กลามายโดสปอร์ (chlamydospore)

เป็นสปอร์ที่เกิดจากเซลล์ของเส้นใย ที่มีผนังหนาขึ้น ซึ่งต่อมากจะหลุดออกมาเป็นก้อนๆ โดยแต่ละก้อนสามารถเจริญเป็นเส้นใยใหม่ได้และก้อนที่มีผนังหนา คือ กลามายโดสปอร์ ซึ่งสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

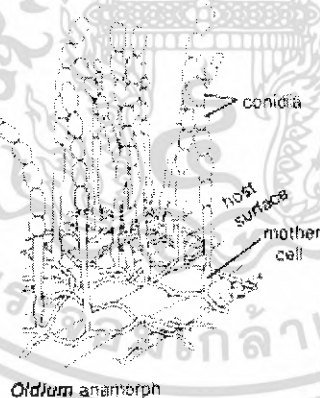


ภาพที่ 2.4 คลามายโดสปอร์ในเห็ดราชั้นเบซิไดโอไมซีทิส

ที่มา : [http://www33a.your-server.co.za/sasppa/images/jan02/feature12\\_2001.gif](http://www33a.your-server.co.za/sasppa/images/jan02/feature12_2001.gif)

#### 2.2.1.2 ออยเดียม (oidium)

เป็นสปอร์ที่เกิดจากการแตกหักของเส้นใยเช่นกัน แต่พวกนี้จะมีผนังบางและเกิดบนก้านสั้นๆ (short branch) ที่เรียกว่า ออยดิโอฟอร์ (oidiophore) พบได้ในเห็ดบางชนิดเช่น เห็ดน้ำหมึก (Coprinus)



ภาพที่ 2.5 แสดงออยเดียมในเห็ดราชั้นเบซิไดโอไมซีทิส

ที่มา <http://www.mycolog.com/oidium.gif>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.2.1.3 คอริเมียม (coremium)

เป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้าย synnema ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบในเห็ดราจำพวก Deuteromycetes ( Fungi Imperferti เช่น สกุล Antromycopsis) โดยมีลักษณะดังต่อไปนี้ ประกอบด้วยก้านที่มีชื่อว่าโคนิดิโอพอร์ (conidiophore) ซึ่งเกิดจากกลุ่มของเส้นใยชนิดเพ็คเทินไฮมา (plectenchyma) ที่อัดกันแน่น มีสีขาวครีม ความสูง 2-4 มิลลิเมตรบริเวณปลายก้านเป็นที่เกิดของกลุ่มโคนิเดียม (conidium) ซึ่งรวมกันทำให้มีลักษณะคล้ายหมวกเก็บ โดยโคนิเดียมจะเกิดเป็นสายลูกโซ่แบบเบซิฟิทอล ซัสเซชัน (basipetal succession) โคนิเดียมมีรูปร่างรีและมีขนาดประมาณ  $9.5-21.5 \times 1.5-6.5$  ( Zervakis. 1998, Esser.1982)



ภาพที่ 1.6 แสดงคอริเมียมในเห็ดราชั้นเบซิฟิโตไมซีทิส

ที่มา : <http://www.apsnet.org/education/llustratedGlossary/PhotosA-D/coremium.htm>

## 2.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเห็ดราส่วนใหญ่ รวมทั้งในเบซิดิโอไมซีทิสจะมีขั้นตอนการเกิดต่อเนื่องกัน 3 ระยะ ดังรายละเอียดต่อไปนี้ ก) พลาสโมแกมี (plasmogamy) หมายถึง การรวมของไซโทพลาซึมของ 2 เซลล์ ทำให้นิวเคลียสของทั้งสองเซลล์นั้นเข้ามาอยู่ในเซลล์เดียวกันของไฮฟา (hypha) ที่เจริญมาจากต่างเซลล์กัน ข) แคริโอแกมี (karyogamy) หมายถึง การรวมกันของนิวเคลียส 2 อันนั้นเข้าด้วยกันได้เป็นไซโกทที่มีนิวเคลียสเป็น  $(2n)$  และ ค) ไมโอซิส (meiosis) หมายถึง การแบ่งนิวเคลียสของไซโกสเพื่อลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งได้เป็นเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์  $(n)$  อีกครึ่งหนึ่งซึ่งในเห็ดราชั้นเบซิดิโอไมซีทิส ระยะแคริโอแกมีจะไม่เกิดขึ้นทันทีหลังพลาสโมแกมีทำให้ไฮฟาที่อยู่ในระยะ  $(n+n)$  เป็นระยะที่นาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 วงจรชีวิตของเห็ดราในชั้นเบซิไดโอไมซิทีส(สுவสันต์ และ สุจลวี, 2001)

วงจรชีวิตของเห็ดราในชั้นเบซิไดโอไมซิทีส มีขั้นตอนดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.3.1 เมื่อดอกเห็ดมีการเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างสปอร์ ที่เรียกว่า เบซิไดโอสปอร์ซึ่งมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (haploid) เมื่อสปอร์ที่แก่จัดถูกคิดหรือปลิวไปตกในบริเวณที่มีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมก็จะงอกเส้นใยออกมาเป็นเส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium)

เส้นใยปฐมภูมิ เป็นเส้นใยที่มีผนังขวาง (septum) กั้นระหว่างแต่ละเซลล์ซึ่งแต่ละเซลล์เหล่านี้สามารถขยายพันธุ์ได้อย่างอิสระ เส้นใยเช่นนี้โดยปกติประกอบด้วยเซลล์ที่มีหนึ่งนิวเคลียสในแต่ละเซลล์จะเป็นนิวเคลียสชนิดเดียวกัน (homokaryon) เส้นใยชนิดนี้อาจขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างคลามายโดสปอร์ ออเบติชม หรือคอร์เมียม ขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ดรา

2.3.2 เมื่อเส้นใยปฐมภูมิที่เข้ากันได้ทางเพศ 2 สายเจริญมาพบกันจะเกิดกระบวนการ plasmogmy ทำให้กลายเป็นเส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium)

เส้นใยทุติยภูมิ เป็นเส้นใยที่มีความสมบูรณ์ทางเพศ โดยสามารถเกิดดอกเห็ดได้เป็นเส้นใยที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryon) และแต่ละเซลล์จะมีนิวเคลียส 2 อันที่ต่างกันทางพันธุกรรมและไม่รวมกัน (dikaryon,  $n+n$ ) บนเส้นใยทุติยภูมินี้จะมีแคลมป์คอนเนกชันหรือแคลมป์ (clamp) แคลมป์เป็นโครงสร้างที่มีรัศมีลักษณะคล้ายตะขอและจะมีนิวเคลียสอันใดอันหนึ่งเคลื่อนที่เข้าไปในส่วนที่ยื่นออกมา จากนั้นนิวเคลียสที่อยู่ในเส้นใยเดิมและที่ส่วนของตะขอจะทำการแบ่งตัว (mitosis) จาก 1 เป็น 2 นิวเคลียส นิวเคลียสที่เกิดใหม่จากทั้งสองจะเคลื่อนที่ไปอยู่บริเวณปลายของเซลล์ พร้อมกันนั้นจะเริ่มมีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่บริเวณส่วนที่งอ ด้านในของตะขอและผนังที่ส่วนปลายตะขอจะละลายทำให้นิวเคลียสทั้งสองไหลมารวมกัน ตะขอนี้จะกลายเป็นปุ่มนูนที่เรียกว่า แคลมป์คอนเนกชัน ซึ่งเป็นลักษณะหนึ่งของเส้นใยทุติยภูมิสามารถขยายพันธุ์ได้อย่างอิสระโดยอาจมีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างคลามายโดสปอร์ ออเบติชม หรือคอร์เมียม เช่นเดียวกันเส้นใยปฐมภูมิ

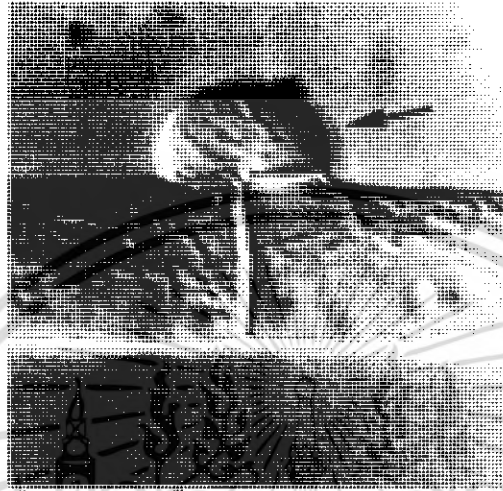
2.3.3 เมื่อเส้นใยทุติยภูมิ เกิดการเจริญเติบโตเต็มที่และมีการสะสมอาหารมากพอ จะเกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มของเส้นใยมากขึ้น ได้เป็นเส้นใยชนิดตติยภูมิ (tertiary mycelium) โดยในแต่ละเซลล์ยังคงมี 2 นิวเคลียส ( $n+n$ ) แต่จะมีการพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดต่อไป

2.3.4 เนื้อเยื่อที่สร้างสปอร์ที่อยู่ตรงครีบดอก (gills) จะสร้างเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายกระบอง (club-shaped) ที่มีชื่อว่า เบซิเดียม โดยแต่ละเบซิเดียมในระยะนี้จะยังคงมีโครโมโซมเป็น ( $n+n$ ) แต่ต่อไปจะมีการรวมกันของนิวเคลียสทั้งสองภายในเบซิเดียมทำให้มีการรวมกันของนิวเคลียสทั้งสองได้เป็นเบซิเดียมที่อยู่ในระยะที่เป็น diploid ( $2n$ )

2.3.5 ต่อไปเบซิเดียมจะแบ่งไมโอซิสทันที ทำให้ได้นิวเคลียสที่มีเจนนวนโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ ( $n$ ) จำนวน 4 อัน และนิวเคลียสแต่ละอันจะเคลื่อนที่เข้าไปสู่เซลล์ที่จะกลายเป็นเบซิไดโอ

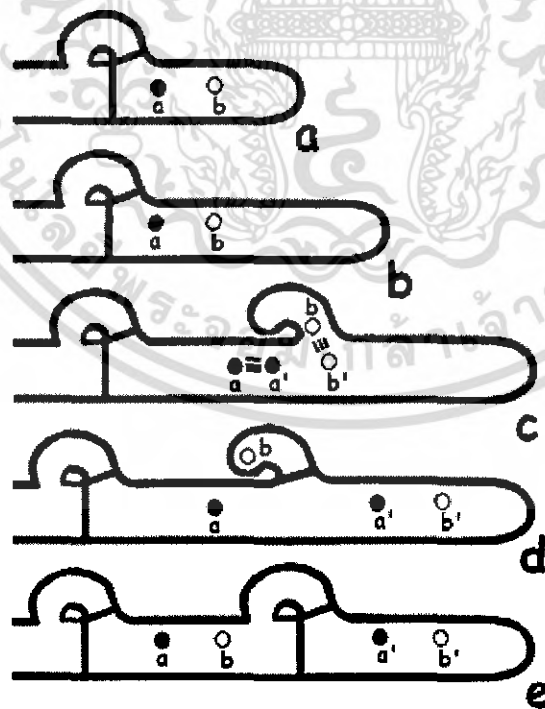
สปอร์ (basidiospore initial) ที่ปลายของสเตอริร็อกมา ซึ่งอยู่ตรงส่วนบนสุดของเบซิเดียมเซลล์ที่ปลายสุด 4 เซลล์นี้จะพัฒนาไปเป็นซิติโอสปอร์

2.3.6 เบซิติโอสปอร์ ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ ( $n$ ) จะถูกปลดปล่อยออกมาจากครีบดอกและเมื่อตกลงในบริเวณที่มีความชื้นจะเกิดการงอกเป็นเส้นไฮโมนาคารีออน (หรือเส้นไฮปฐุมงูมิ) ต่อไป



ภาพที่ 2.8 แคลมปีคอนเนคชันของพืชชั้นเบซิติโอไมซีทีส

ที่มา : <http://www.apsnet.org/education/illustratedGlossary/PhotosA-D/clampconnection.htm>



ภาพที่ 2.9 ขั้นตอนของการเกิดแคลมปีคอนเนคชัน

ที่มา : <http://www.palaeos.com/Fungi/Lists/Glossary/GlossaryA.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 ประเภทของระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดรา (พรธณี, 2005)

อาจแบ่งระบบการผสมพันธุ์ หรือระบบเพศ ของเห็ดรารวมทั้งของชั้นเบซิไดโอไมซีทิส เป็น 2 ประเภท ดังรายละเอียดต่อไปนี้

### 2.4.1 โฮโมทาลิซึม (Homothallism)

เห็ดราในระบบโฮโมทาลิซึม จะผสมพันธุ์ภายในเซลล์เดียวกัน (self-fertile) เท่านั้น ไม่ต้องอาศัยสายพันธุ์จากต่างเซลล์กัน แบ่งออกเป็น 2 ประเภทย่อยดังต่อไปนี้

#### 2.4.1.1 ไพรมารีโฮโมทาลิซึม (Primary Homothallism)

ไพรมารีโฮโมทาลิซึม เกิดขึ้นในเส้นใยที่มีนิวเคลียสชนิดเดียวกัน (hamokaryotic mycelium) และสามารถผสมพันธุ์ภายในเซลล์เดียวกันได้โดยมีราเส้นใยที่ผสมกันแล้วจะสามารถพัฒนาจนเกิดดอกเห็ด ตลอดวงจรชีวิตของเห็ดชนิดนี้จะไม่พบเซลล์คอนเนกชัน ดังนั้น เห็ดราประเภทนี้จึงไม่มี mating type (ชนิดของเพศ) ตัวอย่างเห็ดกินได้ที่มีรายงานว่ามีการผสมพันธุ์ประเภทนี้มีเพียงชนิดเดียว คือ เห็ดฟางหรือเห็ดบัว (*Volvariella volvacea*) ดังนั้นการจะปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยการคัดเลือกสองสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ดีตามต้องการมาผสมพันธุ์กันจะไม่ได้ผล

#### 2.4.1.2 เซกคันดารีโฮโมทาลิซึม (Secondary Homothallism)

เซกคันดารี โฮโมทาลิซึม จะพบได้ในเห็ดราที่เป็ไบโพลาร์ เฮเทอโรทาลิซึม (bipolar heterothallism) บางชนิดเช่น เห็ดประคุม และ *Coprinus bisporus* ที่มีการสร้างเบซิไดโอสปอร์ที่มีนิวเคลียส 2 อันที่มีอัลลีล ของยีน ที่ควบคุม mating type ต่างกัน ดังนั้นเมื่อแต่ละเบซิไดโอสปอร์งอก (germination) จะได้เส้นใยที่เป็นเฮเทอโรคาริออน ( $n+n$ ) ซึ่งนิวเคลียสทั้งสองในแต่ละสปอร์จะผสมกันได้และจะพัฒนาต่อไปจนเกิดเป็นดอกเห็ด

### 2.4.2 เฮเทอโรทาลิซึม (Heterothallism)

เห็ดราในระบบนี้ไม่สามารถผสมพันธุ์ภายในเซลล์เดียวกันได้ (self-sterile) เพราะการผสมพันธุ์จะเกิดขึ้นเมื่อมีนิวเคลียสที่มี mating type ต่างกันมาผสมเท่านั้น แบ่งเป็น 3 ประเภทย่อยตามจำนวนยีนที่ควบคุมดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

### 2.4.2.1 ไบโพลาร์ (Bipolar) หรือ ยูนิแฟกทอเรียล (Unifactorial) เซกเทอโรทาลิ

ซิม

mating type ของเห็ดราในกลุ่มนี้จะถูกควบคุมโดยยีนเพียง 1 ยีน หรือ แฟกเตอร์ (factor) หรือ โลคัส (locus) ซึ่งโดยทั่วไปจะประกอบด้วย 2 อัลลีล (อาจมีเห็ดราบางชนิดที่ยีนนี้จะประกอบด้วยหลายอัลลีลหรือที่เรียกว่า multiple alleles ) ดังนั้น mating type ของเห็ดราประเภทนี้จึงมีได้ 2 ชนิด (หรือ n ชนิดในกรณีที่เป็น multiple alleles ที่มี n alleles แต่ในเห็ดหนึ่งดอกจะมี mating type เพียง 2 ชนิด) เช่น เป็น mating type  $A_1$  และ mating type  $A_2$  ซึ่งการผสมพันธุ์จะเกิดขึ้นเฉพาะในกลุ่มผสมพันธุ์ที่มี mating type ต่างกัน คือ ระหว่าง  $A_1$  กับ  $A_2$  เท่านั้นซึ่งผลจะทำให้ได้เส้นใยลูกผสมที่มีการสร้างเคลมปีคอนเนกชัน ดังนั้น อัตราส่วนระหว่างกลุ่มผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้ต่อกลุ่มผสมพันธุ์ทั้งหมดจึงเท่ากับ 2 : 4 หรือ 1 : 2 ตัวอย่างเห็ดราที่มีรายงานว่ามีการผสมพันธุ์ประเภทนี้มีหลายชนิด

### 2.4.2.2 เทตระโพลาร์ (tetrapolar) หรือ ไบแฟกทอเรียล (bifactorial) เซกเทอโรทาลิ

ลิซิม

เห็ดราที่มีระบบเพศเทตระโพลาร์ เซกเทอโรทาลิซิม จะถูกควบคุมโดยยีน 2 ยีนที่อยู่บนต่างโครโมโซม เช่น ยีน A และยีน B ซึ่งโดยทั่วไปแล้วแต่ละยีนจะมีเพียง 2 อัลลีล (อาจเป็นไปได้ที่ในเห็ดราบางชนิดอาจมีบางยีนที่เป็น multiple alleles แต่ในเห็ดหนึ่งดอกจะมี mating type เพียง 4 ชนิด) เช่น สมมุติว่ายีน A มีอัลลีล เป็น  $A_1$  และ  $A_2$  ส่วนยีน B มีอัลลีลเป็น  $B_1$  และ  $B_2$  ดังนั้น mating type ของสปอร์ของเห็ดราประเภทนี้จึงมีได้ 4 ชนิด คือ  $A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1$  และ  $A_2B_2$  ดังนั้นดอกเห็ด 1 ดอกจะมี mating type ได้ 4 ชนิด ดังกล่าวและเฉพาะพวกที่มี mating type ต่างกัน (มีอัลลีลในแต่ละยีนต่างกัน) เท่านั้นที่จะผสมพันธุ์กันได้ทำให้เส้นใยลูกผสมที่สามารถผสมพันธุ์กันได้ต่อกลุ่มผสมพันธุ์ทั้งหมดจึงเท่ากับ 4 : 16 หรือ 1 : 4 ซึ่งสปอร์แต่ละอันเมื่อกอกจะได้เป็นสายพันธุ์สปอร์เดี่ยว (single spore isolate) ที่ประกอบด้วยเส้นใยที่มีนิวเคลียสในทุกเซลล์เหมือนกัน (homokaryon) และมีจำนวนชุดของโครโมโซมเพียงชุดเดียว (monokaryon, n) โดยเห็ดส่วนใหญ่มีรายงานว่า เป็นเทตระโพลาร์ เซกเทอโรทาลิซิม

Bartholomen et. al. (1996), Oliver and Schweizer (1999) และ Carlile et. al. (2001) กล่าวว่า การเกิดเคลมปีคอนเนกชันเกิดจากการทำงานของยีน A และยีน B กล่าวคือ ยีน B จะควบคุมปรากฏการณ์อื่นๆ ซึ่งได้แก่การเข้าสู่ของนิวเคลียส (nuclear pairing) การสร้างเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายตะขอ (hook cell formation) การแบ่งตัวเองของนิวเคลียส (conjugate division) และการสร้างผนังเพื่อกั้นเซลล์ (cell septation) ดังนั้นถ้ามีเส้นใยโมโนคาริออน (monokaryon) ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวมาผสมกันทีละคู่ (โดยเลี้ยงในจานอาหารวุ้นและให้เส้นใยของกลุ่มผสมเจริญเข้าหากัน) จะมีเฉพาะกลุ่มผสมพันธุ์  $A \neq B$  (อัลลีลของทั้งยีน A และ ยีน B เป็นอัลลีลต่างกัน นั่นคือ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฉพาะคู่  $A_1B_1$  กับ  $A_2B_2$  และ  $A_1B_2$  กับ  $A_2B_1$ ) ที่จะผสมพันธุ์กันได้ (compatible) โดยจะทำให้ได้เส้นใยลูกผสมที่สามารถสร้างดอกเห็ดเพราะยีนทั้ง 2 ยีนสามารถทำงานได้จนถึงขั้นมีแคลมป์คอนเนกชันเกิดขึ้น นอกจากนี้ลักษณะของเส้นใยบริเวณที่คู่ผสมพันธุ์เจริญมาพบกันจะมีลักษณะผสมกลมกลืนกันได้ดี

ตารางที่ 2.1 รูปแบบที่แสดงออกเมื่อเส้นใยเกิดการชนกันระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type แบบเทตระ โปลา เฮทเทอโรทาลิซึม

Mating type	$A_1B_1$	$A_1B_2$	$A_2B_1$	$A_2B_2$
$A_1B_1$	O	F	B	+
$A_1B_2$	F	O	+	B
$A_2B_1$	B	+	O	F
$A_2B_2$	+	B	F	O

เมื่อกำหนดให้

- + หรือ compatible เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ที่มีอัลลีลของยีน A และยีน B ต่างกัน ( $A \neq B \neq$ ) หมายถึง ผสมพันธุ์กันได้อย่างสมบูรณ์ เกิดเส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ที่มีแคลมป์คอนเนกชัน (แคลมป์คอนเนกชันที่แท้จริง) จึงสามารถเกิดดอกเห็ดได้
- O หรือ overlap เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ที่มีอัลลีลของยีน A และ B เหมือนกัน ( $A = B =$ ) หมายถึง ผสมพันธุ์กันไม่ได้ และไม่มีแคลมป์คอนเนกชัน
- B หรือ barrage เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ที่มีอัลลีลของยีน A ต่างกัน แต่อัลลีลของยีน B เหมือนกัน ( $A \neq B =$ ) หมายถึง ผสมพันธุ์กันได้เพียงครั้งเดียว ไม่มีการเคลื่อนย้ายนิวเคลียส ไม่สามารถเกิดดอกเห็ดได้
- F หรือ flat เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ที่มีอัลลีลของยีน A เหมือนกัน แต่อัลลีลของยีน B ต่างกัน ( $A = B \neq$ ) หมายถึง ผสมพันธุ์ได้เพียงครั้งเดียว โดยอาจเกิดการเคลื่อนย้ายนิวเคลียส แต่ไม่มีการแบ่งนิวเคลียสอย่างพร้อมเพรียงกัน หรือไม่เกิดการสร้างแคลมป์คอนเนกชัน

ที่มา : คัดแปลงจาก Carlile and Watkinson (1994)

สำหรับคู่ผสมพันธุ์ประเภทอื่นๆอีก 3 ประเภทจะไม่สามารถผสมกันจนเกิดดอกเห็ดได้ โดยจะไม่สร้างแคลมป์คอนเนกชันในเส้นใยบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมพันธุ์มาพบกัน นอกจากนี้ลักษณะของโคโลนีบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมพันธุ์แต่ละประเภทมาพบกันจะแตกต่างกันดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. กลุ่มผสมพันธุ์เป็นประเภท  $A=B=(A_1B_1 \times A_1B_1, A_1B_2 \times A_1B_2, A_2B_1 \times A_2B_1$  และ  $A_2B_2 \times A_2B_2)$  กรณีนี้้อลลิตทั้ง 2 ของทั้งยีน และ จะเหมือนกัน จึงไม่สามารถผสมกันได้เลย ลักษณะของโคโคโลนิบริเวนท์ที่เส้นใยเจริญมาพบกันจะมีลักษณะแบนราบและเส้นใยของกลุ่มผสมพันธุ์ (monokaryon) จะเจริญมาเหลื่อมกัน ซึ่ง Papazian (1950) เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า “overlab”

2. กลุ่มผสมพันธุ์เป็นประเภท  $A=B \neq (A_1B_1 \times A_2B_1$  และ  $A_1B_2 \times A_2B_2)$  จะผสมพันธุ์กันได้เพียงครึ่งเดียว (hemicompatible-B) ทั้งนี้เพราะมีเฉพาะยีน ที่ทำงาน (มีการเข้าสู่ของนิวเคลียสจนถึงการสร้างผนังเซลล์ แต่ไม่มีการรวมกันของ hook cell) ทำให้เส้นใยที่เป็นผลจากการผสมพันธุ์ของกลุ่มผสมประเภทนี้มีเคลมปีคอนเนคชันที่ไม่สมบูรณ์ เกิดขึ้นและเนื่องจากไม่มีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสจึงทำให้ได้เส้นใยที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryon) จำกัดอยู่เฉพาะบริเวณที่เส้นใยของกลุ่มมาสัมผัสกัน จึงทำให้บริเวณดังกล่าวมีการเจริญของเส้นใยน้อยจึงเกิดเป็นร่อง ซึ่ง Papazian (1950) ได้เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า “barrage”

3. กลุ่มผสมพันธุ์เป็นประเภท  $A \neq B=(A_1B_1 \times A_1B_2$  และ  $A_2B_1 \times A_2B_2)$  จะผสมพันธุ์ได้เพียงครึ่งเดียวเช่นกัน (hemicompatible-A) โดยที่จะมีเฉพาะยีน ที่ทำงาน กล่าวคือ มีการเคลื่อนย้ายนิวเคลียส ทำให้ได้เส้นใยลูกผสมที่มีนิวเคลียสต่างชนิดกัน (heterokaryon) และมักจะมีจำนวนนิวเคลียสแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ เส้นใยบริเวณที่กลุ่มผสมพันธุ์มาสัมผัสกันนี้จะมีการเจริญของเส้นใยเป็นเส้นนูนซึ่ง Papazian (1950) ได้เรียกลักษณะนี้ว่า “flat”

#### 2.4.2.3 ออกตะโพลาร์ (Octapolar) หรือ ไตรแฟคทอเรียล (trifactorial) เฮทเทอโรทาลิซึม

हे็ดตราที่มีระบบการผสมพันธุ์ประเภทนี้ จะถูกควบคุมโดยยีน 3 ยีน เช่น ยีน A ยีน B และยีน C และโดยทั่วไปแต่ละยีนจะมีเพียง 2 อลลิต (บางยีนหรือทุกยีนจะเป็น multiple alleles ก็มี โอกาสเป็นไปได้แต่ยังไม่มียางานการพบ) เช่น  $A_1$  และ  $A_2, B_1$  และ  $B_2$  และ  $C_1$  และ  $C_2$  ดังนั้น mating type ของระบบการผสมพันธุ์ประเภทนี้จะมีได้ 8 ชนิด คือ  $A_1B_1C_1, A_1B_1C_2, A_1B_2C_1, A_1B_2C_2, A_2B_1C_1, A_2B_1C_2, A_2B_2C_1, A_2B_2C_2$  และเฉพาะคู่ที่มี mating type ที่มีอัลลิตต่างกัน (ในทุกยีน) เท่านั้นที่จะสามารถผสมพันธุ์กันได้ ซึ่งอัตราส่วนระหว่างกลุ่มผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้ต่อกลุ่มผสมทั้งหมดเท่ากับ 1 : 8

## 2.5 การคำนวณหาอัตราส่วนของการผสมพันธุ์

### 2.5.1 กรณีที่เป็น bipolar (unifactorial) heterothallism

ตารางที่ 2.2 รูปแบบที่เข้ากันได้หรือไม่ได้ระหว่างกลุ่มผสมพันธุ์ที่มี mating type ชนิดต่างๆของเห็ดราที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบไบโพลาร์เฮเทอโรทาลิซึม

Matingtype	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>
A <sub>1</sub>	—	+
B <sub>1</sub>	+	—

เมื่อ + หมายถึงผสมกันได้หรือเข้ากันทางเพศได้

— หมายถึงไม่ผสมกันได้หรือเข้ากันไม่ได้ทางเพศ

อัตราส่วนของกลุ่มผสมที่เข้ากันได้ต่อกลุ่มผสมทั้งหมดเท่ากับ 2 : 4 หรือเท่ากับ 1 : 2

ดังนั้นหากผลจากการทดลองมีอัตราส่วนของคู่ที่ผสมกันได้ต่อจำนวนคู่ผสมทั้งหมดเป็น 1 : 2 แสดงว่าเห็ดชนิดนั้นๆมีระบบการผสมพันธุ์แบบ bipolar heterothallism

### 2.5.2 กรณีที่เป็นระบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism

ตารางที่ 2.3 รูปแบบที่เข้ากันได้หรือไม่ได้ระหว่างกลุ่มผสมพันธุ์ที่มี mating type ชนิดต่างๆของเห็ดราที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบเทตราโพลาร์เฮเทอโรทาลิซึม

Matingtype	A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>
A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	—	—	—	+
A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	—	—	+	—
A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	—	+	—	—
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	+	—	—	—

เมื่อ + หมายถึงผสมกันได้หรือเข้ากันทางเพศได้

— หมายถึงไม่ผสมกันได้หรือเข้ากันไม่ได้ทางเพศ

อัตราส่วนของกลุ่มผสมที่เข้ากันได้ต่อกลุ่มผสมทั้งหมดเท่ากับ 4 : 16 หรือเท่ากับ 1 : 4

ดังนั้นหากผลจากการทดลองมีอัตราส่วนของคู่ที่ผสมกันได้ต่อจำนวนคู่ผสมทั้งหมดเป็น 1 : 4 แสดงว่าเห็ดชนิดนั้นๆมีระบบการผสมพันธุ์แบบ tetrapolar heterothallism

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.5.3 กรณีที่เป็นระบบ octapolar(trifactorial)heterthallism

ตารางที่ 2.4 รูปแบบที่เข้ากันได้หรือไม่ได้ระหว่างกลุ่มผสมพันธุ์ที่มี mating type ชนิดต่างๆของเห็ดราที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบออกตะโพลเฮเทอโรทาลิซึม

	$A_1B_1C_1$	$A_1B_1C_2$	$A_1B_2C_1$	$A_1B_2C_2$	$A_2B_1C_1$	$A_2B_1C_2$	$A_2B_2C_1$	$A_2B_2C_2$
$A_1B_1C_1$	—	—	—	—	—	—	—	+
$A_1B_1C_2$	—	—	—	—	—	—	+	—
$A_1B_2C_1$	—	—	—	—	—	+	—	—
$A_1B_2C_2$	—	—	—	—	+	—	—	—
$A_2B_1C_1$	—	—	—	+	—	—	—	—
$A_2B_1C_2$	—	—	+	—	—	—	—	—
$A_2B_2C_1$	—	+	—	—	—	—	—	—
$A_2B_2C_2$	+	—	—	—	—	—	—	—

เมื่อ + หมายถึงผสมกันได้หรือเข้ากันทางเพศได้

— หมายถึงไม่ผสมกันได้หรือเข้ากันไม่ได้ทางเพศ

อัตราส่วนของกลุ่มผสมที่เข้ากันได้คือกลุ่มผสมทั้งหมดเท่ากับ 8 : 64 หรือเท่ากับ 1 : 8

ดังนั้นหากผลจากการทดลองมีอัตราส่วนของคู่ที่ผสมกันได้คือจำนวนกลุ่มผสมทั้งหมดเป็น 1 : 8 แสดงว่าเห็ดชนิดนั้นมีระบบการผสมพันธุ์แบบ octapolar heterthallism

### 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุวสันต์ และ สุฉฉวี (2544) ได้ทำการศึกษาลักษณะของเห็ดนางรมสีทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) และเห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) โดยนำเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดทั้งสองชนิดจำนวนชนิดละ 12 สายพันธุ์มาผสมทีละคู่แบบพบกันหมด โดยเลี้ยงในอาหาร MEA เพื่อตรวจควบคุมปีคอนเนคชัน พบว่าเห็ดนางรมสีทองมีระบบการผสมพันธุ์แบบ bipolar heterothallism ส่วนเห็ดนางฟ้ามีระบบการผสมพันธุ์แบบ tetrapolar heterothallism

สาทิณี (2547) ได้ทำการศึกษาการผสมพันธุ์ของเห็ดกินได้ 9 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ซึ่งได้แก่ เห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมขาว เห็ดเป่าฮื้อ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดนางรม เห็ดนางรมอังการี เห็ดนางรมหัว และเห็ดนางรมหลวงผลจากการศึกษาพบว่าในส่วนของสถานวิทยานั้นเห็ดทั้งหมดมีลักษณะที่คล้ายกันหลายลักษณะแต่แตกต่างกันในบางลักษณะ ส่วนในด้านระบบการผสมพันธุ์นั้นพบว่า เห็ดทั้ง 9 ชนิดนั้น มีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar heterothallism

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bumet (1968) ศึกษาลักษณะการผสมพันธุ์ของ *Coprinus comatus* โดยนำเส้นใยที่มาจากสปอร์เดี่ยวมาผสมกันที่ละคู่แบบพบกันหมด ตรวจสอบการเกิด clamp connection ตรงบริเวณที่เส้นใยมาชนกัน จากการทดลองพบว่า *Coprinus comatus* มีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ bipolar heterothallism

Carlile et. al. (2001) ศึกษาลักษณะการผสมพันธุ์ของ *Coprinus cinereus* โดยนำเส้นใยที่มาจากสปอร์เดี่ยวมาผสมกันที่ละคู่แบบพบกันหมด ตรวจสอบการเกิด clamp connection ตรงบริเวณที่เส้นใยมาชนกัน จากการทดลองพบว่า *Coprinus cinereus* มีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ tetrapolar heterothallism

Chang et. al (1993) ได้รายงานว่าพบการศึกษาเรื่องเพศครั้งแรกใน เห็ดแครง เห็ดตีนตุ๊กแก (*Schizophyllum commune*) ส่วน Kemp (1990) รายงานถึงผลการศึกษาระบบผสมพันธุ์ของเห็ดสกุล *Coprinus* โดยพบว่าเห็ดแต่ละชนิดของเห็ดสกุลนี้มีระบบการผสมพันธุ์แตกต่างกัน



## บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีทดลอง

### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

#### 3.1.1 เชื้อเห็ดที่ใช้ในการวิจัยและวัสดุเพาะเห็ดสำเร็จรูป

เชื้อพันธุ์เห็ดโคนน้อยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวบรวมพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

วัสดุเพาะเห็ดที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ ฟางข้าว และ กากถั่ว เมล็ดข้าวฟ่าง

#### 3.1.2 สารเคมี

- มอลท์สกัด (Malt Extract)
- กลูโคส (Glucose)
- เปปโตน (Peptone)
- ผงวุ้น (Bacto agar)

#### 3.1.3 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow) บริษัท ISSCO รุ่น HS 123
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave) บริษัท TOMMY รุ่น 3S-325
- กล้องจุลทรรศน์ บริษัท NIKON รุ่น YS2-H
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) บริษัท SHEL LAB รุ่น 2020
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง บริษัท METTLER-TOLEDO รุ่น AG 204
- เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ งานแก้ว แท่งแก้ว ฯลฯ
- เข็มเขี่ยเชื้อ ลูป (LOOP) และตะเกียงแอลกอฮอล์
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot Air Oven) บริษัท Delta Laboratory
- Cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.50 ซม.
- กล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบถ่ายภาพ บริษัท LICA รุ่น MPS 60
- กระจกสไลด์ (slide) และกระจกปิดสไลด์ (coverslide)
- กล้องถ่ายภาพดิจิทัล บริษัท Fuji Film รุ่น Fine Pix S 304
- กระดาษสีขาวและดำ
- Eyepiece micrometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

### 3.2.1 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใย

นำเส้นใยเห็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร มาเพิ่มปริมาณโดยเชื้อเส้นใยลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วันหรือจนกว่าเส้นใยจะเจริญเกือบเต็มจานอาหาร

### 3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อเห็ด

นำเมล็ดข้าวฟ่างมาแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างมาต้มจนกระทั่งสุก นำมาผึ่งให้แห้งพอหมาด ๆ บรรจุใส่ขวดแบน โดยใส่เมล็ดข้าวฟ่างลงไปประมาณครึ่งขวด ปิดจุกด้วยสำลีแล้วหุ้มด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างเย็นจึงเชื้อเส้นใยที่เจริญบนจานอาหาร PDA จากข้อ 3.2.1 ใส่ลงไป โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เส้นใยจะเจริญเต็มขวดและพร้อมที่จะนำไปเลี้ยงลงในถุงที่เลี้ยงต่อไป

### 3.2.3 การเพาะเห็ด

การเพาะเห็ดทำโดยเชื้อเห็ดในหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างให้กระจายและเติมเมล็ดข้าวฟ่างลงบนฟางข้าวที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 10-15 เมล็ด ต่อฟางข้าว 1 กระบะ ปิดด้านบนกระบะด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์จากนั้นนำเชื้อเห็ดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1-2 สัปดาห์ เมื่อเส้นใยเจริญเต็มกระบะเพาะแล้วทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ จะพบว่าการรวมตัวของเส้นใยเกิดเป็นลักษณะเส้นใยหนาๆ จึงทำการเปิดดอก โดยนำกระบะที่มีเส้นใยเจริญเต็มที่แล้วมาเปิดดอก แล้วใช้พลาสติกคลุมอาหารคลุมไว้ จนมีตุ่มดอกเห็ดปรากฏตามด้วยการทำการเก็บดอกเห็ด

### 3.2.4 การเก็บสปอร์พิมพ์

การเก็บสปอร์พิมพ์จะทำโดยเทคนิคปราศจากเชื้อโดยใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ วิธีการเริ่มจากการทำโดยนำหมวกดอกเห็ดสดที่บ้านเต็มที (ที่ตัดก้านออกแล้ว) แล้วใช้เข็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแทงผ่านบริเวณดอกเห็ด จากนั้นใช้สก็อตเทปยึดบริเวณปลายเข็มที่เล็ยออกมาจากดอกเห็ดให้ติดกับฝาจานแก้ว โดยให้ส่วนที่เป็นครีบดอกยื่นลงข้างล่างในสภาพที่อำนวยความสะดวกยิมปลดปล่อยเบซิไดโอสปอร์ลงสู่ด้านล่าง ค่อยไปนำฝาจานแก้วนั้นไปครอบบนบีกเกอร์ที่มีชั้นกระดาษกรองเล็ก ๆ (ขนาดประมาณ 1x1 ซม) จำนวนหลายๆ ชั้นที่ฆ่าเชื้อที่ปูอยู่แล้วที่ก้นบีกเกอร์นั้น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-10 ชั่วโมง หรือจนกว่ามีสปอร์ตกบนชั้นกระดาษกรอง จึงทำการเปลี่ยนฝาจานแก้วที่สะอาดอันใหม่แทนที่อันเก่าที่มีชั้นหมวกดอกเห็ดติดอยู่จะได้สปอร์พิมพ์ที่ค่อนข้างปราศจากเชื้อซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้เป็นเวลาหลายเดือนถ้าหากเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.5 การแยกสปอร์เดี่ยว

นำสปอร์จากกระดาษกรองมาแยกให้ได้สปอร์เดี่ยว โดยการทำสารแขวนลอย

สปอร์ (spore suspension) โดยกำหนดให้มีความเจือจางของสารแขวนลอยสปอร์  $10^3$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยสปอร์ 0.1 มล. เทลงในแต่ละจานอาหาร PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-5 วัน ถ้าพบว่าไม่มีสปอร์ที่แยกเดี่ยวๆและกำลังงอกเจอร์มทิวป์ (germ tube) ให้ตัดชิ้นวุ้นที่มีเพียง 1 สปอร์ที่กำลังงอกมาแยกเลี้ยงลงในจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-5 วัน ตรวจสอบเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว โดยการตรวจการเกิดแคลมป์คอนเนกชันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการคัดเลือกสปอร์เดี่ยวให้ได้มากที่สุดเพื่อจะได้สายพันธุ์สปอร์เดี่ยว (single spore isolate) หมายเลขต่าง ๆ ในเห็ดแต่ละชนิด และทำการตัดเส้นใยของสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวที่แยกได้ลงในอาหารผิวเยี่ยง PDA เพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป

### 3.2.6 การเลี้ยงเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว

นำเส้นใยที่งอกมาจากสปอร์เดี่ยวจากอาหารผิวเยี่ยง PDA มาเลี้ยงในจานอาหาร PDA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 สัปดาห์ ต่อไปนำเส้นใยที่เจริญเต็มที่แล้วมาทำการผสมพันธุ์ในขั้นต่อไป

### 3.2.7 การศึกษาระบบเพศของเห็ด

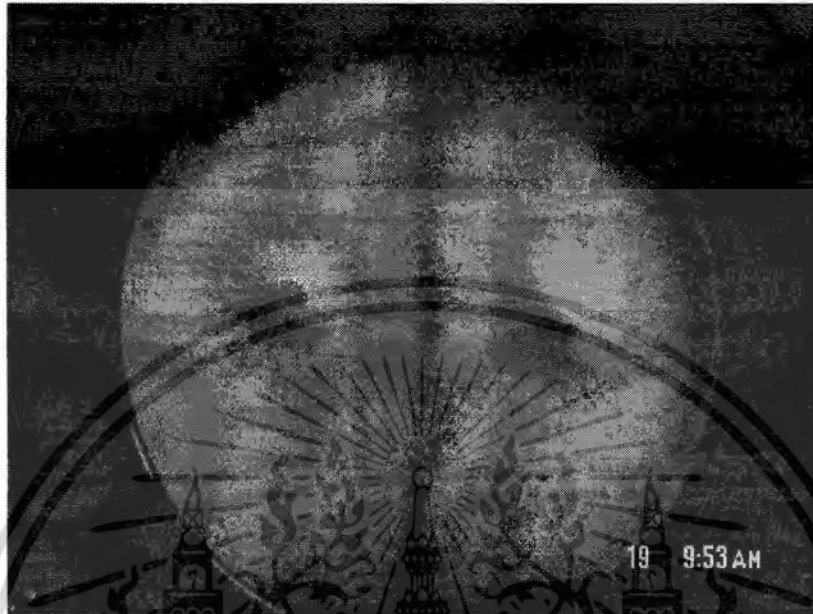
นำเส้นใยที่เป็นสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวของเห็ดโคนน้อย (ไม่ต่ำกว่า 12 สายพันธุ์) มาทำการศึกษาด้วยการผสมพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม (conventional method) แบบพบกันหมดทุกคู่ผสม โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังต่อไปนี้ ตัดเส้นใยสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวด้วย cork borer มาวางบนจานอาหาร PDA โดยให้แต่ละคู่ของสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ สังเกตและถ่ายภาพ (top view) ลักษณะของโคโลนีในแต่ละคู่ผสมพันธุ์ และตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนกชันในเส้นใยบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมพันธุ์เจริญมาพบกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งถ้ามีแคลมป์คอนเนกชัน หมายถึงมีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น (คู่ผสมพันธุ์ที่มี mating types ต่างกันจึงจะผสมกันได้) แต่ถ้าไม่มีแคลมป์คอนเนกชันเกิดขึ้น แสดงว่ามี mating types เหมือนกันหรือเข้ากันไม่ได้จึงไม่เกิดการผสมพันธุ์

### 3.2.8 การแปลผลการทดลองเป็นประเภทของระบบการผสมพันธุ์

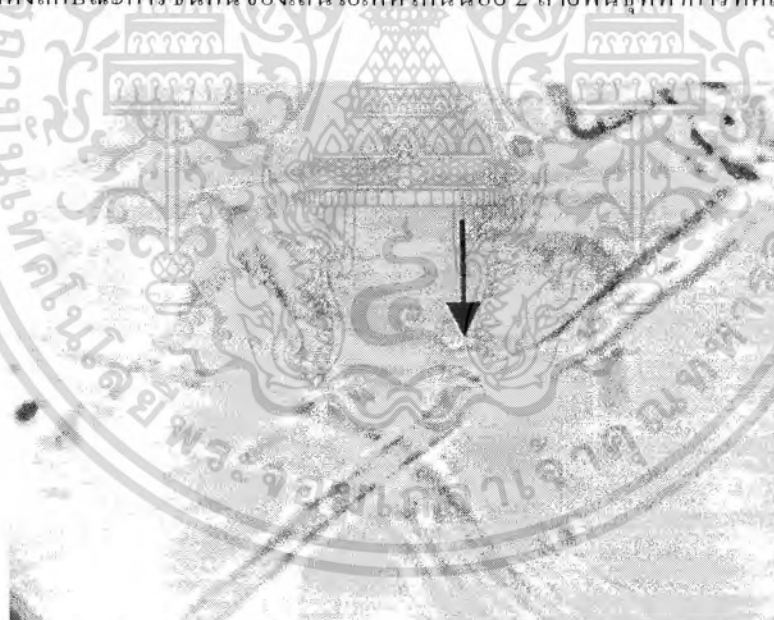
ทำการคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างจำนวนคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้ ต่อจำนวนคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมด และทำการแปลผลการผสมพันธุ์ที่ได้เป็นประเภทของระบบการผสมพันธุ์ตลอดจนทำการจัดกลุ่มสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวที่แยกได้ของแต่ละชนิดออกเป็นชนิดเพศ (mating type) ชนิดต่างๆ

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะการชนกันของเส้นใยเห็ดโคนน้อย 2 สายพันธุ์ที่ทำการทดลอง



ภาพที่ 4.2 แสดงแกลมปีคอนเนคชั่น(บริเวณที่ลูกศรชี้) ในเส้นใยของเห็ดโคนน้อย 2 สายพันธุ์ที่นำมาผสมกัน (1000X)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การผสมพันธุ์สายพันธุ์สปอร์เดี่ยวของเห็ดโคนน้อย จำนวน 10 สายพันธุ์บนจานอาหาร PDA  
 ป่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์

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

- + หมายถึง สามารถผสมพันธุ์กันได้เพราะตรวจพบแคลมป์คอนเนคชัน
- หมายถึง ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้เพราะไม่พบการสร้างแคลมป์คอนเนคชัน

จำนวนคู่ที่ผสมพันธุ์กันได้ ต่อ จำนวนคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมด เท่ากับ 25 : 55 ซึ่งเท่ากับ 1 : 2.2  
 หรือประมาณ 1 : 2

สามารถจัดกลุ่มของสายพันธุ์ได้ 2 กลุ่มได้แก่

กลุ่มที่มี mating type เป็น A<sub>1</sub> ได้แก่สายพันธุ์ที่ 1, 4, 6, 8 และ 9

กลุ่มที่มี mating type เป็น A<sub>2</sub> ได้แก่สายพันธุ์ที่ 2, 3, 5, 7 และ 10

## บทที่ 5

### สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาประเภทของระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดโคนน้อย (*Coprinus sp.*) โดยการนำสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวจำนวน 10 สายพันธุ์ จากดอกเห็ด 1 ดอก มาทำการผสมพันธุ์แบบพบกันหมดทุกคู่ ในจานอาหาร PDA และตรวจดูแคลสป่คอนเนกชันในบริเวณที่เส้นใยของกลุ่มผสมมาพบกันซึ่งถ้าพบแคลสป่คอนเนกชัน แสดงว่าคู่นั้นสามารถผสมกันได้ ผลจากการตรวจสอบแคลสป่คอนเนกชันพบว่า เห็ดโคนน้อย มีอัตราส่วนของจำนวนกลุ่มผสมพันธุ์ที่ผสมกันได้คือจำนวนกลุ่มผสมพันธุ์ทั้งหมดเท่ากับ 25 : 55 หรือเท่ากับ 1 : 2 จึงแสดงให้เห็นว่า เห็ดโคนน้อยมีประเภทของระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ bipolar heterothallism

เห็ดโคนน้อยในเมืองไทยควรจะใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่มีความเป็นไปได้คือ *Coprinus comatus* หรือ *Coprinus cinereus* ตามที่นักเห็ดราวิทยาได้เสนอมา ซึ่งจากการทดลองนี้ที่พบว่าเห็ดโคนน้อยมีระบบการผสมพันธุ์เป็น bipolar heterothallism ซึ่งตรงกับระบบการผสมพันธุ์ของ *C. comatus* แต่แตกต่างกันด้านถิ่นฐานวิทยาภายนอก โดยเห็ดโคนน้อยในเมืองไทยมีขนาดลำต้นและขนาดของดอกเห็ดเล็กกว่า *C. comatus* มากซึ่งถ้าเห็ดโคนน้อยในเมืองไทยเป็นเห็ดชนิดเดียวกันกับในต่างประเทศ (เขตอบอุ่น) แล้ว การที่ดอกเห็ดมีขนาดต่างกันควรจะเกิดจากปัจจัยทางสภาวะสภาพแวดล้อมเช่น อุณหภูมิ ปริมาณแร่ธาตุ และปัจจัยอื่นๆ

## เอกสารอ้างอิง

ชวลี ชัยศรีสุข. 2546. พันธุศาสตร์ของเชื้อรา. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรณี ฐิตาภิชิต 2548. ระบบเพศของเห็ดรา. KU Science J. 2005, Vol 23, No. 2.(เอกสารออก  
ถ้าช้ากว่ากำหนด)

พงศกร สุกการกำจร. 2545. “ความหลากหลายของเห็ดบริเวณห้วยคอกม้าอุทยานแห่งชาติ  
ดอยสุเทพ-ปุยในเดือนพฤศจิกายนและมกราคม.” ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาชีววิทยา  
ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สาทีณี ซื่อตรง. 2547. “สัณฐานวิทยาและระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดกินได้บางชนิดใน  
สกุล *Pleurotus*.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์  
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุขวัตน์ ต่ายทอง และ สุขฉวี อรุณรัศมี. 2544. “ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดนางรมทอง  
(*Pleurotus citrinopileatus*) และเห็ดนางฟ้า (*P. Sajor-caju*)” โครงการพิเศษระดับปริญญา  
ตรี ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ  
ทหารลาดกระบัง.

Bartholomen , K.A, Marion, A.L., Novotny, C.P. and Ullrich, R.C. 1996. A Case study of Fungal  
Development and Genetics : *Schizophyllum commune*. In C.J. Bos (editor) : Fungal  
Genetics, Principles and Practice. New Yory : Marcel Dekker Inc. P. 371-384.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C. and Gooday, G.W. 2001. *The Fungi*. Tokyo : Academic Press.

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

Esser, K. 1982. *Cryptogram*. London : Cambridge University Press.

Hawksworth, D. L., Kirk, P.M., Sutton B.C. and Pegler, D.N. 1995. *Dictionary of The Fungi*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

UK : Cambridge University Press.

Kaufman, E.H.O. 1934. "Study on the germination of spore of contain basidiomycetes."

*Botanical Gaz.* (Crawfordsville) 96 : 282-297.

Miles, P. 1993. Biological background for mushroom breeding. In S.T.Chang and T.H.Quimio (eds). *Tropical Mushroom*. Hongkong : The Chinese University Press. P. 37-64.

Oliver, R.P. And Schweizr, M. 1999 *Molecular Fungus Biology*. UK : Cambridge University Press.

Papazian, R. P. 1950. "Physiology of incompatibility factors in *Schizophyllum commune*."

*Botanical Gaz.* 122 : 143-163

Raper, C.A. 1978. Sexuality and Breeding. In S.T. Chang ang W.A. hayes (eds). *The Biology ans Cultivation of edible Mushroom*. New York : Academic Press. P.83-117.

Zerakis, F.I. 1998. "Mating competence and biological species whitin the subgenus *Coremioplerotus*." *Mycologia* 90(6) : 1063-1074

<http://botit.botany.wisc.edu/Interface/web-lessons/Diversity/fungi/Basidium.html>

[http://searab.cordley.orst.edushroomswebpagetextimagesstro\\_amb\\_micro1b.jpg](http://searab.cordley.orst.edushroomswebpagetextimagesstro_amb_micro1b.jpg)

<http://sevlauqu.club.fr/images/hymenium.gif>

[http://www33a.your-server.co.za/sasppa/images/jan02/feature12\\_2001.gif](http://www33a.your-server.co.za/sasppa/images/jan02/feature12_2001.gif)

<http://www.apsnet.org/education/llustratedGlossary/PhotosA-D/clampconnection.htm>

<http://www.apsnet.org/education/llustratedGlossary/PhotosA-D/coremium.htm>

<http://www.mycolog.com/oidium.gif>

<http://www.palaeos.com/Fungi/Lists/Glossary/GlossaryA.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้