การสร้างและการตรวจสอบลูกผสมระหว่างเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดนม โดยวิธี Mon-mon Mating และ Di-mon Mating

HYBRIDIZATION AND CHARACTERIZATION BETWEEN *Lentinula edodes*, *Lentinus squarrosulus* AND *L. polychrous* BY Mon-mon Mating AND Di-mon Mating METHODS

นันทวดี คำสงค์

NUNTAWADEE CUMSONK

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-8308-08-5

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสร้างและการตรวจสอบลูกผสมระหว่างเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดบด โดยวิธี Mon-mon Mating และ Di-mon Mating

HYBRIDIZATION AND CHARACTERIZATION BETWEEN *Lentinula edodes*, *Lentinus squarrosulus* AND *L. polychrous* BY Mon-mon Mating AND Di-mon Mating METHODS

นันทวดี คำสงค์

NUNTAWADEE CUMSONK

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....69054
วัน,เดือน,ปี.....- 7 ก.พ. 2550

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2549

ISBN 974-8308-06-5

Hybridization AND Characterization between *Lentinula edodes*, *Lentinus squarrosulus* AND *L. polychrous* BY Mon-mon Mating AND Di-mon Mating Methods

NUNTAWADEE CUMSONK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOLL OF GRDUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2006

ISBN 974-8308-06-5

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างและการตรวจสอบลูกผสมระหว่างเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดบด โดยวิธี Mon-mon Mating และ Di-mon Mating

Hybridization and Characterization between *Lentinula edodes, Lentinus squarrosulus* and *L. polychrous* by Mon-mon Mating and Di-mon Mating Methods.

ชื่อนักศึกษา นางสาวนันทวดี คำสงค์

รหัสประจำตัว 45064560

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.พรรณี	ฐิตาภิชิต	
รศ.ดร.สมศักดิ์	อภิสิทธิวาณิช	
รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	
ผศ.อารี	ฤทธิบูรณ์	
นางอัญชลี	เชียงกูล	

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 18 กันยายน 2549 เวลา 09.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ห้อง 242

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ดร.จารุวัตร เจริญสุข)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....17.....**เดือน**.....กันยายน.....**พ.ศ.**.....2549.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสร้างและการตรวจสอบลูกผสมระหว่างเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดบดโดยวิธี Mon-mon Mating และ Di-mon Mating
นักศึกษา	นางสาวนันทวดี คำสงค์
รหัสประจำตัว	45064560
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2549
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช

บทคัดย่อ

ได้ทำการสร้างเห็ดลูกผสมระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว เห็ดหอมกับเห็ดบด และเห็ดขอนขาวกับเห็ดบดด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional method) แบบ mon-mon mating และ di-mon mating จากสายพันธุ์โมโนคาริออนที่ทราบ mating type และสายพันธุ์ไดคาริออน แล้วคัดเลือกฟิวแซนท์จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ MES6 และ MPS19 เป็นฟิวแซนท์จากวิธี mon-mon mating ที่เกิดจากเห็ดหอมที่มี mating type เป็น A_2B_1 กับเห็ดขอนขาวที่มี mating type เป็น A_1B_2 และเห็ดบดที่มี mating type เป็น A_2B_1 กับเห็ดขอนขาวที่มี mating type เป็น A_1B_2 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่เกิดจากวิธี di-mon mating ได้แก่ DES1 DES7 และ DES5 เป็นฟิวแซนท์ที่เกิดจากเห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวที่มี mating type เป็น A_1B_1, A_2B_2, A_1B_2 และสายพันธุ์ DPS8, DPS14 และ DPS12 เป็นฟิวแซนท์ที่เกิดจากเห็ดบดสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวที่มี mating type เป็น A_1B_1, A_2B_2 และ A_1B_2 ตามลำดับ จากนั้นได้ตรวจสอบความเป็นลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดบด โดยใช้สัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล 2 วิธีได้แก่ 1) วิธี PCR ของ rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 3 คู่คือ ITS1 กับ ITS2, ITS1 กับ ITS4 และ ITS3 กับ ITS4 2) วิธี Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR/RFLP) ของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง internal transcribed spacer (ITS) ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด ได้แก่ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III ผลการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาพบว่าฟิวแซนท์ MES6, DES7 และ DPS12 มีลักษณะเด่นของเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว และเห็ดขอนขาวกับเห็ดบดชัดเจน ส่วนผลจากวิธีที่ 2 ตรวจพบความเป็นลูกผสมได้ 5 สายพันธุ์ จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 คือฟิวแซนท์ MES6 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI ฟิวแซนท์ DES1 เมื่อตัด

ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ฟิวแซนท์ DPS12 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และจากคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 คือฟิวแซนท์ DES7 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI และฟิวแซนท์ DPS8 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI และ *Hae*III แต่การตรวจสอบด้วยเทคนิคดีเอ็นเอทั้ง 2 วิธีสามารถยืนยันความเป็นลูกผสมตรงกัน 2 สายพันธุ์คือ MES6 และ DES7 และฟิวแซนท์ MPS19, DES5 และ DPS12 มีดีเอ็นเอของเห็ดขอนขาวมากกว่าเห็ดหอมและเห็ดบด

Thesis Title	Hybridization and Characterization between *Lentinula edodes*, *Lentinus squarrosulus* and *L. polychrous* by Mon-mon Mating and Di-mon Mating Methods.
Student	Miss Nuntawadee Cumsonk
Student ID	45064560
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2006
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Pannee Dhitaphichit
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Somsak Apisitwanich

ABSTRACT

Hybridization between *Lentinula edodes* , *Lentinus squarrosulus* and *L. polychrous* were performed by the conventional methods of Mon-mon Mating and Di-mon Mating using known mating typed monokaryotic strains and dikaryons of the three species. Eight fusants were selected and of which MES6 (A_2B_1 *L. edodes* and A_1B_2 *L. squarrosulus*) and MPS19 (A_2B_1 *L. polychrous* and A_1B_2 *L. squarrosulus*) were from Mon-mon Matings, while DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 and DPS12 were from Di-mon Matings.

Two methods of hybridization detection were studied. In the morphological studies, fruiting bodies of all the 8 fusants along with those of their parents were cultured on saw dust plastic bags and the results were that MES6, MES7 and DPS12 possessed combined characteristics of their parents. When two molecular biological methods (1. PCR of rDNA using 3 pairs of primers: ITS1 V.S. ITS2, ITS1 V.S. ITS4 and ITS3 V.S. ITS4 and 2. PCR/RFLP of internal transcribed spacer DNA) were studied, the results were that MES6, DES1, DES7 DPS8 and DPS12 showed hybrid DNA parents when ITS1 V.S. ITS4 plus *Sau*3AI, ITS1 V.S. ITS4 plus *Eco*RI, ITS3 V.S. ITS4 plus *Sau*3AI and ITS3 V.S. ITS4 plus *Hin*fI and *Hae*III, were used, respectively. In addition, it was found that most of the hybrids possessed more DNA of *L. squarrosulus* than those of *L. edodes* and *L. polychrous.*

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้กรุณาให้วิชาความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา การเอาใจใส่ อบรมดูแลช่วยเหลือด้วยประการทั้งปวง รวมทั้งตรวจสอบเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้ามีความซาบซึ้งและระลึกถึงความกรุณาที่ได้รับจากอาจารย์เป็นอย่างสูง ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษา ให้การสนับสนุนทุกๆด้าน และแก้ไขอุปสรรคที่มีในการทำงาน ตลอดจนสละเวลาอันมีค่าในการให้คำแนะนำ ตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าซาบซึ้งในความเอาใจใส่นี้เป็นอย่างยิ่ง ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สุขใจ ชูจันทร์ ประธานสอบวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำด้านวิชาการ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์ ที่ให้คำแนะนำด้านวิชาการและตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณอาจารย์อัญชลี เชียงกูล ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆ ขอบคุณเจ้าหน้าที่และพนักงานทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการทำงานต่างๆ ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รวมทั้งทุกคนที่ วช. ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือความเป็นกันเอง และเป็นกำลังใจจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้โอกาสในการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต เอื้อเฟื้อสถานที่ ตลอดจนอุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบพระคุณศูนย์รวมเห็ดบ้านอรัญญิก จังหวัดนครปฐมที่ให้ความช่วยเหลือในการเพาะดอกเห็ด

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่ที่ให้ความรัก กำลังใจ และให้โอกาสให้ลูกได้มีชีวิตและทำในสิ่งที่อยากทำ ขอขอบคุณพี่เปี๊ยก พี่ป้อม น้องเปียว และกองทัพญาติๆทุกคน เพื่อนๆ บ้านรุ่ง และทุกคนที่เกี่ยวข้องกับข้าพเจ้าที่ให้การสนับสนุนทั้งกำลังใจ กำลังกาย กำลังทรัพย์ และความอดทน จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นเล่มสมบูรณ์ได้

คุณค่าและประโยชน์อันใดอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเพื่อทดแทนพระคุณแด่คุณพ่อและคุณแม่ผู้เป็นที่สุดของความรักของลูก

นันทวดี คำสงค์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....IV

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง.....IX

สารบัญรูป.....XI

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 ระดับขั้นของการจัดหมวดหมู่ (Categories of classification) ของเห็ดสกุล *Lentinula* และ *Lentinus*.....4

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและการเกิดดอก.....6

2.3 เห็ดราในชั้นแบซิดิโอไมซิทิส (Basidiomycetes).....6

2.4 การสืบพันธุ์ของเห็ดราในชั้นแบซิดิโอไมซิทิส.....12

2.5 ระบบการผสมพันธุ์ในเห็ดรา.....15

2.6 การปรับปรุงพันธุ์เห็ดรา.....18

2.7 เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker).....19

2.8 การตรวจสอบคุณภาพและการวัดปริมาณดีเอ็นเอ.....20

2.9 ยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (Ribosomal RNA gene : *rRNA*).....21

2.10 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส.....22

2.11 การตรวจสอบโพลีมอร์ฟีซึมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ; PCR).....24

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.12 เจลอะกาโรส (agarose gel)……..…….....27

2.13 เจลโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel)…..…….....27

2.14 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) ……..…….....28

2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……..…….....29

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย……..…….....34

3.1 เชื้อเห็ดและวัสดุเพาะเห็ดสำเร็จรูป……..…….....34

3.2 สารเคมี……..…….....35

3.3 อุปกรณ์……..…….....36

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย……..…….....36

3.4.1 การผสมพันธุ์แบบ mon-mon mating……..…….....36

3.4.2 การผสมพันธุ์แบบ di-mon mating……..…….....37

3.4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ฟิวแซนท์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์คู่ผสม……..…….....38

3.4.4 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ……..…….....39

3.4.5. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์……..…….....40

3.4.5.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS2……..…40

3.4.5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4……..…….41

3.4.5.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS3 และ ITS4……..…….41

3.4.5.4 การทำ RFLP ของชิ้นดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์……..…..42

3.4.6 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซิส……..…….43

3.4.7 สถานที่ทำการวิจัย……..…….....43

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....44

4.1 การผสมพันธุ์แบบ mon-mon mating.....44

4.1.1 ความสามารถในการเดินเส้นใยในเมล็ดข้าวฟ่าง.....47

4.1.2 ความสามารถในการเกิดดอก.....47

4.2 การผสมพันธุ์แบบ di-mon mating.....48

เห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว.....48

เห็ดหอมกับเห็ดบด.....48

เห็ดขอนขาวกับเห็ดหอม.....48

เห็ดขอนขาวกับเห็ดบด.....49

เห็ดบดกับเห็ดหอม.....49

เห็ดบดกับเห็ดขอนขาว.....49

4.2.1 ความสามารถในการเดินเส้นใยในเมล็ดข้าวฟ่าง.....50

4.2.2 ความสามารถในการเกิดดอกและการศึกษา
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด.....50

4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์
เปรียบเทียบกับสายพันธุ์คู่ผสม.....51

4.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใย.....51

4.3.1.1 การศึกษาขนาดของเส้นใย.....51

4.3.1.2 การศึกษาการเจริญของเส้นใย.....51

4.3.1.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเส้นใยเห็ด.....54

4.3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด.....57

4.4 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....73

4.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS
ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS2.....73

4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS
ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4.....73

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS
ด้วยไพรเมอร์ ITS3 และ ITS4.....75
4.4.4 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดหอม
เห็ดขอนขาว และเห็ดบดโดยเทคนิค PCR/RFLP.....76
4.4.4.1 การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ
ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....76
4.4.4.2 การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอบนเจลโพลีอะคริลาไมด์.....77
- PCR/RFLP ของ rDNA จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2.....77
- PCR/RFLP ของ rDNA จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4.....89
- PCR/RFLP ของ rDNA จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4.....103

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....118

บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....124

บรรณานุกรม.....126

ภาคผนวก ก.....131
ภาคผนวก ข.....132
ภาคผนวก ค.....134
ภาคผนวก ง.....135
ภาคผนวก จ.....137

ประวัติผู้เขียน.....139

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 รูปแบบการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type ต่างๆ ในเห็ดราแบบไบโพลา เฮทเทอโรทาลิซึม....16

2.2 รูปแบบการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type ต่างๆ ในเห็ดราแบบเททราโพลา เฮทเทอโรทาลิซึม....17

2.3 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดยเจลอะกาโรส....27

2.4 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดยเจลโพลีอะคริลาไมด์....28

4.1 ผลของการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์แบบ mon-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว....45

4.2 ผลของการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์แบบ mon-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดบด....46

4.3 ผลของการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์แบบ mon-mon mating ระหว่างเห็ดบดกับเห็ดขอนขาว....46

4.4 ผลของการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์แบบ di-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว....50

4.5 ผลของการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์แบบ di-mon mating ระหว่างเห็ดบดกับเห็ดขอนขาว....50

4.6 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์ MES6, MPS19 DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MEA พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วันและ 5 วัน....53

4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบด และฟิวแซนท์สายพันธุ์ MES6, MPS19 และ DES1....58

4.8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบด และฟิวแซนท์สายพันธุ์ DES7, DES5 และ DPS8....67

4.9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบด และฟิวแซนท์สายพันธุ์ DPS14 และ DPS12....70

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.10 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 ด้วยวิธี PCR/RFLP จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2.....116

4.11 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 ด้วยวิธี PCR/RFLP จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4.....116

4.12 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 ด้วยวิธี PCR/RFLP จากคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4.....117

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ส่วนต่างๆของโครงสร้างภายนอกของดอกเห็ดในชั้น Basidiomycetes.....7

2.2 รูปร่างของหมวกดอกแบบต่างๆ.....8

2.3 ลักษณะของขอบหมวกดอก.....8

2.4 ลักษณะแบบต่างๆ ที่ไม่เรียบของผิวหมวกดอกเห็ด.....9

2.5 การยึดติดของครีบกับก้านดอกแบบต่างๆ.....9

2.6 รูปแบบการเว้นช่องว่างภายในครีบแบบต่างๆ.....9

2.7 รูปร่างของก้านดอกแบบต่างๆ.....10

2.8 ลักษณะก้านดอกติดกับหมวกดอกแบบต่างๆ.....10

2.9 ลักษณะของผิวของก้านดอกเห็ดแบบต่างๆ.....10

2.10 วงจรชีวิตของเห็ดราในชั้นแบซิดิโอไมซิทิส.....13

2.11 ขั้นตอนการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น.....14

2.12 แคลมป์คอนเนคชั่นของเห็ดราในไฟลัมเบซิดิโอมัยคอต้า.....15

2.13 ตำแหน่งของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ และตำแหน่งของไพรเมอร์บนสายดีเอ็นเอ.....22

2.14 ตำแหน่งของไพรเมอร์ ITS1 ถึง ITS4 บริเวณ ITS บนสายดีเอ็นเอ.....22

2.15 ขั้นตอนการตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมจากผลผลิตของพีซีอาร์
โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....25

2.16 การทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....26

4.1 การเจริญของเส้นใยฟิวแซนท์จากวิธี mon-mon mating และ di-mon mating 55

4.2 ดอกเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์.....62

4.3 สีสปอร์พิมพ์ดอกเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์.....63

4.4 ขนาดสปอร์ของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์ MES6, MPS19,
DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12.....65

4.5 อิเล็คโทรโฟรีแกรมของดีเอ็นเอเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบด และฟิวแซนท์
ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 บนเจลอะกาโรสร้อยละ 2.....73

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.6 อิเล็คโทรโฟรีแกรมของดีเอ็นเอเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบด และฟิวแซนท์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 บนเจลอะกาโรสร้อยละ 2.....74

4.7 อิเล็คโทรโฟรีแกรมของดีเอ็นเอเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบด และฟิวแซนท์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 บนเจลอะกาโรสร้อยละ 2.....76

4.8 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ E22, MES6 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....81

4.9 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ P7, MPS19 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....82

4.10 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ E, DES1 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....83

4.11 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ E, DES7 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....84

4.12 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ E, DES5 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....85

4.13 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ P, DPS8 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....86

4.14 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ P, DPS14 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....87

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.15 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2
ของสายพันธุ์ P, DPS12 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ
และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....88

4.16 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4
ของสายพันธุ์ E22, MES6 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *S*au3AI
และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....95

4.17 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4
ของสายพันธุ์ E, DES1 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI
และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....96

4.18 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4
ของสายพันธุ์ P, DPS12 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI
และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....97

4.19 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4
ของสายพันธุ์ P7, MPS19 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ
และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....98

4.20 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4
ของสายพันธุ์ E, DES7 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ
และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....99

4.21 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4
ของสายพันธุ์ E, DES5 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ
และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....100

4.22 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4
ของสายพันธุ์ P, DPS8 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ
และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....101

4.23 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4
ของสายพันธุ์ P, DPS14 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ
และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....102

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.24 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E, DES7 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....108

4.25 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P, DPS8 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI และ *Hae*III และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....109

4.26 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E22, MES6 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....110

4.27 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P7, MPS19 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....111

4.28 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E, DES1 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....112

4.29 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E, DES5 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....113

4.30 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P, DPS14 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....114

4.31 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P, DPS12 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส.....115

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

เห็ด (mushroom) จัดเป็นเห็ดรา (fungus) กลุ่มที่มีวิวัฒนาการสูงกว่าเห็ดราชนิดอื่นๆ มีทั้งชนิดที่รับประทานได้และไม่ได้ เห็ดมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีราคาถูก มีทั้งชนิดที่ขึ้นเองตามธรรมชาติและชนิดที่สามารถเพาะทางการค้าได้ ปัจจุบันมีผู้นิยมบริโภคเห็ดกันมากขึ้นเพราะเห็ดเป็นอาหารที่มีรสชาติดี หาซื้อได้ง่ายและยังพบว่าเห็ดเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนอาหารประเภทเนื้อสัตว์ได้ มีเกลือแร่และวิตามินเป็นส่วนประกอบที่สูงกว่าพืชผักชนิดอื่นๆ จึงเหมาะสมต่อการบริโภคของมนุษย์ทุกเพศทุกวัยเนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ ชนชาติจีนและญี่ปุ่นบริโภคเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) เพื่อรักษาอาการหวัด ไข้หวัดใหญ่และมะเร็งในกระเพาะอาหาร (Chang. 1999)

การบริโภคเห็ดในประเทศไทยนั้นไม่มีหลักฐานปรากฏแน่ชัดว่าเริ่มตั้งแต่เมื่อใด แต่คนไทยนั้นรู้จักนำเห็ดมาบริโภคตั้งแต่โบราณแล้ว ดังเห็นได้จากในท้องถิ่นชนบทที่ยังไม่มีการเพาะเห็ดเพื่อการบริโภค ในช่วงต้นฤดูฝน (ประมาณเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน) ประชาชนมักจะออกไปเก็บเห็ดตามป่าเขาหรือในบริเวณที่มีเห็ดขึ้นเองตามธรรมชาติ ตามกองฟาง กองเปลือกถั่วต่างๆ หรือบริเวณใกล้จอมปลวกซึ่งมักพบเห็ดโคน (*Termitomyces* sp.) ซึ่งอาจเนื่องมาจากเห็ดชนิดนี้เป็น mycorrhizal fungi ก็เป็นได้ ปัจจุบันเห็ดหลายชนิดได้มีการการเพาะเป็นการค้าอย่างแพร่หลาย เช่น เห็ดหอม เห็ดหลินจือ เห็ดนางฟ้า เป็นต้น เห็ดหอมเป็นเห็ดที่มีประโยชน์ทางโภชนาการสูง รสชาติดี มีกลิ่นหอม และมีสรรพคุณทางยา แต่มีข้อจำกัดตรงที่เห็ดหอมที่เพาะได้ในประเทศไทย เป็นพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้ดีเฉพาะในช่วงฤดูหนาวที่มีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ เมื่อเพาะในฤดูร้อนจะทำให้ดอกเห็ดหอมที่ได้มีขนาดเล็ก คุณภาพต่ำ เห็ดออกดอกน้อย ผลผลิตลดลง จึงต้องปรับสภาพโรงเรือนให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดหอม ทำให้ไม่คุ้มเมื่อทำเป็นการค้า การปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมให้สามารถทนร้อน ตามสภาพอากาศของบ้านเราจึงเป็นวิธีการที่จะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเห็ดหอมเพื่อเป็นการค้าอย่างมาก โดยการนำเห็ดหอมมาผสมกับเห็ดในสกุลอื่นที่มีความใกล้ชิดกัน เช่น เห็ดบด (เห็ดลม, *Lentinus polychrous*) และเห็ดขอนขาว (*L. squarrosulus*) เพื่อให้ได้เห็ดลูกผสมที่มีลักษณะดีของเห็ดหอม แต่มีคุณสมบัติเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศร้อนเหมือนเห็ดขอนขาวและเห็ดบด และสามารถนำไปเพาะในโรงเรือนได้ เนื่องจากเดิมเห็ดหอมมีชื่อว่า *Lentinus edodes* อยู่ในสกุลเดียวกันกับเห็ดบดและเห็ดขอนขาว (จากวิทยานิพนธ์ของจันทิมาภรณ์ นววงศ์วิวัฒน์ (2546) ที่ได้ศึกษาระบบเพศของเห็ดหอม และเห็ดขอนขาว โดยพบว่าเห็ดทั้ง 3 ชนิดมีระบบเพศ (mating system) เป็นแบบ tetrapolar

(bifactorial) heterothallism ซึ่งมีชนิดของเพศ (mating type) 4 ชนิด และได้จัดกลุ่มของสายพันธุ์โมโนคาริออนของเห็ดแต่ละชนิดออกเป็น 4 กลุ่ม) รายงานนี้จึงได้นำสายพันธุ์ที่มีประเภทของชนิดของเพศของเห็ดหอม เห็ดขอนขาวจากวิทยานิพนธ์ของจันทิมาภรณ์ นววงศ์วิวัฒน์ และเห็ดบดที่ได้จากงานปัญหาพิเศษของนันทวดี คำสงค์ (2546) มาใช้ประโยชน์ในการผสมพันธุ์ด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional method) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอม เห็ดบด และเห็ดขอนขาว โดยวิธีดั้งเดิม (conventional method) แบบ mon-mon mating และ di-mon mating ที่มีความเสถียรทางพันธุกรรม

2. เพื่อปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอม เห็ดบด และเห็ดขอนขาวให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะดีของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดบด และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศของเขตร้อน

3. ตรวจสอบลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอม เห็ดบด และเห็ดขอนขาวด้วยวิธี mon-mon mating และ di-mon mating จากสัณฐานวิทยาและเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลระดับดีเอ็นเอ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ศึกษาวิธีการสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว เห็ดหอมกับเห็ดบด และเห็ดขอนขาวกับเห็ดบด จากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาริออนและสายพันธุ์ไดคาริออนด้วยวิธีดั้งเดิม แบบ mon-mon mating และ di-mon mating

2 ตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยศึกษาด้านสัณฐานวิทยาและโดยการประยุกต์เทคนิคด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลด้วยวิธี PCR กับ PCR/RFLP

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. จะได้ลูกผสมที่เกิดจากการผสมเห็ดต่างสกุล (genus) ระหว่างเห็ดในสกุล *Lentinula* กับ *Lentinus* และลูกผสมระหว่างชนิด (species) ระหว่างเห็ดขอนขาวและเห็ดบดที่มีความเสถียรทางพันธุกรรม

2. จะได้ลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะดีของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดบดที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพโรงเรือนทั่วไปและสามารถใช้ในการผลิตเชิงพาณิชย์

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เห็ดเป็นเห็ดราประเภทหนึ่งที่อยู่ในไฟลัม (phylum) เบสิดิโอมัยคอต้า (Basidiomycota) (Alexopoulos. 1996) โดยเห็ดในสกุล *Lentinula* เช่น เห็ดหอม (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) เป็นเห็ดที่มีรสชาติดี มีกลิ่นหอม และมีคุณค่าทางโภชนาการเหมาะที่จะนำไปประกอบอาหารหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีเห็ดในสกุล *Lentinus* อีกหลายชนิด เช่น เห็ดบด เห็ดขอนขาว เห็ดหูกวาง เป็นต้นได้รับความนิยมนำมาบริโภคเช่นกัน เนื่องจากมีรสชาติดีและเพาะปลูกง่าย จึงมีการเพาะในเชิงพาณิชย์กันอย่างแพร่หลาย และยังมีสารบางอย่างที่มีสรรพคุณทางยาหรือใช้ป้องกันกำจัดโรคได้ เช่น มีสารสกัดที่สามารถลดการสะสมของไขมันในหลอดเลือด ความดันโลหิตสูง มีสารต่อต้านเนื้องอก ไวรัสและมะเร็ง สารสกัดจากดอกและสปอร์ของเห็ดหอมยังมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านเชื้อไวรัส (antiviral agents) และสามารถยับยั้งการเจริญรวมทั้งการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ influenza A/SW15 virus ที่เกิดในหนู ส่วนสารเอซีทูพี (Ac 2 P) ในเห็ดหอมมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหวัด หัด และโปลิโอ (Borchrs และคณะ. 1999) ในปี 1992 Triratana และคณะได้ศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดหอมต่อการจับตัวของเกล็ดเลือด พบว่าสามารถยับยั้งการจับตัวของเกล็ดเลือดในหลอดทดลอง อันจะทำให้สามารถป้องกันการอุดตันในหลอดเลือด เนื่องจากการจับตัวของเกล็ดเลือดได้ (ประภัสสร โชคสวนทรัพย์. 2540) และยังมี Lentinan และ L.E.M. เป็นองค์ประกอบสำคัญซึ่ง beta-glucans ใน Lentinan และ LEM เป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ที่กระตุ้นระบบเซลล์ภูมิต้านทานของร่างกาย ให้สามารถยับยั้งการเพิ่มตัวของเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งในกระเพาะอาหาร และทำให้เซลล์มะเร็งลดจำนวนลง อีกทั้งยังมีสารสกัด eritadenine ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยลดการเกิดโรคหัวใจ และลดระดับไขมันและคลอเรสเตอรอลในเลือดได้ (USDA nutrition database. online) และมีสาร guanosine 5'-monophosphate ทำให้เห็ดหอมมีรสชาติดี และ lenthionine ทำให้เห็ดหอมมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว รวมทั้งมีวิตามิน D_2 ซึ่งสามารถถูกชักนำให้กลายเป็นวิตามิน D ได้โดยรังสีอุลตราไวโอเลต (Tokimoto และ Komatsu. 1978)

เห็ดหอมมีชื่อสามัญที่รู้จักกัน เช่นประเทศญี่ปุ่นเรียกว่า "ชิตาเกะ" (shii-take) และภาษาจีนเรียกว่า "เฮียะโกะ" (Haeng-ko) โดยทั่วไปเห็ดหอมมี 3 ลักษณะคือ เห็ดหอมลาย เห็ดหอมหนา และเห็ดหอมบาง ส่วนสายพันธุ์เห็ดหอมแบ่งเป็น 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ฮานาดอนโกะ (Hana Donko) สายพันธุ์ดอนโกะ (Donko) สายพันธุ์โกตซูบุดอนโกะ (Kotsubu Donko) สายพันธุ์โกะชิน (Koshin) และสายพันธุ์โกโกะ (Koko) โดยสายพันธุ์ฮานาดอนโกะเป็นเห็ดหอมที่มีคุณภาพดีที่สุด มีเนื้อหมวกดอกหนา ขอบหมวกไม่บานออก และมีก้านดอกอวบสั้น การ

เจริญเติบโตจะขึ้นได้ดีเฉพาะที่มีอุณหภูมิต่ำมากๆเท่านั้น ส่วนเห็ดหอมที่เพาะกันในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นสายพันธุ์โกะชิน ซึ่งมีลักษณะเนื้อหมวกดอกบาง ขอบหมวกมักบานออก ก้านดอกยาว และราคาซื้อขายต่ำกว่าสายพันธุ์ฮานาดอนโกะ สายพันธุ์ดอนโกะ และสายพันธุ์โกตซูบุดอนโกะ เห็ดหอมมีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เรียกกันมาแต่ดั้งเดิมว่า *Lentinus edodes* (Berk.) Sing แต่ต่อมา Pegler (1975) เป็นคนแรกที่เปลี่ยนชื่อเห็ดหอมเป็น *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler ทั้งนี้ Pegler (1983) ให้เหตุผลในการเปลี่ยนชื่อว่า hyphal system ของเห็ดหอมมีลักษณะแตกต่างจากเห็ดในสกุล *Lentinus* ที่ generative hyphae ของเห็ดหอมเป็นประเภท monomitic (ซึ่งเป็นลักษณะของเห็ดสกุล *Lentinula* ในขณะที่เห็ดสกุล *Lentinus* ต้องเป็นประเภท dimitic หรือ trimitic) และจากการศึกษาระบบเพศของ Miles และ Chang (1989) พบว่าเห็ดหอมมีวงจรชีวิตเป็นแบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism คือระบบเพศถูกควบคุมโดยยีน 2 ชนิด คือ ยีน A กับยีน B จึงมีชนิดของเพศ (mating type) 4 ชนิด สายพันธุ์โมโนคาริออนที่ผสมกันได้ต้องมีชนิดของเพศต่างกันทั้ง 2 ตำแหน่ง (locus) จึงจะเข้ากันได้ (compatible) เมื่อผสมกันแล้วจะได้เส้นใยที่เป็นไดคาริออน (dikaryon, n+n) โดยมีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection) และพัฒนาเป็นดอกเห็ดต่อไป (จันทิมาภรณ์ นววงศ์วิวัฒน์. 2546)

2.1 ระดับขั้นของการจัดหมวดหมู่ (categories of classification) ของเห็ดสกุล *Leninula* และ *Lentinus*

ระดับขั้นของการจัดหมวดหมู่ของเห็ดหอม (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) มีดังต่อไปนี้ (Alexopoulos และ Mims. 1979)

Kingdom.....Fungi

Division.....Amastigomycota

Subdivision.....Basidiomycotina

Class.....Basidiomycetes

Subclass.....Holobasidiomycetidae II

Order.....Agaricales

Family.....Tricholomataceae

Genus..... .....*Lentinula*

Species.....*Lentinula edodes*

เห็ดขอนขาวเป็นเห็ดป่าที่อยู่ในสกุล *Lentinus* เป็นที่รู้จักกันในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือและภาคใต้ของไทย ส่วนภาคกลางเรียกว่า "เห็ดมะม่วง" เป็นเห็ดที่ชอบขึ้นบนขอนไม้ตระกูลเต็งรังและมะม่วง มีลักษณะคล้ายเห็ดบด ดอกอ่อนมีรสหวาน แต่เนื้อ

เหนียวคล้ายเนื้อสัตว์และความเหนียวจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อดอกแก่ขึ้น มีราคาแพงกว่าเห็ดที่เพาะเลี้ยงหลายชนิด ปัจจุบันการศึกษาในด้านต่างๆเกี่ยวกับเห็ดขอนขาวยังแทบจะไม่มีรายงานเผยแพร่ พรรณี ฐิตาภิชิตและประภัสสร โชคสวนทรัพย์ (2539) ได้ตรวจเอกลักษณ์ (identify) ของเห็ดขอนขาวและพบว่าเห็ดขอนขาวควรเป็นเห็ดจำพวก agarics ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Pegler (Pegler. 1986) ซึ่งเห็ดเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตง่าย ขยายพันธุ์ได้ดีและรวดเร็ว เป็นที่นิยมบริโภคจึงเหมาะแก่การเพาะเลี้ยงเชิงการค้า จึงน่าจะพัฒนาสายพันธุ์เห็ดในสกุลนี้เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการ เพื่อพัฒนาเพาะเลี้ยงในเชิงการค้าต่อไป

ระดับขั้นการจัดหมวดหมู่ของเห็ดขอนขาวเหมือนกับการจัดหมวดหมู่เห็ดหอม แตกต่างกันเพียงการจัดลำดับสกุล (genus) และลำดับชนิด (species) เป็น *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Pegler (Alexopoulos และ Mims. 1979)

ในประเทศไทย *Lentinus polychrous* เป็นที่รู้จักกันดีในชื่อเห็ดบด เห็ดลม เห็ดกระด้าง เป็นเห็ดพื้นเมืองที่มักเกิดบนขอนไม้เต็ง รัง เหียน และไม้ตะเคียน ให้ดอกปลายฤดูฝนถึงต้นฤดูหนาว เป็นเห็ดกินได้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพราะนิยมเพาะเพื่อเป็นการค้า โดยเฉพาะทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมากว่า 20 ปีมาแล้วโดยจังหวัดที่มีการเพาะมากที่สุด ได้แก่ จังหวัดแพร่ ขอนแก่น กาฬสินธุ์ ชัยภูมิ และร้อยเอ็ด เป็นต้น การผลิตต่อปีผลิตได้ประมาณ 45 ตันต่อปี (Pornthap *et.al.* 2003.) เนื่องจากมีรสชาติดี เพาะง่าย เจริญเติบโตดีเหมาะกับสภาพอากาศร้อนชื้นของประเทศไทย และยังมีประโยชน์ทางโภชนาการซึ่งประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต แคลเซียม และฟอสฟอรัสในปริมาณสูง ยิ่งกว่านั้นยังพบสารประกอบที่มีสมบัติทางยา เช่น eritadenine, germanium และ ergosterol (Pegler. 1983)

เห็ดบดมีลักษณะใกล้เคียงกับเห็ด *Lentinus praergidus* Berk. ชอบขึ้นเป็นดอกเดี่ยวหรือขึ้นเป็นกลุ่ม โคนติดกัน 3-5 ดอก หมวกดอกมีขนาดตั้งแต่ 4-20 เซนติเมตร แผ่กว้างคล้ายกับพัดใบลาน สีของดอกเห็ดมีตั้งแต่น้ำตาลซีดจนถึงเข้ม ขึ้นอยู่กับสภาพดินฟ้าอากาศหรือสายพันธุ์ กล่าวคือ หากมีแสงมากหรือหนาวเย็น สีของดอกจะมีสีน้ำตาลเข้มมาก ผิวของหมวกดอกเรียบ มีขนสีน้ำตาลดำเห็นได้ชัด ขอบของหมวกดอกม้วนงอเข้าไปทางครีบในขณะที่ยังเล็กอยู่ แต่เมื่อโตขึ้นจะค่อยๆคลี่ออกจนไม่เห็นส่วนที่งอ หรือหากปล่อยไว้นานๆจนแก่จัด ขอบหมวกก็อาจจะงอขึ้นไปข้างบนตรงข้ามกับรอยต่อระหว่างหมวกดอกกับก้านจะมีรอยเว้าเขาไปข้างใน ก้านดอกเห็ดเป็นส่วนชูหมวกดอก และเป็นส่วนที่ยึดติดกับวัสดุเพาะเห็ดหรืออาหารและหมวกดอก ก้านของดอกเห็ดบดมีขนาด 0.3-1.6 เซนติเมตร ยาวตั้งแต่ 3.2-13.2 เซนติเมตร ทั้งนี้ขนาดความหนาและความยาวขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมเช่นกัน โดยปกติแล้วก้านของดอกเห็ดจะเรียวเล็ก ด้านฐานเล็กส่วนที่โตที่สุดคือ ตรงรอยต่อของหมวกดอก ก้านและหมวกดอกเชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียวกัน ครีบของดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายครีบของปลา เป็นแผ่นบางเล็กๆ สั้นบ้างยาวบ้าง มีครีบเล็กๆ เป็นจำนวนมากตรงปลายขอบดอก รูปร่างของสปอร์มีลักษณะเรียวยาวคล้ายกับกล้วยไข่ มีขนาดกว้าง

ประมาณ 2.5-3.5 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 6.0-7.5 ไมโครเมตร (จันทิมาภรณ์ นววงศ์วิวัฒน์. 2546)

ระดับขั้นการจัดหมวดหมู่ของเห็ดบดเหมือนกับการจัดหมวดหมู่เห็ดขอนขาว แตกต่างกันเพียงการจัดลำดับชนิด (species) เป็น *L.* polychrous (Alexopoulos และ Mims. 1979)

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและการเกิดดอก

การเจริญเติบโตของเส้นใยจนพัฒนาเกิดเป็นดอกเห็ด (เกษม สร้อยทอง. 2529) แบ่งออกเป็น 3 ระยะคือ ระยะสปอร์ ระยะเส้นใย และระยะออกดอก ซึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อช่วงต่างๆของเห็ดได้แก่ อุณหภูมิ โดยธรรมชาติแล้วเห็ดหอมจะชอบอากาศเย็นหรืออุณหภูมิค่อนข้างต่ำ สามารถแบ่งตามระยะการเจริญเติบโต คือ ระยะสปอร์ ซึ่งจะเริ่มพัฒนาเป็นสปอร์ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส และสปอร์จะงอก (germinate) ไปเป็นเส้นใยได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิระหว่าง 24-26 องศาเซลเซียส ระยะเส้นใย เส้นใยเจริญเติบโตดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 22-26 องศาเซลเซียส และระยะออกดอก โดยช่วงที่ดอกเห็ดเจริญได้ดีที่สุดคือ 12-17 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส เห็ดจะเจริญได้เร็วแต่ดอกจะมีขนาดบาง ก้านดอกยาว แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำไป เห็ดจะเจริญช้าแต่ดอกมีขนาดหนากว่า ความชื้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ โดยความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดหอมตามระยะการเจริญเติบโตของเห็ดหอมเริ่มตั้งแต่ ระยะสปอร์ ระยะนี้ต้องการความชื้นสูงมาก เพื่อทำให้ผนังหุ้มสปอร์อ่อนตัว สปอร์จะได้งอกออกมาได้ง่าย ระยะเส้นใย ในระหว่างการเพาะในท่อนไม้เส้นใยจะเจริญเติบโตได้ดีที่ความชื้นระหว่าง 35-40% แต่ถ้าเพาะในก้อนเชื้อ ถ้าความชื้นในวัสดุเพาะต่ำเกินไปเส้นใยของเห็ดจะเจริญเติบโตไม่ดี เนื่องจากธาตุอาหารในวัสดุเพาะไม่สามารถละลายออกมาได้ ทำให้เส้นใยเห็ดนำไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ แต่ถ้าความชื้นในวัสดุเพาะมากเกินไป เส้นใยเห็ดจะเจริญเติบโตช้าและเดินไม่เต็มก้อน ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด ควรมีความชื้นระหว่าง 60-75% เชื้อเห็ดจึงจะเจริญเติบโตได้ดี ส่วนในระยะออกดอก เห็ดหอมจะต้องการความชื้นสูงมาก ภายในโรงเพาะควรมีความชื้นสัมพันธ์ประมาณ 80-90% และความชื้นภายในก้อนเชื้อประมาณ 75-80% ถ้าหากความชื้นต่ำเกินไปจะทำให้ดอกเห็ดมีเนื้อหมวกบาง บานง่าย ก้านดอกยาว และคุณภาพไม่ดีเท่าที่ควร

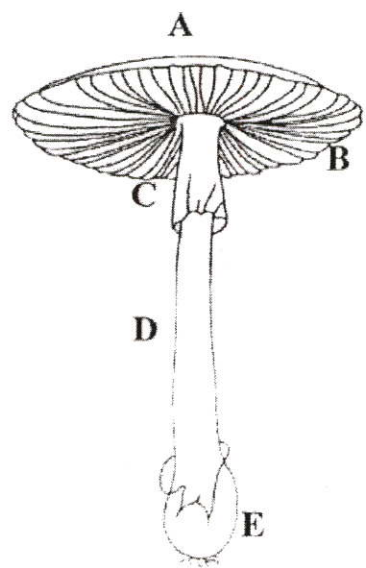
2.3 เห็ดราในชั้นแบซิดิโอไมซิทิส (Basidiomycetes)

เห็ดราชั้น Basidiomycetes สร้างสปอร์แบบมีเพศที่เรียกว่า basidicspores บน basidium มีทั้งพวกที่ไม่สร้างดอกเห็ด [(basidiocarp) ซึ่งได้แก่ เห็ดราที่ทำให้เกิดโรคพืชชนิดราสนิม (rusts) และ

ราเขม่าดำ (smuts) รวมทั้งพวกที่มีเซลล์เดียว (basidiomycetous yeast)] และพวกที่สร้างดอกเห็ด ซึ่งเป็นเห็ดราที่สามารถบริโภคได้ (สาทินี ซื่อตรง. 2546)

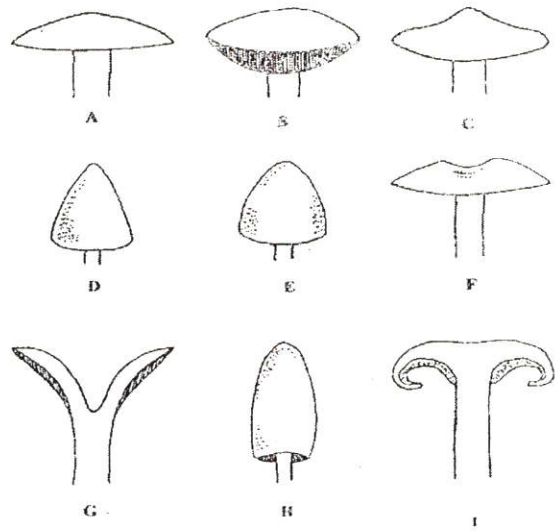
2.3.1 ลักษณะโครงสร้างภายนอกของดอกเห็ด

เห็ดมีส่วนประกอบต่างๆ ประกอบด้วย หมวกเห็ด [(cap หรือ pileus) (A)] ครีบหรือรูใต้หมวกดอก [(gills หรือ lamella ในเห็ดราพวก gill mushrooms และ pores หรือ tube ในเห็ดราพวก bolete (B)] ที่ส่วนบนของก้านดอกอาจมีวงแหวน [(ring หรือ annulus) (C)] ก้านดอก [(stipe หรือ stalk) (D)] ที่โคนก้านดอกอาจมีปลอกหุ้มโคน [(volva หรือ cup) (E)]



รูปที่ 2.1 ส่วนต่างๆของโครงสร้างภายนอกของดอกเห็ดในชั้น Basidiomycetes
ที่มา : สาทินี ซื่อตรง. (2546)

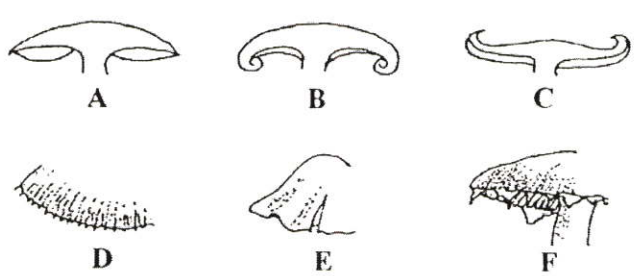
รูปร่างของหมวกดอกเห็ดมีความสำคัญในการจัดจำแนกชนิด ซึ่งมีรูปแบบของส่วนต่างๆ ภายนอกของดอกเห็ดดังต่อไปนี้



รูปที่ 2.2 รูปร่างของหมวกดอกแบบต่างๆ

A = หมวกดอกเป็นรูปกลมคล้ายกระทะคว่ำ ขอบหมวกเสมอกัน (regular and convex) B = หมวกเห็ดมีลักษณะแบนราบ (plane or expanded) C = หมวกเห็ดมีลักษณะคล้ายกระทะคว่ำแต่โป่งตรงกลาง (umbonate) D = หมวกเห็ดมีลักษณะคล้ายรูปกรวย (conical) E = หมวกเห็ดมีลักษณะคล้ายรูประฆัง (bell shaped or campanulate) F = หมวกเห็ดมีลักษณะตรงกลางบุ๋มเป็นช่อง (centraldepressed or umbilicate) G = หมวกเห็ดมีลักษณะคล้ายกรวยกรองตรงกลางบุ๋มลึกเกือบถึงก้านดอก (unfundibuliform or funnel shaped) H = หมวกเห็ดมีลักษณะคล้ายรูปทรงกระบอก (cylindricall) I = หมวกเห็ดมีลักษณะม้วนงอเข้าหาก้านดอก (involute)

ที่มา : สาทินี ซื่อตรง. (2546)



รูปที่ 2.3 ลักษณะของขอบหมวกดอก

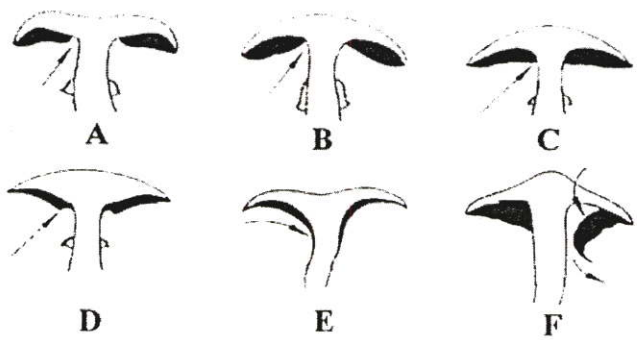
A = turned, B = inrolled, C = turned up, D = grooved, E = split, F = partial veil

ที่มา : สาทินี ซื่อตรง. (2546)

รูปที่ 2.4 ลักษณะแบบต่างๆ ที่ไม่เรียบของผิวหมวกดอกเห็ด

A = tessellated, B = fibrous scales, C = scales over lapped-like roof, D = with warts

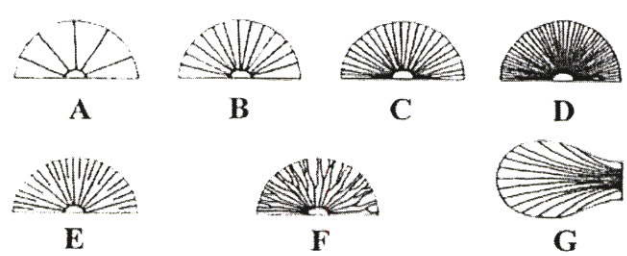
ที่มา : สาทินี ซื่อตรง. (2546)



รูปที่ 2.5 การยึดติดของครีบกับก้านดอกแบบต่างๆ

A = ครีบไม่ติดกับก้านดอก (free), B = ครีบติดกับก้านดอกเล็กน้อย (adnexed), C = ครีบติดกับก้านดอกมากกว่าแบบ adnexed (adnated), D = โคนครีบบริเวณที่ติดกับก้านมีติ่งเล็กๆ (sinuate), E = ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (decurrent), F = ครีบดึงออกจากก้านได้อย่างง่าย (gill easily detached)

ที่มา : สาทินี ซื่อตรง. (2546)

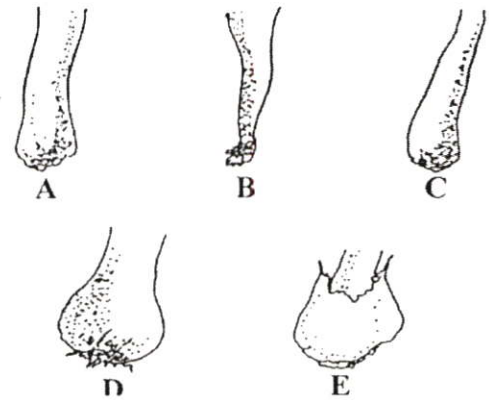


รูปที่ 2.6 รูปแบบการเว้นช่องว่างภายในครีบแบบต่างๆ

A = distant, B = subdistant, C = closed, D = crowed,

E = intermediate, F = forked, G = fanned

ที่มา : สาทินี ซื่อตรง. (2546)

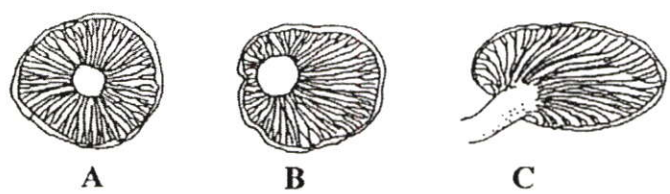


รูปที่ 2.7 รูปร่างของก้านดอกแบบต่างๆ

A = equal, B = tapering to narrow base, C = tapering from a broader base,

D = with a bulbose base E = emerging from a sac-like volva

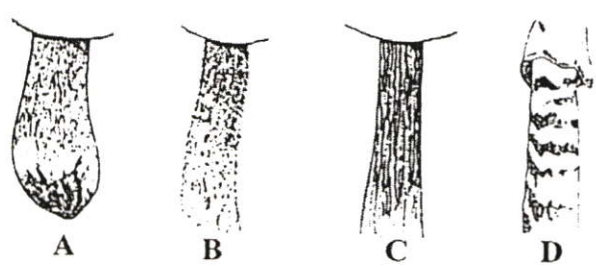
ที่มา : สาทินี ซื่อตรง. (2546)



รูปที่ 2.8 ลักษณะก้านดอกติดกับหมวกดอกแบบต่างๆ

A = central B = eccentric, C = lateral

ที่มา : สาทินี ซื่อตรง. (2546)



รูปที่ 2.9 ลักษณะของผิวของก้านดอกเห็ดแบบต่างๆ

A = reticulate, B = scaly, C = longitudinally scaly, D = random snake-like

ที่มา : สาทินี ซื่อตรง. (2546)

2.3.2 โครงสร้างภายในของดอกเห็ด

2.3.2.1 ไฮมีเนียม (Hymenium)

ไฮมีเนียม คือ ชั้นของเนื้อเยื่อที่ให้กำเนิดสปอร์ของดอกเห็ด ประกอบด้วยส่วนของเบซิเดียม (basidium) สเตอริกมา (sterigma) และเบซิดิโอสปอร์ (basidiospores)

2.3.2.2 เบซิเดียม (Basidia) และส่วนต่างๆของเบซิเดียม

เบซิเดียมถูกสร้างขึ้นที่ชั้นไฮมีเนียมใน basidiocarp มีรูปร่างคล้ายกระบองหรือทรงกระบอก เกิดจากส่วนปลายของเส้นใยเหนือผนังกั้นที่เป็นแคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection) โดยเบซิเดียมในระยะแรกนั้นจะมีลักษณะแคบและยาว เมื่อเจริญต่อไปจะขยายกว้างขึ้น ในขณะเดียวกันนิวเคลียสทั้งสองนิวเคลียสที่อยู่ภายในเบซิเดียมเกิดรวมตัวกัน คือเกิดขบวนการแคริโอแกมมี (karyogamy) ได้เป็นไซโกท (zygote) และเกิดการแบ่งตัวต่อไปแบบไมโอซิส (meiosis) ได้นิวเคลียสแบบแฮพลอยด์ (haploid) 4 อัน และที่ปลายจะโป่งออก แล้วนิวเคลียสทั้ง 4 อันนี้ จะไหลผ่านช่องภายในสเตอริกมาแต่ละอันเข้าไปในเบซิดิโอสปอร์แต่ละอันได้เป็นเซลล์แฮพพลอยด์ ปกติแล้วเบซิดิโอสปอร์มี 4 อัน แต่เห็ดราบางอันอาจมีมากกว่าหรือน้อยกว่าก็ได้ นอกจากนี้เบซิเดียมยังเป็นที่สร้างอาหารและสะสมไกลโคเจน ไขมันและน้ำมันอีกด้วย

Hawksworth และคณะ (1995) ได้แบ่งชนิดของเบซิเดียมตามลักษณะของรูปร่างได้ 2 แบบ คือ

1. Phragmobasidia (Heterobasidia) คือ เบซิเดียมที่มีการแบ่งเป็นหลายเซลล์โดยมีผนังกั้นบางชนิดเป็นลอนหรือพู (lobe)
2. Holobasidia (Homobasidia) คือ เบซิเดียมที่ไม่มีการแบ่งเป็นส่วนและไม่มีผนังกั้น (ประกอบด้วยเซลล์เพียงเซลล์เดียว)

2.3.2.3 เบซิดิโอสปอร์ (Basidiospores) (รัตเขตร์ เชยกลิ่น. 2545)

เบซิดิโอสปอร์ เป็นโครงสร้างส่วนที่เล็กที่สุดไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เป็นสปอร์ที่มีเซลล์เดียว มีนิวเคลียสเดียวและมีนิวเคลียสชนิดเฮพลอยด์ มีรูปร่างแตกต่างกันไปตั้งแต่ กลม รูปไข่หรือยาวเรียว ผิวสปอร์อาจเรียบ (รูปที่ 1.12) หรือไม่เรียบคือเป็นแบบขรุขระหรือเป็นหนาม (รูปที่ 2.13) อาจมีสีเช่น สีขาว สีน้ำตาล สีเหลืองหรือสีชมพู หรือไม่มีสีก็ได้ เมื่อเบซิดิโอสปอร์แก่จะมีหยดน้ำเกิดขึ้นที่ฐานของเบซิดิโอสปอร์ หยดน้ำนี้จะเริ่มขยายตัวขึ้นเรื่อยๆ จนทำให้เบซิดิโอสปอร์ถูกยิงหลุดออกจากสเตอริกมา หลังจากปลดปล่อยสปอร์ออกไปอาจจะแฟบลงหรือคงสภาพเดิมก็ได้ และสเตอริกมาจะไม่เกิดเบซิดิโอสปอร์ขึ้นอีก เมื่อเบซิดิโอสปอร์ตกลงมาในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็จะงอกเป็นเจิร์มทิวป์ (germ tube) เจริญเป็นเส้นใยต่อไป

2.4 การสืบพันธุ์ของเห็ดราในชั้นแบซิดิโอไมซิทิส

เห็ดราในชั้นแบซิดิโอไมซิทิสเป็นเห็ดราชั้นสูง ที่มีการสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศ แต่ส่วนใหญ่จะพบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมากกว่าแบบไม่อาศัยเพศ

2.4.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเห็ดราในชั้นแบซิดิโอไมซิทิส ได้แก่ การหักของเส้นใย (fragementation) หรือเมื่อเส้นใยอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมก็จะสืบพันธุ์ โดยการสร้างสปอร์ที่ไม่อาศัยเพศได้

2.4.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

เห็ดราในชั้นแบซิดิโอไมซิทิสส่วนใหญ่เป็นชนิดโมโนพลอยด์ (monoploid, n) คือในนิวเคลียสมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (n) โดยมีขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ 3 ขั้นตอน ดังนี้

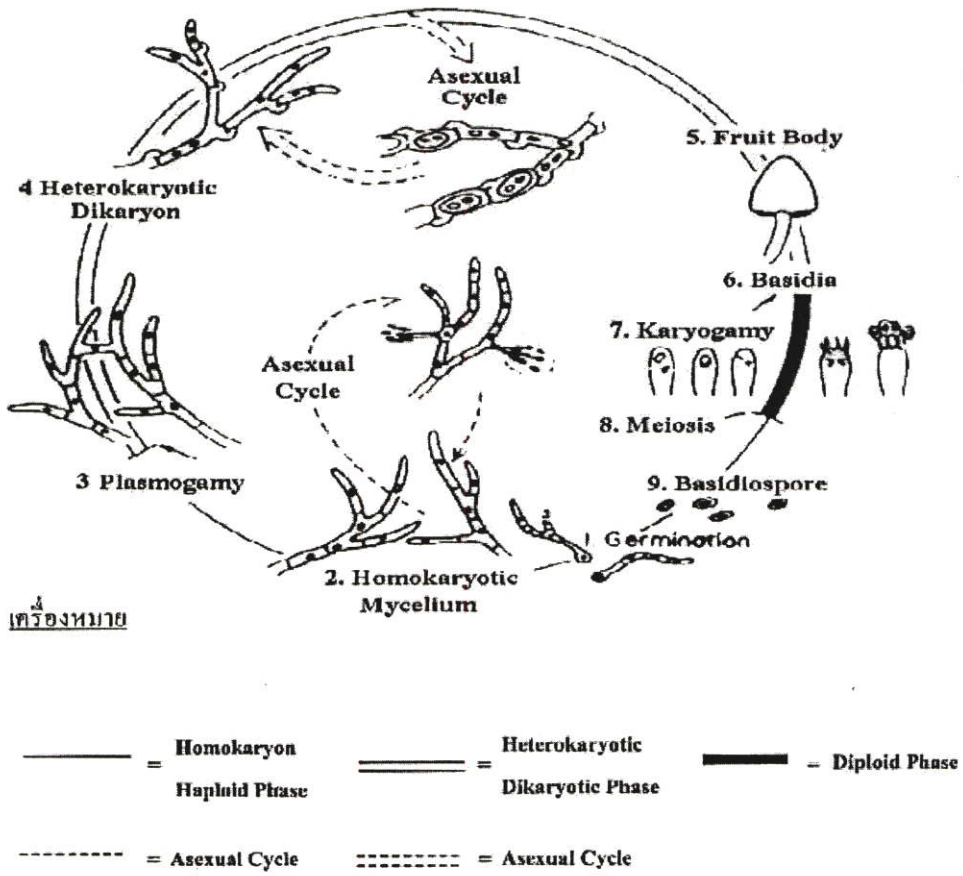
1. การรวมตัวกันของโพรโตพลาสซึมของเซลล์ 2 เซลล์ ที่เป็นประเภทโมโนคารีออน (monokaryon, n) อยู่รวมกันในเซลล์เดียวกัน (n+n)

2. การรวมตัวกันของนิวเคลียส 2 นิวเคลียส (karyogamy) ได้ไซโกทที่มีนิวเคลียสเป็น 2n

3. การแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส (meiosis) เป็นการแบ่งนิวเคลียสของไซโกทเพื่อลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งได้เป็นเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ (n) หรือโมโนพลอยด์ (n)

วงจรชีวิตของเห็ดราในชั้นแบซิดิโอไมซิทิส

เมื่อดอกเห็ดมีการเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างสปอร์ เรียกว่า เบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) ซึ่งสปอร์ชนิดนี้จะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (haploid) เมื่อสปอร์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมก็จะงอกเส้นใยออกมาเป็นเส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) (รูปที่ 2.10)



รูปที่ 2.10 วงจรชีวิตของเห็ดราในชั้นแบซิดิโอไมซิทิส

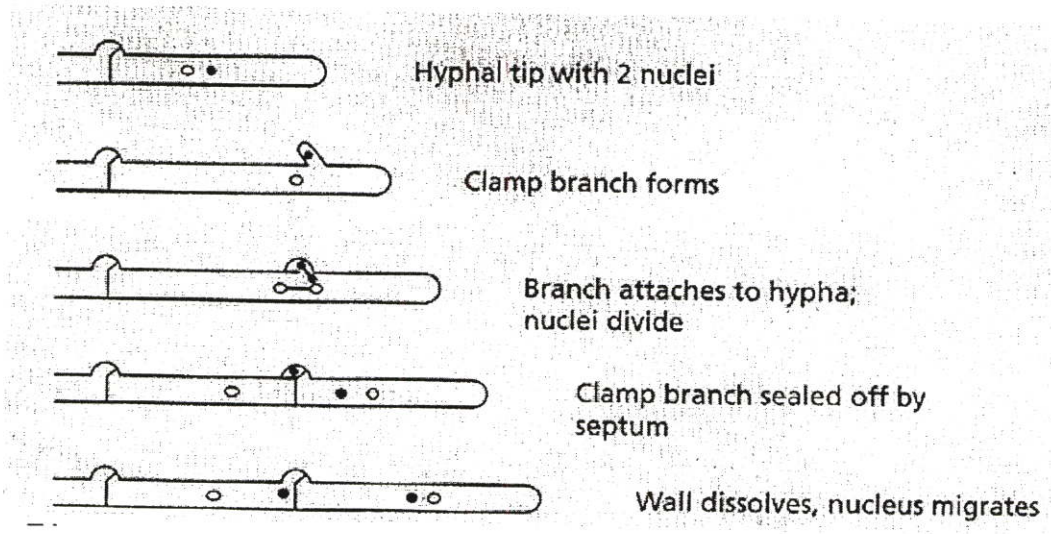
ที่มา : สาทินี ซื่อตรง. (2546)

เส้นใยของเห็ดราชั้นแบซิดิโอไมซิทิส มีการเจริญเป็น 3 ระยะ คือ

1. เส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) เป็นเส้นใยที่เกิดจากการงอกของเบซิดิโอสปอร์มาเป็นเส้นใยที่มีผนังกั้น (septum) แต่ละเซลล์มีหนึ่งนิวเคลียสและมีสภาพของโครโมโซมเป็นโมโนพลอยด์ (monoploid,n)

2. เส้นใยทุติยภูมิ เมื่อเส้นใยปฐมภูมิที่เข้ากันได้ทางเพศ 2 สายพันธุ์เจริญมาพบกันจะเกิดการรวมไซโตพลาสซึม (cytoplasm) จากเซลล์หนึ่งมารวมกับอีกเซลล์หนึ่ง ได้เป็นเซลล์เดียวที่มีสองนิวเคลียสที่แตกต่างกันและทั้งสองนิวเคลียสไม่รวมกัน เรียกสภาพของเซลล์ในสภาวะนี้ว่า ไดคาริออน (dikaryon, n+n) บนเส้นใยทุติยภูมินี้จะมีแคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection) หรือแคลมป์ (clamp) เป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายตะขอ เป็นทางผ่านของนิวเคลียสจากเส้นใยหนึ่งเข้าไปรวมกับนิวเคลียสของเส้นใยเดิม จากนั้นนิวเคลียสที่อยู่ในเส้นใยเดิมและส่วนที่อยู่ในตะขอจะทำการแบ่งตัวแบบไมโอซิส (meiosis) จาก 1 เป็น 2 นิวเคลียส นิวเคลียสที่เกิดใหม่จากทั้งสองจะเคลื่อนที่ไปอยู่บริเวณปลายของเซลล์ และจะเริ่มสร้างผนังเซลล์

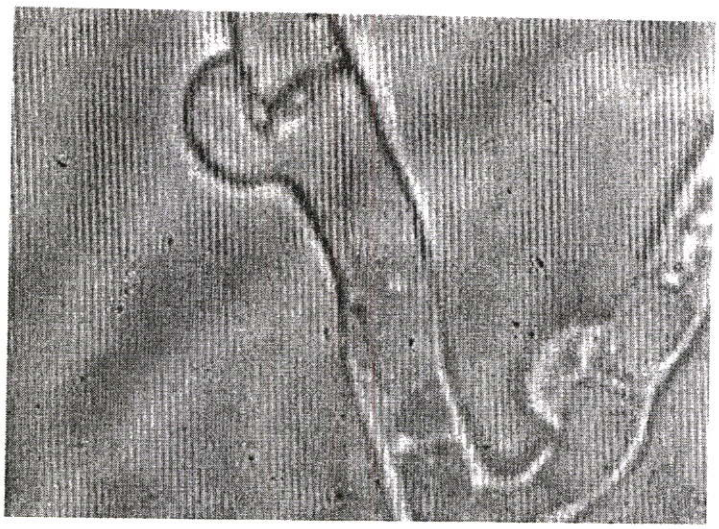
ขึ้นมาใหม่ บริเวณส่วนที่งอของตะขอและผนังที่ส่วนปลายของตะขอจะละลาย ทำให้นิวเคลียสทั้งสองไหลมารวมกัน ตะขอนี้จะกลายเป็นปุ่มนูนที่เรียกว่าแคลมป์คอนเนคชั่น



รูปที่ 2.11 ขั้นตอนการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น

ที่มา : Jim Deacon. (1997)

3. เส้นใยตติยภูมิ เมื่อเส้นใยทุติยภูมิเกิดการเจริญเติบโตเต็มที่ และมีการสะสมอาหารมากพอ จะเกิดการรวมกลุ่มของเส้นใยมากขึ้น กลายเป็นเส้นใยตติยภูมิ (tertiary mycelium) โดยแต่ละเซลล์ยังคงมี 2 นิวเคลียส (n+n) เส้นใยจะเริ่มพัฒนาเป็นตุ่มดอกเล็กๆ และจะเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆเป็นดอกเห็ด (basidiocarp) ดอกเห็ดในระยะนี้มีการพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดที่มีรูปร่างคล้ายร่ม และมีการสร้างเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายกระบองเรียกว่า เบซิเดียม (basidium) ในแต่ละเบซิเดียมยังคงมีนิวเคลียส 2 อัน (binucleate, n+n) ต่อมานิวเคลียสทั้งสองภายในเบซิเดียมเดียวกันจะรวมกัน ได้เป็นเบซิเดียมที่มีนิวเคลียสอยู่ในระยะที่เป็นดิพลอยด์ (diploid, 2n) ต่อมาเบซิเดียมจะแบ่งตัวแบบไมโอซิสเพื่อลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งเป็นแฮพลอยด์ (haploid, n) จำนวน 4 อัน ขณะเดียวกันจะมีการสร้างก้านชูสปอร์ (sterigma) ที่อยู่ตรงส่วนบนสุดของเบซิเดียม 4 อัน และนิวเคลียสแต่ละอันจะเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ที่จะกลายเป็นเบซิดิโอสปอร์ที่ปลายของสเตอริกมา และพัฒนาต่อไปเป็นเบซิดิโอสปอร์ มีจำนวนโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ และเมื่อเบซิดิโอสปอร์ถูกปลดปล่อยออกมาจากครีบดอก หรือเมื่อตกอยู่ในที่มีความชื้นก็จะงอกเส้นใยปฐมภูมิต่อไป



รูปที่ 2.12 แคลมป์คอนเนคชั่นของเห็ดราในไฟลัมเบซิดิโอมัยคอต้า

ที่มา : Jim Deacon. (1997)

2.5 ระบบการผสมพันธุ์ในเห็ดรา

ระบบการผสมพันธุ์ (mating system, breeding system) หรือระบบเพศ (sexual system) ของเห็ดราในชั้นแบซิดิโอไมซิทิสแบ่งได้ 2 ประเภท (พรรณี ฐิตาภิชิต. 2548) ดังนี้

2.5.1 โฮโมทาลิซึม (Homothallism)

เห็ดราที่มีระบบเพศแบบโฮโมทาลิซึม สามารถผสมพันธุ์ได้ภายในธาลัสเดียวกัน (self-sterile) โดยไม่ต้องอาศัยสายพันธุ์จากต่างธาลัสกัน แบ่งออกเป็น 2 ประเภทย่อยๆ คือ

2.5.1.1 ไพรมารี โฮโมธาลิซึม (Primary homothallism) ไพรมารี โฮโมธาลิซึมเกิดขึ้นในเส้นใยที่มีนิวเคลียสชนิดเดียวกันเท่านั้น (homokaryotic mycelium) และสามารถผสมพันธุ์ภายในธาลัสเดียวกันได้ เมื่อเส้นใยที่ผสมกันแล้วจะพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้ ตลอดวงจรชีวิตของเห็ดพวกนี้ไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน และไม่มีชนิดของเพศ (mating type) ตัวอย่างของเห็ดในกลุ่มนี้ได้แก่ เห็ดฟางหรือเห็ดบัว (*Volvariella volvacea*) และ *Coprinus sterguilinus* ดังนั้นเห็ดราในกลุ่มนี้จึงไม่จำเป็นต้องทำการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์

2.5.1.2 เซคคันดารี โฮโมทาลิซึม (Secondary homothallism) พบได้ในเห็ดราที่เป็นไบโพลา มีการสร้างเบซิดิโอสปอร์ที่มีนิวเคลียสสองอันที่มีอัลลีลต่างกัน ดังนั้นเมื่อแต่ละสปอร์งอกก็จะสามารถเจริญและผสมกันเองได้ภายในธาลัสของมันเอง จึงเป็นโฮโมทาลิซึมที่เรียกว่า เซคคันดารี โฮโมธาลิซึม

2.5.2 เฮทเทอโรทาลิซึม (Heterothallism) หรือ self-fertility

เห็ดราในระบบนี้เป็นเห็ดราที่ไม่สามารถผสมกันเองได้ภายในธาลัสเดียวกัน การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีนิวเคลียสจากต่างธาลัสที่มีชนิดของเพศ (mating type) แตกต่างกันมาผสมกันเท่านั้น การผสมพันธุ์ในระบบนี้แบ่งย่อยตามจำนวนยีนที่ควบคุมระบบเพศออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้

2.5.2.1 ไบโพลา (bipolar) หรือยูนิแฟคทอเรียล (unifactorial) เฮทเทอโรทาลิซึม

ระบบเพศของเห็ดราในกลุ่มนี้ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียวที่ประกอบด้วย 2 อัลลีล (alleles) ดังนั้น mating type จึงมี 2 ชนิด เช่น mating type A_1 และ mating type A_2 (ในเห็ดราบางชนิดอาจมียีนที่ประกอบด้วยหลายอัลลีลเรียกว่า multiple alleles จึงมี mating type เป็น n alleles) ดังนั้นการผสมเห็ดสองสายพันธุ์จึงต้องเป็นคู่ที่มี mating type ต่างกัน เช่น A_1 ต้องผสมกับ A_2 จะได้เส้นใยลูกผสมที่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่น โดยอัตราส่วนระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดเท่ากับ 2:4 หรือ 1:2 ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 รูปแบบการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type ต่างๆ ในเห็ดราแบบไบโพลา เฮทเทอโรทาลิซึม

Mating type	A_1	A_2
A_1	-	+
A_2	+	-

กำหนดให้

\+ หมายถึง ผสมพันธุ์กันได้ (sexual compatible)

\- หมายถึงผสมพันธุ์กันไม่ได้ (sexual incompatible)

2.5.2.2 เททระโพลา (tetrapolar) หรือไบแฟคทอเรียล (bifactorial) เฮทเทอโรทาลิซึม

เห็ดราที่มีระบบเททราโพลา เฮทเทอโรทาลิซึม จะถูกควบคุมโดยยีน 2 ยีนที่อยู่ต่างโครโมโซมกัน เช่น ยีน A และยีน B โดยแต่ละยีนมี 2 อัลลีล (หรืออาจเป็น multiple allels ก็ได้) คือยีน A เป็น A_1 และ A_2 ส่วนยีน B เป็น B_1 และ B_2 ดังนั้น mating type ของสปอร์เห็ดราประเภทนี้จึงมี 4 ชนิด คือ A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1 และ A_2B_2 ในเห็ดหนึ่งดอกจึงมี mating type 4 ชนิด ซึ่งเฉพาะสายพันธุ์ที่มี mating type ต่างกันเท่านั้นจึงจะสามารถผสมพันธุ์กันได้และได้ลูกผสมที่มีเส้นใยเป็นไดคาริออนที่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น โดยอัตราส่วนระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดเท่ากับ 4:16 หรือ 1:4 ดังตารางที่ 2.2 ลูกผสมที่ได้จะเป็นเส้นใยที่

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

มีนิวเคลียสเหมือนกัน และมีจำนวนชุดของโครโมโซมเพียงชุดเดียวหรือโมโนคารีออน ซึ่งพบว่าเห็ดกินได้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มนี้

ตารางที่ 2.2 รูปแบบการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type ต่างๆ ในเห็ดราแบบเททราโพลา เฮทเทอโรทาลิซึม

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

กำหนดให้

\+ หมายถึง ผสมพันธุ์กันได้อย่างสมบูรณ์ (compatible) ได้เส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ สร้างแคลมป์คอนเนคชั่นที่แท้จริงหรือแคลมป์สมบูรณ์ (true clamps) สามารถเกิดดอกเห็ดได้ (A≠B≠)

\- หมายถึง ผสมพันธุ์กันไม่ได้ ไม่เกิดแคลมป์คอนเนคชั่น สร้างเส้นใยเหลื่อมกันหรือ overlap (A=B=)

F หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่ผสมกันได้เพียงครึ่งเดียว ไม่เกิดแคลมป์คอนเนคชั่น จึงไม่เกิดดอกเห็ด การชนกันของเส้นใยมีลักษณะนูนหรือ flat เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ที่มียีน A เหมือนกัน แต่ยีน B ต่างกัน (A = B ≠)

B หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่ผสมกันได้เพียงครึ่งเดียว บางครั้งพบการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นที่ไม่สมบูรณ์ (แคลมป์เทียม, false clamp) และไม่เกิดดอกเห็ด การชนกันของเส้นใยมีลักษณะเป็นร่องหรือ barrage เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ที่มียีน A ต่างกันแต่ยีน B เหมือนกัน (A ≠ B =)

ในระบบการผสมพันธุ์แบบเททราโพลา ไบแฟคทอเรียล เฮทเทอโรทาลิซึมนี้ ทั้งยีน A และยีน B จะควบคุมลักษณะที่แตกต่างกันหรือมีผลต่อการผสมพันธุ์ที่ต่างกัน กล่าวคือในช่วงการผสมพันธุ์ยีน A จะควบคุมการจับคู่กันของนิวเคลียสและการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น ส่วนยีน B จะควบคุมการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสและการเชื่อมกันของปลายข้อยึดระหว่างเซลล์

2.5.2.3 ออกตะโพลา (ไตรแฟคทอเรียล) เฮทเทอโรทาลิซึม [Octapolar (trifactorial) heterothallism]

เป็นการผสมพันธุ์กันของเห็ดราที่เจริญมาจากต่างธาลัสที่มีความเข้ากันได้ทางเพศ โดยมียีนควบคุมระบบเพศ 3 ยีน เช่น ยีน A ยีน B และยีน C ซึ่งโดยทั่วไปแต่ละยีนจะมี 2 อัลลีล (แต่อาจเป็น multiple allels ก็ได้) ดังนั้น mating type ของระบบการผสมพันธุ์นี้จะมี 8 ชนิด ซึ่งคู่ผสม

พันธุ์ที่เข้ากันได้ต้องเป็นยีนที่มีอัลลีลแตกต่างกันในทุกยีน จึงจะสามารถผสมพันธุ์กันได้อย่างสมบูรณ์ อัตราส่วนระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดเท่ากับ 8:64 หรือ 1:8 แต่อย่างไรก็ตามเห็ดราส่วนน้อยที่มีระบบเพศประเภทนี้

นอกจากนี้การผสมพันธุ์ในเห็ดรายังเกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ควบคุมการแสดงออกหรือกิจกรรมต่างๆ ของยีนใดยีนหนึ่งภายในเซลล์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมที่ควบคุมการแสดงออกหรือการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้สายพันธุ์นั้นมีลักษณะเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ เมื่อมีการผสมพันธุ์ระหว่าง 2 สายพันธุ์ ทำให้เกิดการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมจากสายพันธุ์หนึ่งไปยังอีกสายพันธุ์หนึ่ง มีการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) ในขณะที่มีการแบ่งเซลล์ จากนั้นมีการส่งผ่านข้อมูลทางพันธุกรรมของยีนจากดีเอ็นเอมาสู่อาร์เอ็นเอ เพื่อทำการแปลรหัส (translation) บนอาร์เอ็นเอเป็นกรดอะมิโน ในที่สุดก็จะได้โพลีเพปไทด์ (polypeptide) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนและส่งผลให้มีการแสดงออกของเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม (ประภัสสร โชคสวนทรัพย์. 2540)

2.6 การปรับปรุงพันธุ์เห็ดรา

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดราเป็นการผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ ซึ่งถูกควบคุมโดยพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่แตกต่างกันและสามารถรวมเข้ากันได้ โดยการปรับปรุงพันธุ์ในเห็ดกลุ่มที่ผสมพันธุ์ภายในธาลัสตัวเองไม่ได้นี้นิยมใช้วิธีการผสมข้าม (cross breeding) ซึ่งสามารถทำได้โดยวิธีดังต่อไปนี้

2.6.1 วิธี Mon-mon Mating

เป็นการนำเส้นใยโมโนคาริออนสองชนิด หรือสปอร์เดี่ยวจากสองสายพันธุ์มาเลี้ยงบนจานอาหารมอลท์สกัดแล้วปล่อยให้เส้นใยเจริญมาชนกัน ถ้าเส้นใยของคู่ผสมพันธุ์ใดเป็นยีนที่มีอัลลีลต่างกันก็สามารถผสมเข้ากันได้ เกิดเป็นเส้นใยลูกผสมที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryon) สร้างแคลมป์คอนเนคชั่น สังเกตได้ว่าเส้นใยลูกผสมดังกล่าวจะหนาเป็นปุย (fluffy) เส้นหนา (stringy) เส้นใยจะเจริญอย่างแข็งแรง ซึ่งเป็นลักษณะที่ได้จากการผสมข้าม และสามารถเกิดเป็นดอกเห็ดได้ ในขณะเดียวกันถ้าเป็นคู่ผสมพันธุ์ที่ไม่สามารถเข้ากันได้ จะไม่เกิดแคลมป์คอนเนคชั่น เส้นใยจะบางและเติบโตช้า

2.6.2 วิธี Di-mon Mating (Di-mon crossing)

เป็นการนำเส้นใยนิวเคลียสคู่ผสมกับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวบนจานอาหารมอลท์สกัด ทำให้นิวเคลียสใดนิวเคลียสหนึ่ง หรือทั้งสองนิวเคลียสของเส้นใยนิวเคลียสคู่ที่เข้ากันได้กับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว เข้าไปรวมกันอยู่ที่ปลายของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ทำให้ได้เส้นใยนิวเคลียสคู่ของ

ลูกผสมที่มีนิวเคลียสตัวใหม่ของเส้นใยนิวเคลียสคู่กับนิวเคลียสเดิมของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ซึ่งวิธี di-mon mating นี้น่าจะเป็นวิธีการที่ใช้ได้กับการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดได้ดี

2.6.3 การรวมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion) (สุมาลี พิชญางกูร. 2541)

เป็นการนำเซลล์ปกติของสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย เห็ดรา ยีสต์ และพืชมาทำให้อยู่ในสภาพไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) โดยมีเฉพาะพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ห่อหุ้ม โพรโตพลาสต์ไว้ ผลการรวมโพรโตพลาสต์จะทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดลูกผสมระหว่างพันธุ์ (species) ที่เรียกว่า interspecific hybridization หรือระหว่างต่างสกุล (genus) ซึ่งเรียกว่า intergeneric hybridization

2.7 เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

ดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลสำคัญของสิ่งมีชีวิต จึงทำหน้าที่ควบคุมกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ การถ่ายทอดข้อมูลจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง การแสดงออกหรือการแสดงกิจกรรมของยีนใดยีนหนึ่งในเซลล์ต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิต จะส่งผลให้เกิดลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด การถ่ายทอดข้อมูลเกิดจากการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอจาก 1 โมเลกุลเป็น 2 โมเลกุลที่มีลำดับเบสเหมือนกันในขณะที่มีการแบ่งเซลล์ เรียกว่า การจำลองโมแลกุลของดีเอ็นเอ (DNA Replication) การแสดงกิจกรรมของยีนนั้นจะมีการส่งผ่านข้อมูลจากดีเอ็นเอมาสู่อาร์เอ็นเอ (Transcription) แล้วจึงมีการแปลรหัสจากอาร์เอ็นเอเป็นกรดอะมิโน ในที่สุดจะได้สารโพลีเพพไทด์ซึ่งอาจจะทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง เอนไซม์ หรืออื่นๆภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์สิ่งมีชีวิตมีลักษณะต่างๆ ปรากฏขึ้น โดยดีเอ็นเอจะมีอยู่ทั้งในนิวเคลียส ไมโตคอนเดรีย และในพืชก็ยังพบดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์อีกด้วย โมเลกุลของดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์สิ่งมีชีวิตมีความสามารถในการจำลองตัวเองได้อย่างแม่นยำเพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูก และยังคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีความผิดพลาดของเซลล์เองหรือจากสาเหตุอื่นๆ เช่นมีการเปลี่ยนแปลงของเบสบางตัวที่อาจเป็นระดับโครโมโซม ทำให้เกิดความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ดังนั้นการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสในดีเอ็นเอ จึงเป็นวิธีหาความแตกต่างที่มีความแม่นยำสูง

จีโนม (genome) หรือยีนของเห็ดราประกอบด้วยดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเป็นส่วนใหญ่ โดยเห็ดราเป็นยูคาริโอตที่มีขนาดจีโนมเล็กที่สุด มีขนาดจีโนมตั้งแต่ประมาณ 12-88 เมกกะคู่เบส ส่วนใหญ่เห็ดราในชั้นเบซิดิโอมัยซิทิสมีขนาดจีโนมประมาณ 21-38 เมกกะคู่เบส ส่วนปริมาณของ repetitive DNA ในเห็ดรามีปริมาณน้อยมากประมาณ 0%-23% ของปริมาณจีโนมทั้งหมด ซึ่ง repetitive DNA นี้ส่วนใหญ่เป็น ribosomal RNA gene ซึ่งสัมพันธ์กับเครื่องหมายหรือ marker ที่เป็นเครื่องบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ อาจใช้เพื่อ

เป็นการจำแนกความแตกต่างในระหว่างและภายในชนิด ระหว่างและภายในประชากร หรือระหว่างแต่ละตัวก็ได้ เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างมี 2 ประเภท คือ

2.7.1 เครื่องหมายสัณฐานวิทยา (Morphological marker)

เป็นการบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ที่ใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกหรือทางสรีรวิทยา ฟีโนไทป์ โดยลักษณะที่ตรวจสอบมักขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและความชำนาญพิเศษของผู้ทำการตรวจสอบ

2.7.2 การตรวจสอบทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

2.7.2.1 เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) หมายถึงโปรตีนที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์

2.7.2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่งๆบนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนล (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้ เนื่องจากเกิดความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลีเมอร์ฟีซึมนั่นเอง การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอได้ผลแม่นยำเป็นเพราะโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียร สามารถวิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานานได้ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใดๆ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใดๆก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ ยีนมีการแสดงออกหรือไม่แสดงออกก็ได้ จึงสามารถตรวจสอบได้อย่างไม่จำกัดและครอบคลุมตลอดทั้งจีโนม

2.8 การตรวจสอบคุณภาพและการวัดปริมาณดีเอ็นเอ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอทำได้พร้อมๆ กัน วิธีที่ใช้โดยทั่วไปมี 2 วิธี คือวิธีวัดการดูดกลืนแสงวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยใช้ spectrophotometer จากการดูดกลืนแสงจากเบสพิวรีนและพิริมิดีน อีกวิธีหนึ่งคือการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบรไมด์หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ส่วนโปรตีนดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 ไมโครมิลลิลิตรสามารถดูดกลืนแสงได้ค่า absorbance ที่ 260 นาโนเมตร (A_{260} หรือ OD_{260}) เท่ากับ 1 และสามารถวัดปริมาณที่แน่นอนและตรวจสอบคุณภาพโดยเปรียบเทียบค่า OD_{260} และ OD_{280} สารละลายที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280} ประมาณ

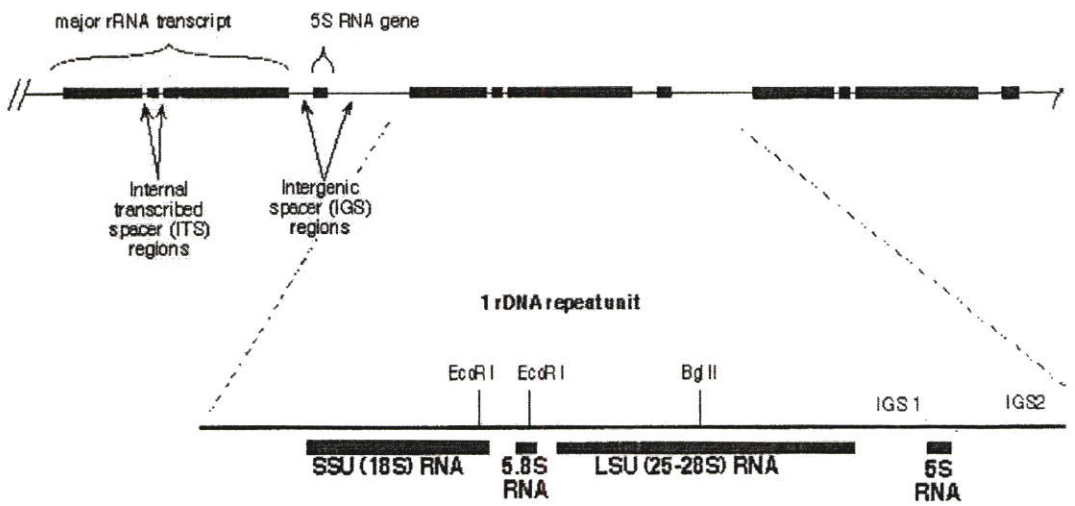
1.8 ถ้าได้ค่ามากแสดงว่าอาจมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน แต่ถ้าค่าต่ำแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล แก้ไขด้วยการนำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางลง แล้ววัดค่า OD_{260} และ OD_{280} แล้วจึงคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นที่ถูกต้อง

2.9 ยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (Ribosomal RNA gene : *rRNA*) (พรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา. 2546.)

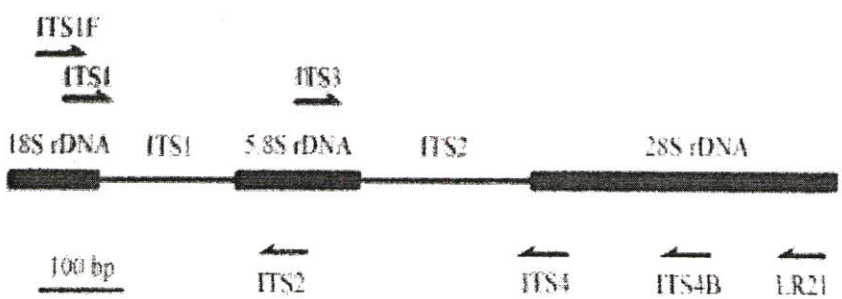
rRNA เป็นยีนที่ทำหน้าที่ในการกำหนดรหัสในการสังเคราะห์ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (rRNA) โดยยีนนี้มีจะจำนวนซ้ำมาก และชุดที่ซ้ำกันนี้จะอยู่ติดกันเป็นช่วงยาวอยู่กันเป็นกลุ่มเรียกว่า cluster gene ในเห็ดราไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) จะมียีนสำหรับลอกรหัสเป็น rRNA ชนิด 18S, 5.8S, 25S และ 5S ตามลำดับ ซึ่งในเห็ดราจะมีจำนวนชุดของ rRNA gene ที่ซ้ำกันถึง 40-240 ชุด จำนวนซ้ำของ rRNA gene ในเห็ดรามีความหลากหลายทั้งขนาดลำดับเบสและเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์สูง แต่บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน rRNA ที่เรียกว่า spacer region เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูงดังนั้นบริเวณนี้จึงถูกนำมาหาความสัมพันธ์ของประชากรได้

จากการค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับบริเวณ rRNA gene ทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA ของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต จนกระทั่ง White และคณะ (1990) ได้ทำการรวบรวมเป็นข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของไพรเมอร์ ที่นำมาใช้เพิ่มปริมาณของ rDNA เห็ดราในชั้นแบซิดิโอมัยซิทิสในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยไพรเมอร์จะจับเข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ จึงจัดกลุ่มของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบความหลากหลายในเห็ดราและสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

1. Small subunit RNA (17-18S) primer sequences เป็นไพรเมอร์ในบริเวณ small-subunit (SSU) rDNA
2. Large subunit RNA (25-28S) primer sequences เป็นไพรเมอร์ในบริเวณ large-subunit (LSU) RNA และส่วนที่อยู่ต่อกับบริเวณ intergenic spacer (IGS)
3. Internal transcribed spacer (ITS) region primers เป็นไพรเมอร์ที่อยู่ระหว่างบริเวณ 5.8S RNA เนื่องจากยีนบริเวณนี้มีวิวัฒนาการเร็ว และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าบริเวณอื่นของ rDNA จึงใช้แยกความแตกต่างของเห็ดราทั้งในระดับระหว่างชนิด (interspecific) และภายในชนิดกัน (intraspecific)
4. Intergenic spacer (IGS) region primers เป็นไพรเมอร์ที่อยู่ระหว่างบริเวณ 5S RNA primer sequence เป็นบริเวณที่ไม่มีการลอกรหัส มีขนาดประมาณ 2 กิโลเบสขึ้นไป จึงไม่นิยมใช้ไพรเมอร์บริเวณนี้มาตรวจสอบสิ่งมีชีวิตที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงมากๆ



รูปที่ 2.13 ตำแหน่งของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ และตำแหน่งของไพรเมอร์บนสายดีเอ็นเอ
ที่มา : Vilgalys Lab. 1999.



รูปที่ 2.14 ตำแหน่งของไพรเมอร์ ITS1 ถึง ITS4 บริเวณ ITS บนสายดีเอ็นเอ
ที่มา : www.unite.zbi.ee/primers.php3. 2005.

2.10 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้าและตัวกลางที่ใช้ด้วย

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต สารละลายดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอจึงมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย ได้แก่

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่ ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรง ดีเอ็นเอเกลียวคู่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่แปรผกผันกับขนาดโมเลกุล ถ้านำระยะทางที่โมเลกุลเคลื่อนที่มาเขียนกราฟคู่กับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) จะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ ซึ่งมีความสัมพันธ์ในลักษณะเส้นตรงอยู่ช่วงหนึ่ง ดังนั้นถ้าต้องการทราบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ สามารถทำได้โดยนำอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุลแล้ว นำมาเขียนกราฟระหว่างระยะทางที่เคลื่อนที่และ log ของน้ำหนักโมเลกุลเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน ทั้งนี้จะต้องเปรียบเทียบในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสครั้งเดียวกันเท่านั้น เนื่องจากเป็นค่าแบบสัมพัทธ์

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

3. เปอร์เซ็นต์และชนิดของเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจล โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลิอิกอีกคือโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) และอะกาโรสเจล (agarose gel) โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6—1,000 คู่เบส (ตารางที่ 2.3) ส่วนอะกาโรสเจลใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 100 คู่เบสจนถึงกว่า 50,000 คู่เบส (ตารางที่ 2.4)

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสนี้ ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำเกินไปดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้า แยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ของดีเอ็นเอ

5. ชนิดของบัฟเฟอร์ 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 ใช้ได้ทั่วไปและใช้ได้ดีในกรณีที่ต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก แต่มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ จึงไม่ควรใช้ในกรณีที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเวลานานมากหรือควรให้มีการหมุนเวียนของบัฟเฟอร์ ส่วน TPE มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอได้เร็ว แต่ไม่

เหมาะถ้ามีการสกัดดีเอ็นเอจากเจลและตกตะกอนด้วยเอธานอล เพราะจะเกิดการตกตะกอนของฟอสเฟตด้วย

2.11 การตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction ; PCR)

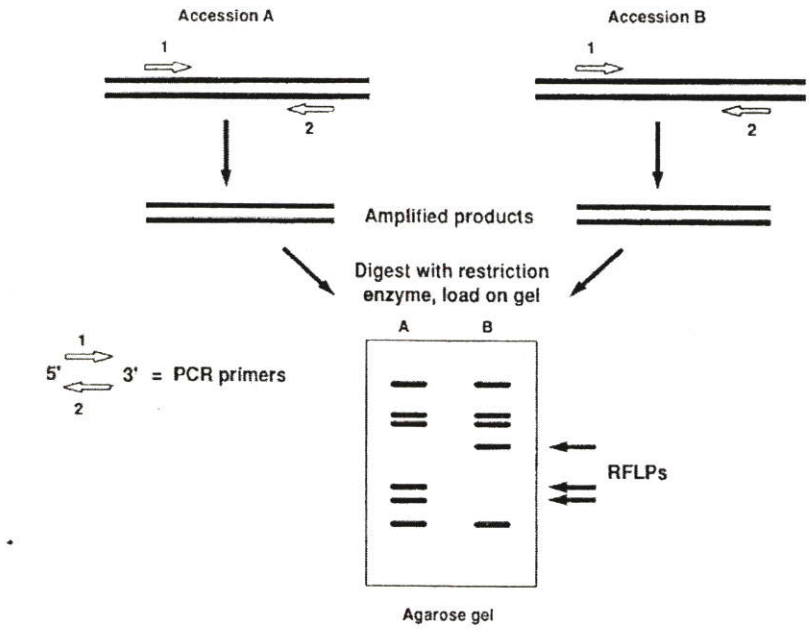
พีซีอาร์เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยอาศัยหลักการ DNA replication เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายคู่ที่ทำในหลอดทดลองแบบซ้ำๆ กันหลายรอบ ให้ได้ปริมาณมากขึ้นหลายเท่าโดยอาศัยปฏิกิริยาเร่งของเอนไซม์ DNA polymerase อย่างต่อเนื่อง และทำงานร่วมกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดียว ดีเอ็นเอไพรเมอร์จำเพาะ 2 ชนิดซึ่งเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ อาศัยดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต 4 ชนิด (dATP, dTTP,dCTP,dGTP) เป็นสับสเตรท ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ไพรเมอร์จะถูกสร้างต่อไปในทิศทาง 5'→3' ลำดับเบสของดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นจะเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เมื่อดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์จบแล้วนำผลที่ได้ไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิส และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จะทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของผลผลิตที่ได้ว่ามีความยาวเท่าใด ถ้ามีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วนของดีเอ็นเอภายในชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย จะพบว่าผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละตัวอย่างนั้นมีขนาดต่างกันหรือไม่ ถ้ามีขนาดเท่ากันจะต้องมีวิธีตรวจสอบต่อไปอีก เช่น นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดก่อน แล้วจึงนำไปแยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (PCR/RFLP หรือ CAPS, cleaved amplified polymorphic sequence) ซึ่งอาจจะพบโพลีมอร์ฟิซึมได้

เทคนิค polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนต่อเนื่องกันดังนี้

1. denaturation เป็นการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 91-95 °C ซึ่งจะทำลายไฮโดรเจนบอนด์ที่ยึดดีเอ็นเอสองสายไว้ด้วยกัน

3. annealing เมื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลงมาประมาณ 50-55 °C DNA primers ที่เติมอยู่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาจะจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ต้องการศึกษา ตรงบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันทางด้านปลาย 3' ของแต่ละสาย

4. primer extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ โดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเส้นเดี่ยวทั้งสองเส้นเป็นต้นแบบ สร้างต่อออกไปจากไพรเมอร์ในทิศทาง 5'→3' ของไพรเมอร์ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ครบทั้ง 4 ชนิด (dGTP, dATP, dCTP, dTTP) อุณหภูมิที่ใช้ซึ่งเหมาะสมสำหรับเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ polymerase คือ 70-75°C



รูปที่ 2.15 ขั้นตอนการตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมจากผลผลิตของพีซีอาร์ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ที่มา : สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. (2545)

2.11.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมโดยเทคนิคพีซีอาร์

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme หรือ restriction endonuclease)

เอนไซม์ในระบบนี้แบ่งเป็น 3 แบบตามลักษณะการทำงาน องค์ประกอบของหน่วยย่อยของเอนไซม์ องค์ประกอบร่วมที่ใช้ และวิธีการตัดดีเอ็นเอ

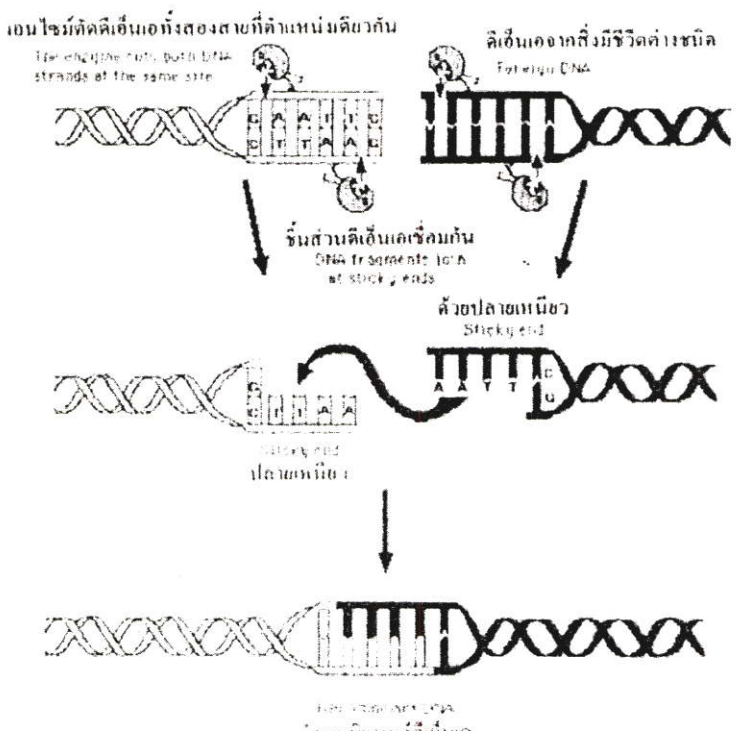
แบบที่ 1 (type I) เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ 3 สาย สามารถตัดดีเอ็นเอ (nuclease) และเปลี่ยนแปลงโดยการเติมหมู่เมธิลเข้าไปที่เบสบางเบส (methylase) ในขณะเดียวกันเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำที่จำเพาะ แต่จะตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่ไม่เจาะจงห่างออกไป 400-7,000 คู่เบส การตัดดีเอ็นเอต้องอาศัยแมกนีซียมไอออน (Mg^{2+}) ATP และ S-adenosylmethionine (SAM) ขณะที่เกิดการตัดสายดีเอ็นเอให้ขาด จะมีการสลาย ATP ควบคู่ไปด้วย หลังจากนั้นเอนไซม์จะหมดคุณสมบัติที่จะตัดดีเอ็นเอ แต่ยังมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สลาย ATP (ATPase) ต่อไปได้อีก นอกจากนี้เอนไซม์ในแบบที่ 1 นี้จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำด้วย

แบบที่ 2 (type II) เป็นเอนไซม์ที่ใช้มากในการตัดต่อยีน เนื่องจากโมเลกุลไม่ซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเพพไทด์เพียงสายเดียว การตัดดีเอ็นเอจะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะใน

บริเวณจดจำหรือที่จุดใกล้กับบริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน และในปฏิกิริยาต้องการเฉพาะแมกนีเซียมไอออนเท่านั้น มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงอย่างเดียว

แบบที่ 3 (type III) ประกอบด้วยโพลีเพพไทด์ 2 ชนิด มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะและเติมหมู่เมธิลในขณะเดียวกัน การตัดดีเอ็นเอจะเกิดห่างจากบริเวณจดจำประมาณ 25-27 คู่เบส ในปฏิกิริยาต้องมีแมกนีเซียมไอออนและ ATP โดยไม่จำเป็นต้องมี S-adenosylmethionine แต่ถ้ามี S-adenosylmethionine จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และเอนไซม์จะสามารถเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะได้ พบว่ายีนที่กำหนดการสร้างโพลีเพพไทด์ทั้ง 2 ชนิดของเอนไซม์นี้มีตำแหน่งอยู่ใกล้ๆกัน ในส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมของ *E. coli* บางสายพันธุ์ การสร้าง mRNA แยกกันเป็น 2 หน่วย ยีนหนึ่งทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอและอีกยีนหนึ่งทำหน้าที่เติมหมู่เมธิล

เอนไซม์แบบที่ 1 และแบบที่ 3 จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดไม่แน่นอน และปฏิกิริยามีการแข่งขันกันว่าจะเกิดการตัดดีเอ็นเอหรือเติมหมู่เมธิล จึงไม่นิยมใช้ในการโคลนยีน (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2543) ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะจะทำงานโดยการกราดโมเลกุลของดีเอ็นเอและหยุดเมื่อมันจำตำแหน่งของลำดับเบส ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ดีเอ็นเอจะถูกตัด เรียกว่าตำแหน่งจดจำ (recognition site) ที่ประกอบด้วยเบส 4 ถึง 6 คู่เบส



รูปที่ 2.16 การทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ที่มา : อุไรวรรณ วิจารณกุล (2545)

2.12 เจลอะกาโรส (agarose gel) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

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

ตารางที่ 2.3 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดยเจลอะกาโรส (ดัดแปลงจากสุรินทร์ ปิยะโชคณากุล 2545)

ความเข้มข้นของเจล (%)	ขนาดที่เหมาะสมในการแยก (คู่เบส)
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

2.13 เจลโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)

เจลโพลีอะคริลาไมด์ เกิดจากการรวมตัวของอะคริลาไมด์ (acrylamide) และบิสอะคริลาไมด์ (N',N'-methylene bisacrylamide หรือเรียกว่า bisacrylamide) โมเลกุลเดี่ยวมารวมตัวกันเกิดเป็นโพลีเมอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นร่างแห เป็นโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี จึงมีความสม่ำเสมอควบคุมขนาดได้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีใด มีความใส มีความคงตัวของ pH อุณหภูมิ และมี ionic strength กว้าง สามารถปรับขนาดของช่องในโพลีเมอร์ได้จึงเหมาะสมสำหรับเป็นตัวกลางในการแยกโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอ

ขนาดของช่อง (pore size) ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์และเปอร์เซ็นต์บิสอะคริลาไมด์ที่มีในเจลทั้งหมด การบอกความเข้มข้นของเจลจึงมี 2 ค่า คือ

1. %T (total) = ความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์ของโมเลกุลเดี่ยวทั้งหมด (อะคริลาไมด์ + บิสอะคริลาไมด์)
2. %C (crosslinker) = ความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์ของบิสอะคริลาไมด์เทียบกับความเข้มข้นของโมเลกุลเดี่ยวทั้งหมด

การจับตัวของโพลีเมอร์ (polymerization) ของอะคริลาไมด์และบิสอะคริลาไมด์เริ่มต้นโดยการเตรียมสารแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) หรือไรโบฟลาวิน

(riboflavin) หรือใส่ N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) หรือ 3'-dimethylamino-propionitrile (DMAPN) เพื่อเร่งให้เกิดปฏิกิริยาการจับตัวเป็นโพลีเมอร์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตและ TEMED TEMED จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) จากแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ทำให้เกิดการเริ่มต้นปฏิกิริยาการจับตัวของอะคริลาไมด์ และบิสอะคริลาไมด์เป็นโพลีเมอร์ ดังนั้นถ้าเพิ่มปริมาณ TEMED หรือแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต จะเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการจับตัวเป็นโพลีอะคริลาไมด์

ระบบไรโบฟลาวินและ TEMED อาศัยแสงเพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยาการจับตัวเป็นโพลีเมอร์ โดยไรโบฟลาวิน ซึ่งไรโบฟลาวินจะสลายตัวเกิดเป็นอนุมูลอิสระเมื่อได้รับแสง จึงทำให้เกิดการจับตัวของอะคริลาไมด์และบิสอะคริลาไมด์เป็นโพลีเมอร์ได้โดยไม่จำเป็นต้องมี TEMED แต่ถ้ามี TEMED ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีกว่าและได้เจลที่สม่ำเสมอกว่า

ตารางที่ 2.4 ช่วงขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แยกได้โดยเจลโพลีอะคริลาไมด์ (ดัดแปลงจาก สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545)

ความเข้มข้นของเจล (%) (ใช้อะคริลาไมด์ : บิสอะคริลาไมด์ = 29:1)	ขนาดที่เหมาะสมในการแยก (คู่เบส)
3.5	100 — 1,000
5.0	80 —500
8.0	60 —400

อะคริลาไมด์และบิสอะคริลาไมด์โมเลกุลเดี่ยว เป็นสารที่เป็นพิษและสามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ จึงควรสวมถุงมือขณะปฏิบัติงาน โพลีอะคริลาไมด์เจลใช้ได้ทั้งในแบบ native gel เพื่อใช้แยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ตามธรรมชาติ และใช้ในแบบ denaturing gel เพื่อแยกโมเลกุลดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ผ่านการทำให้เสียสภาพแล้ว โดยการเติมยูเรียลงไปในเจลให้มีความเข้มข้น 7-8 โมลาร์ ทั้ง native gel และ denaturing gel มีวิธีเตรียมเหมือนกัน ต่างกันเฉพาะการเติมหรือไม่เติมยูเรียเท่านั้น

2.14 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)

อาร์เอฟแอลพี หมายถึงความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้ถูกนำมาใช้กับการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ โดยสามารถวิเคราะห์จากส่วนใดก็ได้ส่วนของดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลบางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์และไมโตคอนเดรีย โมเลกุลของดีเอ็นเอนี้มีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้อย่าง

ถูกต้องและแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะคงที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่ หรือเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายโครโมโซม หรือจากต่างโครโมโซม (transposition) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) แล้วนำมาเปรียบเทียบกันซึ่งทำได้ยากและใช้เวลามาก วิธีง่ายกว่าคือนำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้น มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น

2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จันทิมาภรณ์ นววงศ์วิวัฒน์. (2546) รายงานเกี่ยวกับ *Lentinula edodes* หรือเห็ดหอมว่าเป็นเห็ดที่มีถิ่นกำเนิดในแถบประเทศที่มีอากาศหนาวเย็น เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ส่วน *Lentinus squarrosulus* หรือเห็ดขอนขาวมีลักษณะดอกสีขาวครีม เนื้อเหนียว นิยมรับประทานดอกอ่อน เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส และ *L. polychrous* หรือเห็ดบดมีลักษณะดอกสีน้ำตาลเข้ม ดอกบานใหญ่ เนื้อเหนียวมาก นิยมรับประทานขณะดอกอ่อน เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส (จันทิมาภรณ์ นววงศ์วิวัฒน์. 2546 ; Pornthap. *et.al.* 2546) โดยทั้ง *L. edodes* *L. squarorsulus* และ *L. polychrous* มีระบบเพศ (mating type) เป็นแบบ tetrapolar heterothallism (จันทิมาภรณ์ นววงศ์วิวัฒน์. 2546 ; นันทวดี คำสงค์. 2546) เหมือนกับระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ก็มีระบบเพศเป็นแบบ tetrapolar heterothallism เช่นกัน (สาทินี ซื่อตรง. 2546) สอดคล้องกับรายงานของ Papazian (1950) ที่ได้ศึกษาความไม่เข้ากันของระบบเพศ (incompatibility) ของ *Schizophyllum commune* ว่าเกี่ยวข้องกับการจับคู่ผสมกันของเส้นใยที่มี mating type ต่างกัน แล้วมีการเคลื่อนย้าย mating type ที่ไม่เข้ากันมีอัลลีลต่างกัน ทำให้นิวเคลียสมารวมกันอยู่ภายในไซโตพลาสซึม เกิดเป็นเซลล์ลูกผสมขึ้น ในกรณีนี้แม้แต่ Basidiomycetous yeast เช่น *Rhodosporidium* *Leucosporidium* (candida) *scottii* เองก็มีระบบยีน multiple alleles bifactorial system ที่ควบคุมระบบเพศด้วยเช่นกันกับ *S. commune* (Fell and Tallman. 1982) สอดคล้องกับ Snider และ Raper (1958) อธิบายว่า เมื่อเส้นใย dikaryon 2 สายพันธ์ที่มี mating type ไม่เหมือนกันมาจับคู่ผสมกัน สายพันธุ์ migrant จะสร้างเส้นใยแบบไดคาริออน ส่วนสายพันธุ์

resident จะสร้างเส้นใยประเภทเฮทเทอโรคาริออนที่มี Common A (Common A-heterokaryon) และ Ian (1976) ได้ศึกษาการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสในการผสมเส้นใยแบบไดคาริออน ของ *S. commune* และ *Coprinus congregatus* Fried ว่านิวเคลียสมีอัตราการเคลื่อนที่ประมาณ 0.5-3 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง (Ross. 1976) ส่วนการสร้างลูกผสมจากเส้นใยโมโนคาริออน ก็อาศัยหลักการความไม่เข้ากันของระบบเพศเช่นเดียวกัน ในปี 2001 Larraya และคณะได้สร้างลูกผสมจาก *P. ostreatus* สายพันธุ์โมโนคาริออน พบว่ามียีนที่ควบคุมอัลลีลที่ไม่เข้ากันมารวมกัน ซึ่งข้อดีของการสร้างลูกผสมจากเส้นใยโมโนคาริออนคือ อัลลีลที่คู่กันมีการแยกตัวจากกัน จึงมีอิสระในการรวมตัวกับอัลลีลอื่นได้ง่าย ทำให้ยีนมีโอกาสจับคู่กับอัลลีลอิสระอื่น เกิดลูกผสมที่มีอัลลีลต่างจากพ่อแม่ จาก Darmono และ Burdsall Jr. (1992) ได้ทำการจับคู่ผสมกันของเส้นใยแบบโมโนคาริออนของ *Armillaria mellea* แล้วเกิดการชนกันของเส้นใย 4 แบบ คือ แบบ compatible (A≠B≠) common A (A=B≠) common B (A≠B=) และ common AB (A=B=) พบว่ามีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสเฉพาะคู่ผสมที่เคลื่อนที่ชนกันแบบ compatible และ common A เท่านั้น งานวิจัยของ Kothe สนับสนุนว่า *Schizophyllum commune* และ *Coprinus cinereus* ในชั้นแบซิดิโอมัยซิทิสจะมียีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุม ให้มีการรวมกันของสายพันธุ์ที่นิวเคลียสเป็นแฮพลอยด์ให้กลายเป็นสายพันธุ์ไดคาริออน เพราะเห็ดทุกชนิดมียีน 2 ยีนที่ควบคุมการผสมพันธุ์ของเส้นใย และแต่ละยีนมี 2 loci โดยยีน A ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดที่เป็น heterodimerization ที่มีอัลลีลต่างกัน ทำหน้าที่ส่งผ่านสารข้อมูลจากยีนหนึ่งไปยังยีนตรงข้าม เมื่อเส้นใยมาชนกันก็จะเกิดการแลกเปลี่ยนนิวเคลียส มีการรวมโปรตีนกันภายในไซโตพลาสซึม และยีน B ทำหน้าที่เป็น pheromone เพื่อรับโปรตีนที่ส่งผ่านมาโดยยีน A ส่งเสริมให้มีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสในช่วงแรกของการสร้างลูกผสม จากคุณสมบัติข้อนี้จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดเพาะเพื่อการค้า โดยเฉพาะได้ใช้ปรับปรุง *Agarricus biporus* ในเห็ด Oster mushroom และ *P. ostreatus* มาแล้ว (Kothe. 2001) ในระบบเพศระดับอัลลีลเองก็มีอัลลีลย่อยชนิด α ช่วยส่งเสริมให้เกิดการควบคุมการผสมพันธุ์ใน *Cryptococcus neoformaus* (Hull และคณะ. 2002) และงานวิจัยของ Larraya และคณะ (2001) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของอัลลีลย่อย α และ β กับอัตราการเจริญของเส้นใยโมโนคาริออนที่มีต่อระบบเพศในเห็ด *P. ostreatus*

จากความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์ในปัจจุบัน จึงนิยมตรวจสอบพันธุกรรมที่มีความแปรผันสูง ด้วยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุลมากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว ง่ายและสามารถตรวจสอบได้ทุกส่วนของตัวอย่างทดสอบ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545) โดยเฉพาะการตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณ *rDNA* ซึ่งเห็ดราในชั้นแบซิดิโอมัยซิทิสนิยมใช้ไพรเมอร์บริเวณ international transcribed spacer มาตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมทั้งในระหว่างชนิด และภายในชนิดมากกว่า *rDNA* บริเวณ SSU และ LSU ในปี 1993 Gardes และ Bruns รายงานว่าห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้ไพรเมอร์ ITS1-ITS4 ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เนื่องจากเป็นไพรเมอร์ที่

สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบสและใช้คัดเลือกลำดับเบสในเห็ดราได้ดี (www.unite.zbi.ee/primer.php3) โดย Arima และ Morinaga (1993) ตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมโครโมโซมของดีเอ็นเอ *L. edodes* บนเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสได้จำนวน 8 แถบ พบว่าดีเอ็นเอมีขนาด 7-2.2 เมกกะไบต์ ส่วนจีโนมมีขนาดประมาณ 3.3 เมกกะไบต์ Tyagi (2004) ได้ใช้เทคนิคพีซีอาร์ ตรวจสอบตัวอย่างลูกผสมที่มีการกลายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์เพียง 1 ไพรเมอร์ (reward หรือ forword) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบแรก เพื่อต่อสายไพรเมอร์ให้ยาวขึ้น จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์เป้าหมายไปตรวจสอบบนเจลอะกาโรส แล้วตัดชิ้นส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์อีกรอบ ทำให้ตรวจสอบพบความแตกต่างของพลาสมิดเป้าหมายได้ 4 แถบ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ไม่สิ้นเปลือง และทราบตำแหน่งเบสที่มีการกลายพันธุ์สูงได้โดยตรง เนื่องจากการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ Somashekar และคณะ (2003) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-RFLP ตรวจสอบยีน *afl*R ที่มีใน *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในพืชและพืชอาหารสัตว์ จากการเลี้ยงเชื้อราตัวอย่างในแป้งข้าวโพด จากคุณสมบัติของไพรเมอร์บริเวณ ITS ทำให้ Martin และ Rygiewicz (2005) ได้ปรับปรุงไพรเมอร์ของ White และคณะ (1990) ขึ้นมาใหม่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 5.8S ให้ดียิ่งขึ้น โดยพัฒนาไพรเมอร์ ITS1/ITS2 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 5.8S DNA (small subunit ; SSU) และ large subunit ; LSU) ของเห็ดราได้เป็นบริเวณกว้าง และจำแนกความหลากหลายภายในออร์แกเนลได้ดี ส่วนไพรเมอร์ ITS1/ITS4 วิเคราะห์ความแตกต่างของยีนภายในบริเวณ ITS ในเห็ดราได้ดี Egger (1994) ได้นำไพรเมอร์ที่คิดค้นโดย White และคณะ (1990) มาปรับปรุงใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเซลล์ที่เป็นไดคาริออน โดยเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ NLB3 (จาก White *et.al.* 1990 : ITS1-F) สามารถเข้าจับกันได้ดีกับไพรเมอร์ ITS4-B ผลที่ได้คือคู่ไพรเมอร์ ITS1-F/NLB3 คู่กับ ITS4-B สามารถเพิ่มประสิทธิภาพปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ดี เหมาะกับการเพิ่มลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์กับตัวอย่างพืช เชื้อราในชั้นแบซิดิโอมัยซิทิส แต่ใช้ไม่ได้ผลดีนักกับการตรวจสอบราในชั้นแอสโคมัยซิทิส เป้าหมายการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1-F กับ ITS4-B ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ก็เพื่อเพิ่มอัตราการสุ่มจับกับเบสเป้าหมายได้เป็นบริเวณกว้างมากขึ้น และลดอัตราการสุ่มจับกับเป้าหมายที่ไม่ต้องการด้วย จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างพืช เชื้อราในชั้นเบซิดิโอมัยซิทิสและเชื้อราในชั้นแอสโคมัยซิทิส ทั้ง 43 ชนิด โดยใช้เทคนิค PCR/RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ *Tag*I *Hin*fI และ *Cfo*I พบว่าไพรเมอร์สำหรับเห็ดราไม่เหมาะกับการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืช ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ไพรเมอร์ให้เหมาะกับตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ (Martine and Rygiewicz. 2005) สอดคล้องกับ Uetake และคณะ (2001) ได้ทำการตรวจสอบความสัมพันธ์ในระดับชนิด (interspecific) ยีนบริเวณ ITS 5.8S rDNA กับ *Helicobasidium* sp. และ *Rhizoctonia* sp. จำนวน 43 สายพันธุ์ พบว่าสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่มที่มีโพลิมอร์ฟิซึมต่างกัน

แต่ความสัมพันธ์ของตัวอย่างทดสอบภายในกลุ่มมีความเหมือนกันร้อยละ 81.8-98.2 ต่อมา Barsotti และคณะได้จำแนกพร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกลุ่มของ *Streptococcus mitis* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคทางทันตกรรมและโรคอื่นๆ ด้วยวิธี RFLP ในชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ในบริเวณ 16S-23S rDNA intergenetic spacer โดยใช้ไพรเมอร์ FGPS 1490-72 และ FGPL 132-38 หลังจากการนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 14 ชนิด พบว่าเอนไซม์ *Alu*I *Mbo*I *Cfo*I *Hin*fI และ *Mae*II ตรวจสอบความแตกต่างได้มากกว่า 1 ชนิด แต่ *Hae*III *Hin*dIII และ T*rug*I แยกความแตกต่างได้เฉพาะ *S. parasanguinis* ส่วน *Msp*I และ *Tag*I แยก *S. sanguinis* และ *Hpa*II กับ *Rsa*I แล้วไม่พบความแตกต่างใน *Streptococcus* sp. ทุกชนิด แต่เมื่อรวมเอนไซม์ 5 ชนิดคือ *Alu*I + *Mbo*I + *Cfo*I + *Hin*fI + *Mae*II มาทำงานร่วมกันจะสามารถจำแนกจีโนมที่แตกต่างกันภายในสปีชีส์ของกลุ่ม mitis ได้ (Barsotti. *et.al.* 2002)

ในปี 2004 Drogemuller และคณะได้ศึกษาความแตกต่างของ *Anoplocephala perfoliata* และ *Anoplocephalpiaes mamillana* จาก tapeworm ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในคน ด้วยการเพิ่มปริมาณ rDNA บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS-1 (18S rDNA) ITS-2 (5.8S) และช่วง 28S rDNA พบว่าไพรเมอร์ ITS-1 จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ร้อยละ 39.9-43.5 ITS-2 เป็นร้อยละ 59.5-61.2 แต่ไพรเมอร์ ITS-2 ไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่าง *A. perfoliata* กับ *A. maniiana* ได้ และงานวิจัยของ Kauserud และ Schumacher ที่วิเคราะห์ population genetic ของ *Trichaptum abietinum* ด้วยวิธี PCR-RFLP ทำให้ทราบว่ายีนบริเวณ *nrDNA* ที่มีวิวัฒนาการเปลี่ยนไปไม่มากยังคงมีอยู่ในประชากรตามธรรมชาติอยู่แล้ว ซึ่งเป็นผลจากในช่วง meiotic recombination ของยีน α และ β บริเวณ *nrDNA* แต่การที่ยีนบริเวณ *nrDNA* ของ *T. Abietinum* มีความแตกต่างจากกลุ่มประชากรเดียวกัน อาจมีวิวัฒนาการมากขึ้นหลังเกิดการ hybridization เมื่อวิเคราะห์ด้วย phylogenetic ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณลำดับ ITS2 ของ *nrDNA* และ *ntSSU* จำแนกได้ว่า *Trichaptum* เริ่มวิวัฒนาการมาจาก monophyletic เดียวกัน เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของ *nrDNA* ที่มี subdivision 3 ลำดับ จึงสรุปว่า *T. Abietinum* อาจอยู่ในช่วงกำลังวิวัฒนาการเพื่อพัฒนาไปสู่รูปร่าง ลักษณะทางพันธุกรรมใหม่ก็ได้ (H. Kauserud และ T. Schumacher. 2003) จากเหตุผลนี้ Saito และคณะได้ตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของ *L. edodes* 16 สายพันธุ์ที่เพาะเป็นการค้า โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์บริเวณ IGS1 และ IGS2 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ H*ind*III พบว่า ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ของยีนเป้าหมาย SR1 และ SR2 ซึ่งอาจพัฒนาไปใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ กับ *L. edodes* สายพันธุ์ป่าอื่นๆ อีกได้ (Saito. *et.al.* 2002) ส่วน Fukuda และ Mori ได้ตรวจสอบลักษณะความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *L. edodes* สายพันธุ์ป่า 18 สายพันธุ์ที่เก็บตัวอย่างใกล้บริเวณท่อนไม้ *Querous mongolica* var. *grosseserrata* จาก mating type ของแต่ละสายพันธุ์ และระบุได้ว่ามียีน 6 ยีนทำหน้าที่ควบคุม mating type เมื่อตรวจสอบยีนบริเวณ *mtDNA*

ด้วยวิธี RFLP ปรากฏว่า *L. edodes* ทั้ง 18 สายพันธุ์มีการแสดงออกของจีโนไทป์ที่ต่างกันอย่างน้อย 4 ลักษณะที่น่าจะถูกถ่ายทอดมาจากรุ่นพ่อแม่ โดยสายพันธุ์ที่มียีนเหมือนๆกัน เป็นกลุ่มดอกเห็ดที่ถูกเก็บห่างจากท่อนไม้ *Q. mongolica* var. *grosseserrata* ประมาณ 1 เมตร จึงสรุปได้ว่า *L. edodes* ทั้ง 18 สายพันธุ์ที่เก็บตัวอย่างจากขอบเขตพื้นที่ห่างกันมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (Fukuda and Mori. 2003) และหากพัฒนานำ marker ของเทคนิค AFLP มาใช้ร่วมกับเทคนิค RFLP ก็จะสามารถตรวจสอบความเกี่ยวข้องของยีนที่ทำหน้าที่อื่นๆ ได้ (Larraya. *et.al.* 2001)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อเห็ดและวัสดุเพาะเห็ดสำเร็จรูป

3.1.1 เส้นใยไดคาริออนของเห็ดหอม ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์รวบรวมพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร

3.1.2 เส้นใยไดคาริออนเห็ดบดและเห็ดขอนขาว ได้จากการเพาะเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดที่ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์รวมเห็ดบ้านอรัญญิก จังหวัดนครปฐม

3.1.3 เส้นใยโมโนคาริออนเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวที่ทราบ mating type แล้ว ได้จากงานวิทยานิพนธ์ของนางสาวจันทิมาภรณ์ นววงศ์วิวัฒน์ (2546) เรื่อง สัณฐานวิทยาและระบบเพศของเห็ดกินได้บางชนิดในสกุล *Lentinus* โดยมีการจัดกลุ่มชนิดของเพศใหม่เป็น

เห็ดหอม	กลุ่มที่ 1	A_1B_1	ได้แก่	สายพันธุ์ 37
(E)	กลุ่มที่ 2	A_2B_1	ได้แก่	สายพันธุ์ 22
	กลุ่มที่ 3	A_2B_2	ได้แก่	สายพันธุ์ 38, 39
เห็ดขอนขาว	กลุ่มที่ 1	A_1B_1	ได้แก่	สายพันธุ์ 1, 2, 4
(S)	กลุ่มที่ 2	A_1B_2	ได้แก่	สายพันธุ์ 10, 11
	กลุ่มที่ 3	A_2B_1	ได้แก่	สายพันธุ์ 6, 9
	กลุ่มที่ 4	A_2B_2	ได้แก่	สายพันธุ์ 3, 5

3.1.4 เส้นใยโมโนคาริออนเห็ดบดที่ทราบ mating type แล้ว ได้จากงานปัญหาพิเศษของนางสาวนันทวดี คำสงค์ (2546) เรื่อง การศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดบด โดยจัดกลุ่มชนิดของเพศของเห็ดบดเป็น

เห็ดบด	กลุ่มที่ 1	A_1B_1	ได้แก่	สายพันธุ์ 3, 8, 9
(P)	กลุ่มที่ 2	A_1B_2	ได้แก่	สายพันธุ์ 10, 11
	กลุ่มที่ 3	A_2B_1	ได้แก่	สายพันธุ์ 2, 5, 7
	กลุ่มที่ 4	A_2B_2	ได้แก่	สายพันธุ์ 1, 4, 6

3.1.5 วัสดุเพาะเห็ดสำเร็จรูปได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์รวมเห็ดบ้านอรัญญิก จังหวัดนครปฐม

3.1.6 เมล็ดข้าวฟ่าง

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ มีดังต่อไปนี้

- มอลท์สกัด (malt extract)
- กลูโคส (glucose)
- เปปโตน (peptone)

3.2.2 เอนไซม์

- *Taq* DNA polymerase จาก Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย
- Restriction endonuclease *Eco*RI จาก Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย
- Restriction endonuclease *Sau*3AI จาก Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย
- Restriction endonuclease *Hin*fI จาก Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย
- Restriction endonuclease *Hin*dIII จาก Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย
- Restriction endonuclease *Dde*I จาก Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย
- Restriction endonuclease *Hae*II จาก Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย
- Restriction endonuclease *Hae*III จาก Boehringer Mannheim Biochemica. ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการศึกษา DNA

- agarose (USB., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- ethidium bromide (ภาคผนวก 2)
- dNTPs จาก Amersham Pharmacia Biotech, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- tracking dye (ภาคผนวก 2)
- tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer) (ภาคผนวก 2)
- TE- EDTA buffer (TE buffer) (ภาคผนวก 2)
- extraction buffer (ภาคผนวก 2)
- ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) จาก TIG, ประเทศไทย
- แอลกอฮอล์ 70%

- ไอโซโพรพานอล (isopropanol)
- โซเดียมอะซีเตท (sodium acetate)
- ผงวุ้น (Bacto agar)
- สารละลายทวีน 80 (tween 80)

3.3 อุปกรณ์

- ตู้เขี่ยเชื้อ (ISSCO รุ่น HS1230)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave) (TOMY รุ่น 3S-325)
- กล้องจุลทรรศน์ (NIKON รุ่น YS2-H)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (SHEL LAB รุ่น 2020)
- ไมโครปิเปตต์ (micropipette) (LABSYSTEMS)
- อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (heamacytometer)(BOECO)
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (METTLER-TOLEDO รุ่น AG 204)
- เครื่องแก้ว เช่น บิกเกอร์ จานแก้ว แท่งแก้วงอ กระบอกตวง เป็นต้น
- ตู้อบ (MEMMERT)
- อุปกรณ์ตัดเส้นใย (cook borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร
- กระจกปิดสไลด์และสไลด์
- เข็มเขี่ยเชื้อและลูป (loop)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- กล้องถ่ายภาพ

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การผสมพันธุ์แบบ mom-mon mating

3.4.1.1 เตรียมเส้นใยโมโนคาริออนที่มี mating type 4 ชนิด คือ A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1 และ A_2B_2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ mating type ละ 3 สายพันธุ์

3.4.1.2 ทำการผสมพันธุ์แบบ mon-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดบด เห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว และเห็ดบดกับเห็ดขอนขาว โดยนำเส้นใยโมโนคาริออนของคู่ผสมทั้ง 3 คู่ที่ทราบ mating type แล้วทั้ง 4 ชนิดมาผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดในจานอาหาร MEA ทั้งนี้ได้วางโคโลนีให้ห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร ดังวิธีการในไดอะแกรมต่อไปนี้ (เปลี่ยนชนิดของเห็ดจนครบทุกคู่ผสมพันธุ์ทั้ง 3 คู่) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้อง

คู่ผสมพันธุ์แบบ mon-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว

เห็ดหอมสายพันธุ์โมโนคาริออน (ME)

Mating type สายพันธุ์ที่		A_1B_1 37	A_1B_2 -	A_2B_1 22	A_2B_2 38 39
เห็ดขอนขาวสายพันธุ์โมโนคาริออน (MS) A_1B_1	1				
	2				
	4				
A_1B_2	10				
	11				
A_2B_1	6				
	9				
A_2B_2	3				
	5				

3.4.1.3 เมื่อเส้นใยของคู่ผสมพันธุ์เจริญมาชนกันแล้ว ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยบริเวณที่เส้นใยเจริญมาชนกันมาตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น ถ้าพบในคู่ผสมพันธุ์คู่ใดแสดงว่าคู่ผสมคู่นั้นผสมกันได้เพราะมีชนิดของเพศที่เข้ากันได้

3.4.1.4 ขยายปริมาณเส้นใยเห็ดลูกผสม (เส้นใยที่มีแคลมป์คอนเนคชั่น) ในเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่ได้ปริมาณ 10-20 เมล็ด มาทำการเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูป ทำการคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะเด่นของสายพันธุ์คู่ผสม เพื่อตรวจด้านสัณฐานวิทยาต่อไป

3.4.2 การผสมพันธุ์แบบ di-mon mating

3.4.2.1 เตรียมเส้นใยไดคาริออนและโมโนคาริออนที่มี mating type 4 ชนิดเช่นเดียวกันกับการผสมแบบ mon-mon mating ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ mating type ละ 3 สายพันธุ์

3.4.2.2 ทำการผสมพันธุ์แบบ di-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดบด เห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว และเห็ดบดกับเห็ดขอนขาว ทำการจับคู่ผสมพันธุ์เห็ดทีละคู่แบบพบกันหมด โดยนำเส้นใยไดคาริออนของเห็ดหอมมาผสมพันธุ์กับเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดบดและเห็ดขอนขาว เส้นใยไดคาริออนของเห็ดบดมาผสมพันธุ์กับเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว เส้นใยไดคาริออนของเห็ดขอนขาวมาผสมพันธุ์กับเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดบด

(ดังไดอะแกรมข้างล่าง) ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.1.2 ดังไดอะแกรมต่อไปนี้ (เปลี่ยนชนิดของเห็ดจนครบทุกคู่ผสมพันธุ์) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้อง

คู่ผสมพันธุ์แบบ di-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว

เห็ดขอนขาวสายพันธุ์โมโนคาริออน (MS)

เห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออน (E)	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
	1 2 4	10 11	6 9	3 5

3.4.2.3 เมื่อเส้นใยของคู่ผสมพันธุ์เจริญมาชนกันดีแล้ว ทำการตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นที่อยู่ค่อนมาทางด้านเส้นใยโมโนคาริออน ซึ่งถ้าพบว่าคู่ผสมพันธุ์คู่ใดเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นแสดงว่าคู่ผสมพันธุ์คู่นั้นผสมกันได้

3.4.2.4 ขยายปริมาณเส้นใยเห็ดลูกผสมที่เกิดแคลมป์คอนเนคชั่น ในเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่ได้ปริมาณ 10-20 เมล็ด มาทำการเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูป แล้วทำการคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะเด่นของสายพันธุ์คู่ผสม เพื่อตรวจด้านสัณฐานวิทยาต่อไป

3.4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ฟิวแซนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์คู่ผสม

3.4.3.1 การศึกษาลักษณะของการเจริญของเส้นใย นำเส้นใยลูกผสมที่คัดเลือกแล้วมาเลี้ยงในอาหารแข็ง MEA เพื่อศึกษาการเจริญของเส้นใยลูกผสม และเปรียบเทียบลักษณะของเส้นใยลูกผสมกับเส้นใยสายพันธุ์คู่ผสม โดยทำการวัดการเจริญและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยแบบสุ่มทั้งหมด 10 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์คู่ผสมเป็นเวลา 7 วัน และเก็บเส้นใยลูกผสมที่ได้ในอาหารหลอดผิวเอียงเพื่อเก็บเส้นใยไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.3.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของดอกเห็ด ตรวจดูลักษณะด้านสัณฐานวิทยาภายนอกของเห็ดลูกผสม โดยบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหมวกดอก ลักษณะรูปร่าง พื้นผิว สี และการสัมผัส (texture) ของหมวกดอก การยึดติดของครีบกับก้านดอก การเว้นช่องว่างภายในครีบดอก สีของครีบดอก ความยาวของก้านดอก เส้นผ่านศูนย์กลาง ผิว รูปแบบและลักษณะภายในก้านดอก การยึดติดของก้านกับหมวกดอก เก็บสปอร์พิมพ์แล้วบันทึกสีของสปอร์พิมพ์ จากนั้นทำการศึกษาสัณฐานวิทยาภายใน โดยบันทึกรูปร่าง ขนาดเบซิดิโอสปอร์ (ตามวิธีของ Walting. 1973) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มี eyepiece micrometer (ที่เทียบค่าแล้ว) เพื่อวัดขนาด

3.4.4 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3.4.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ปรับปรุงโดย Cenis J. (1992) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

นำเส้นใยจากหัวเชื้อเห็ดมาตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5 มิลลิลิตรด้วย cork borer แล้วถ่ายเชื้อลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB พีเอช 8.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 5-7 วัน จากนั้นนำเส้นใยมาสกัดดีเอ็นเอ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. กรองเส้นใยเห็ดด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง แล้วนำเส้นใยใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 0.1-0.3 กรัม

2. ล้างเส้นใยด้วย TE buffer นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3. รินสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง นำเส้นใยใส่ลงในโกร่งที่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วม บดเส้นใยให้ละเอียดอย่างรวดเร็วจนมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ถ่ายลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ในขณะที่บดอยู่ถ้าไนโตรเจนเหลวระเหยหมดให้เติมใหม่

4. เติม extraction buffer 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. ดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนมาใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ ผสม isopropanol ลงในหลอดเป็นปริมาตรเท่ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

7. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. รินสารละลายส่วนใสทิ้ง จะเหลือดีเอ็นเอติดอยู่ที่ก้นหลอด ล้างดีเอ็นเอด้วยเอธานอลร้อยละ 70 จากนั้นดูดเอธานอลที่เหลือทิ้ง แล้วคว่ำหลอดเซ็นตริฟิวจ์บนกระดาษทิชชูจนกระทั่งแห้ง

9. ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer จำนวน 50 ไมโครลิตร

10. เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.4.4.2 การวัดปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

ในการวิจัยนี้จะได้ทำการตรวจสอบสารละลายดีเอ็นเอ 2 วิธี คือ

1. การหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้นใน TE buffer มาวัดการดูดกลืนแสง (absorbance ; A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ถ้าค่า A_{260} มากกว่า 1.0 ให้เจือจางสารละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงใหม่

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

1.3 ตรวจสอบคุณภาพของกรดนิวคลีอิก โดยการหาอัตรส่วนของค่า A_{260}/ A_{280} ได้ค่ามากกว่า 1.8 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเออาจมีอาร์เอ็นเอปน และถ้าค่าต่ำแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์เหมาะสำหรับการนำไปใช้งานในขั้นต่อไปจะมีค่าระหว่าง 1.65-1.85

3.4.5. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

วิธี mon-mon mating : นำดีเอ็นเอของลูกผสมที่มีลักษณะของสายพันธุ์คู่ผสมจากคู่ผสมระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว คือ MES6 และระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดบด คือ MPS19 มาตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ระหว่างช่วง 18S rDNA ถึง 28S rDNA ด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ คือ ITS1 กับ ITS2, ITS1 กับ ITS4 และ ITS3 กับ ITS4

วิธี di-mon mating : นำดีเอ็นเอของลูกผสมที่มีลักษณะของสายพันธุ์คู่ผสมจากคู่ผสมระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว คือ DES1, DES7 และ DES5 และระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดบด คือ DPS8, DPS14 และ DPS12 มาตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเช่นเดียวกับวิธี mon-mon mating

3.4.5.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS2

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยการใช้ไพรเมอร์ 2 ตัวร่วมกันคือไพรเมอร์ ITS1 ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่บริเวณ ITS โดยมีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' และไพรเมอร์ ITS2 โดยมีลำดับเบสดังนี้ 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3' (White.*et.al.* 1990) โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพ และทราบความเข้มข้นแล้วมาเติมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการต่อไปนี้

DNA template (50 นาโนกรัม)	5	ไมโครลิตร
Primer ITS1 (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
Primer ITS2 (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
dNTP (2 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	5	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.3	ไมโครลิตร
H_2O	25.7	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

3.4.5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยการใช้ไพรเมอร์ 2 ตัวร่วมกันคือไพรเมอร์ ITS1 ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่บริเวณ ITS โดยมีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' และไพรเมอร์ ITS4 โดยมีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White.*et.al.* 1990) โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้

DNA template (50 นาโนกรัม)	5	ไมโครลิตร
Primer ITS1 (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
Primer ITS4 (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
dNTP (2 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	5	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.3	ไมโครลิตร
H_2O	25.7	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

3.4.5.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS3 และ ITS4

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยการใช้ไพรเมอร์ 2 ตัวร่วมกันคือไพรเมอร์ ITS3 ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่บริเวณ ITS โดยมีลำดับเบส

ดังนี้ 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' และไพรเมอร์ ITS4 โดยมีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White.*et.al.* 1990) โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้

DNA template (50 นาโนกรัม)	5	ไมโครลิตร
Primer ITS3 (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
Primer ITS4 (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
dNTP (2 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	5	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.3	ไมโครลิตร
H_2O	25.7	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

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

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

3.4.5.4 การทำ RFLP ของชิ้นดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำผลผลิตพีซีอาร์จากข้อ 3.4.5.1 ข้อ 3.4.5.2 และ 3.4.5.3 มาทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด คือ *Hin*fI, *Dae*I, S*au*3AI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III

การดำเนินปฏิกิริยาเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dae*I, S*au*3AI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III มีการเติมสารต่างๆ ดังนี้

PCR Product	5	ไมโครลิตร
Restriction Enzyme	0.5	ไมโครลิตร
Buffer	2	ไมโครลิตร
BSA	2	ไมโครลิตร
H_2O	10.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

การดำเนินปฏิกิริยาเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI และ *Eco*RI มีการเติมสารต่างๆ ดังนี้

PCR Product	5	ไมโครลิตร
Restriction Enzyme	0.5	ไมโครลิตร
Buffer	2	ไมโครลิตร
H_2O	12.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นนำผลผลิตดังกล่าวไปหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส (ภาคผนวก ง)

3.4.6 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซิส

3.4.6.1 ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของลูกผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลร้อยละ 2 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดบด

3.4.6.2 ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของลูกผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 6 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดบดสายพันธุ์โมโนคาริออน แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเห็ดหอม เห็ดขอนขาวและเห็ดบดสายพันธุ์โมโนคาริออนและลูกผสม

3.4.7 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และห้องปฏิบัติการภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การผสมพันธุ์แบบ Mon-mon Mating

เมื่อทำการจับคู่ผสมพันธุ์ ระหว่างเส้นใยโมโนคาริออนเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวจำนวน 36 คู่ บ่มเส้นใยในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จนสังเกตเห็นว่าเส้นใยเจริญมาชนกันดีแล้ว จึงใช้เข็มเขี่ยเส้นใยบริเวณที่ชนกัน มาตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 4.1) พบว่ามีคู่ผสมพันธุ์ที่เกิดแคลมป์คอนเนคชั่นสมบูรณ์ (true clamp : TC) 5 คู่ ได้แก่ E22×S11, E37×S2, E37×S11, E38×S2 และ E39×S11 คู่ผสมพันธุ์ที่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่นสมบูรณ์แต่มีขนาดเล็ก และเกิดแคลมป์ไม่สมบูรณ์หรือแคลมป์เทียม (false clamp : FC) 3 คู่ คือ E22×S2, E38×S11 และ E39×S2 โดยคู่ผสมพันธุ์เป็นชนิดของเพศที่ไม่เข้ากัน (incompatible) ได้แก่ E37×S2, E37×S11, E22×S2, E22×S11, E38×S2, E39×S2, E38×S11 และ E39×S11, ซึ่งเป็นเห็ดหอมจากกลุ่มที่ 1 (A_1B_1 ; สายพันธุ์ 37) กับเห็ดขอนขาวกลุ่มที่ 1 (A_1B_1 ; สายพันธุ์ 1, 2, 4) และกลุ่ม 2 (A_1B_2 ; สายพันธุ์ 10, 11) , เห็ดหอมจากกลุ่มที่ 2 (A_2B_1 ; สายพันธุ์ 22) กับเห็ดขอนขาวกลุ่มที่ 1 และกับกลุ่มที่ 2 สุดท้ายเห็ดหอมกลุ่มที่ 3 (A_2B_2 ; สายพันธุ์ 38, 39) กับเห็ดขอนขาวกลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งไม่ตรงตามทฤษฎีของ Buller (1966) หรือรายงานของ Papazian (1950) ที่ทำการทดลองใน *Schizophyllum commune*

การจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมกับเห็ดบดจำนวน 44 คู่ บ่มเส้นใยในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จนสังเกตเห็นว่าเส้นใยเจริญมาชนกันดีแล้ว จึงใช้เข็มเขี่ยเส้นใยบริเวณที่ชนกัน มาตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 4.2) พบว่ามีคู่ผสมพันธุ์ที่เกิดแคลมป์คอนเนคชั่นสมบูรณ์ 2 คู่ คือ E22×P4 และ E38×P4 นอกจากนี้ยังพบคู่ผสมพันธุ์ที่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่นเล็ก และเกิดแคลมป์เทียมหนึ่งคู่ คือ E39×P4 โดยคู่ผสมพันธุ์เป็นชนิดของเพศที่ไม่เข้ากันคือ เห็ดหอมจากกลุ่มที่ 3 (A_2B_2 ; สายพันธุ์ 38, 39) กับเห็ดบดกลุ่มที่ 4 (A_2B_2 ; สายพันธุ์ 1, 4, 6) และเห็ดหอมจากกลุ่มที่ 2 (A_2B_1 ; สายพันธุ์ 22) กับเห็ดบดกลุ่มที่ 4 ซึ่งไม่ตรงตามรายงานของ Papazian (1950)

การจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยโมโนคาริออนเห็ดบดกับเห็ดขอนขาวจำนวน 99 คู่ บ่มเส้นใยในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จนสังเกตเห็นว่าเส้นใยเจริญมาชนกันดีแล้ว จึงใช้เข็มเขี่ยเส้นใยบริเวณที่ชนกัน มาตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 4.3) พบว่ามีคู่ผสมพันธุ์ที่เกิดแคลมป์คอนเนคชั่นสมบูรณ์ 8 คู่ ได้แก่ P1×S2, P2×S11, P4×S1, P4×S2, P4×S4, P5×S11, P6×S2 และ P7×S11 โดยทุกคู่ผสมพันธุ์มีชนิดของเพศที่เข้ากัน (compatible) ตรงตามรายงานของ Papazian (1950) คือ เห็ดบดที่มีชนิดของเพศเป็น A_2B_1 กับเห็ด

ขอนขาวที่เป็น A_1B_2 และเห็ดบดที่เป็น A_2B_2 กับเห็ดขอนขาวที่เป็น A_1B_1 ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่าเป็นเพราะเห็ดขอนขาวและเห็ดบดอยู่ในสกุลเดียวกัน (*Lentinus*) มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม ดังนั้นชนิดของเพศของเห็ดทั้ง 2 ชนิด จึงควรจะตรงกัน ส่วนคู่ผสมพันธุ์ที่มีชนิดของเพศที่ไม่เข้ากัน แต่สามารถสร้างแคลมป์สมบูรณ์ได้ และเป็นเพราะเห็ดขอนขาว เห็ดบด มีระบบเพศประเภทเททระโพลา ไดคาริออน จึงมีโอกาสที่ชนิดของเพศของเห็ดทั้ง 2 ชนิดจะตรงกัน (พรรณี ฐิตาภิชิต. 2548)

ตารางที่ 4.1 ผลของการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์แบบ mon-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว (ME = เห็ดหอมสายพันธุ์โมโนคาริออน, MS = เห็ดขอนขาวสายพันธุ์โมโนคาริออน ; TC = true clamp, FC = false clamp)

เห็ดหอมสายพันธุ์โมโนคาริออน (ME)

เห็ดขอนขาวสายพันธุ์โมโนคาริออน (MS)	Mating type สายพันธุ์ที่	A_1B_1 37	A_1B_2 -	A_2B_1 22	A_2B_2 38	A_2B_2 39
	1					
A_1B_1	2	MES1 (TC)		MES2 (FC)	MES3 (TC)	MES4 (FC)
	4					
	10					
A_1B_2	11	MES5 (TC)		MES6 (TC)	MES7 (FC)	MES8 (TC)
	6					
A_2B_1	9					
	3					
A_2B_2	5					

ตารางที่ 4.2 ผลของการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์แบบ mon-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดบด (ME = เห็ดหอมสายพันธุ์โมโนคาริออน, MP = เห็ดบดสายพันธุ์โมโนคาริออน ; TC = true clamp, FC = false clamp)

เห็ดหอมสายพันธุ์โมโนคาริออน (ME)

เห็ดบดสายพันธุ์โมโนคาริออน (MP) Mating type สายพันธุ์ที่		A_1B_1 37	A_1B_2 -	A_2B_1 22	A_2B_2 38	39
A_1B_1	3, 8, 9					
A_1B_2	10, 11		โ			
A_2B_1	2, 5, 7					
A_2B_2	1, 4, 6			MEP9 (TC)	MEP10 (TC)	MEP11 (FC)

ตารางที่ 4.3 ผลของการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์แบบ mon-mon mating ระหว่างเห็ดบดกับเห็ดขอนขาว (MS = เห็ดขอนขาวสายพันธุ์โมโนคาริออน, MP = เห็ดบดสายพันธุ์โมโนคาริออน)

เห็ดบดสายพันธุ์โมโนคาริออน (MP)

เห็ดขอนขาวสายพันธุ์โมโนคาริออน (MS) Mating type สายพันธุ์ที่		A_1B_1 3 8 9	A_1B_2 10 11	A_2B_1 2 5 7	A_2B_2 1 4 6
A_1B_1	1, 2, 4				MPS12 MPS13 MPS14 MPS15 MPS16
A_1B_2	10, 11			MPS17 MPS18 MPS19	
A_2B_1	6, 9				
A_2B_2	3, 5				

<u>หมายเหตุ</u> ลูกผสมของทุกคู่ผสมสร้างแคลมป์สมบูรณ์ (true clamps)

4.1.1 ความสามารถในการเดินเส้นใยในเมล็ดข้าวฟ่าง

เมื่อนำเส้นใยฟิวแซนท์ มาขยายปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเส้นใยฟิวแซนท์ใช้เวลาเดินเส้นใยจนเต็มเมล็ดข้าวฟ่างใกล้เคียงกัน โดยกลุ่มที่เส้นใยเจริญเร็วใช้เวลาในการเดินเส้นใย 5 วันมี 15 สายพันธุ์ ได้แก่ MPS13, MPS17, MPS12, MPS14, MPS18, MPS15, MPS19, MEP10, MES1, MES5, MES6, MES2, MES7, MES4 และ MES8 ส่วนกลุ่มที่เส้นใยเดินช้ามี 4 สายพันธุ์โดยใช้เวลาในการเดินเส้นใย 10 วัน ได้แก่ MPS16, MEP11, MEP9 และ MES3 จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าฟิวแซนท์ MPS16 และ MEP11 มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นเล็กมาก ไม่สมบูรณ์และเกิดแคลมป์เทียม เส้นใยมีลักษณะผอม เล็ก คล้ายเส้นใยโมโนคาริออน เป็นลูกผสมที่ไม่สมบูรณ์ อ่อนแอ จึงไม่ทำการต่อเชื้อในรุ่นถัดไป

4.1.2 ความสามารถในการเกิดดอก

เมื่อนำเส้นใยฟิวแซนท์ที่ขยายปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่าง มาเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูป บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งในระยะนี้ยังไม่จำเป็นต้องให้แสงมากนัก จนสังเกตเห็นว่ามีเส้นใยเริ่มเจริญจากปากถุงพลาสติกลงมาเรื่อยๆ ซึ่งฟิวแซนท์มีความสามารถในการเจริญในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูปแตกต่างกัน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกคือกลุ่มที่เส้นใยเจริญเติบโตเร็ว ใช้เวลาในการเจริญจนเต็มก้อนขี้เลื่อย 57 วัน มี 7 สายพันธุ์ ได้แก่ MES6, MES5, MES8, MPS13, MPS17, MPS15 และ MPS19 จนเมื่อเส้นใยเจริญพร้อมที่จะเกิดดอกจะสังเกตว่ามีเส้นใยหนาๆ มากระจุกตัวกันเป็น primodia (ตุ่มดอก) จึงทำการเปิดดอกโดยใช้มีดตัดปากถุงพลาสติกให้เสมอไหล่ถุง เพื่อให้เส้นใยได้รับอากาศมากที่สุด รดน้ำทุกวันๆละ 3 ครั้งจนมีตุ่มดอกเห็ดเกิดขึ้น กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่เส้นใยเจริญเติบโตช้า ใช้เวลาในการเจริญจนเต็มก้อนขี้เลื่อยมากกว่า 70 วัน มี 8 สายพันธุ์ ได้แก่ MES2, MEP9, MES1, MEP10, MES4, MPS12, MPS14 และ MPS18 เมื่อเส้นใยเจริญเต็มที่พร้อมที่จะออกดอก ให้ทำการเปิดดอกด้วยวิธีการเดียวกันกับกลุ่มแรก

เมื่อสังเกตเห็นว่าเส้นใยสร้างสารสีน้ำตาลเข้มเป็นหย่อมๆ หรือเดินเป็นเส้นใยสีน้ำตาลแสดงว่าเส้นใยเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ระยะนี้เส้นใยจะรวมกันหนาเข้าสู่ระยะที่จะสร้าง preprimordia พร้อมที่จะเกิด primordial หรือตุ่มดอก เมื่อทำการเปิดปากถุงแล้วประมาณ 3 วันก็จะเกิดดอก ซึ่งฟิวแซนท์แต่ละตัวสามารถเกิดตุ่มดอกได้ช้าเร็วต่างกัน จึงได้จัดเป็นกลุ่มระยะการออกดอกได้ 4 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 ฟิวแซนท์ที่ใช้เวลาในการออกดอก 70-89 วัน ได้แก่ MES6, MES5, MES8, MPS17 MPS18 และ MPS19

กลุ่มที่ 2 ฟิวแซนท์ที่ใช้เวลาในการออกดอก 90-99 วันได้แก่ MES2, MPS13 และ MPS14

กลุ่มที่ 3 ฟิวแซนท์ที่ใช้เวลาในการออกดอก 100-119 วัน ได้แก่ MES1

กลุ่มที่ 4 ฟิวแซนท์ที่เส้นใยไม่ออกดอก ได้แก่ MES3, MES4 และ MPS15

นอกจากนี้ยังมีคู่ผสมพันธุ์ที่สร้างแคลมป์สมบูรณ์ แต่ไม่สามารถพัฒนาเส้นใยต่อไปจนเกิดดอก ได้แก่ฟิวแซนท์สายพันธุ์ MPS16 (เห็ดขอนขาวที่มีชนิดของเพศเป็น A_1B_1 กับเห็ดบดที่เป็น A_2B_2) และฟิวแซนท์สายพันธุ์ MES3 (เห็ดหอมที่มีชนิดของเพศเป็น A_2B_2 กับเห็ดขอนขาวที่เป็น A_1B_1) ที่เป็นเช่นนี้อาจเกี่ยวข้องกับโปรตีนบางชนิดที่ควบคุมการทำงานของยีนในคู่ผสมพันธุ์ และจากการสังเกตการออกดอกจะเห็นว่าฟิวแซนท์ระหว่างเห็ดหอมสายพันธุ์ E และเห็ดบดสายพันธุ์ P เมื่อผสมพันธุ์คู่กับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 สามารถออกดอกเร็วที่สุด รองลงมาได้แก่คู่ผสมพันธุ์กับ S2 อาจเป็นเพราะเส้นใยสายพันธุ์ S11 มีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตดีที่สุด เมื่อจับคู่ผสมกับสายพันธุ์ใดก็เกิดการรวมนิวเคลียสได้ดี ส่วนสายพันธุ์ S2 อาจมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตด้อยกว่าเล็กน้อย เมื่อจับคู่ผสมพันธุ์กับสายพันธุ์ใดจึงเกิดการรวมนิวเคลียสได้รองลงมา แต่ดอกเห็ดที่เกิดขึ้นมีลักษณะไม่สมบูรณ์และออกดอกน้อย

4.2 การผสมพันธุ์แบบ Di-mon Mating

ทำการจับคู่ผสมข้ามสกุลด้วยวิธีดั้งเดิมแบบ di-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว และเห็ดหอมกับเห็ดบด และผสมข้ามชนิด ระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดบดด้วยวิธีการเดียวกัน โดยกำหนดให้เห็ดชนิดแรกเป็นเส้นใยไดคาริออน และเห็ดชนิดที่สองเป็นเส้นใยโมโนคาริออน มีคู่ผสม 6 คู่ ดังต่อไปนี้

<u>เห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว</u>

ทำการจับคู่ผสมข้ามสกุล ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวจำนวน 9 คู่ แล้วนำเส้นใยไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 5 วัน เมื่อเส้นใยเจริญมาชนกันดีแล้ว ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยบริเวณเยื้องมาทางด้านเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดขอนขาว มาตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 4.4) พบว่ามีเพียง 7 คู่ คือคู่ผสมระหว่าง DE×S1, DE×S2, DE×S3, DE×S4, DE×S6, DE×D10 และ DE×S11 เกิดแคลมป์คอนเนคชั่นสมบูรณ์ โดยแนวชนของเส้นใยมีลักษณะฟู เป็นรอยนูน เมื่อดูใต้จานอาหารแข็งพบว่ามีการสร้างสารสีน้ำตาล

<u>เห็ดหอมกับเห็ดบด</u>

ทำการจับคู่ผสมข้ามสกุล ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดบดจำนวน 11 คู่ แล้วนำเส้นใยไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 5 วัน เมื่อเส้นใยเจริญมาชนกันดีแล้ว ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยบริเวณเยื้องมาทางด้านเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดบด มาตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าทุกคู่ผสมไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่น จึงไม่เกิดฟิวแซนท์

<u>เห็ดขอนขาวกับเห็ดหอม</u>

ทำการจับคู่ผสมข้ามสกุล ระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอมจำนวน 11 คู่ แล้วนำเส้นใยไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 5 วัน เมื่อเส้นใยเจริญมาชนกันดีแล้ว ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยบริเวณเยื้องมา

ทางด้านเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอม มาตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าทุกคู่ผสมไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่น จึงไม่เกิดฟิวแซนท์

เห็ดขอนขาวกับเห็ดบด

ทำการจับคู่ผสมข้ามสกุล ระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดบดจำนวน 11 คู่ แล้วนำเส้นใยไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 3 วัน เมื่อเส้นใยเจริญมาชนกันดีแล้ว ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยบริเวณเยื้องมาทางด้านเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดบด มาตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าทุกคู่ผสมไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่น จึงไม่เกิดฟิวแซนท์

เห็ดบดกับเห็ดหอม

ทำการจับคู่ผสมข้ามสกุล ระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอมจำนวน 4 คู่ แล้วนำเส้นใยไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 5 วัน เมื่อเส้นใยเจริญมาชนกันดีแล้ว ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยบริเวณเยื้องมาทางด้านเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอม มาตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าทุกคู่ผสมไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่น จึงไม่เกิดฟิวแซนท์

เห็ดบดกับเห็ดขอนขาว

ทำการจับคู่ผสมข้ามชนิด ระหว่างเห็ดบดกับเห็ดขอนขาวจำนวน 9 คู่ แล้วนำเส้นใยไปบ่มในตู้บ่มเป็นเวลา 3 วัน เมื่อเส้นใยเจริญมาชนกันดีแล้ว ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยบริเวณเยื้องมาทางด้านเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดขอนขาว มาตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 4.5) พบว่าคู่ผสมระหว่าง DP×S1, DP×S2, DP×S3, DP×S4, DP×S6, DP×S10 และ DP×S11 เกิดแคลมป์คอนเนคชั่นสมบูรณ์ เมื่อดูใต้จานอาหารแข็งพบว่ามีการสร้างสารสีน้ำตาล ซึ่งแต่ละคู่ผสมพันธุ์สร้างแนวชนกันของเส้นใยแตกต่างกันโดย DP×S1, DP×S2, DP×S3 และ DP×S11 ลักษณะการชนกันของเส้นใยเป็นร่องบางๆ (flat) ส่วน DP×S4, DP×S6 และ DP×D10 ลักษณะการชนกันของเส้นใยสามารถเจริญเข้ากันได้ (compatibility) กล่าวคือเส้นใยฟูรวมกันดี

ตารางที่ 4.4 ผลของการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์แบบ di-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว (DE = เห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออน, MS = เห็ดขอนขาวสายพันธุ์โมโนคาริออน)

	เห็ดขอนขาวสายพันธุ์โมโนคาริออน (MS)			
	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
	1 2 4	10 11	6 9	3 5
เห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออน (DE)	DES1 DES2 DES3	DES4 DES5	DES6	DES7

ตารางที่ 4.5 ผลของการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมพันธุ์แบบ di-mon mating ระหว่างเห็ดบดกับเห็ดขอนขาว_(DP = เห็ดบดสายพันธุ์ไดคาริออน, MS = เห็ดขอนขาวสายพันธุ์โมโนคาริออน)

	เห็ดขอนขาวสายพันธุ์โมโนคาริออน (MS)			
	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
	1 2 4	10 11	6 9	3 5
เห็ดบดสายพันธุ์ไดคาริออน (DP)	DPS8 DPS9 DPS10	DPS11 DPS12	DPS13	DPS14

4.2.1 ความสามารถในการเดินเส้นใยในเมล็ดข้าวฟ่าง

เมื่อนำเส้นใยจากคู่ผสมข้ามสกุลและข้ามชนิดด้วยวิธีดั้งเดิมแบบ di-mon mating ทั้ง 14 สายพันธุ์ได้แก่ DES1, DES2, DES3, DES4, DES5, DES6, DES7, DPS8, DPS9, DPS10, DPS11, DPS12,DPS13 และ DPS14 มาขยายปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเส้นใยของคู่ผสมทุกคู่ใช้เวลาในการเดินเส้นใยจนเต็มเมล็ดข้าวฟ่างได้ใกล้เคียงกันคือ 5-7 วัน

4.2.2 ความสามารถในการเกิดดอกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด

เมื่อนำเส้นใยฟิวแซนท์ที่ขยายปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่าง มาเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูป แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้อง พบว่ามีฟิวแซนท์ 8 สายพันธุ์ที่เส้นใยเจริญเติบโตสมบูรณ์ เมื่อสังเกตเห็นว่าเส้นใยเจริญจากปากถุงพลาสติกลงมาเรื่อยๆ โดยเส้นใยจะสร้างสารสีน้ำตาลเข้มเป็นหย่อมๆ เกิดเส้นใยหนามากระจุกตัวเกิดเป็น primodia แสดงว่าเส้นใยพร้อมที่จะเกิดดอก หลังจากนั้นเส้นใยจะรวมตัวกันหนาแน่นเพื่อเข้าสู่ระยะ preprimodia เมื่อทำการเปิดปากถุงก็จะพัฒนาเกิดเป็นดอกเห็ดได้ โดยใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน จึงได้ทำการแบ่งกลุ่มฟิวแซนท์ตามความสามารถในการเกิดดอกดังนี้คือ ฟิวแซนท์ที่ใช้เวลาในการออกดอก 114-122 วันมี 4 คู่ ได้แก่

DPS9, DES7, DES1, DES8 และ DPS12 ส่วนฟิวแซนท์ที่ใช้เวลาในการออกดอก 132-145 วันมี 3 คู่ ได้แก่ DES5, DPS14 และ DES12

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานและคัดเลือกด้วยสายตาของดอกเห็ดทั้งจากวิธี mon-mon mating 19 สายพันธุ์และ di-mon mating 8 สายพันธุ์ จึงคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่มีลักษณะเด่นของเห็ดหอม เห็ดขอนขาวและเห็ดบด 8 สายพันธุ์คือ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 เพื่อนำมาตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมต่อไป

4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์คู่ผสม

4.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใย

4.3.1.1 การศึกษาขนาดของเส้นใย

เมื่อวัดขนาดของเส้นใยฟิวแซนท์และเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดบด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยฟิวแซนท์สายพันธุ์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 1.43, 1.37, 1.53, 1.50, 1.56, 1.36, 1.38 และ 1.48 ไมโครเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์เห็ดหอม เห็ดขอนขาวและเห็ดบดคือ E, E22, P, P7, S1, S3 และ S11 มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 2.15, 1.7, 1.36, 1.18, 1.1, 1.04 และ 1.38 ไมโครเมตรตามลำดับ

4.3.1.2 การศึกษาการเจริญของเส้นใย

เมื่อเลี้ยงเส้นใยของสายพันธุ์ฟิวแซนท์ เห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดบด บนจานอาหารแข็ง MEA ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสสำหรับเห็ดหอม เป็นเวลา 3 และ 5 วัน (ตารางที่ 4.6) พบว่าโคโลนีฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์มีระยะเวลาการเจริญใกล้เคียงกัน เมื่อเลี้ยงโคโลนีบนจานอาหารแข็ง MEA เป็นเวลา 3 วัน ฟิวแซนท์สายพันธุ์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 มีขนาดโคโลนี 4.96, 4.94, 5.4, 5.57, 5.02, 5.00, 6.40 และ 5.66 เซนติเมตรตามลำดับ ในขณะที่โคโลนีของเห็ดหอมสายพันธุ์ E, E22 เห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1, S3, S11 และเห็ดบดสายพันธุ์ P, P7 มีขนาด 1.22. 0.53, 3.76, 5.42, 4.64 5.01 และ 3.59 เซนติเมตรตามลำดับ และเมื่อเส้นใยทั้งหมดเจริญจนมีอายุ 5 วัน พบว่าเส้นใยฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 8.68, 8.65, 9.00, 9.00, 8.92, 8.85, 9.00 และ 9.00 เซนติเมตรตามลำดับ โดยขนาดเส้นใย 9 คือโคโลนีเจริญจนเต็มจานอาหาร MEA ในขณะที่โคโลนีสายพันธุ์เห็ดหอมสายพันธุ์ E, E22 เห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1, S3, S11 และเห็ดบดสายพันธุ์ P, P7 มีขนาด 1.84, 1.71, 7.38, 9.00, 8.53, 8.87 และ 6.42 เซนติเมตรตามลำดับ จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่าโคโลนีของสายพันธุ์ฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์ใช้เวลาประมาณ 5 วัน ก็สามารถเจริญจนเต็มจานอาหาร ในขณะที่สายพันธุ์คู่ผสมใช้เวลาประมาณ 7 วัน และสายพันธุ์ฟิวแซนท์เจริญเติบโตได้เร็วกว่าสาย

พันธุ์คู่ผสม โดยเฉพาะเห็ดหอมสายพันธุ์ E และ E22 เมื่อเลี้ยงบนจานอาหาร MEA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 20-25 วันจึงเจริญจนเต็มจานอาหาร เมื่อวิเคราะห์การเจริญเติบโตของโคโลนีเส้นใยฟิวแซนท์กับสายพันธุ์เห็ดหอม เห็ดบดและเห็ดขอนขาว พบว่าขนาดเส้นใยของแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 4.6 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MEA พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วันและ 5 วัน

สายพันธุ์	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	
	วันที่ 3	วันที่ 5
E22	0.53[a]	1.71[a]
DE	1.22[a]	1.84[a]
P7	3.59[b]	6.42[b]
S1	3.76[bc]	7.38[c]
S11	4.64[bcd]	8.53[d]
MPS19	4.94[bcd]	8.65[d]
MES6	4.96[bcd]	8.68[d]
DPS8	5.00[bcd]	8.85[d]
P	5.01[bcd]	8.87[d]
DES5	5.02[bcd]	8.92[d]
DES1	5.40[bcd]	9.00[d]
S3	5.42[cd]	9.00[d]
DES7	5.57[cd]	9.00[d]
DPS12	5.66[d]	9.00[d]
DPS14	6.40[d]	9.00[d]

<u>หมายเหตุ</u>

1. ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรที่ไม่เหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเปรียบเทียบแบบ Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

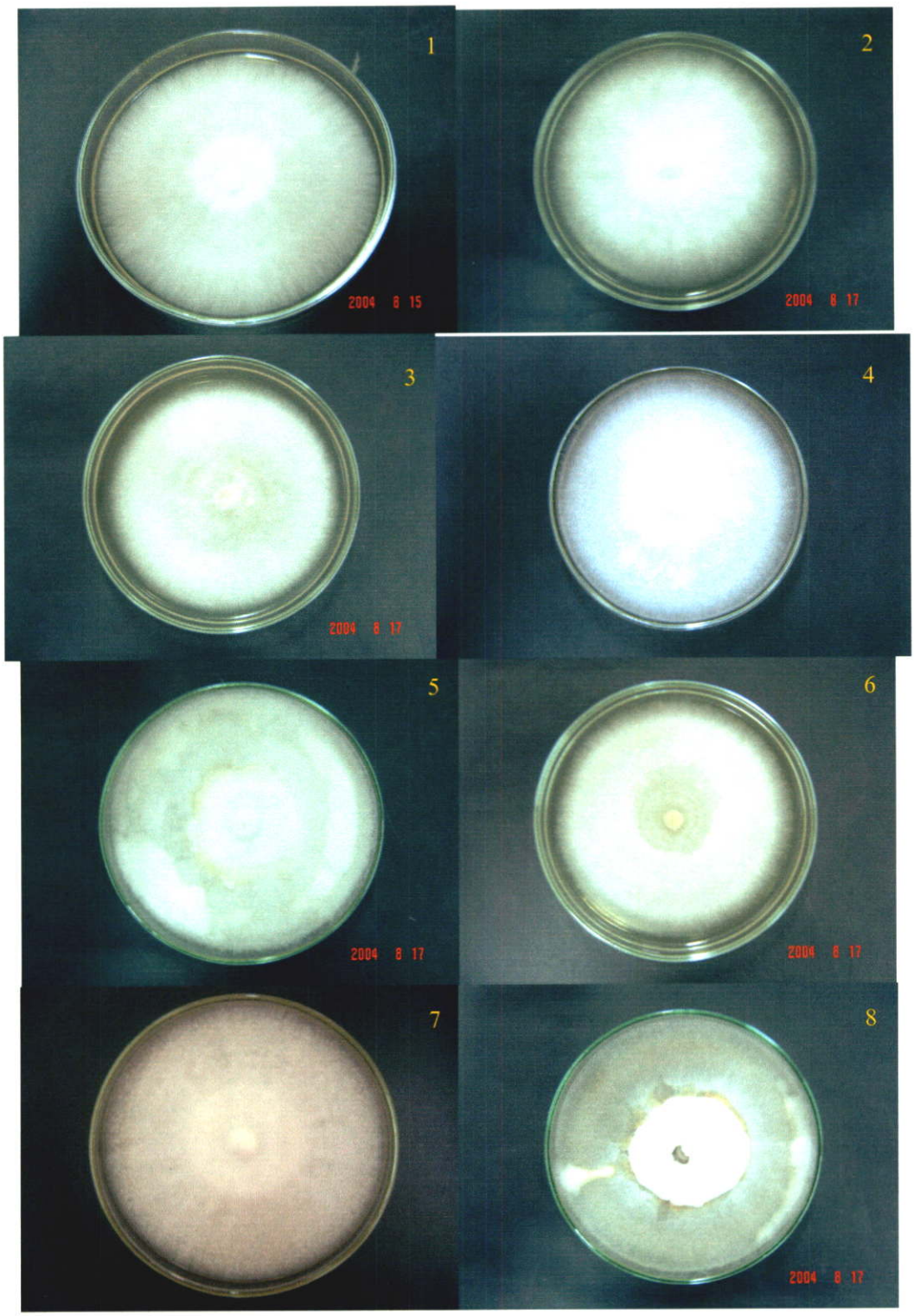
2. E = เห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออน, E22 = เห็ดหอมสายพันธุ์โมโนคาริออน, P = เห็ดบดสายพันธุ์ไดคาริออน, P7 เห็ดบดสายพันธุ์โมโนคาริออน, S1, S3, S11 = เห็ดขอนขาวสายพันธุ์โมโนคาริออน, MES6 = ฟิวแซนท์จากวิธี mom-mom mating ระหว่างเห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 , MPS19 = ฟิวแซนท์จากวิธี mom-mom mating ระหว่างเห็ดบดสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11, DES1 = ฟิวแซนท์จากวิธี di-mom mating ระหว่างเห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1, DES7 = ฟิวแซนท์จากวิธี di-mom mating ระหว่างเห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3, DES5 = ฟิวแซนท์จากวิธี di-mom mating ระหว่างเห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวสาย

พันธุ์ S11, DPS8 = ฟิวแซนท์จากวิธี di-mom mating ระหว่างเห็ดบดสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 , DPS14 = ฟิวแซนท์จากวิธี di-mom mating ระหว่างเห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3, DPS12 = ฟิวแซนท์จากวิธี di-mom mating ระหว่างเห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11

4.3.1.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเส้นใยเห็ด

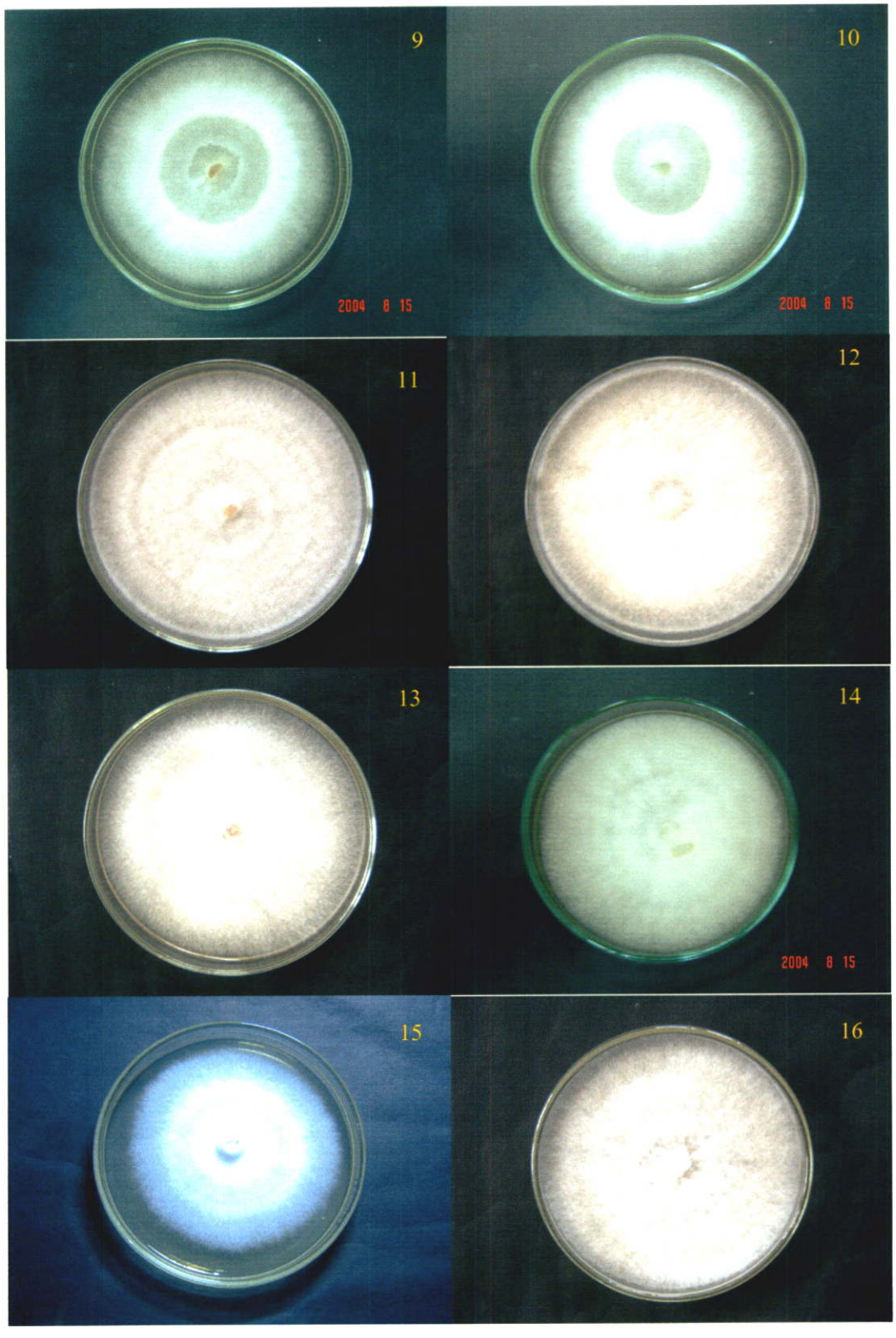
เมื่อพิจารณาลักษณะของโคโลนี**สายพันธุ์ MES6** และ **MPS19** (รูปที่ 4.1) เส้นใยมีลักษณะฟูเรียบ สร้างสารสีน้ำตาลตามขอบจานอาหาร MEA, **สายพันธุ์ DES1** เส้นใยมีลักษณะฟูเป็นปุยแต่ไม่หนามากนัก เดินเส้นใยเรียบ เส้นใยขดตัวเป็นเม็ดสีน้ำตาลขึ้นเป็นวงรอบจานอาหาร, **สายพันธุ์ DES7** เส้นใยตรงกลางฟูหนา รอบจานอาหารฟูเรียบและสร้างสารสีน้ำตาลอ่อน, **สายพันธุ์ DES5** เส้นใยเป็นปุยบางไม่ฟูมาก ขอบจานอาหารเส้นใยเดินเรียบและสร้างสารสีน้ำตาล, **สายพันธุ์ DPS8** เส้นใยตรงกลางมีสีขาวฟูหนา เส้นใยฟูแต่ไม่หนารอบขอบจานอาหาร, **สายพันธุ์ DPS14** เส้นใยฟูเป็นปุยหนา เส้นใยอัดกันแน่นเป็นเม็ดเล็กๆ และสร้างสารสีน้ำตาลรอบนอกจานอาหาร และ**สายพันธุ์ DPS12** เส้นใยสีขาวเดินฟูเป็นปุย เนื้อเหนียว ในขณะที่**เห็ดหอมสายพันธุ์ E, เห็ดขอนขาวและเห็ดบด**เส้นใยมีสีขาว ฟูเป็นปุยหนาลักษณะเส้นใยจะใหญ่กว่าสายพันธุ์โมโนคาริออนเล็กน้อย เมื่อเส้นใยแก่จะมีสีน้ำตาลเล็กน้อย, **สายพันธุ์ E22** เส้นใยสีขาวฟูเป็นปุยหนา, **สายพันธุ์ P** เส้นใยมีสีขาวอมน้ำตาลอ่อน เดินฟูเรียบและสร้างสารสีน้ำตาล, **P7** เส้นใยมีสีขาวเดินฟูเรียบและสร้างสารสีน้ำตาล, **สายพันธุ์ S1** เส้นใยสีขาวฟูปุยหนา, **S3** เส้นใยสีขาวฟูเรียบมีสีน้ำตาลกระจายเป็นกลุ่มๆ และ **S11** เส้นใยสีขาวเดินเรียบและสร้างสารสีน้ำตาล

จากลักษณะดังกล่าวจะเห็นได้ว่า โคโลนีฟิวแซนท์มีลักษณะเส้นใยคล้ายกับเห็ดหอม เห็ดขอนขาวและเห็ดบด เกือบทุกสายพันธุ์มีการสร้างสารสีน้ำตาล ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเห็ดหอมและเห็ดบดที่มีผิวหมวกดอกเป็นสีน้ำตาล นอกจากนั้นพบว่าเส้นใยที่เดินเรียบ และมีการสร้างสารสีน้ำตาล ตรวจพบแคลมป์คอนเนคชั่นที่สมบูรณ์ดีกว่าเส้นใยที่เดินฟู



รูปที่ 4.1 การเจริญของเส้นใยฟิวแซนท์จากวิธี mon-mon mating และ di-mon mating

กำหนดให้ : 1 = E, 2 = E22, 3 = P, 4 = P7, 5 = S, 6 = S1, 7 = S3, 8 = S11



รูปที่ 4.1 (ต่อ)

กำหนดให้ : 9 = MES6, 10 = MPS19, 11 = DES1, 12 = DES7, 13 = DES5, 14 = DPS8, 15 = DPS14, 16 = DPS12

4.3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด

เมื่อนำฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์ไปเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูป แล้วทำการตรวจสอบสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดเปรียบเทียบกับดอกเห็ดหอม เห็ดขอนขาวและเห็ดบด (รูปที่ 4.2-4.4 และตารางที่ 4.7-4.9) พบว่า

- เห็ดหอม มีรูปร่างคล้ายร่ม ขนาดดอกปานกลาง ขอบดอกตัน ผิวสีน้ำตาลเข้ม มีเกล็ดนูน เนื้อดอกหนา เหนียว ก้านดอกอวบสั้นกว้างเกือบเท่ากันตลอดก้าน สปอร์พิมพ์สีขาวครีม สปอร์รูปร่างรี

- เห็ดขอนขาว ดอกเป็นรูปกรวยตื้น ดอกมีขนาดเล็ก ขอบดอกคว่ำลง ผิวสีครีมเทา เนื้อดอกบาง เปราะหักง่าย ก้านดอกมีความกว้างเกือบเท่ากันตลอดก้าน สปอร์พิมพ์สีเหลืองครีม สปอร์รูปร่างรี

- เห็ดบด ดอกเป็นรูปกรวยลึก ดอกขนาดใหญ่ ขอบดอกม้วนลง ผิวดอกสีน้ำตาลเข้ม เนื้อดอกบาง เหนียวมาก ก้านดอกมีความก้างเกือบเท่ากันตลอดก้าน สปอร์พิมพ์สีครีมอมน้ำตาล สปอร์รูปร่างรี

ฟิวแซนท์จากวิธี mon-mon mating

- สายพันธุ์ MES6 (คู่ผสมระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว) มีลักษณะของเห็ดขอนขาวคือหมวกดอกเป็นรูปกรวยตื้นดอกเล็ก บานใหญ่ สีขาวครีม ผิวหมวกดอกมีเกล็ดขนสีน้ำตาล กลีบดอกบางม้วนขึ้นด้านใน มีเนื้อดอกพอสมควร เนื้อเหนียว ครีบดอกเรียงสั้นสลับยาว ก้านดอกมีความยาวเกือบเท่ากันตลอดก้าน สปอร์พิมพ์สีครีมอมน้ำตาล สปอร์รูปร่างยาวรี ส่วนที่คล้ายเห็ดหอมคือมีหมวกดอกเป็นรูปทรงกรวยตื้น

- ฟิวแซนท์สายพันธุ์ MPS19 (คู่ผสมระหว่างเห็ดบดกับเห็ดขอนขาว) มีลักษณะเด่นของทั้งเห็ดขอนขาวคือผิวหมวกรูปกรวยตื้น ดอกใหญ่ เนื้อดอกบาง เหนียว ก้านดอกมีความยาวเกือบเท่ากันตลอดก้าน และเห็ดบดคือดอกขนาดใหญ่ ผิวหมวกดอกสีน้ำตาลอมเทา ครีบสีน้ำตาลอ่อนหนาเรียงสั้นสลับยาว เนื้อเหนียว โคนดอกสีน้ำตาลเข้ม สปอร์พิมพ์สีเหลืองครีม สปอร์มีรูปร่างยาวรี

ฟิวแซนท์จากวิธี di-mon mating

- สายพันธุ์ DES1 (คู่ผสมระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว) หมวกดอกรูปกรวยตื้น ดอกขนาดเล็ก ผิวหมวกดอกสีขาวครีม มีเนื้อดอกปานกลาง เหนียว ก้านดอกมีความยาวเกือบเท่ากันตลอดก้าน สปอร์พิมพ์สีเหลืองครีม สปอรูปร่างยาวรี

- สายพันธุ์ DES7 (คู่ผสมระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว) มีความเป็นลูกผสมคือรูปร่างดอกเป็นรูปกรวยตื้น ดอกขนาดปานกลาง ขอบดอกคว่ำลง ผิวหมวกดอกมีสีครีมอมน้ำตาล มีเกล็ดขนสีน้ำตาลขึ้นบนผิวหมวกดอก เนื้อดอกบาง เหนียว ก้านดอกมีความยาวเกือบเท่ากัน

ตลอดก้าน ครีบดอกสีน้ำตาลเรียงตัวแบบสั้นสลับยาว บริเวณโคนก้านดอกต่อกับครีบดอกมีลักษณะของเห็ดหอม สปอร์พิมพ์สีเหลืองครีม สปอร์รูปร่างยาวรี

- สายพันธุ์ DES5 (คู่ผสมระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว) หมวกดอกรูปกรวยตื้น ดอกขนาดใหญ่สีขาวครีม มีเกล็ดขนสีน้ำตาลอ่อน ปลายกลีบบางม้วนลงด้านในเล็กน้อย มีเนื้อดอกพอสมควร เหนียว ครีบดอกเป็นสีครีมอมน้ำตาลอ่อน ก้านดอกมีความกว้างเกือบเท่ากันตลอดก้าน สปอร์พิมพ์สีเหลืองครีมเข้ม สปอร์รูปร่างยาวรี

- สายพันธุ์ DPS8 (คู่ผสมระหว่างเห็ดบดกับเห็ดขอนขาว) หมวกดอกเป็นรูปกรวยตื้นเล็กน้อย ดอกมีขนาดปานกลางสีขาวครีม ครีบดอกสีขาวครีมเล็กเรียงตัวถี่แบบสั้นสลับยาว มีลักษณะของเห็ดบดคือมีเกล็ดขนสีครีมอมเทาขึ้นหนาแน่น ผิวหมวกดอกขรุขระ เนื้อดอกบางเหนียว ก้านดอกมีความกว้างเกือบเท่ากันตลอดก้าน สปอร์พิมพ์สีครีมเข้มอมเหลืองครีม สปอร์รูปร่างยาวรี

- สายพันธุ์ DPS14 (คู่ผสมระหว่างเห็ดบดกับเห็ดขอนขาว) มีส่วนที่คล้ายเห็ดขอนขาวคือดอกเป็นรูปกรวยตื้น ดอกเล็กสีขาวครีมบานเล็กน้อย ขอบดอกม้วนลง เนื้อดอกปานกลางเปราะ ผิวหมวกดอกมีสีเทาขรุขระเล็กน้อย ส่วนที่คล้ายเห็ดบดคือหมวกดอกมีรูปร่างทรงกรวยเล็กน้อย เนื้อดอกเหนียว ก้านดอกมีความกว้างเกือบเท่ากันตลอดก้าน สปอร์พิมพ์สีครีมเข้มอมเหลืองครีม สปอร์รูปร่างยาวรี

- สายพันธุ์ DPS12 (คู่ผสมระหว่างเห็ดบดกับเห็ดขอนขาว) ดอกมีรูปร่างกรวยตื้น ดอกเล็กสีครีมเทา มีลักษณะของเห็ดขอนขาว ผิวหมวกดอกมีเกล็ดขนสีน้ำตาลอ่อน ผิวหยาบแต่ไม่ขรุขระมากนัก มีเนื้อดอกบางเปราะ ก้านดอกมีความกว้างเกือบเท่ากันตลอดก้าน สปอร์พิมพ์สีเหลืองครีมอมน้ำตาล สปอร์รูปร่างยาว

ตารางที่ 4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์สายพันธุ์ MES6, MPS19 และ DES1

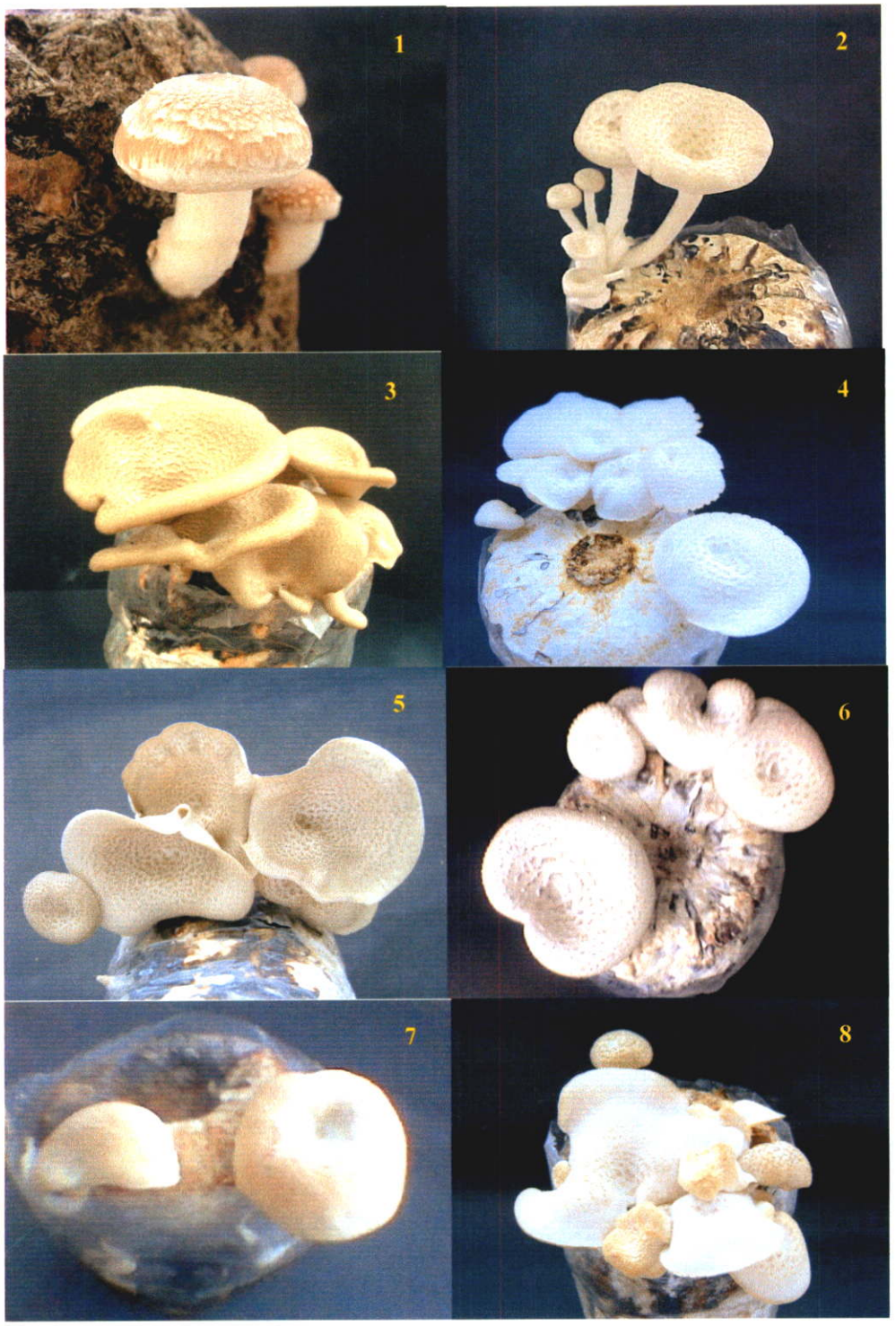
สายพันธุ์ / ตรวจสัณฐาน	E	S	P	MES6	MPS19	DES1
จำนวนวันที่ออกดอก นับจากวันที่ลงก้อน	-	-	-	94	71	151
จำนวนดอก/ก้อนเพาะ	-	-	-	5	8	5
นน.สด/ก้อน (กรัม)	-	-	-	20.34	17.23	20.26
ขนาดของหมวกดอก (ซม.)	3.53×4.38	4.11×5.01	3.91×4.18	5.3×4.35	5.53×4.65	2.65×2.75
รูปร่างของหมวกดอก	Regular and convex	Central depress – unfundibuliform	unfundibuliform	Central depress	Depress-infundibuliform	Central depress กลางดอกปุ่มเล็กน้อย
สีของหมวกดอก	น้ำตาลอ่อน	ครีมอมเทา	น้ำตาลอมเทา	ขาวครีมอมเทา	น้ำตาลอมเทาคล้ายเห็ดบด	ขาว
พื้นผิวของหมวกดอก	มีขนสีขาวขึ้นเป็นเกล็ดแบบ Tessellated	ผิวขรุขระ มีขนสีเทาขึ้นเป็นเกล็ดแบบ Fibrous scales	ผิวขรุขระ มีขนสีเทาอมน้ำตาลขึ้นเป็นเกล็ดแบบ Fibrous scales	ผิวสีขาวครีม ขรุขระ มีขนสีน้ำตาลขึ้นหนาแน่นแบบ Fibrous scales	ขรุขระ มีขนสีน้ำตาลเข้มขึ้นหนาแน่นแบบ Fibrous scales	มีขนสีน้ำตาลอ่อนเล็กน้อยเป็นเส้นๆ ไม่เป็นเกล็ดแบบ Fibrous scales ชัดเจน
ขอบของหมวกดอก	ขอบดอกม้วนลง (inrolled)	ขอบดอกม้วนขึ้น(turned) ถึงม้วนลง (inrolled)	ขอบหมวกดอก ม้วนลงด้านใน (inrolled)	ขอบหมวกดอกม้วนลง (inrolled)	ขอบหมวกดอกบาง ม้วนลงด้านใน (inrolled)	ขอบหมวกดอก ม้วนลงเล็กน้อย (inrolled)
ความหนาของหมวกดอกและผิวสัมผัส	เนื้อดอกหนา แน่น ยืดหยุ่นดี	เนื้อดอกบาง เหนียว ยืดหยุ่น	เนื้อดอกบาง เหนียวมาก ยืดหยุ่น	บาง เหนียว ยืดหยุ่น	บาง เหนียว ยืดหยุ่น	เนื้อดอกบาง เหนียว ยืดหยุ่น

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

ลายพันธุ์ / ตรวจสัณฐาน	E	S	P	MES6	MPS19	DES1
การเว้นช่องว่างภายในครีบดอก	-ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)
สีของครีบดอก	ครีม	เหลืองครีม	ครีมแก่อมน้ำตาล	ขาวครีม	ครีมแก่อมน้ำตาล	ครีม
จำนวนครีบดอก/1ซม.	24	23	19	21	20	15-18
ความกว้างของครีบดอก/1ซม.	0.05-0.1	0.05-0.1	0.05-0.15	0.1-0.15	0.05	0.75
การยึดติดของครีบดอกกับก้าน	ครีบติดกับก้านดอกมากกว่าแบบ adnated (Adnexed)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)
สีของก้านดอก	ขาวครีม	ครีมอมเทา	น้ำตาลอมเทา	ขาวครีม	ขาวครีม	ครีม แต่โคนก้าน-กลางก้านเป็นสีน้ำตาลเข้ม
ความยาวของก้านดอก (ซม.)	2.39	3.38	3.42	4.5	3.8	2.37
รูปแบบของก้านดอก	โคนก้านดอกโป่งเล็กน้อย (tapering from a boader base)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)
ผิวก้านดอก	recticulate	Random-snake-like	Longitudinally scaly	Random-snake-like	Random-snake-like	Random-snake-like

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

สายพันธุ์ / ตรวจสัณฐาน	E	S	P	MES6	MPS19	DES1
ลักษณะภายในก้าน	ตัน ไม่กลวง ยืดหยุ่นดี	ตัน ไม่กลวง ยืดหยุ่นดี	ตัน ไม่กลวง ยืดหยุ่นดี	ตัน ไม่กลวง เนื้อเหนียว ยืดหยุ่นดี	ตัน ไม่กลวง เนื้อเหนียว ยืดหยุ่นดี	ตัน ไม่กลวง เนื้อเหนียว ยืดหยุ่นดี
การยึดติดของก้านดอกกับหมวกดอก	ก้านยึดตรงกลาง (Central)	ก้านยึดตรงกลาง-เยื้องด้านใดด้านหนึ่ง (Central- eccentric)	ก้านยึดตรงกลาง (Central)	ก้านยึดตรงกลาง (Central)	ก้านยึดตรงกลาง-เยื้องด้านใดด้านหนึ่งเล็กน้อย (Central-eccentric)	เยื้องด้านใดด้านหนึ่ง-ก้านยึดตรงกลาง (Eccentric-Central)
สีของเนื้อเยื่อ	ขาวครีม	ขาวครีม	ครีม	ขาวครีม	ขาวครีมเข้มเล็กน้อย	น้ำตาล
ขนาดของเส้นใยเฉลี่ย (µm)	1.95	1.08	1.27	1.43	1.37	1.53
สีของสปอร์พิมพ์	ขาวครีม	เหลืองครีม	ครีมอมน้ำตาล	ครีมอมน้ำตาลเข้ม	เหลืองครีม	เหลืองครีม
รูปร่างของสปอร์	รูปกลมรี	รูปรี	รูปรี	รูปยาวรี	รูปยาวรี	รูปยาวรี
ขนาดของสปอร์เฉลี่ย (µm)	3.07×1.36	2.97×1.66	3.77×1.17	3.04×1.19	3.8×1.37	3.15×1.55
สรุป	-	-	-	คล้ายเห็ดขอนขาวมากกว่าเห็ดหอม	คล้ายทั้งเห็ดขอนขาวและเห็ดบด	คล้ายเห็ดขอนขาวมากกว่าเห็ดหอม

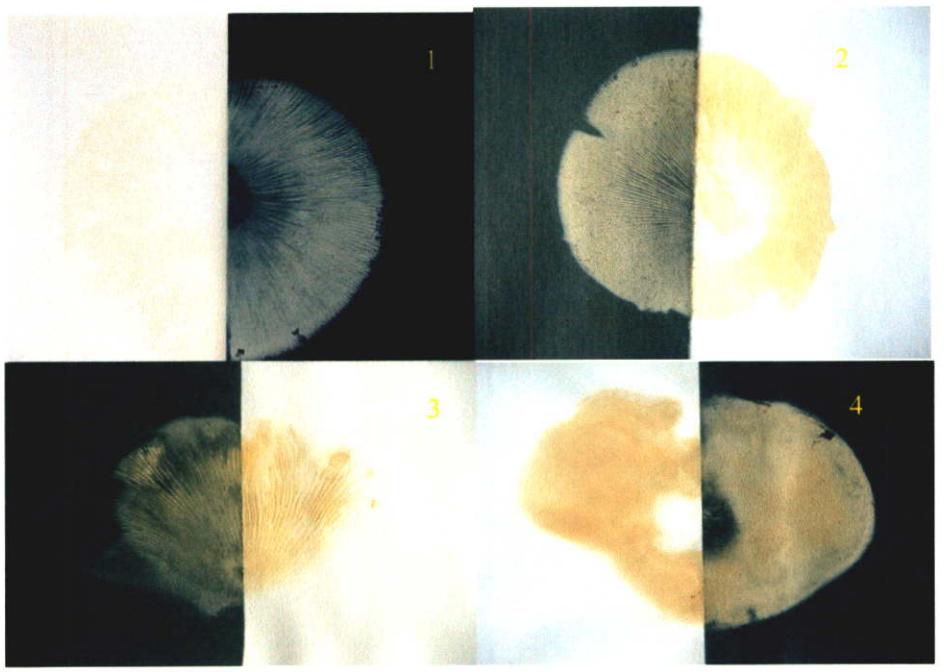


รูปที่ 4.2 ดอกเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์

กำหนดให้ : 1 = เห็ดหอม, 2 = เห็ดขอนขาว, 3 = เห็ดบด, 4 = MES6, 5 = MPS19, 6 = DES1, 7 = DES7, 8 = DES5

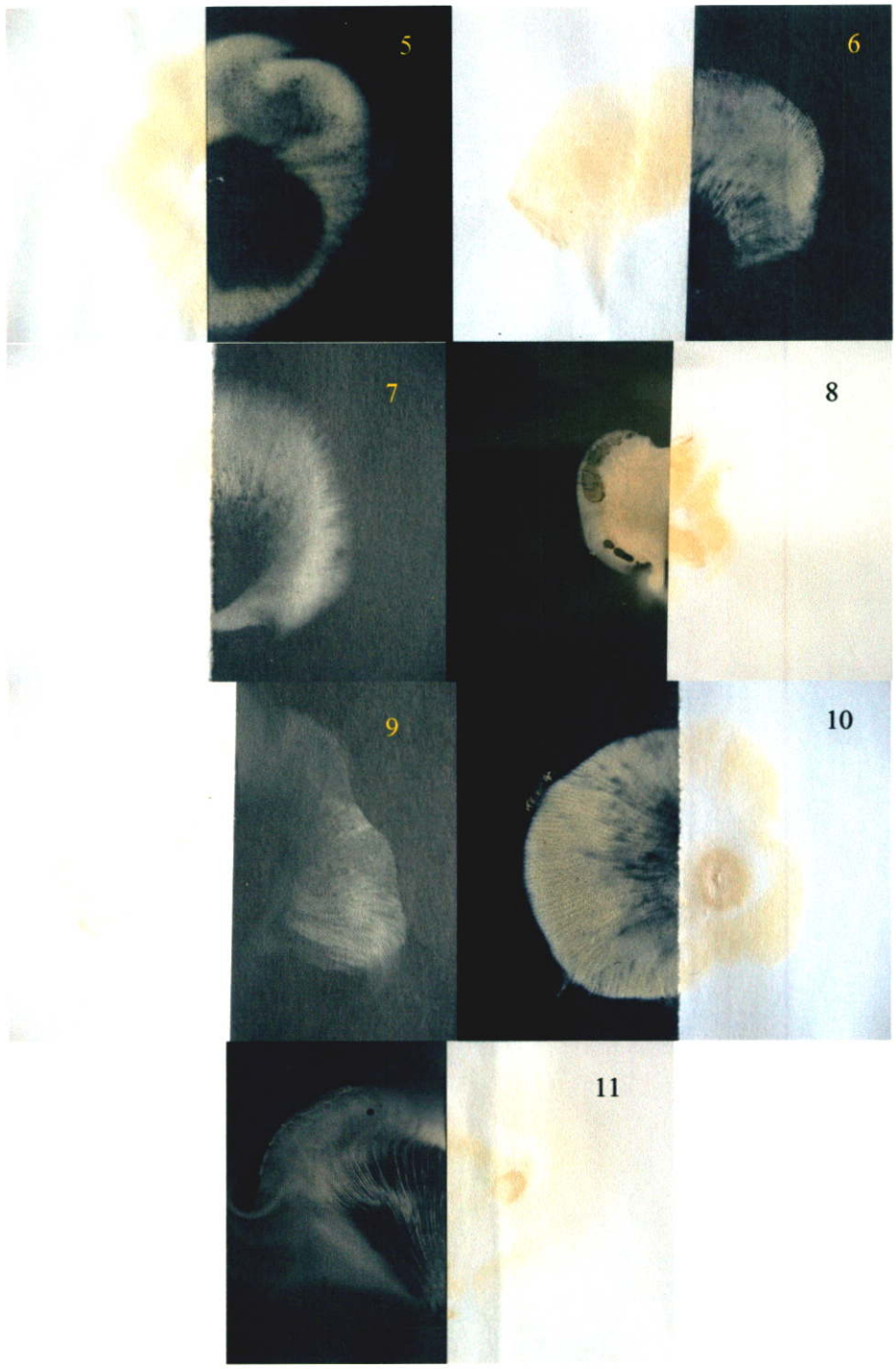
รูปที่ 4.2 (ต่อ)

กำหนดให้ : 9 = DPS8, 10 = DPS14, 11 = DPS12



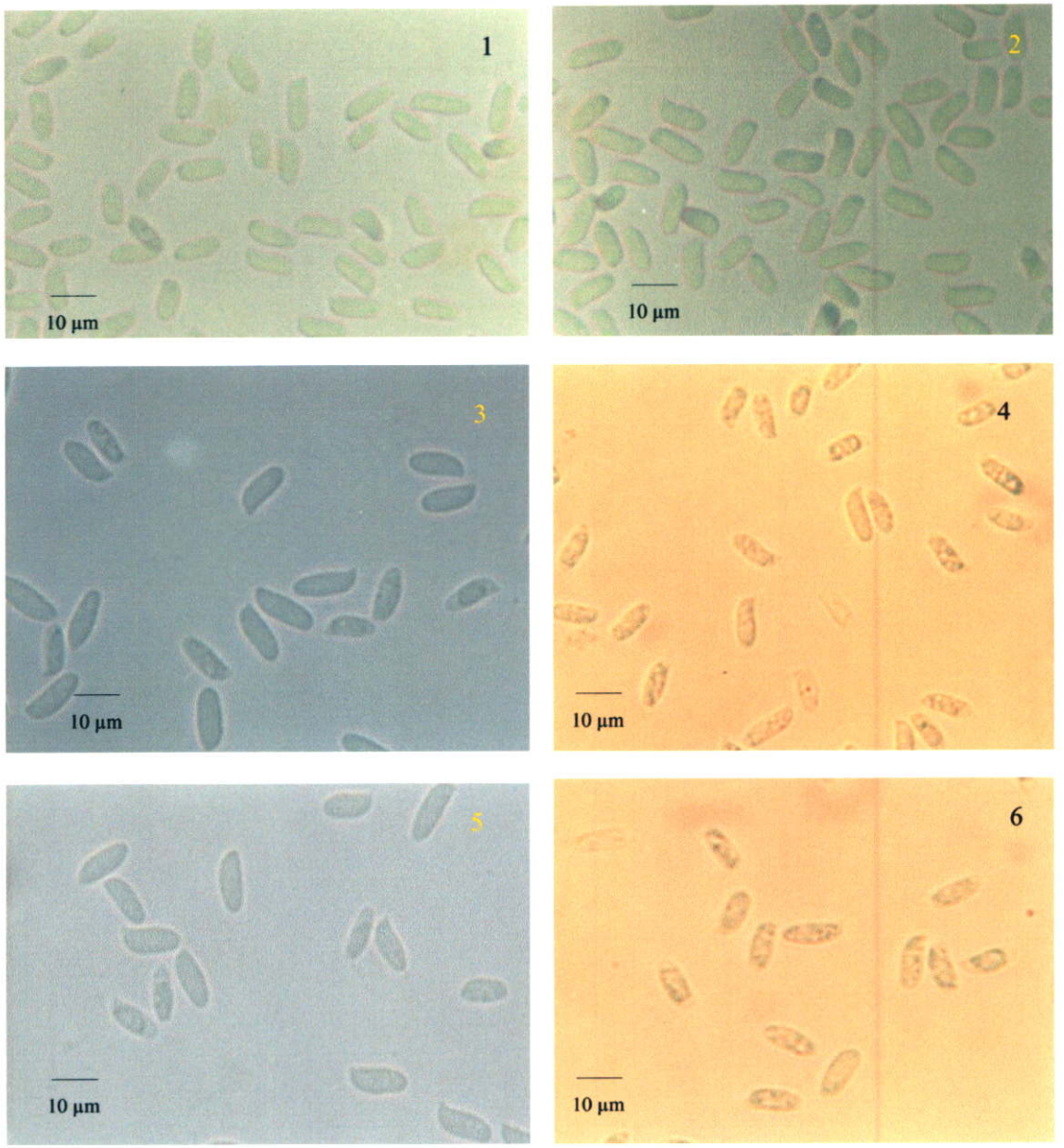
รูปที่ 4.3 สีสปอร์พิมพ์ดอกเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์

กำหนดให้ : 1 = เห็ดหอม, 2 = เห็ดขอนขาว, 3 = เห็ดบด, 4 = MES6



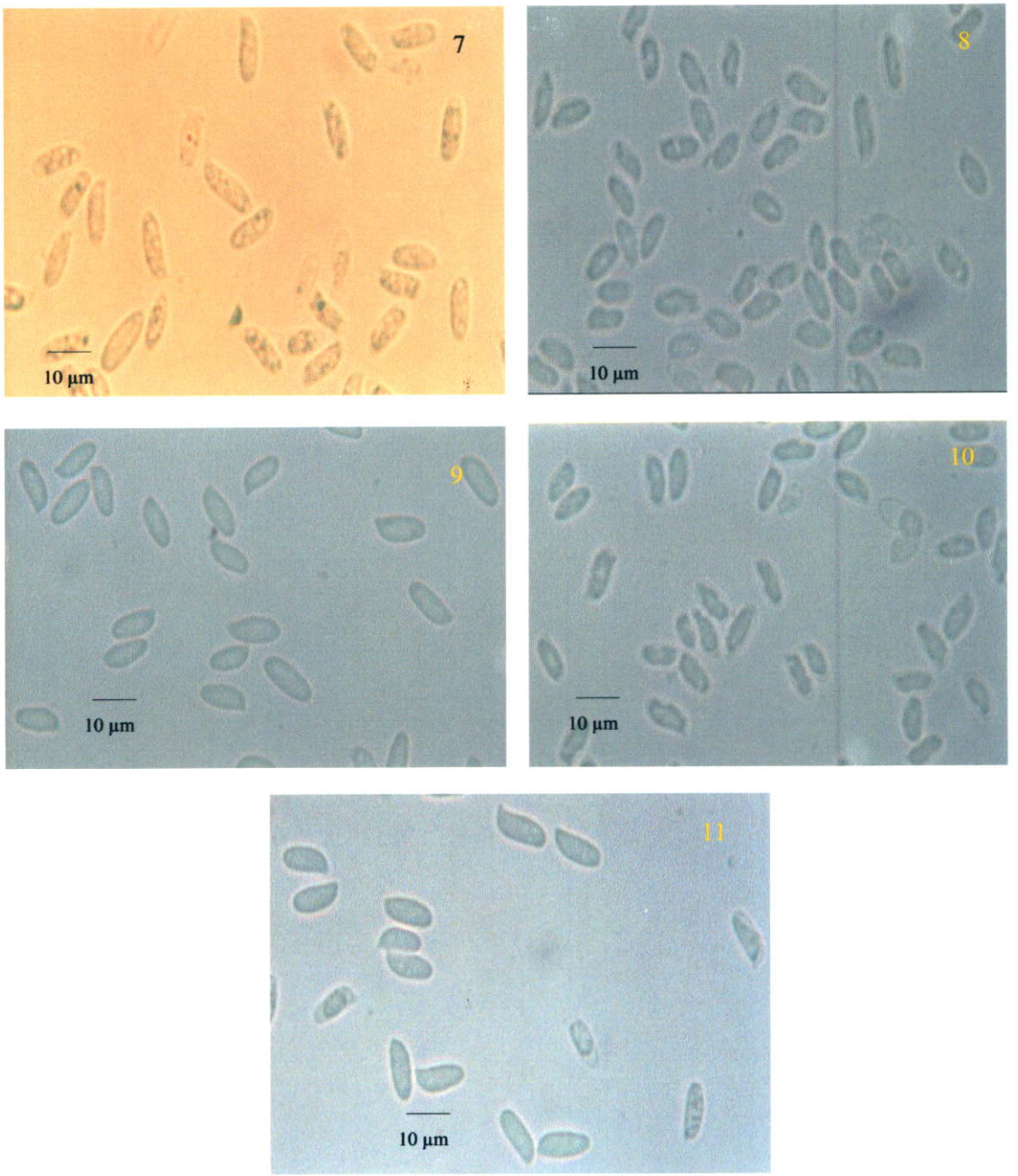
รูปที่ 4.3 (ต่อ)

กำหนดให้ : 5 = MPS19, 6 = DES1, 7 = DES7, 8 = DES5, 9 = DPS8, 10 = DPS14, 11 = DPS12



รูปที่ 4.4 ขนาดสปอร์ของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12

กำหนดให้ : 1 = เห็ดหอม, 2 = เห็ดขอนขาว, 3 = เห็ดบด, 4 = MES6, 5 = MPS19, 6 = DES1



รูปที่ 4.4 (ต่อ)

กำหนดให้ : 7 = DES7, 8 = DES5, 9 = DPS8, 10 = DPS14, 11 = DPS12

ตารางที่ 4.8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์สายพันธุ์ DES7, DES5 และ DPS8

สายพันธุ์ / ตรวจสัณฐาน	E	S	P	DES7	DES5	DPS8
จำนวนวันที่ออกดอกนับจากวันที่ลงก้อน	-	-	-	150	149	149
จำนวนดอก/ก้อนเพาะ	-	-	-	3	8	10
นน.สด/ก้อน (กรัม)	-	-	-	27.32	20.44	21.5
ขนาดของหมวกดอก (ซม.)	3.53×4.38	4.11×5.01	3.91×4.18	6.6×6.5	6×6	5.2×5
รูปร่างของหมวกดอก	Regular and convex	Central depress – unfundibuliform	unfundibuliform	Central depress กลางดอกบุ๋มเล็กน้อย เป็นกรวยแต่ไม่ลึกมาก	Central depress กลางดอกบุ๋มเล็กน้อย โคนก้านไม่ใหญ่นัก	Depress กลางดอกเป็นรูปกรวยเล็กน้อย
สีของหมวกดอก	น้ำตาลอ่อน	ครีมอมเทา	น้ำตาลอมเทา	ครีมอมน้ำตาล	น้ำตาล	ขาวครีม
พื้นผิวของหมวกดอก	มีขนสีขาวขึ้นเป็นเกล็ดแบบ Tessellated	ผิวขรุขระ มีขนสีเทาขึ้นเป็นเกล็ดแบบ Fibrous scales	ผิวขรุขระ มีขนสีเทาอมน้ำตาลขึ้นเป็นเกล็ดแบบ Fibrous scales	ผิวขรุขระ ขนสีน้ำตาลขึ้นเป็นชั้นชิดกัน เห็นเกล็ดแบบ Fibrous scales ชัดเจน	มีขนสีน้ำตาลเป็นเส้นเกล็ดเล็กๆแบบ Fibrous scales แต่ขึ้นไม่ถี่	ขรุขระ มีเกล็ดสีครีมอมน้ำตาลอ่อนแบบ Fibrous scales ขึ้นเกือบเต็มดอก
ขอบของหมวกดอก	ขอบดอกม้วนลง (inrolled)	ขอบดอกม้วนขึ้น(turned) ถึงม้วนลง (inrolled)	ขอบหมวกดอก ม้วนลงด้านใน (inrolled)	ขอบดอกม้วนแน่นคล้ายตะเข็บผ้า แต่ม้วนลงไม่มาก (inrolled)	ขอบหมวกดอกม้วนลงด้านในเล็กน้อย คล้ายตะเข็บผ้า (inrolled)	ตรงขอบดอกผิวหยักขึ้นเป็นชั้นคล้ายขอบจาน (turned)

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

สายพันธุ์ / ตรวจสัณฐาน	E	S	P	DES7	DES5	DPS8
ความหนาของหมวกดอกและผิวสัมผัส	เนื้อดอกหนา แน่น ยืดหยุ่นดี	เนื้อดอกบาง เหนียว ยืดหยุ่น	เนื้อดอกบาง เหนียวมาก ยืดหยุ่น	เนื้อดอกหนา เหนียว ยืดหยุ่นดี	เนื้อดอกหนา แข็ง เปราะหักง่าย ผิวขรุขระเล็กน้อย	ตรงกลางเนื้อดอกหนา จนถึงขอบมวกดอก
การเว้นช่องว่างภายในครีบดอก	-ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว ครีบใหญ่ชัดเจน โคนดอกต่อกับครีบเป็นวงรอยหยักคล้ายเห็ดหอม (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว ขนาดครีบใหญ่เรียงห่างกันพอสมควร (Intermediate)	ครีบเล็ก ไม่หนา เรียงตัวติดกันถี่ (Intermediate)
สีของครีบดอก	ครีม	เหลืองครีม	ครีมแก่อมน้ำตาล	ครีมอมน้ำตาล	ครีมเข้มถึงน้ำตาลอ่อน	ขาวครีม
จำนวนครีบดอก/1ซม.	24	23	19	15-17	17	27-29
ความกว้างของครีบดอก/1ซม.	0.05-0.1	0.05-0.1	0.05-0.15	0.05-0.1	0.5-1	0.05-0.1
การยึดติดของครีบดอกกับก้าน	ครีบติดกับก้านดอกมากกว่าแบบ adnated (Adnexed)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)	คล้ายเห็ดหอม ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่างใต้ครีบดอกมีรอยหยักเป็น 2 ชั้น (Decurrent)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)
สีของก้านดอก	ขาวครีม	ครีมอมเทา	น้ำตาลอมเทา	ครีมอมน้ำตาลอ่อน	ครีม มีสีน้ำตาลอมเหลืองขึ้นเป็นปุ่มเล็กๆ	ขาวครีม
ความยาวของก้านดอก (ซม.)	2.39	3.38	3.42	4.05	3.12	2.63
รูปแบบของก้านดอก	โคนก้านดอกโป่งเล็กน้อย (tapering from a boader base)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน ตรงโคนก้านโป่งเล็กน้อย (Equal)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

สายพันธุ์ / ตรวจสัณฐาน	E	S	P	DES7	DES5	DPS8
ผิวก้านดอก	recticulate	Random-snake-like	Longitudinally scaly	มีเส้นเป็นแนวขาวบางๆ และผิวขรุขระเป็นกลีดลีกๆ Recticulate	มีชั้นเล็กๆของเกล็ดสีน้ำตาลอมเหลือง Random-snake-like	Random-snake-like
ลักษณะภายในก้าน	ตัน ไม่กลวง ยืดหยุ่นดี	ตัน ไม่กลวง ยืดหยุ่นดี	ตัน ไม่กลวง ยืดหยุ่นดี	ตัน ไม่กลวง เนื้อเหนียว	ตัน ไม่กลวง เนื้อเหนียว	ตัน ไม่กลวง ยืดหยุ่น
การยึดติดของก้านดอกกับหมวกดอก	ก้านยึดตรงกลาง (Central)	ก้านยึดตรงกลาง-เยื้องด้านใดด้านหนึ่ง (Central- eccentric)	ก้านยึดตรงกลาง (Central)	ก้านยึดตรงกลาง-เยื้องด้านใดด้านหนึ่ง (Central- eccentric)	ก้านยึดตรงกลาง (Central)	ก้านยึดตรงกลาง (Central)
สีของเนื้อเยื่อ	ขาวครีม	ขาวครีม	ครีม	น้ำตาล	ครีมเข้ม	ขาวครีม
ขนาดของเส้นใยเฉลี่ย (µm)	1.95	1.08	1.27	1.5	1.56	1.36
สีสปอร์พิมพ์	ขาวครีม	เหลืองครีม	ครีมอมน้ำตาล	เหลืองครีม	ครีม	เหลืองครีม
รูปร่างของสปอร์	รูปกลมรี	รูปรี	รูปรี	รูปยาวรี	รูปยาวรี	รูปยาวรี
ขนาดของสปอร์เฉลี่ย (µm)	3.07×1.36	2.97×1.66	3.77×1.17	3.10×1.61	3.1×1.59	3.8×1.63
สรุป	-	-	-	คล้ายทั้งเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว	คล้ายเห็ดขอนขาวมากกว่าเห็ดหอม	คล้ายเห็ดขอนขาวมากกว่าเห็ดบด

ตารางที่ 4.9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์สายพันธุ์ DPS14 และ DPS12

สายพันธุ์ / ตรวจสัณฐาน	E	S	P	DPS14	DPS12
จำนวนวันที่ออกดอก นับจากวันที่ลงก้อน	-	-	-	149	158
จำนวนดอก/ก้อนเพาะ	-	-	-	8	7
นน.สด/ก้อน (กรัม)	-	-	-	29.39	35.84
ขนาดของหมวกดอก (ซม.)	3.53×4.38	4.11×5.01	3.91×4.18	4 ×4.2	6.2×6
รูปร่างของหมวกดอก	Regular and convex	Central depress – unfundibuliform	unfundibuliform	Unfundibuliform โคนก้านดอกเป็นกรวยเล็กน้อย กลางดอกนูนแต่ไม่ลึก	Unfundibuliform โคนก้านเป็นกรวย แต่ไม่ลึกมาก
สีของหมวกดอก	น้ำตาลอ่อน	ครีมอมเทา	น้ำตาลอมเทา	ขาวครีม	ขาวครีมอมน้ำตาล่อน
พื้นผิวของหมวกดอก	มีขนสีขาวขึ้นเป็นเกล็ดแบบ Tessellated	ผิวขรุขระ มีขนสีเทาขึ้นเป็นเกล็ดแบบ Fibrous scales	ผิวขรุขระ มีขนสีเทาอมน้ำตาลขึ้นเป็นเกล็ดแบบ Fibrous scales	ผิวขรุขระ มีเกล็ดเล็กๆ สีครีมอมเทาแบบ Fibrous scales	ขรุขระ มีขนสีน้ำตาลอ่อนขึ้นเป็นเกล็ดเล็กๆแบบ Fibrous scales
ขอบของหมวกดอก	ขอบดอกม้วนลง (inrolled)	ขอบดอกม้วนขึ้น(turned) ถึงม้วนลง (inrolled)	ขอบหมวกดอก ม้วนลงด้านใน (inrolled)	ขอบหมวกดอกบาง ม้วนพับลงด้านใน (inrolled)	ขอบหมวกดอกม้วนลงด้านใน (inrolled)
ความหนาของหมวกดอกและผิวสัมผัส	เนื้อดอกหนา แน่น ยืดหยุ่นดี	เนื้อดอกบาง เหนียว ยืดหยุ่น	เนื้อดอกบาง เหนียวมาก ยืดหยุ่น	เนื้อดอกบางแต่ไม่มาก เหนียวเล็กน้อย	เนื้อดอกหนาพอสมควร เหนียว ยืดหยุ่น

ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

สายพันธุ์ / ตรวจสัณฐาน	E	S	P	DPS14	DPS12
การเว้นช่องว่างภายในครีบดอก	-ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว แต่ครีบไม่เล็ก และเรียงไม่ถี่มาก (Intermediate)	ครีบสั้นสลับครีบยาว ครีบใหญ่ เรียงห่างกัน I(ntermediate)
สีของครีบดอก	ครีม	เหลืองครีม	ครีมแก่อมน้ำตาล	ครีมเข้มอมน้ำตาลอ่อน	เหลืองครีม-อมน้ำตาล
จำนวนครีบดอก/1ซม.	24	23	19	19-20	20-22
ความกว้างของครีบดอก/1ซม.	0.05-0.1	0.05-0.1	0.05-0.15	0.05-0.75	0.05-0.1
การยึดติดของครีบดอกกับก้าน	ครีบติดกับก้านดอกมากกว่าแบบ adnated (Adnexed)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)	ครีบติดกับก้านดอกจากด้านบนมาด้านล่าง (Decurrent)
สีของก้านดอก	ขาวครีม	ครีมอมเทา	น้ำตาลอมเทา	ครีม	ขาวครีม
ความยาวของก้านดอก (ซม.)	2.39	3.38	3.42	4.9	3.9
รูปแบบของก้านดอก	โคนก้านดอกโป่งเล็กน้อย (tapering from a boader base)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)	ยาวเท่ากันเกือบตลอดก้าน (Equal)	ยาวเท่ากันตลอดก้าน (Equal)

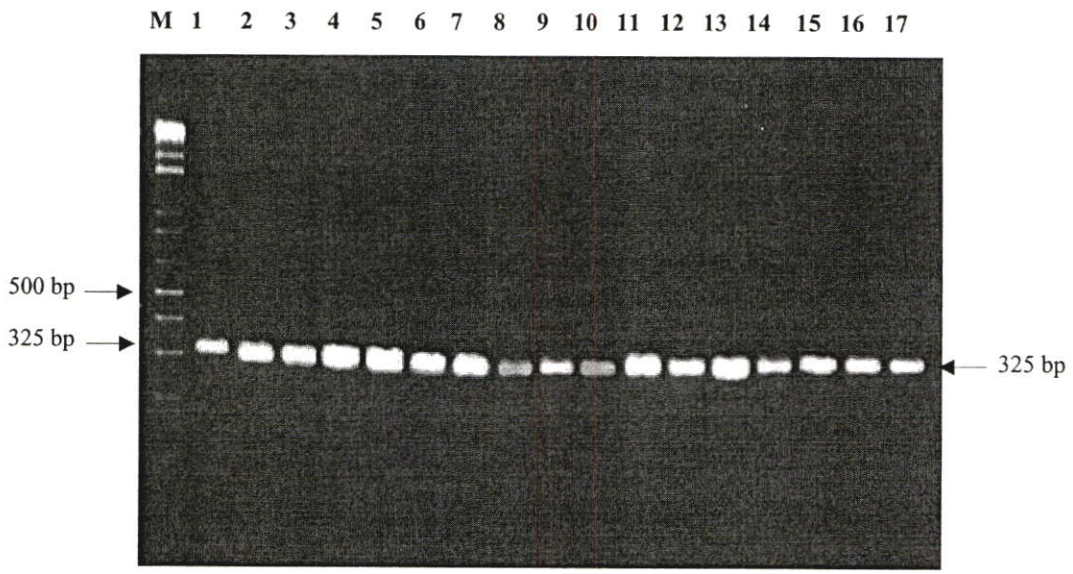
ตารางที่ 4.9 (ต่อ)

สายพันธุ์ / ตรวจสัณฐาน	E	S	P	DPS14	DPS12
ผิวก้านดอก	recticulate	Random-snake-like	Longitudinally scaly	กลางก้านดอก-โคนผิวมีเกล็ดเล็กๆ สีครีม Random-snake-like	โคนก้านเป็นเส้นตามยาวสีเทาอ่อนๆเป็นลักษณะ Longitudinaly scaly กลางก้านเป็นเกล็ดแบบ Random-snake-like
ลักษณะภายในก้าน	ตัน ไม่กลวง ยืดหยุ่นดี	ตัน ไม่กลวง ยืดหยุ่นดี	ตัน ไม่กลวง ยืดหยุ่นดี	ตัน เนื้อเหนียว	ตัน เนื้อเหนียว ยืดหยุ่น
การยึดติดของก้านดอกกับหมวกดอก	ก้านยึดตรงกลาง (Central)	ก้านยึดตรงกลาง-เยื้องด้านใดด้านหนึ่ง (Central- eccentric)	ก้านยึดตรงกลาง (Central)	ก้านยึดตรงกลาง (Central)	ก้านยึดตรงกลาง-เยื้องด้านใดด้านหนึ่งเล็กน้อย (Central- eccentric)
สีของเนื้อเยื่อ	ขาวครีม	ขาวครีม	ครีม	ครีม	เหลืองครีม
ขนาดของเส้นใยเฉลี่ย (µm)	1.95	1.08	1.27	1.38	1.48
สีสปอร์พิมพ์	ขาวครีม	เหลืองครีม	ครีมอมน้ำตาล	ครีมเข้มอมเหลือง	เหลืองครีมอมน้ำตาล
รูปร่างของสปอร์	รูปกลมรี	รูปรี	รูปรี	รูปยาวรี	รูปยาวรี
ขนาดของสปอร์เฉลี่ย (µm)	3.07×1.36	2.97×1.66	3.77×1.17	3.81×1.4	3.75×1.77
สรุป	-	-	-	คล้ายเห็ดขอนขาวมากกว่าเห็ดบด	คล้ายเห็ดขอนขาวและเห็ดบด

4.4 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

4.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2

เมื่อนำดีเอ็นเอของฟังไจแซนท์ที่มีลักษณะของเห็ดหอม เห็ดขอนขาวและเห็ดบด มาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ระหว่างชนิด 18S rDNA กับ 25S rDNA ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 แล้วนำมาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสร้อยละ 2 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดทั้งหมดที่มีขนาด 325 คู่เบสเช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.5)



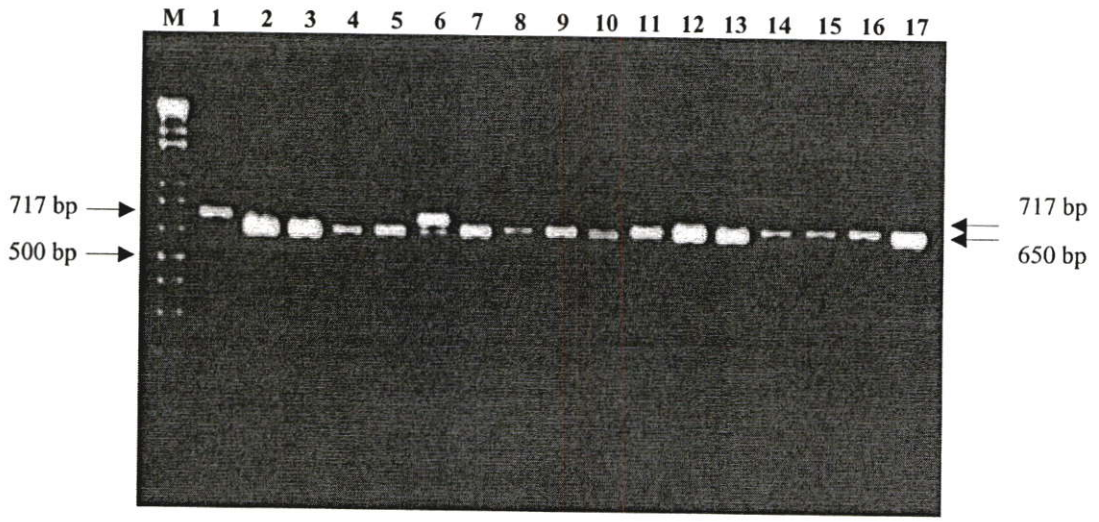
รูปที่ 4.5 อิเล็คโทรโฟรีแกรมของดีเอ็นเอเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบด และฟังไจแซนท์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 บนเจลอะกาโรสร้อยละ 2

กำหนดให้ M = marker, 1 = E22, 2 = MES6, 3 = S11, 4 = P7, 5 = MPS19
6 = E, 7 = DES1, 8 = S1, 9 = DES7, 10 = S3, 11 = DES5, 12 = S11
13 = P, 14 = DPS8, 15 = DPS14, 16 = DPS12, 17 = S11

4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4

เมื่อนำดีเอ็นเอของฟังไจแซนท์ที่มีลักษณะของสายพันธุ์ที่มีลักษณะของเห็ดหอม เห็ดขอนขาวและเห็ดบด มาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ระหว่างชนิด 18S rDNA กับ 25S rDNA ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 แล้วนำมาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสร้อยละ 2 พบว่าสามารถเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอฟิวแซนท์ทุกสายพันธุ์ โดยเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 717 คู่เบส และเห็ดหอมสายพันธุ์ E พบชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นที่มีขนาดประมาณ 650 และ 717 คู่เบส ส่วนเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1, S3, S11 และฟิวแซนท์ DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14, DPS12 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 650 คู่เบส ดังนั้นคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ที่แตกต่างกันได้ 2 ชิ้นขนาด 650 และ 717 คู่เบส เห็ดหอมสายพันธุ์ E22 มีขนาด 717 คู่เบส เห็ดบดสายพันธุ์ P, P7 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1, S3, S11 พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบส ในขณะที่ฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES8, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดเห็ดหอมสายพันธุ์ E เห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1, S3, S11 และเห็ดบดสายพันธุ์ P, P7 (รูปที่ 4.6) ดังนั้นจากการที่เห็ดหอมสายพันธุ์ E ตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดแตกต่างกัน 2 ชิ้น ขนาด 717 คู่เบสเท่ากับดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 และดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบสเท่ากับดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P, P7 และฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 ทำให้ทราบว่าเห็ดหอมสายพันธุ์ E มี 2 นิวเคลียสที่ต่างชนิดกันมารวมกันภายในเซลล์เป็นแบบเฮทเทอโรคาริออน (heterokaryon) อีกทั้ง *Lentinula edodes*, *Lentinus squarrosulus* และ *L. polychrous* เคยจัดอันดับให้อยู่ในสกุลเดียวกัน (*Lentinus*) มาก่อน จึงอาจมีความเกี่ยวข้องกันทางพันธุกรรมระหว่างเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์

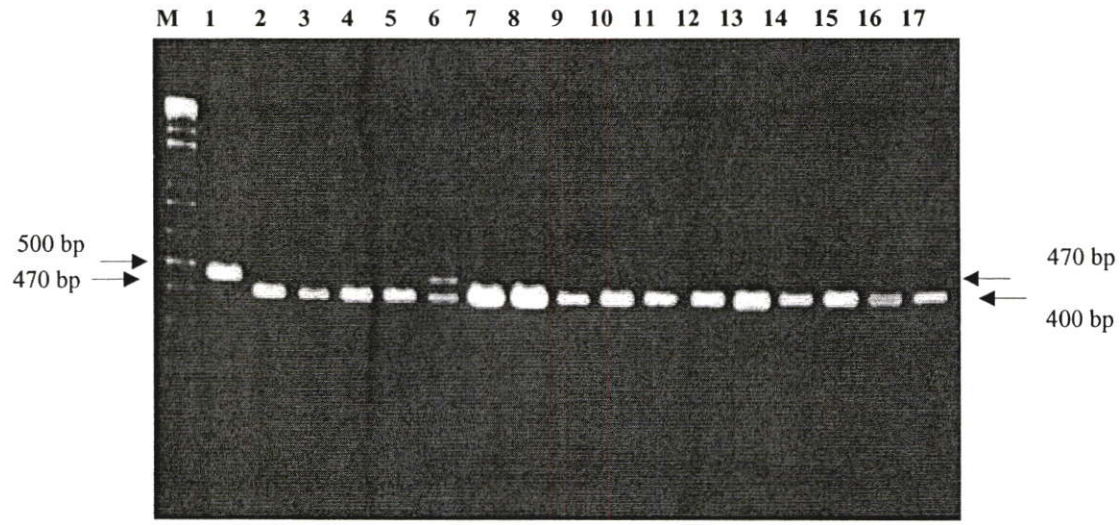


รูปที่ 4.6 อิเล็คโทรโฟรีแกรมของดีเอ็นเอเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบด และฟิวแซนท์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 บนเจลอะกาโรสร้อยละ 2

กำหนดให้ M = marker, 1 = E22, 2 = MES6, 3 = S11, 4 = P7, 5 = MPS19, 6 = E, 7 = DES1, 8 = S1, 9 = DES7, 10 = S3, 11 = DES5, 12 = S11, 13 = P, 14 = DPS8, 15 = DPS14, 16 = DPS12, 17 = S11

4.4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4

เมื่อนำดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ ที่มีลักษณะของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดบด มาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ระหว่างชนิด 18S rDNA กับ 25S rDNA ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 แล้วนำมาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสร้อยละ 2 (รูปที่ 4.7) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของเห็ดทุกสายพันธุ์ โดยเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 470 คู่เบส และเห็ดหอมสายพันธุ์ E แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอได้ 2 ชิ้นที่มีขนาดประมาณ 400 และ 470 คู่เบส ส่วนเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1, S3, S11 และฟิวแซนท์ DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14, DPS12 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 400 คู่เบส ดังนั้นคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ที่แตกต่างกันได้ 2 ชิ้นขนาด 400 และ 470 คู่เบส เห็ดหอมสายพันธุ์ E22 พบขนาด 470 คู่เบส เห็ดบดสายพันธุ์ P, P7 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1, S3, S11 พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ในขณะที่ฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES8, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดเห็ดหอมสายพันธุ์ E เห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1, S3, S11 และเห็ดบดสายพันธุ์ P, P7 ดังนั้นจากการที่เห็ดหอมสายพันธุ์ E ตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดแตกต่างกัน 2 ชิ้น คือขนาด 470 คู่เบสเท่ากับดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 และดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสเท่ากับดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P, P7 และฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 ทำให้ทราบว่าเห็ดหอมสายพันธุ์ E มี 2 นิวเคลียสที่ต่างชนิดกันมารวมกันภายในเซลล์เป็นแบบเฮทเทอโรคาริออน (heterokaryon) อีกทั้ง *Lentinula edodes*, *Lentinus squarrosulus* และ *L. polychrous* เคยจัดอันดับให้อยู่ในสกุลเดียวกัน (*Lentinus*) มาก่อน จึงอาจมีความเกี่ยวข้องกันทางพันธุกรรมระหว่างเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์



รูปที่ 4.7 อิเล็คโทรโฟรีแกรมของดีเอ็นเอเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบด และฟิวแซนท์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 บนเจลอะกาโรสร้อยละ 2

กำหนดให้ M = marker, 1 = E22, 2 = MES6, 3 = S11, 4 = P7, 5 = MPS19, 6 = E, 7 = DES1, 8 = S1, 9 = DES7, 10 = S3, 11 = DES5, 12 = S11, 13 = P, 14 = DPS8, 15 = DPS14, 16 = DPS12, 17 = S11

เนื่องจากดีเอ็นเอของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์ที่เพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์มีขนาดใกล้เคียงกัน ทำให้การตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมไม่สามารถระบุได้ชัดเจน จึงได้ตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอทุกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR/RFLP เพื่อความชัดเจนยิ่งขึ้น

4.4.4 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดหอม เห็ดขอนขาวและเห็ดบดโดยเทคนิค PCR/RFLP

4.4.4.1 การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

จากการนำผลผลิตพีซีอาร์ของสายพันธุ์ MES6 ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 มาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR/RFLP จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด ได้แก่ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI, *Eco*RI, *Hin*dIII และ *Hae*III แล้วตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลร้อยละ 2 เพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอฟิวแซนท์กับเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว พบว่าเอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ 2 ชิ้นที่มีขนาดประมาณ 417 คู่เบส และ 385 คู่เบส ในขณะที่ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของ MES6 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบสได้ เอนไซม์ *Dde*I ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ที่มีขนาดประมาณ 830 คู่เบสได้ แต่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์ MES6 และเห็ดขอนขาวได้ 3 ชิ้น ที่มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 783, 500 และ 300 คู่เบสตามลำดับ เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัด

ชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ 2 ชิ้นที่มีขนาดประมาณ 517 และ 267 คู่เบส แต่ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของ MES6 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ที่มีขนาดประมาณ 350 คู่เบสได้ เอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ 2 ชิ้นที่มีขนาดประมาณ 433 และ 366 คู่เบส และตัดชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์ MES6 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 2 ชิ้นที่มีขนาดประมาณ 400 และ 360 คู่เบส เอนไซม์ *Hin*dIII สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ 3 ชิ้นที่มีขนาดประมาณ 500, 360 และ 300 คู่เบส แต่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ 6 สายพันธุ์และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 2 ชิ้นที่มีขนาดประมาณ 717 และ 400 คู่เบส และเอนไซม์ *Hae*III ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ที่มีขนาดประมาณ 717 คู่เบส และสายพันธุ์ MES6 กับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 433 คู่เบสได้

จากผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอสายพันธุ์ MES6 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 6 ชนิด ดังกล่าวด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ให้ผลการตรวจสอบการแยกขนาดดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์ไม่ชัดเจนนัก และไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอได้ครบทุกสายพันธุ์ จึงได้ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอฟิวแซนท์สายพันธุ์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 ด้วยเทคนิค PCR/RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด ได้แก่ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III แล้วตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

4.4.4.2 การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอบนเจลโพลีอะคริลาไมด์

<u>PCR/RFLP ของ rDNA จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2</u>

จากการนำฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์มาตรวจสอบด้วย PCR/RFLP โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด (รูปที่ 4.8) พบว่าเอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Eco*RI, *Hin*dIII และ *Hae*II ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ที่ตรงกับฟิวแซนท์ MES6 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ส่วนเอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 240/85, 250/75 และ 275/50 คู่เบส และสามารถตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ MES6 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 4 ชิ้นคือ 245/80, 255/70, 275/50 และ 290/35 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 250/75 และ 300/25 คู่เบส

เอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Eco*RI, *Hin*dIII และ *Hae*II ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P7 ที่ตรงกับฟิวแซนท์ MPS19 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ (รูปที่ 4.9) ส่วนเอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของ P7 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 265/60, 275/50, 290/35 และ 300/25 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอของ MPS19 ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/240, 140/185, 180/145, 250/75, 275/50 และ 300/25 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอของ S11 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 250/75, 275/50 และ 300/25 คู่เบส และเอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอของ P7 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/240, 95/230 และ 120/205 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอของ MPS19 และ S11 ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/240, 100/225, 120/205, 150/175, 200/125 และ 300/25 คู่เบส แต่ในภาพนี้เห็นได้เฉพาะชิ้นดีเอ็นเอขนาด 85 คู่เบส เนื่องจากใช้เวลาในการทำ

อิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ MPS19 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 เท่านั้น

ฟิวแซนท์ DES1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ฟิวแซนท์ DES1 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ (รูปที่ 4.10) ส่วนเอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 10 ชิ้นที่ตำแหน่ง 45/280, 200/125, 225/100, 230/95, 240/85, 260/65, 275/50, 285/40, 290/35 และ 300/25 คู่เบส แต่ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES1 เห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ เอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ DES1 และ S1 ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 185/140, 200/125, 235/90, 250/75, 260/65, 265/60, 290/35 และ 300/25 คู่เบส แต่ไม่ตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P7 เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P7ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/240 และ 120/205 คู่เบส แต่ในภาพนี้เห็นได้เฉพาะชิ้นดีเอ็นเอขนาด 85 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI, *Hin*dIII และ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES1 เหมือนกับเห็ดขอนขาว สายพันธุ์ S1 เท่านั้น

ฟิวแซนท์ DES7 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Eco*RI, *Hin*dIII และ *Hae*II ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ฟิวแซนท์ DES7 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 (รูปที่ 4.11) ส่วนเอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 200/125, 250/75, 275/50 และ 300/25 คู่เบส สามารถตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES7 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 225/100, 250/75, 275/50 และ 300/25 คู่เบส และเอนไซม์ *Hae*III ตรวจพบดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ที่ตำแหน่ง 225/100 คู่เบส สามารถตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์สายพันธุ์ DES7 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/240, 115/210, 150/175, 180/145 และ 200/125 คู่เบส ตัดเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/240, 90/235, 115/210, 150/175, 180/145 และ 200/125 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI และ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES7 เหมือนกับเห็ดขอนขาว สายพันธุ์ S3 เท่านั้น

ฟิวแซนท์ DES5 เมื่อตัดเอนไซม์ *Dde*I และ *Hae*II ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ที่ตรงกับฟิวแซนท์ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ (รูปที่ 4.12) โดยเอนไซม์ *Hin*fI ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอ DES5 ได้ แต่ตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 300/25 และ 315/10 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 25/300 และ 300/25 คู่เบส แต่เนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนานดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 25 คู่เบสจึงตกเจลไป และเอนไซม์ *Sua*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 10 ชิ้นที่ตำแหน่ง

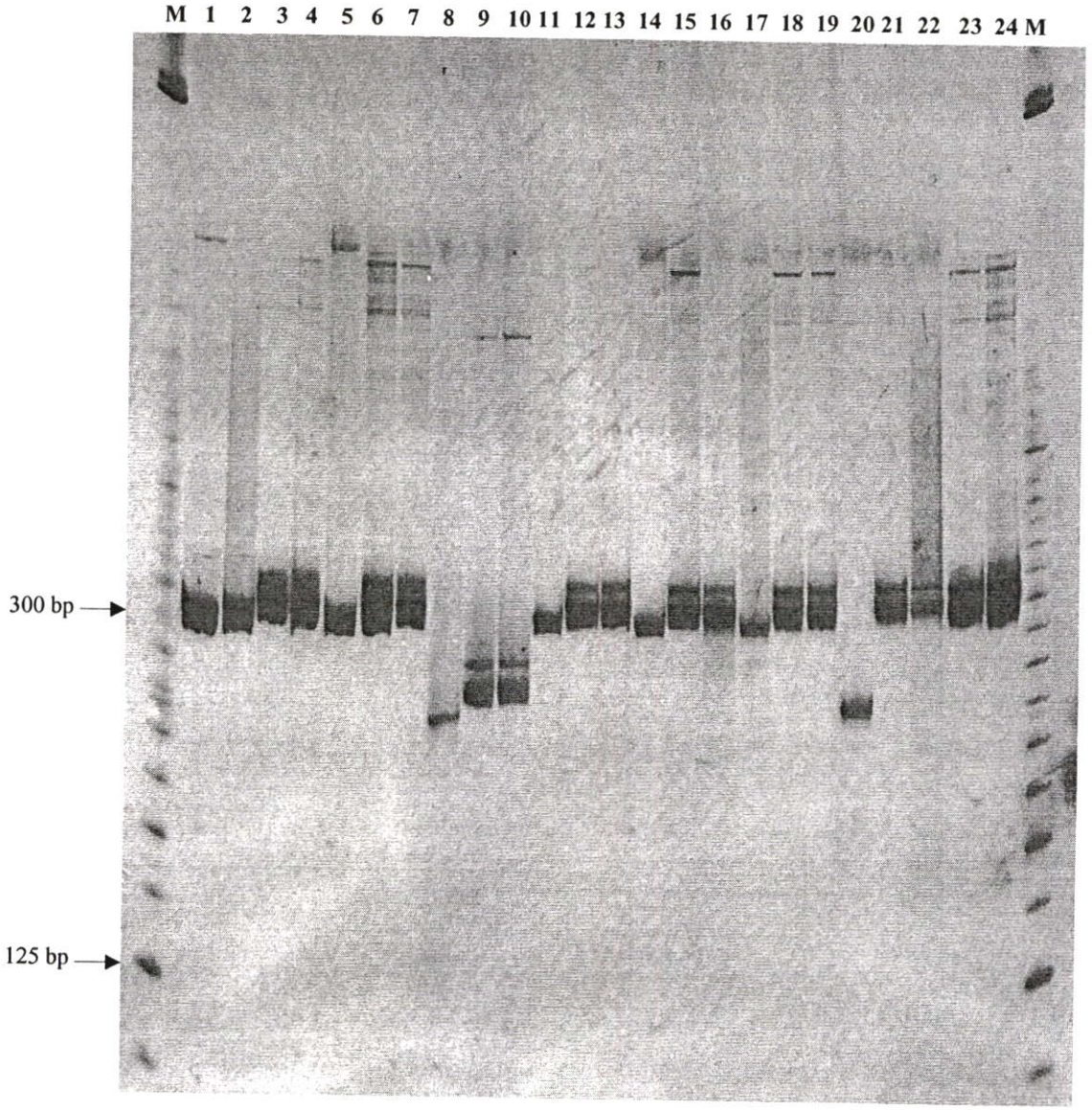
85/240, 125/200, 185/140, 215/110, 225/100, 230/95, 250/75, 260/65, 275/50 และ 300/25 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 250/75, 260/65, 275/50, 280/45, 290/35 และ 300/25 คู่เบส เอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 275/50, 280/45 และ 300/25 คู่เบส เอนไซม์ *Hin*dIII สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 200/125, 235/90, 275/50, 285/40 และ 300/25 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III ตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 10 ชิ้นที่ตำแหน่ง 110/215, 135/190, 140/185, 165/160, 175/150, 225/100, 250/75, 275/50, 285/40 และ 300/25 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES5 ได้ 9 ชิ้นที่ตำแหน่ง 75/225, 85/240, 90/235, 110/140, 135/190, 185/215, 175/150, 250/75 และ 300/25 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 110/215, 135/190, 140/185, 175/150, 250/75, 265/60 และ 300/25 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 เท่านั้น

ฟิวแซนท์ DPS8 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ที่ตรงกับฟิวแซนท์ DPS8 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ (รูปที่ 4.13) แต่เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 290/35 และ 310/15 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS8 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 295/30 และ 320/5 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอของเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 2 ชิ้นขนาด 280/45 และ 300/25 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 110/215, 180/145 และ 185/140 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS8 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 110/215 และ 185/140 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 16 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/225, 115/210, 125/200, 130/195, 140/185, 175/150, 185/140, 200/125, 215/110, 225/100, 230/95, 250/75, 275/50, 280/45, 300/25 และ 320/5 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DPS8 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/225, 115/210, 185/140 และ 220/105 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/225, 160/165, 180/145 และ 190/135 คู่เบส เอนไซม์ *Eco*RI ตัดเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 300/25 และ 315/10 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*II ตัดเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 225/100 และ 275/50 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 275/50 และ 290/35 คู่เบส และเอนไซม์ *Hae*III ตัดเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 245/100 และ 275/50 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS8 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 250/75, 285/40, 300/25 และ 315/10 ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 300/25 และ 320/5 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI และ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ

PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS8 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 เท่านั้น

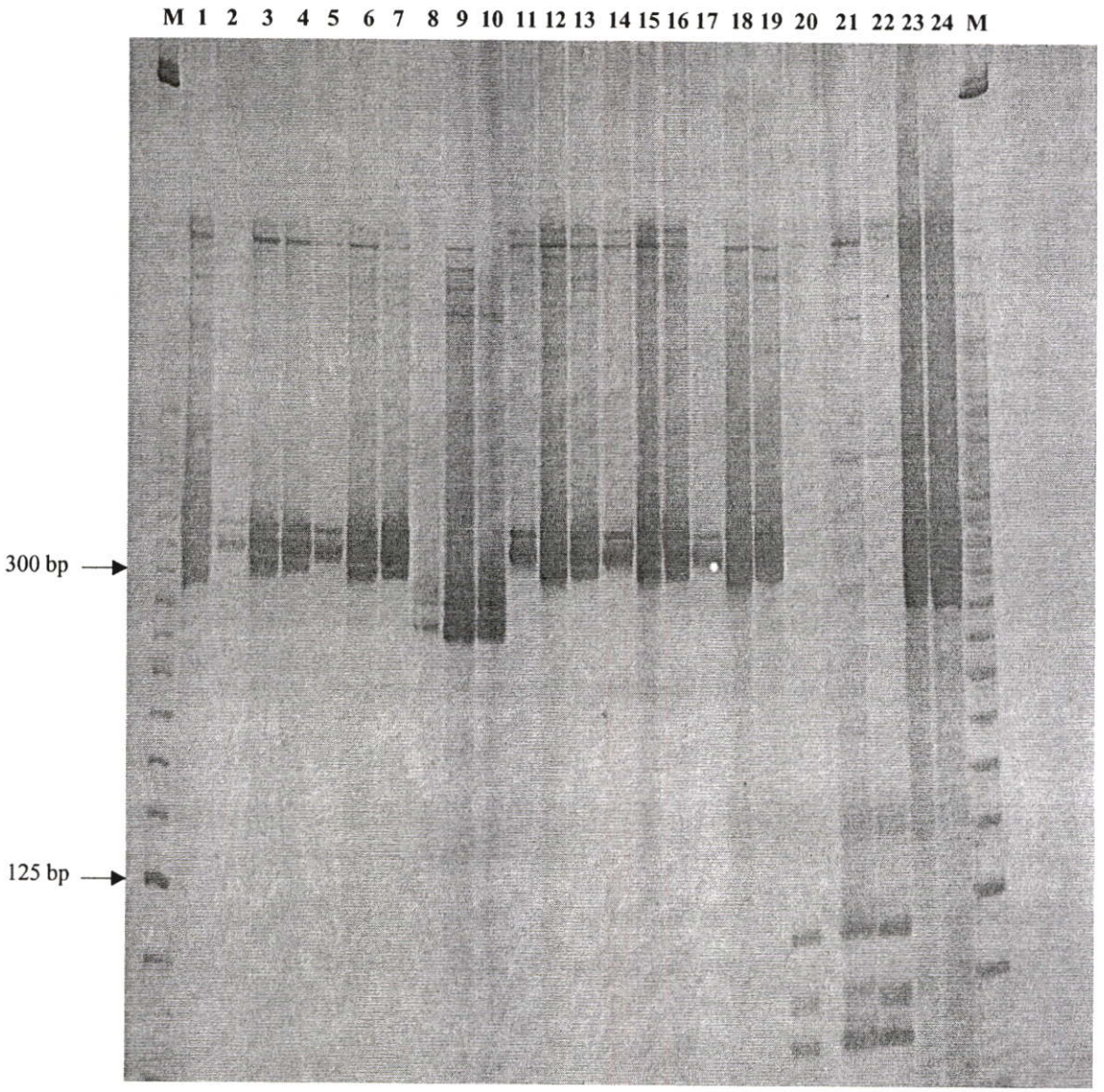
เอนไซม์ *Dde*I, *Eco*RI และ *Hin*dIII ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ที่ตรงกับฟิวแซนท์ DPS14 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ (รูปที่ 4.14) แต่เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 265/60, 290/35 และ 315/10 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 9 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/225, 135/190, 170/155, 190/135, 200/125, 215/110, 235/90, 265/60 และ 275/50 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DPS14 ได้ 10 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/225, 140/185, 160/165, 185/140, 220/105, 230/95, 255/70, 285/40, 300/25 และ 315/10 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 13 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/225, 140/185, 175/150, 180/145, 215/110, 220/105, 230/95, 245/80, 255/70, 275/50, 285/40, 300/25 และ 315/10 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*II สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 255/70, 275/50, 290/35 และ 300/25 คู่เบส และเอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 11 ชิ้นที่ตำแหน่ง 80/245, 85/240, 115/210, 150/175, 155/170, 175/150, 200/125, 225/100, 250/75, 275/50 และ 310/15 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS14 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 80/245, 115/210, 150/175 และ 225/100 คู่เบส เห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 80/245, 85/240, 115/210, 150/175 และ 310/15 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI และ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS14 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 เท่านั้น

ฟิวแซนท์ DPS12 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Dde*I, *Eco*RI, *Hin*dIII และ *Hae*II ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ที่ตรงกับฟิวแซนท์ DPS12 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ (รูปที่ 4.15) ส่วนเอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 275/50, 300/25 และ 315/10 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 250/75, 275/50, 285/40 และ 300/25 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DPS12 และ S11 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 275/40, 285/50 และ 300/25 คู่เบส และเอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 280/45, 290/35 และ 315/10 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DPS12 และ S11 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 120/205, 150/175, 155/170, 265/60 และ 280/45 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS12 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 เท่านั้น



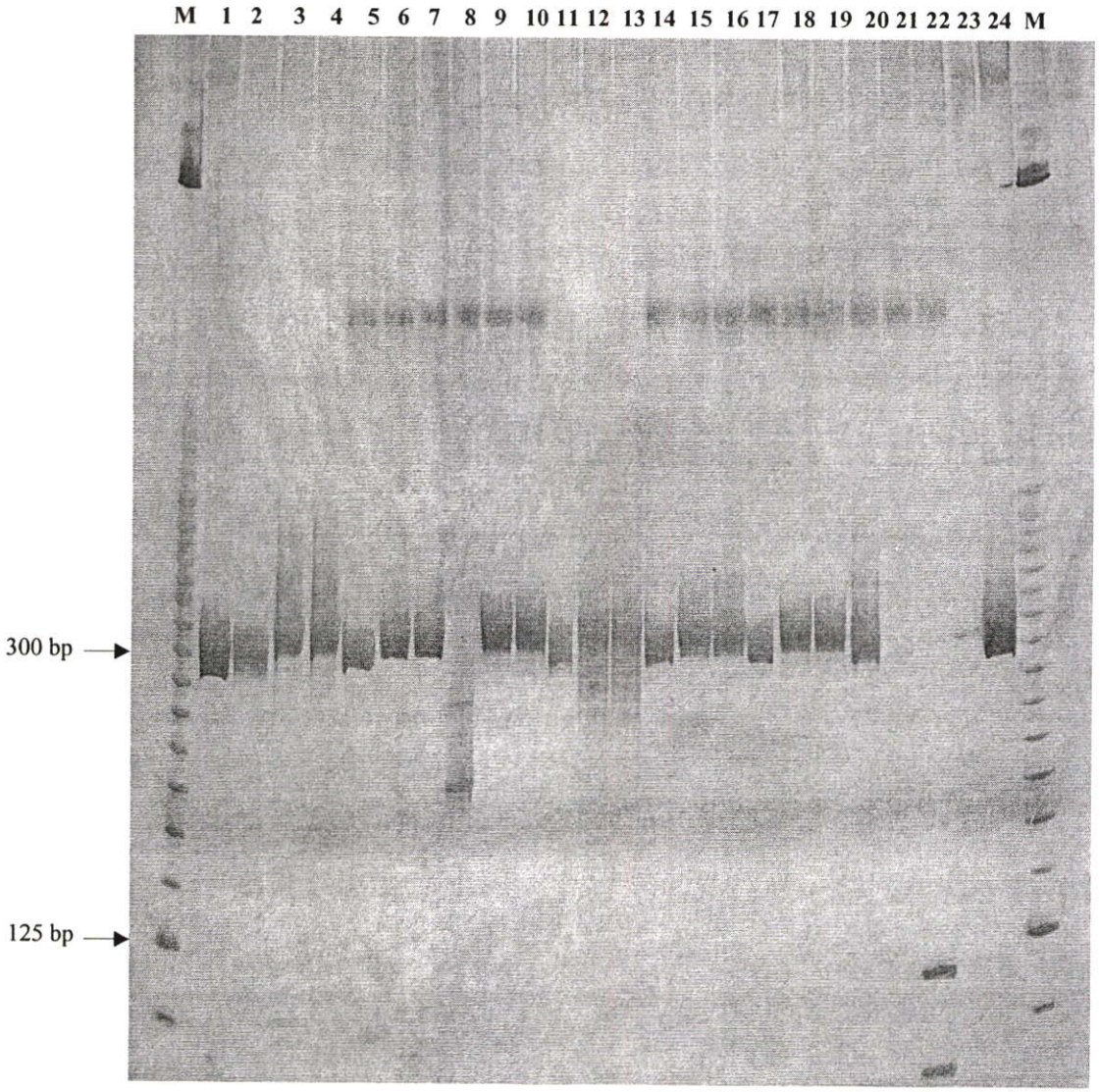
รูปที่ 4.8 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ E22, MES6 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E22 (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = MES6 (ตัวควบคุม), 24 = S11 (ตัวควบคุม)



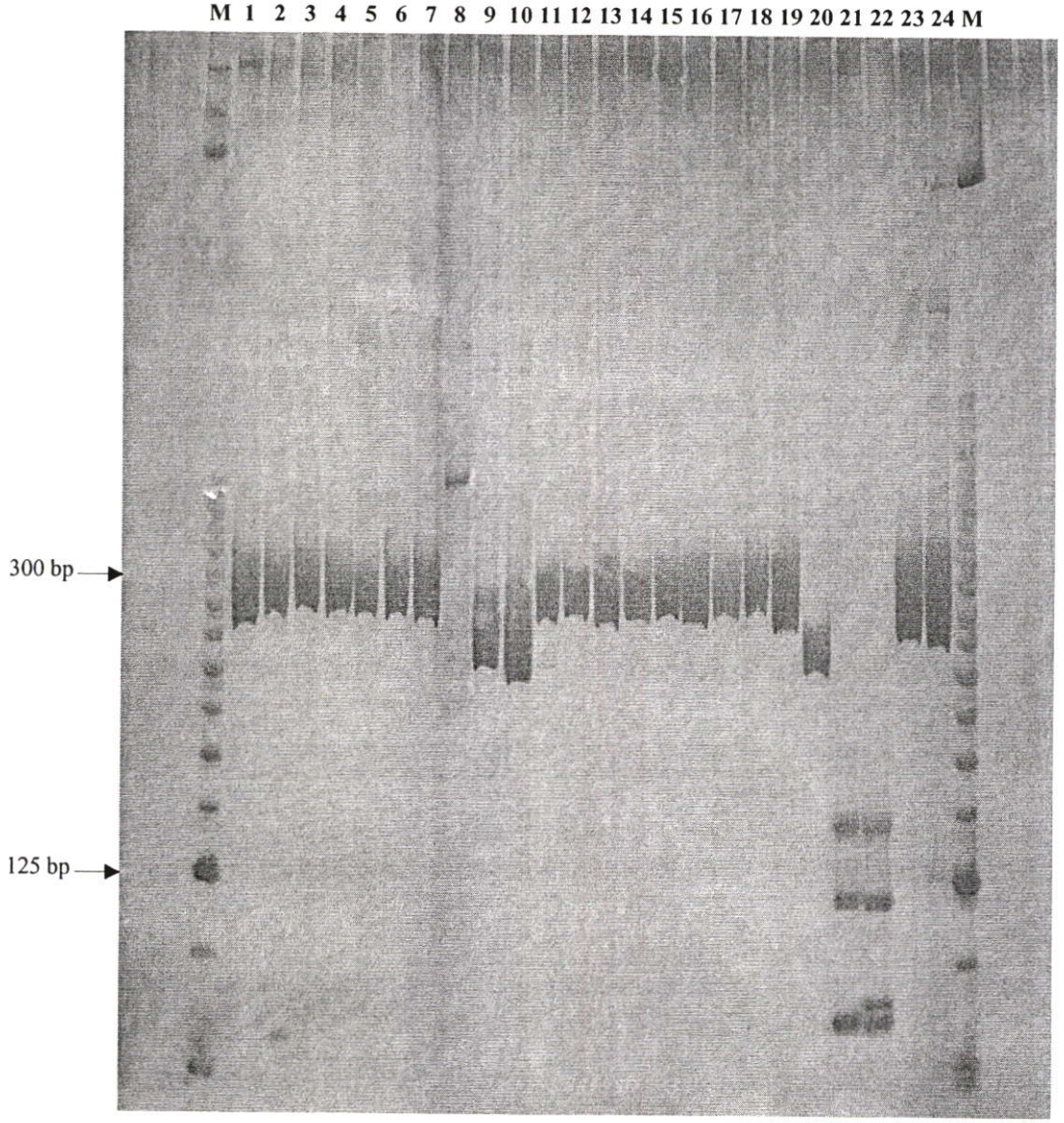
รูปที่ 4.9 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ P7, MPS19 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P7 (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = MPS19 (ตัวควบคุม), 24 = S11 (ตัวควบคุม)



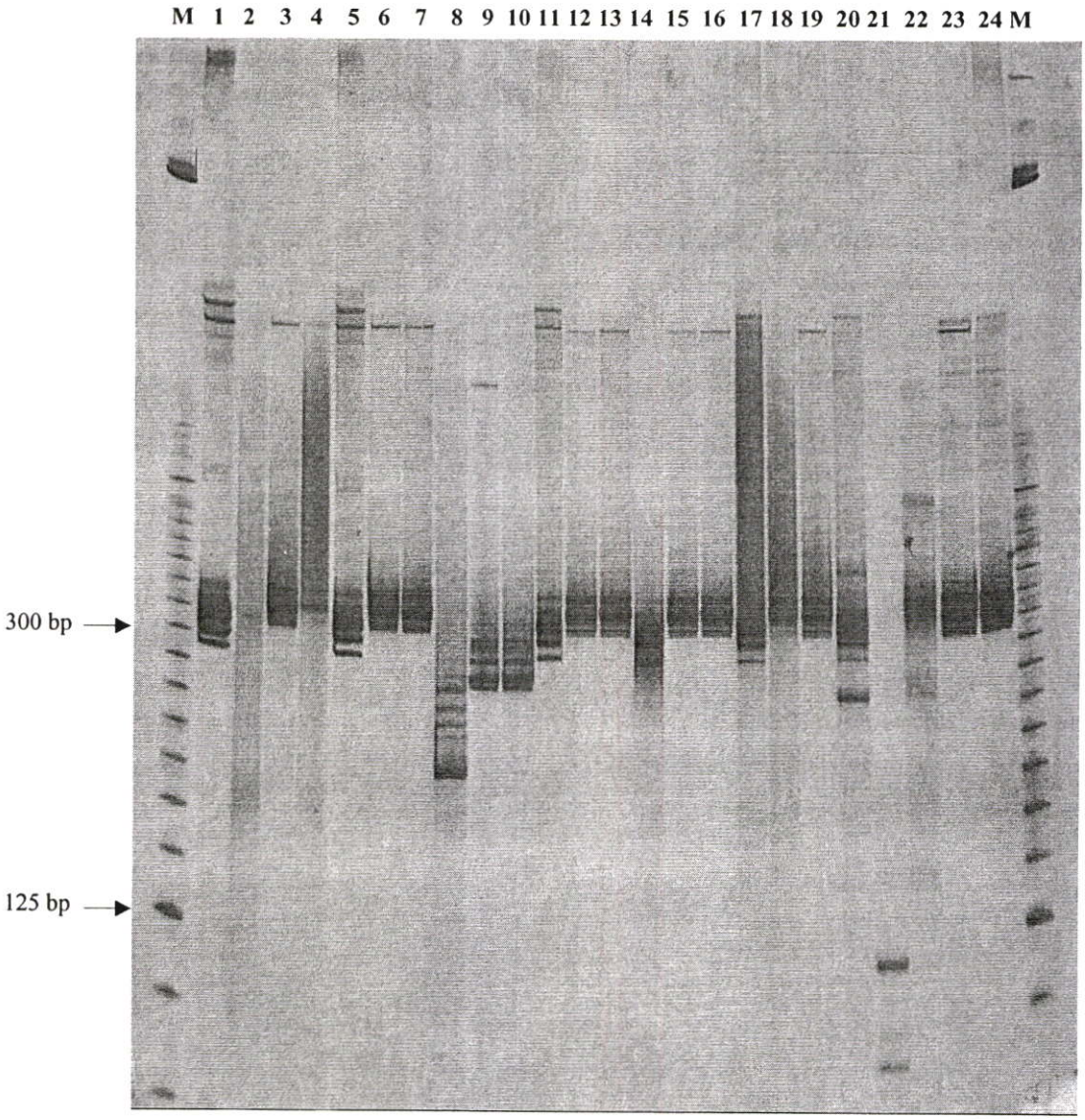
รูปที่ 4.10 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ E, DES1 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DES1 (ตัวควบคุม), 24 = S1 (ตัวควบคุม)



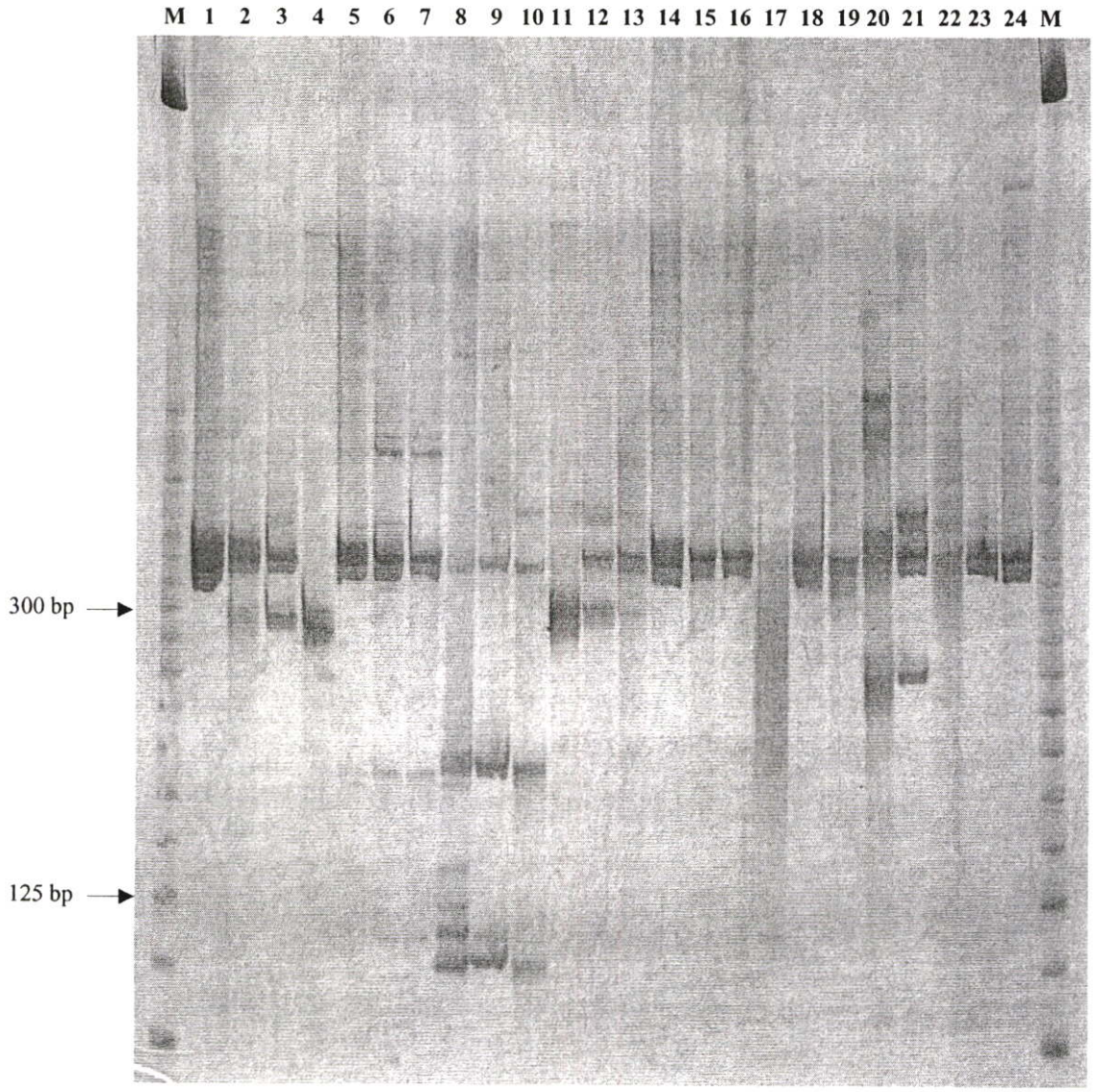
รูปที่ 4.11 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ E, DES7 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DES7 (ตัวควบคุม), 24 = S3 (ตัวควบคุม)



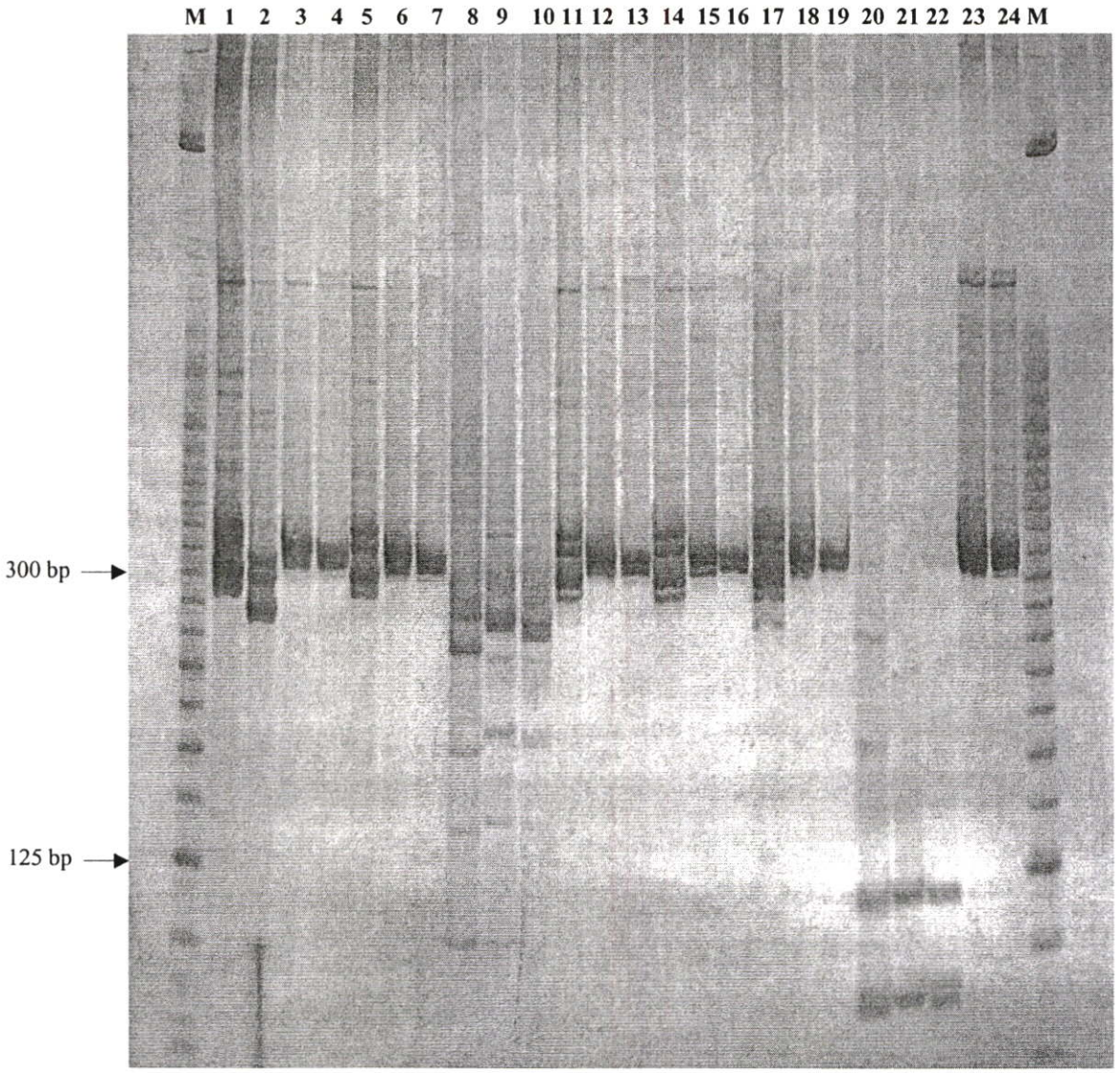
รูปที่ 4.12 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ E, DES5 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DES5 (ตัวควบคุม), 24 = S11 (ตัวควบคุม)



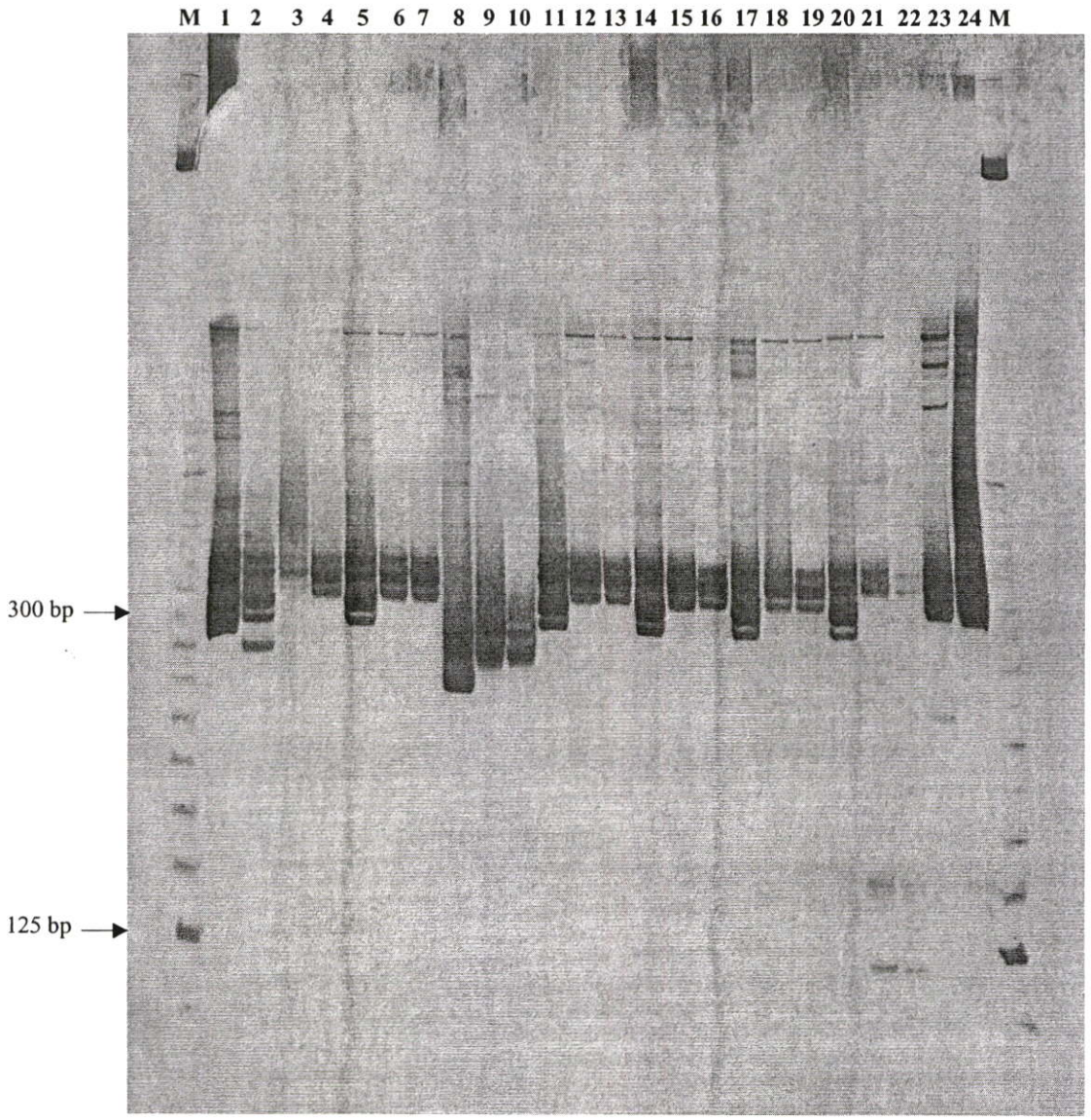
รูปที่ 4.13 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ P, DPS8 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DPS8 (ตัวควบคุม), 24 = S1 (ตัวควบคุม)



รูปที่ 4.14 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ P, DPS14 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DPS14 (ตัวควบคุม), 24 = S3 (ตัวควบคุม)



รูปที่ 4.15 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ของสายพันธุ์ P, DPS12 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DPS12 (ตัวควบคุม), 24 = S11 (ตัวควบคุม)

PCR/RFLP ของ rDNA จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4

จากการนำฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์มาตรวจสอบด้วย PCR/RFLP (รูปที่ 4.16) พบว่า เอนไซม์ *Eco*RI และ *Hae*III ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ที่ตรงกับฟิวแซนท์ MES6 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 350/367 และ 425/292 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ MES6 ได้3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 330/387, 360/357 และ 375/342 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 325/392, 330/387, 360/357 และ 375/342 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ MES6 และ S11 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 225/492 และ 465/252 คู่เบส เอนไซม์ *Hin*dIII ตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 315/402 และ 465/252 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*II ตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 350/367 และ 375/342 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ 12 ชิ้นที่ตำแหน่ง 200/517, 225/492, 250/467, 275/442, 285/432, 300/417, 325/392, 375/342, 425/292, 475/242, 500/217 และ 550/167 คู่เบส และสามารถตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ MES6 ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 150/567, 250/467, 256/461, 275/442, 282/435 และ 300/417 คู่เบส และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 11 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/632, 150/567, 155/562, 175/542, 240/477, 256/461, 275/442, 282/435, 300/417, 350/367 และ 450/267 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอตรงกันของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 กับฟิวแซนท์ MES6 ที่ตำแหน่ง 250 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอตรงกันของฟิวแซนท์กับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ที่ตำแหน่ง 256 คู่เบส อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ MES6 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 เท่านั้น

เอนไซม์ *Hin*dIII และ *Hae*III ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ที่ตรงกับฟิวแซนท์ DES1 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ (รูปที่ 4.17) แต่เอนไซม์ *Hin*fI ตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 135/582, 150/567, 185/532, 300/417, 335/382, 350/367 และ 425/292 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES1 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 325/392 และ 355/362 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 325/392, 345/372 และ 350/367 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I ตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 220/497, 225/492, 420/297, 425/292, 450/267, 460/257, 475/242 และ 500/217 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES1 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 225/492 และ 450/267 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI ตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 140/577, 230/487, 425/292, 475/242 และ 500/217 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES1 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 140/577, 165/552, 250/467, 275/442 และ 480/237 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธ์ถ S1 ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 140/577, 165/522, 240/477, 250/467, 275/442, 300/417, 315/402 และ 460/257 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES1 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 375/342, 415/302, 450/267 และ 515/202 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดดีเอ็นเอ

ของเห็ดหอม E ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 475/242, 500/217, 540/177, 555/162, 588/129, 600/117 และ 620/97 คู่เบส สามารถตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES1 ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 330/387, 345/372, 570/174, 588/129, 600/117, 605/112 และ 625/92 คู่เบส และสามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 330/387, 345/372, 570/147, 600/117 และ 605/112 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอตรงกันของเห็ดหอมสายพันธุ์ E กับฟิวแซนท์ DES1 ที่ตำแหน่ง 588 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอตรงกันของฟิวแซนท์ DES1 กับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ที่ตำแหน่ง 330, 345, 570, 600 และ 605 คู่เบส อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES1 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 เท่านั้น

เอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ที่ตรงกับฟิวแซนท์ DPS12 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11ได้ (รูปที่ 4.18) แต่เอนไซม์ *Hin*fI ตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 140/577, 200/517, 417/382, 335/382, 350/367 และ 475/242 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DPS12 และ S11 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 325/392, 335/382, 365/352, 380/337 และ 415/302 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I ตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 225/492, 230/487, 425/292, 465/252 และ 475/242 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DPS12 และ S11 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 230/487, 240/477, 455/262 และ 475/242 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 12 ชิ้นที่ตำแหน่ง 80/637, 145/572, 150/567, 170/457, 180/537, 190/527, 220/497, 235/482, 260/457, 270/447, 300/417 และ 415/302 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DPS12 และ S11 ได้ 17 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/632, 145/572, 150/567, 170/547, 225/492, 235/482, 250/467, 260/457, 270/447, 275/442, 300/417, 400/317, 415/302, 420/297, 440/277, 465/252 และ 495/222 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*II สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 9 ชิ้นที่ตำแหน่ง 220/497, 225/492, 290/427, 325/392, 350/367, 425/292, 450/267, 465/252 และ 480/237 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DPS12 ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 225/492, 235/482, 325/392, 350/367, 455/262 และ 465/252 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอ DPS12 และ S11 ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/632, 95/622, 290/427, 375/342, 390/327, 400/317, 420/297 และ 435/282 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 220/497, 225/492, 305/412, 315/402, 325/392, 350/367 และ 370/347 คู่เบส สามารถตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS12 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 225/492, 325/392, 350/367 และ 375/342 คู่เบส และสามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 340/377, 350/367 และ 375/342 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอตรงกับเห็ดบดสายพันธุ์ P กับฟิวแซนท์ DPS12 ที่ตำแหน่ง 325 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอตรงกันของฟิวแซนท์ DPS12 กับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ที่ตำแหน่ง 350 และ 375 คู่เบส อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS12 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 เท่านั้น

ฟิวแซนท์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III ในกลุ่มที่ดีเอ็นเอมีขนาด 717 คู่เบส เมื่อตรวจแล้วไม่พบความแตกต่าง ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอที่ช่วงบริเวณต่ำกว่า 500 คู่เบสลงมา ดังนี้

ฟิวแซนท์ MPS19 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI, *Eco*RI, *Hin*dIII และ *Hae*II ไม่สามารถบ่งชี้ความเป็นลูกผสมระหว่างดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P7 ฟิวแซนท์ DPS19 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ (รูปที่ 4.19) ส่วนเอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 325/175, 360/140 และ 385/115 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้ 4 ชิ้นได้ที่ตำแหน่ง 225/275, 240/260, 450/50 และ 475/25 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดทั้ง 3 สายพันธุ์ P7 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 90/410, 150/340, 160/325, 175/350 และ 265/235 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้ 4 ชิ้นได้ที่ตำแหน่ง 85/415, 100/400, 375/125 และ 425/75 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอเห็ดทั้ง 3 สายพันธุ์เหมือนกันทั้ง 3 ขนาด

เอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ที่ตรงกับฟิวแซนท์ DES7 (รูปที่4.20) แต่ตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ฟิวแซนท์ DES7 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ โดยเอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 11 ชิ้นที่ตำแหน่ง 140/360, 190/310, 275/225, 300/200, 320/180, 325/175, 340/160, 350/150, 395/105, 420/80 และ 440/60 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES7 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 330/170, 340/160, 350/150 และ 365/135 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/400, 150/350, 330/170, 340/160, 350/150 และ 365/135 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 16 ชิ้นที่ตำแหน่ง 215/285, 220/280, 225/275, 235/265, 265/235, 320/180, 340/160, 350/150, 355/145, 370/130, 380/120, 425/75, 435/65, 465/35, 470/30 และ 480/20 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES7 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 230/270, 355/145, 400/100 และ 460/40 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3ได้ 18 ชิ้นที่ตำแหน่ง 50/450, 100/400, 150/350, 215/285, 220/280, 225/275, 230/270, 250/250, 275/225, 300/200, 330/170, 345/155, 355/145, 425/75, 435/65, 450/50, 465/35 และ 475/25 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 16 ชิ้นที่ตำแหน่ง 50/450, 105/395, 150/350, 175/325, 185/315, 240/260, 250/250, 260/240, 275/225, 300/200, 350/150, 400/100, 425/75, 435/65, 460/40 และ 475/25 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES7 ได้ 14 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/400, 140/360, 150/335, 215/285, 225/275, 245/255, 250/250, 260/240, 280/220, 300/200, 400/100, 425/75, 440/60 และ 460/40 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3ได้ 12 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/400, 150/350, 215/285, 225/275, 250/250, 260/240, 275/225, 280/220, 400/100, 425/75, 440/60 และ

460/40 คู่เบส เอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 230/270, 315/5185, 325/175, 340/160, 375/125, 425/75, 450/50 และ 465/32 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES7 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/400, 235/265, 350/150 และ 465/35 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3ได้ 9 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/400, 235/265, 325/175, 340/160, 350/150, 375/125, 415/85, 435/75 และ 465/35 คู่เบส เอนไซม์ *Hin*dIII สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 285/215, 300/200, 325/175, 350/150, 370/130, 380/120, 400/100 และ 490/10 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES7 ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/400, 145/355, 305/195, 330/170, 350/150, 375/125, 400/100 และ 425/75 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/400, 145/355, 305/195, 400/100, 475/25 และ 485/15 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*II สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ที่ตำแหน่ง 375/125 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES7 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/400, 140/360, 235/265, 340/160, 360/140, 400/100, 440/60 และ 465/35 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 12 ชิ้นที่ตำแหน่ง 75/425, 100/400, 125/375, 140/360, 200/300, 240/260, 290/210, 325/175, 375/125, 390/110, 400/100 และ 405/95 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES7 เห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/400, 140/360, 150/350, 185/315, 400/100, 405/95, 420/80 และ 495/5 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3ได้ 12 ชิ้นที่ตำแหน่ง 75/425, 95/405, 100/400, 125/375, 140/360, 150/350, 160/340, 170/330, 400/100, 405/95, 420/80 และ 425/75 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI และ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES7 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 เท่านั้น

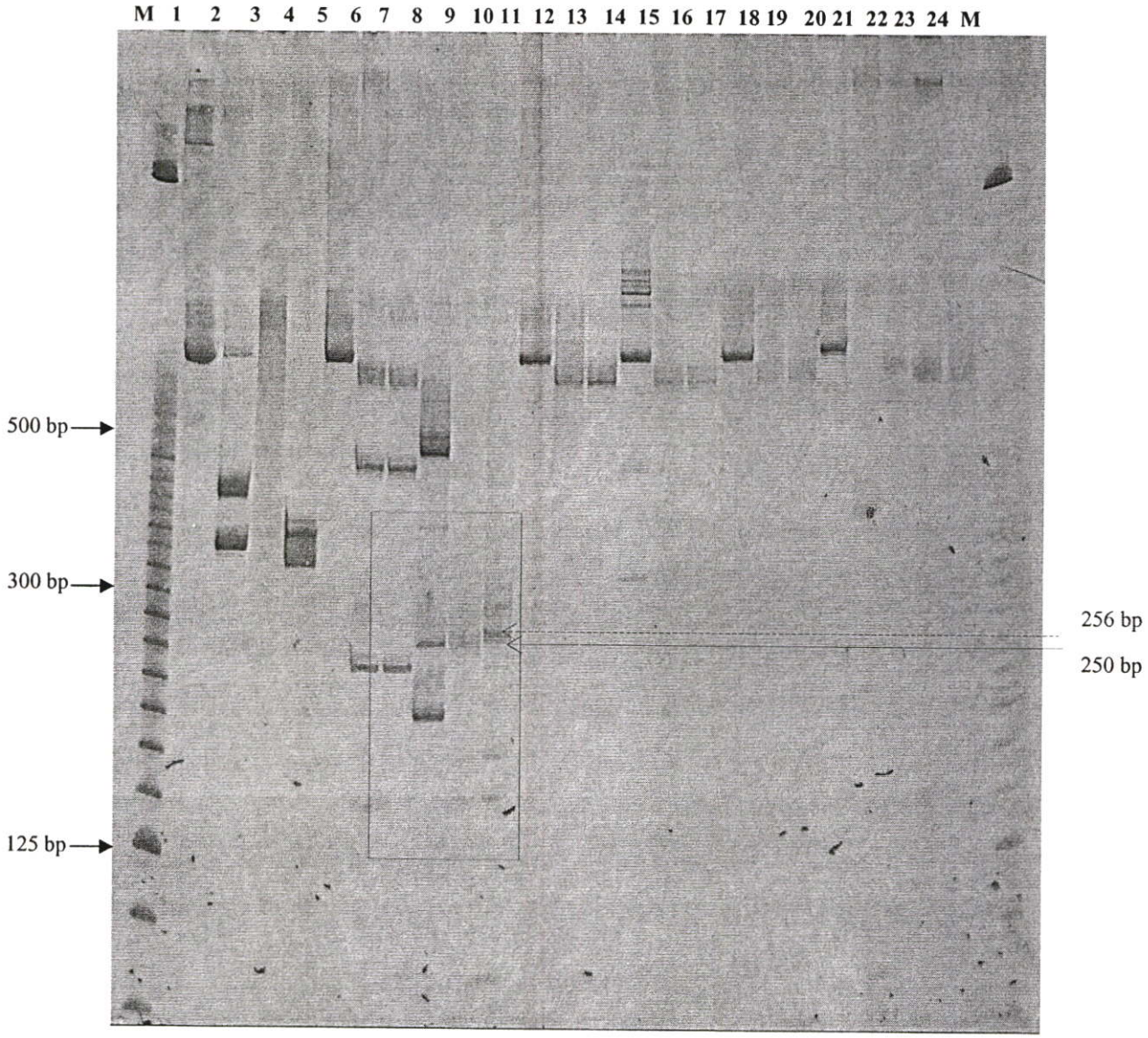
ฟิวแซนท์ DES5 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E ที่ตรงกับฟิวแซนท์ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 (รูปที่4.21) แต่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ฟิวแซนท์ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 9 ชิ้นที่ตำแหน่ง 140/260, 190/310, 300/200, 325/175, 350/150, 400/100, 425/75, 460/40 และ 475/25 คู่เบส ฟิวแซนท์ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 4 ชิ้นขนาด 330/170, 350/150, 370/130 และ 380/120 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I ตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 200/300, 210/290, 250/250, 425/75, 450/50, 465/35 และ 475/25 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 235/265, 240/260, 450/50, 465/35 และ 475/25 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI ตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 21 ชิ้นที่ตำแหน่ง 110/475, 135/365, 150/350, 175/325, 185/315, 210/290, 220/280, 230/270, 240/260, 250/250, 270/230, 275/225, 285/215, 310/190, 340/160, 375/125, 400/100, 415/85, 435/65, 450/50 และ 475/25 คู่เบส ตัดดีเอ็น

เอฟิวแซนท์ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 12 ชิ้นที่ตำแหน่ง 150/350, 155/345, 170/330, 250/250, 270/230, 275/225, 285/125, 300/200, 325/175, 340/160, 360/140 และ 400/100 คู่เบส เอนไซม์ *Eco*RI ตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 315/185, 325/175, 340/160, 350/150, 375/125, 430/70 และ 450/50 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 340/160, 350/150 และ 375/125 คู่เบส เอนไซม์ *Hin*dIII ตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 285/215, 300/100, 325/175, 370/130, 375/125, 425/75 และ 475/25 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 285/215 และ 450/50 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*II ตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 285/215, 370/130, 375/125, 425/75, 450/50, 460/40 และ 475/25 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III ตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 9 ชิ้นที่ตำแหน่ง 80/420, 100/400, 375/125, 415/85, 425/75, 440/60, 465/35, 475/25 และ 480/20 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI และ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES5 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 เท่านั้น

เอนไซม์ *Hin*dIII ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 และฟิวแซนท์ DPS8ได้ (รูปที่4.22) แต่เอนไซม์ *Hin*fI ตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 140/360, 190/310, 300/200, 325/175 และ 350/150 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS8 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 2 ชิ้น 320/180 และ 350/150 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I ตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 225/275, 235/265, 240/60, 425/75, 460/40 และ 470/30 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS8 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 4 ชิ้น 225/275, 230/270, 440/60 และ 450/50 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI ตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 80/420, 145/355, 175/325, 235/275, 240/260, 265/235, 275/225 และ 285/215 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS8 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 7 ชิ้น 85/415, 150/350, 175/325, 225/275, 230/270, 255/245 และ 285/215 คู่เบส เอนไซม์ *Eco*RI ตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 325/375, 335/365 และ 350/150 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS8 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 4 ชิ้น 115/385, 230/270, 345/155 และ 350/150 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*II ตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 225/275, 300/200, 330/170, 365/135, 385/115, 440/60, 465/35 และ 470/30 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS8 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 4 ชิ้น 230/270, 325/175, 335/165 และ 460/40 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 80/420, 95/405, 375/125, 400/100, 435/65, 460/40 และ 470/30 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS8 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 8 ชิ้น 85/415, 100/400, 325/175, 360/140, 390/110, 425/75, 435/65 และ 470/30 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI, *Eco*RI และ *Hae*III

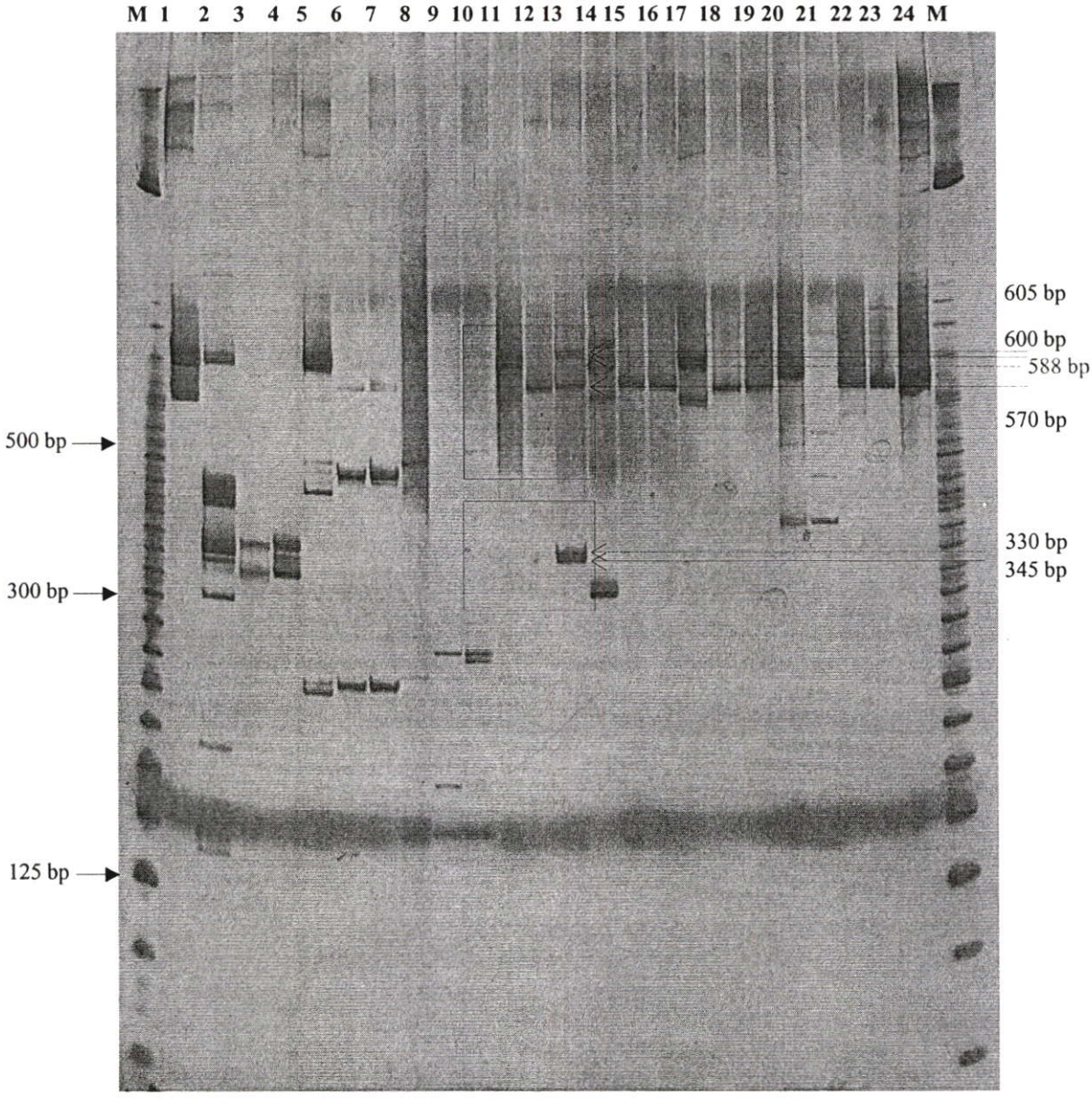
อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS8 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 เท่านั้น

เอนไซม์ *Hin*dIII ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 และฟิวแซนท์ DPS14ได้ (รูปที่4.23) แต่เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 11 ชิ้นที่ตำแหน่ง 140/360, 145/355, 190/310, 200/300, 215/285, 240/260, 300/200, 325/175, 330/170, 350/150 และ 375/125 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS14 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 5 ชิ้น 325/175, 330/170, 340/160, 350/150 และ 365/135 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 230/270, 240/260, 255/245, 425/75, 440/60, 455/45, 470/30 และ 475/25 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS14 ได้ 3 ชิ้น 235/265, 450/50 และ 460/40 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 7 ชิ้น 210/290, 220/280, 225/275, 235/265, 450/50, 460/40 และ 475/25 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 115/385, 135/365 และ 375/125 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS14 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 5 ชิ้น 150/350, 350/150, 360/140, 375/125 และ 400/100 คู่เบส เอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 310/190, 325/175, 340/160, 350/150 และ 450/50 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS14 ได้ 3 ชิ้น 320/180, 330/170 และ 345/155 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 375/125 และ 380/120 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS14 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 380/120 และ 470/30 คู่เบส เนื่องจากในแผ่นเจลนี้เห็นเฉพาะดีเอ็นเอที่มีขนาด 125 คู่เบสขึ้นไป และใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน ดังนั้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI และ *Hae*III ที่มีขนาดเล็กกว่า 125 คู่เบสจึงตกเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS14 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 เท่านั้น



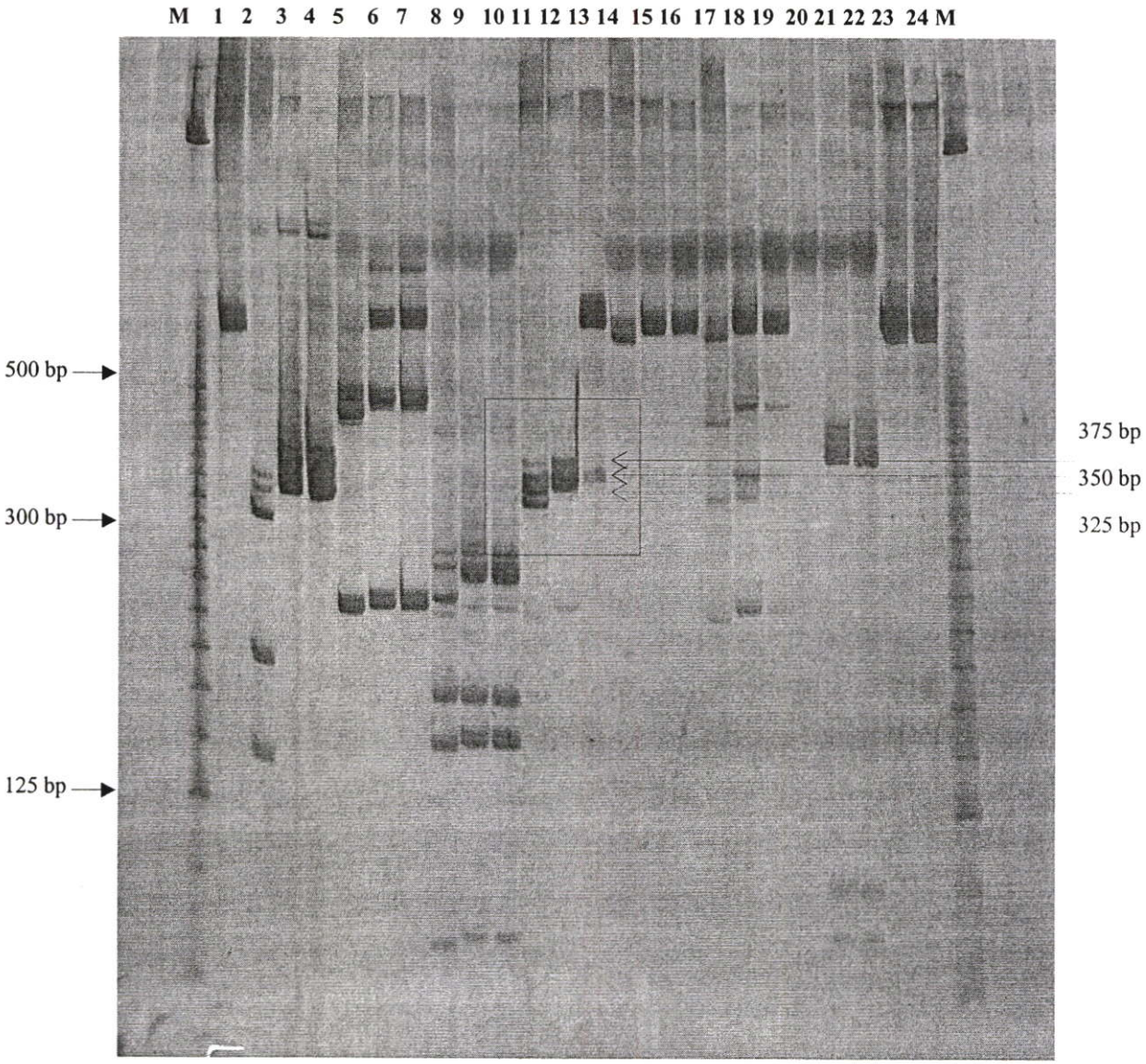
รูปที่ 4.16 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E22, MES6 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E22 (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = MES6 (ตัวควบคุม), 24 = S11 (ตัวควบคุม)



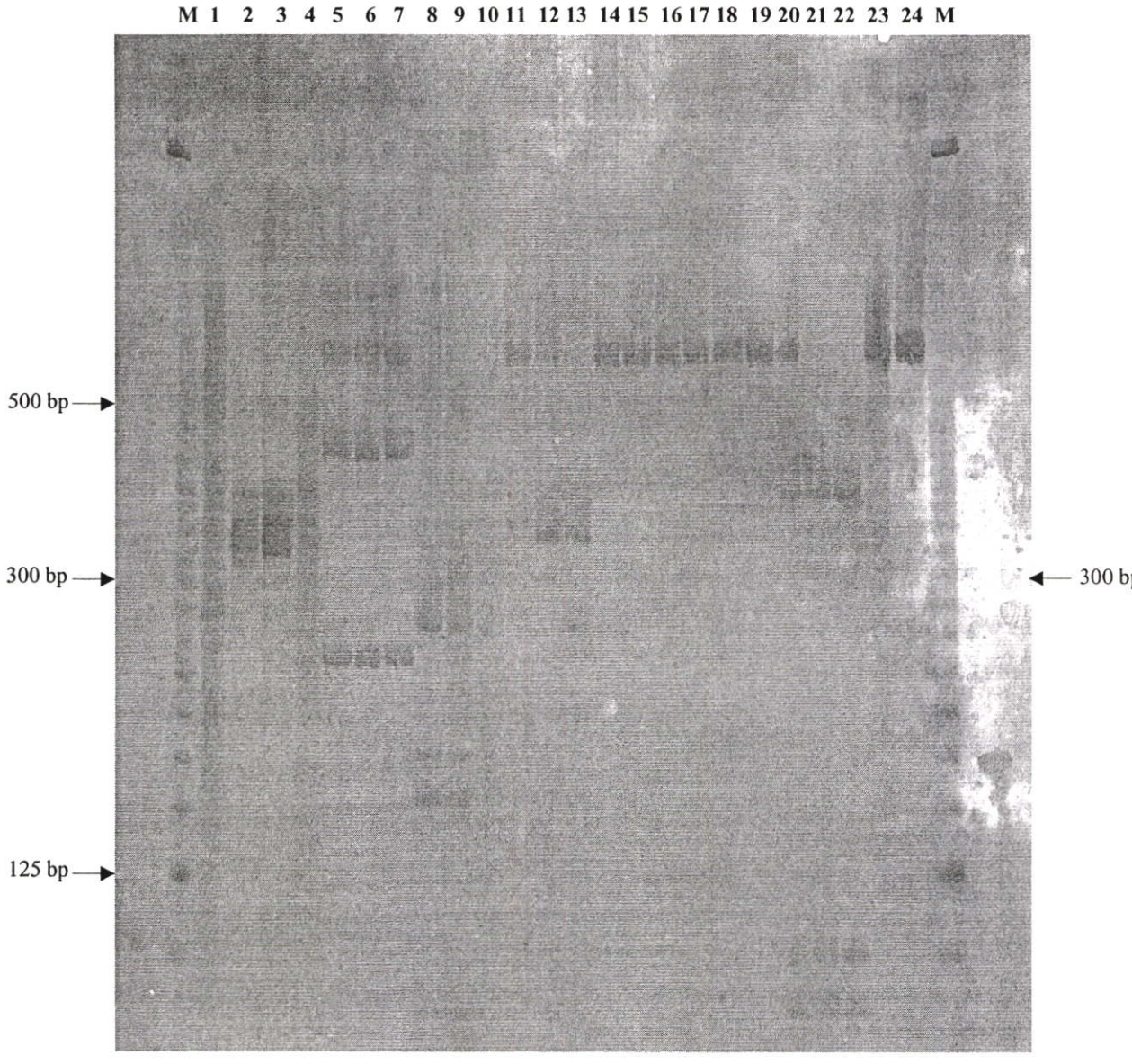
รูปที่ 4.17 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E, DES1 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DES1 (ตัวควบคุม), 24 = S1 (ตัวควบคุม)



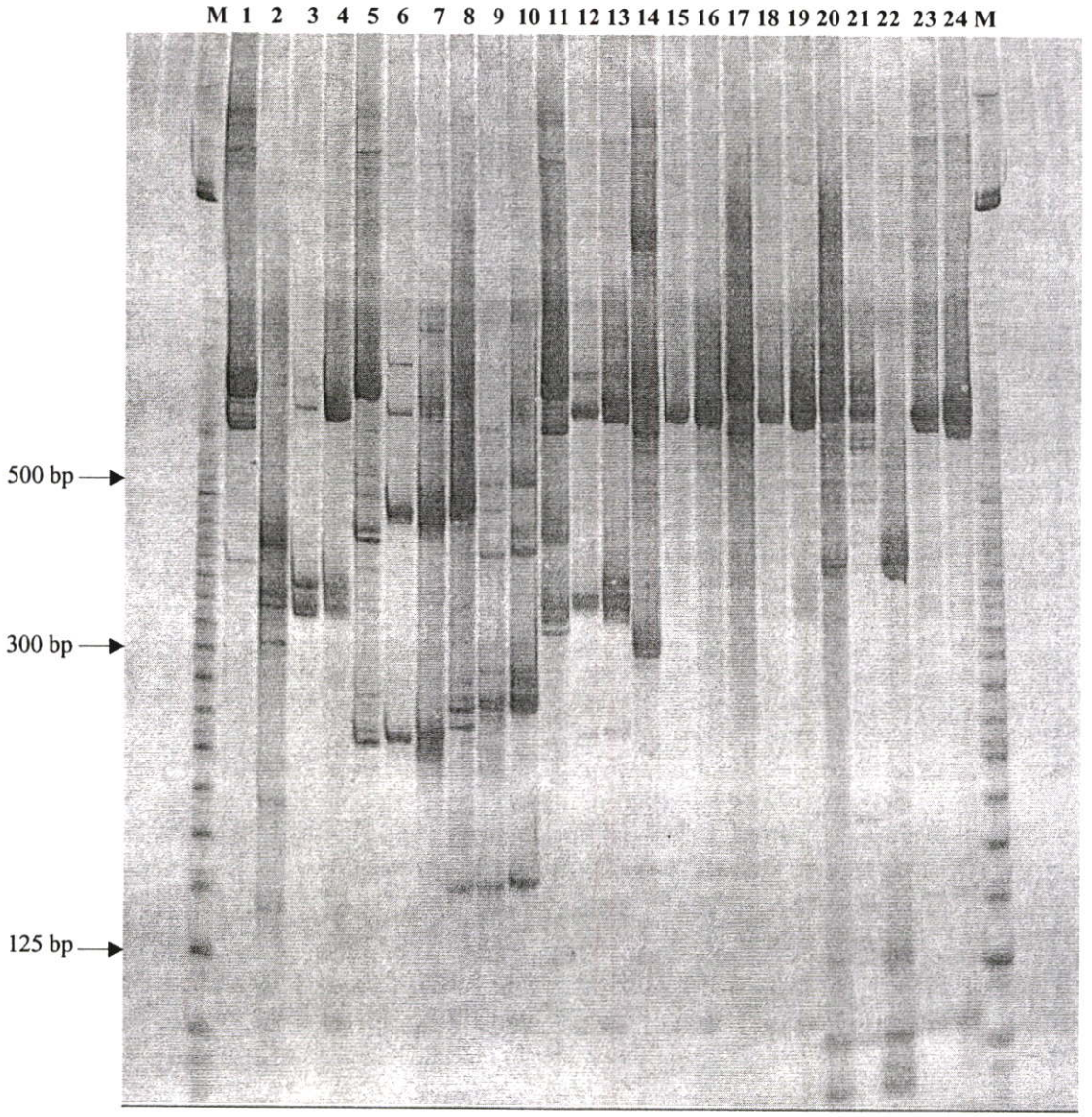
รูปที่ 4.18 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P, DPS12 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DPS12 (ตัวควบคุม), 24 = S11 (ตัวควบคุม)



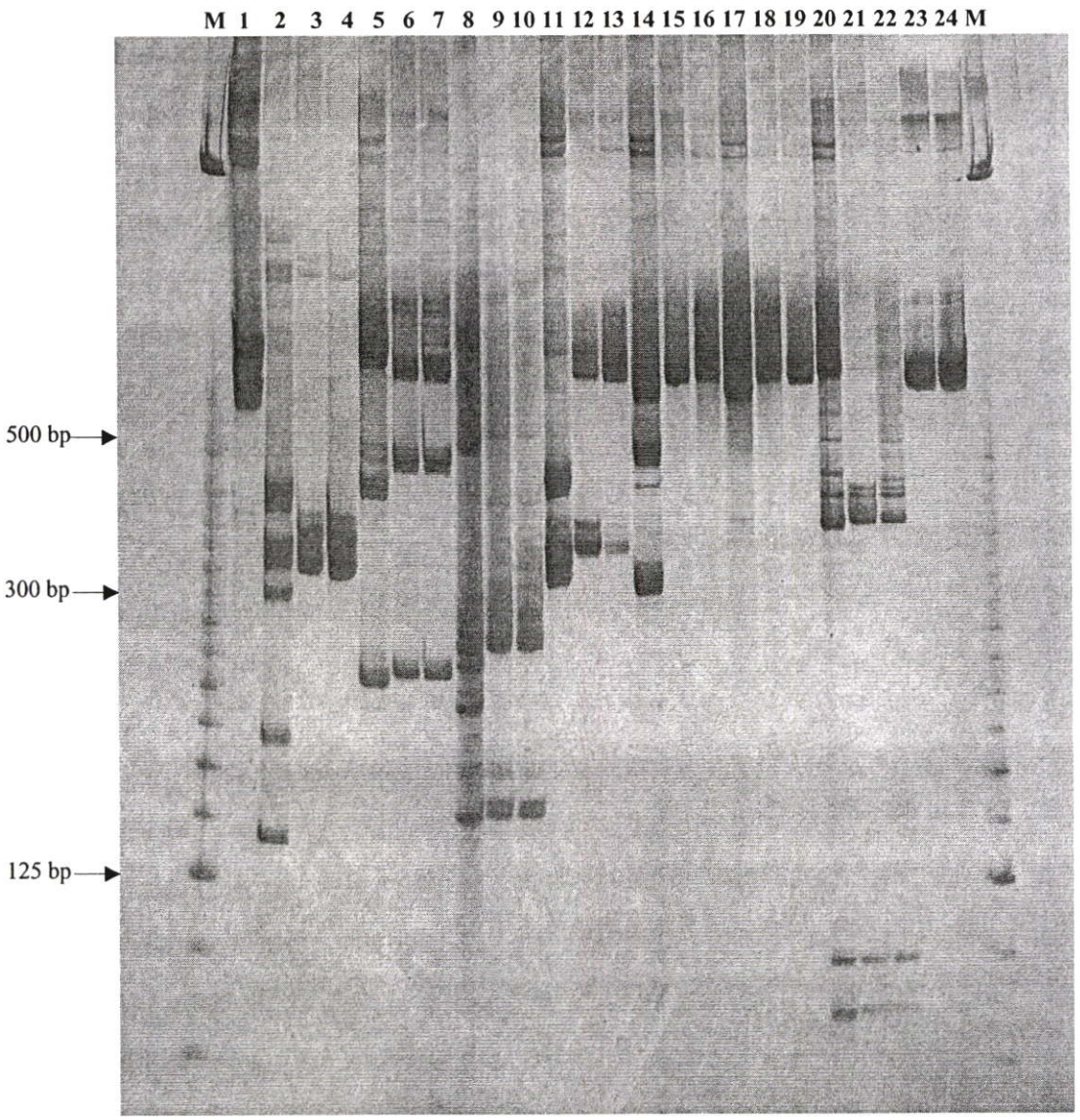
รูปที่ 4.19 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P7, MPS19 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P7 (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = MPS19 (ตัวควบคุม), 24 = S11 (ตัวควบคุม)



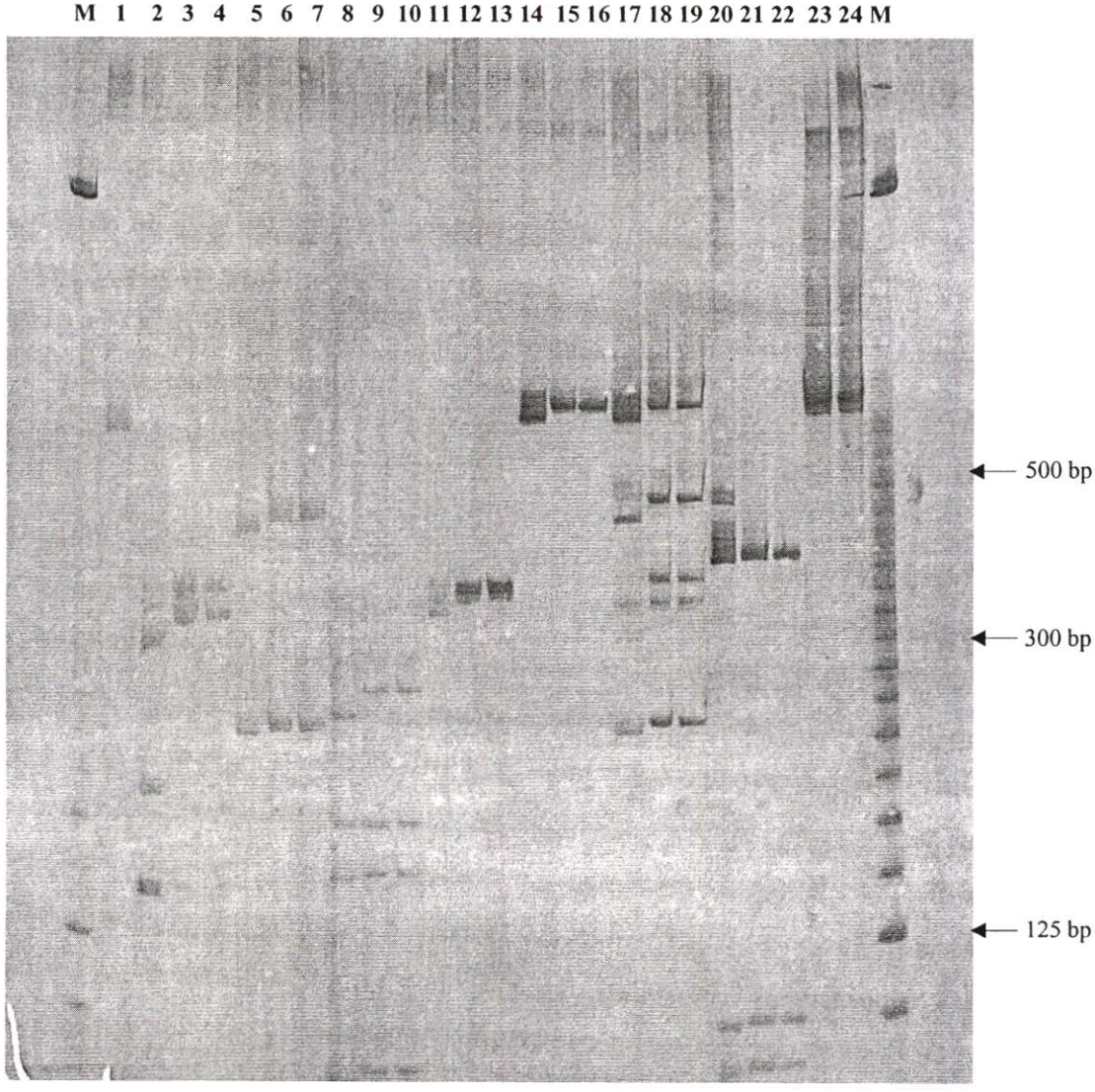
รูปที่ 4.20 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E, DES7 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DES7 (ตัวควบคุม), 24 = S3 (ตัวควบคุม)



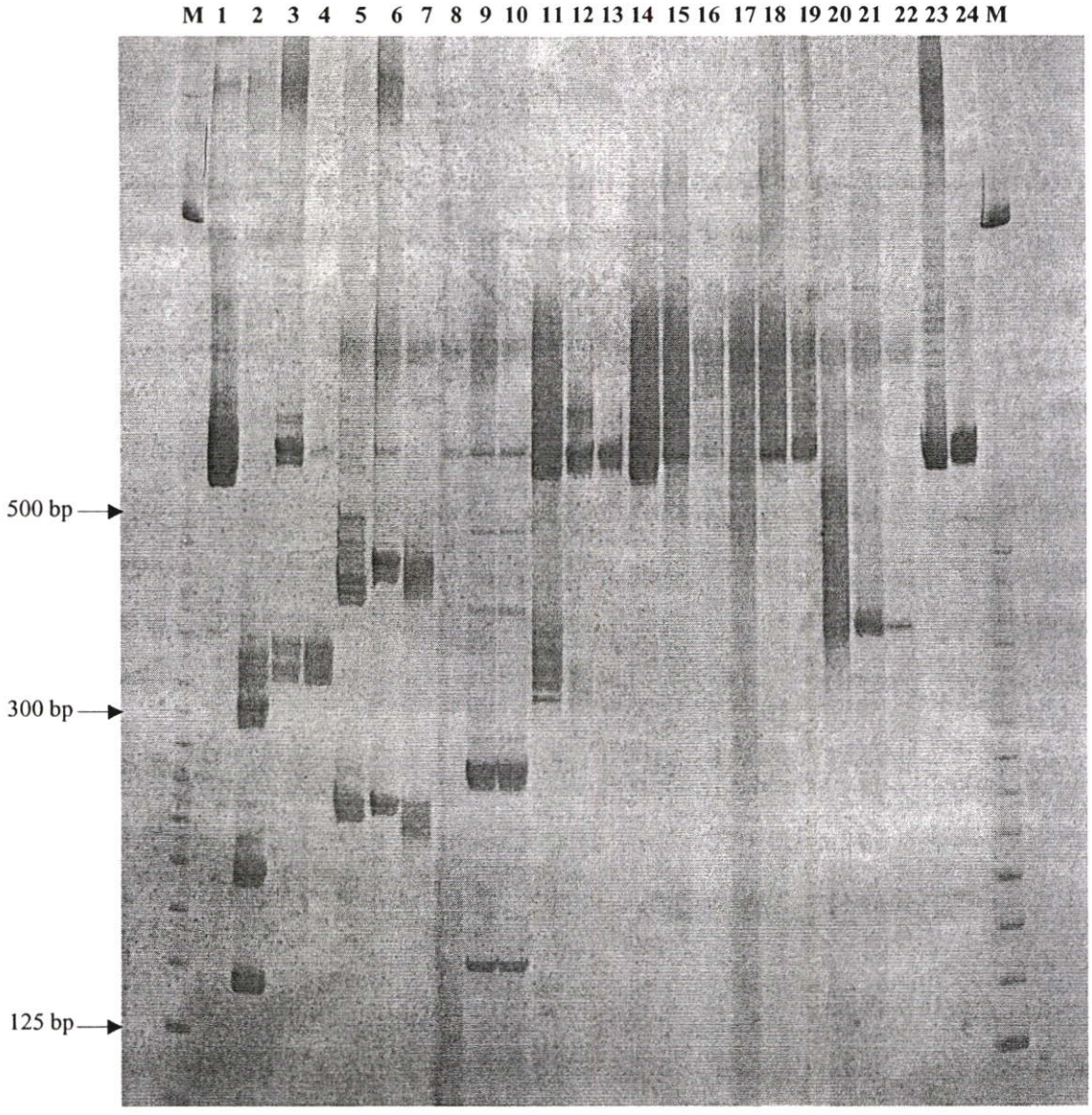
รูปที่ 4.21 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E, DES5 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DES5 (ตัวควบคุม), 24 = S11 (ตัวควบคุม)



รูปที่ 4.22 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P, DPS8 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DPS8 (ตัวควบคุม), 24 = S1 (ตัวควบคุม)



รูปที่ 4.23 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P, DPS14 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DPS14 (ตัวควบคุม), 24 = S3 (ตัวควบคุม)

PCR/RFLP ของ rDNA จากการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4

จากการนำฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์มาตรวจสอบด้วย PCR/RFLP โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด พบว่าเอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ที่ตรงกับฟิวแซนท์ DES7 (รูปที่ 4.24) แต่เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 145/325 และ 200/270 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 170/300 และ 240/230 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DES7 ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 170/430, 240/230, 390/80, 400/70, 420/50 และ 425/45 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 5 ชิ้น ที่ตำแหน่ง 170/300, 240/230, 415/55, 425/45 และ 450/20 คู่เบส เอนไซม์ *Eco*RI ตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES7 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 170/300, 250/220, 365/105 และ 400/70 คู่เบส เอนไซม์ *Hin*dIII สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 185/285, 190/280, 325/145 และ 400/70 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 300/170, 325/145, 410/60 และ 425/45 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DES7 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 105/365, 300/170, 410/60 และ 450/20 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 105/365, 300/170, 325/145, 335/135, 410/60, 450/20 และ 465/5 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ Eได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 160/210, 165/305, 235/235, 240/130, 250/220, 275/195 และ 300/170 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES7 ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/385, 90/180, 115/355, 160/310, 165/305, 240/130 และ 250/120 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/385, 90/380, 115/355, 160/310, 165/305 และ 240/130 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอตรงกันของเห็ดหอมสายพันธุ์ E กับฟิวแซนท์ DES7 ที่ตำแหน่ง 275 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอตรงกันของฟิวแซนท์ DES7 กับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ที่ตำแหน่ง 160, 165 และ 240 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I และ *Sau*3AI อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES7 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 เท่านั้น

เอนไซม์ *Hin*dIII ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ที่ตรงกับฟิวแซนท์ DPS8 ได้ (รูปที่ 4.25) แต่เอนไซม์ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 160/310, 230/240, 235/235, 388/82, 420/50 และ 430/40 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DPS8 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 160/310, 235/235, 388/82, 420/50 และ 435/35 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 160/310, 235/235 และ 420/50 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 20 ชิ้นที่ตำแหน่ง 150/320, 160/310, 170/300, 180/290, 190/280, 230/240, 240/230, 250/220, 255/215, 265/205, 275/195, 285/185, 290/180, 300/170, 320/150, 330/140, 350/120, 400/80, 425/45 และ 450/20 คู่เบส เอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบด

สายพันธุ์ P ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 345/125, 360/110, 395/75 และ 420/50 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ DPS8 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 350/120, 400/70 และ 450/20 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*II สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 270/200 และ 400/70 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 338/132, 400/70 และ 420/50 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 330/140 และ 350/120 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS8 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 345/125, 400/70 และ 440/30 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอตรงกันของเห็ดบดสายพันธุ์ P กับฟิวแซนท์ DPS8 ที่ตำแหน่ง 400 คู่เบส เนื่องจากเอนไซม์ชนิดอื่นตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS8 ตรงกับแถบดีเอ็นเอของเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 แต่เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P ตรงกับฟิวแซนท์ DPS8 จึงยืนยันได้ว่าฟิวแซนท์ DPS8 เป็นลูกผสมระหว่างเห็ดบดสายพันธุ์ P กับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 และเอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 8 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/370, 175/295, 300/170, 315/155, 325/145, 400/70, 420/50 และ 425/45 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS8 ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/370, 300/170, 315/155, 325/145, 400/70 และ 450/20 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 350/120, 360/110, 375/95, 385/85, 405/65 และ 450/20 คู่เบส พบแถบดีเอ็นเอตรงกันของเห็ดบดสายพันธุ์ P กับฟิวแซนท์ DPS8 ที่ตำแหน่ง 100, 300, 315, 325 และ 400 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS8 ที่ตรงกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ที่ตำแหน่ง 450 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS8 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 เท่านั้น

เอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ที่ตรงกับฟิวแซนท์ MES6 (รูปที่4.26) แต่ เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ที่ตำแหน่ง 425/45 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ MES6 และ ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 325/145, 330/140, 350/120, 365/105, 375/75, 415/55 และ 425/45 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอ MES6 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 160/310, 225/245, 240/230, 390/80, 415/55 และ 425/45 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI ตัดดีเอ็นเอ MES6 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 14 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/385, 150/320, 155/315, 240/230, 250/220, 265/205, 285/187, 300/170, 325/145, 340/130, 400/70, 425/45, 430/40 และ 465/5 คู่เบส เอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ที่ตำแหน่ง 445/25 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ MES6 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 350/120, 400/70, 425/45 และ 450/20 คู่เบส เอนไซม์ *Hin*dIII สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ได้ 8 ที่ตำแหน่ง 200/270, 205/265, 215/255, 315/155, 375/95, 400/70, 425/45 และ 450/20 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ MES6 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 400/70, 425/45 และ 450/20 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*II สามารถตัดดีเอ็นเอฟิว

แซนท์ MES6 ได้ 4 ที่ตำแหน่ง 345/125, 400/70, 425/45 และ 440/30 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ MES6 ได้ 6 ที่ตำแหน่ง 100/370, 300/170, 320/150, 325/145, 350/120 และ 400/75 คู่เบส และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ MES6 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 เท่านั้น

เอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P7 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ที่ตรงกับฟิวแซนท์ MPS19 (รูปที่ 4.27) แต่เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 265/205 และ 400/70 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 330/140, 335/135, 360/110, 365/105, 370/100, 395/75 และ 400/70 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P7 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 400/70 และ 410/60 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ MPS19 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 390/80 และ 395/75 คู่เบส เอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 400/55 และ 415/70 คู่เบส เอนไซม์ *Hin*dIII สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้ 6 ชิ้นที่ตำแหน่ง 375/95, 380/90, 385/85, 390/80, 410/60 และ 415/55 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*II สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดบดสายพันธุ์ P7 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 250/220, 405/65 และ 415/55 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอ MPS19 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 250/220 และ 385/85 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอ MPS19 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 335/135, 365/105 และ 400/70 คู่เบส เนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Hin*dIII และ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ MPS19 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 เท่านั้น

เอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hae*II และ *Hae*III ไม่สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ที่ตรงกับแถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES1 (รูปที่4.28) แต่เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 345/125, 400/70, 425/45 และ 450/20 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES1 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 340/130 และ 360/110 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES1 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 130/340, 165/305, 240/230 และ 400/70 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI ตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 75/395, 150/320, 170/300 และ 245/225 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DES1 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 80/390, 155/315, 170/300 และ 245/225 คู่เบส แต่เนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป เอนไซม์ *Eco*RI ตัดดีเอ็นเอ DES1ได้ที่ตำแหน่ง 360/110 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III ตัดดีเอ็นเอ DES1ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 125/345 และ 290/180 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 95/375 และ 290/180 คู่

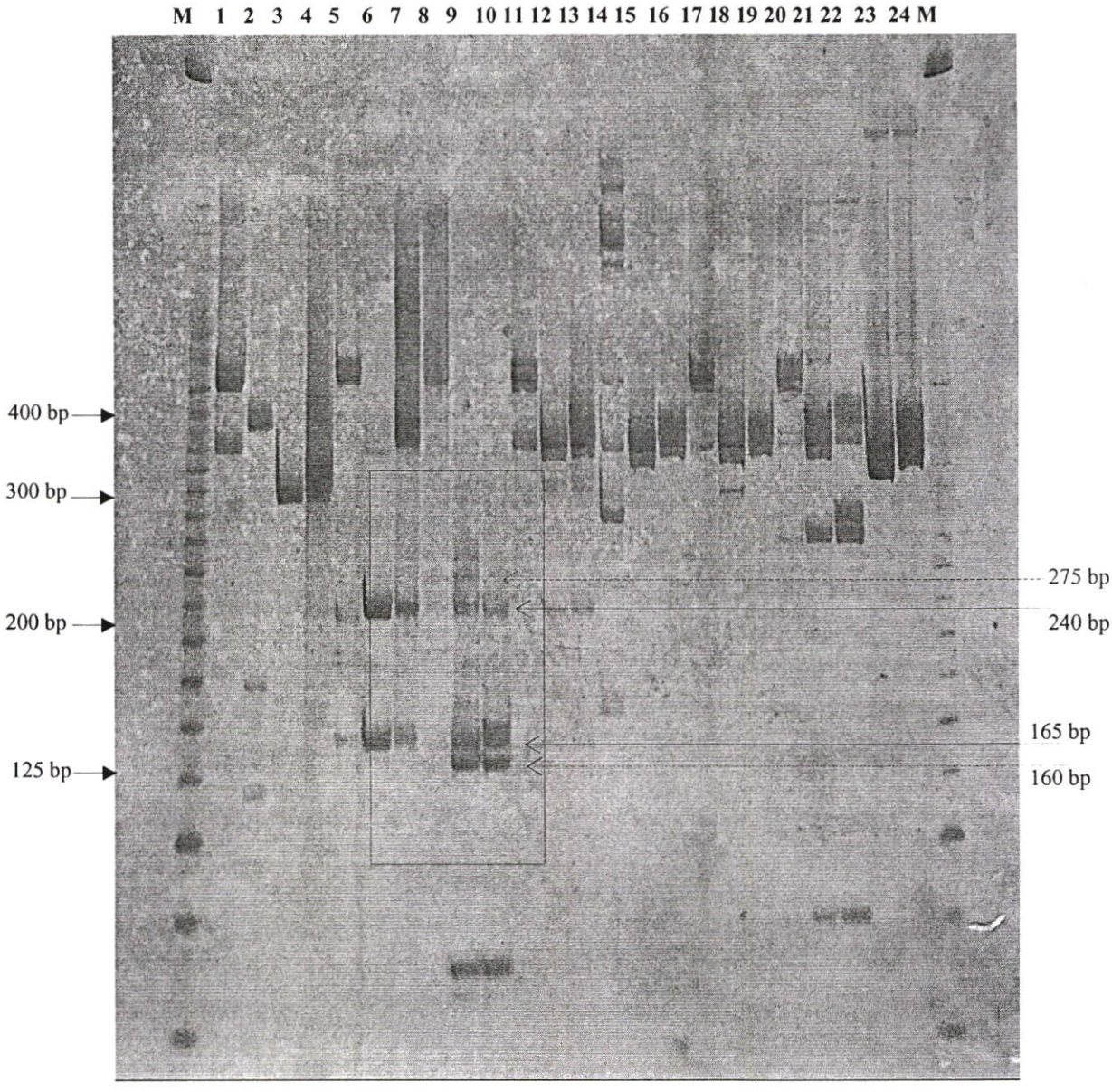
เบส แต่เนื่องจากใช้เวลาในการทำเจลอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES1 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 เท่านั้น

เอนไซม์ *Eco*RI, *Hae*II และ *Hae*III ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E ฟิวแซนท์ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ (รูปที่ 4.29) แต่เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอของ DES5 ได้ที่ตำแหน่ง 325/145 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 330/140, 350/120 และ 375/95 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอของ DES5 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 230/240 และ 265/205 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 155/315 และ 225/245 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 145/325, 155/315, 225/245 และ 230/240 คู่เบส สามารถตัดดีเอ็นเอของ DES5 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 145/325, 150/320, 230/240, 245/225 และ 255/215 คู่เบส และเอนไซม์ *Hin*dIII ตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E ได้ที่ตำแหน่ง 300/170 คู่เบส อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DES5 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 เท่านั้น

เอนไซม์ *Eco*RI ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ฟิวแซนท์ DPS14 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ (รูปที่ 4.30) ส่วนเอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 140/330 และ 190/280 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 160/310, 170/300, 225/245 และ 240/230 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS14 ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 160/310, 230/240, 350/120 และ 395/75 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 120/350, 125/345, 165/305, 190/280, 210/260, 220/250 และ 230/240 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 80/390, 145/325, 160/310, 170/300, 230/240, 245/225 และ 280/190 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS14 และดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 9 ชิ้นที่ตำแหน่ง 85/385, 145/325, 160/310, 170/300, 230/240, 250/220, 265/205, 275/195 และ 280/190 คู่เบส เอนไซม์ *Hin*dIII และ *Hae*II ตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 220/250, 225/245 และ 235/235 คู่เบส เอนไซม์ *Hae*III ตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 90/380, 290/180, 300/170, 345/125 และ 355/115 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS14 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 95/375, 275/195, 290/180, 380/90 และ 415/55 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ 3 ชิ้นที่ตำแหน่ง 95/375, 275/195 และ 290/180 คู่เบส แต่ทั้งหมดนี้ไม่สามารถบ่งชี้ความเป็นลูกผสมระหว่างเห็ดบดสายพันธุ์ P ฟิวแซนท์ DPS14 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ได้ เนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Dde*I, *Sau*3AI และ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่

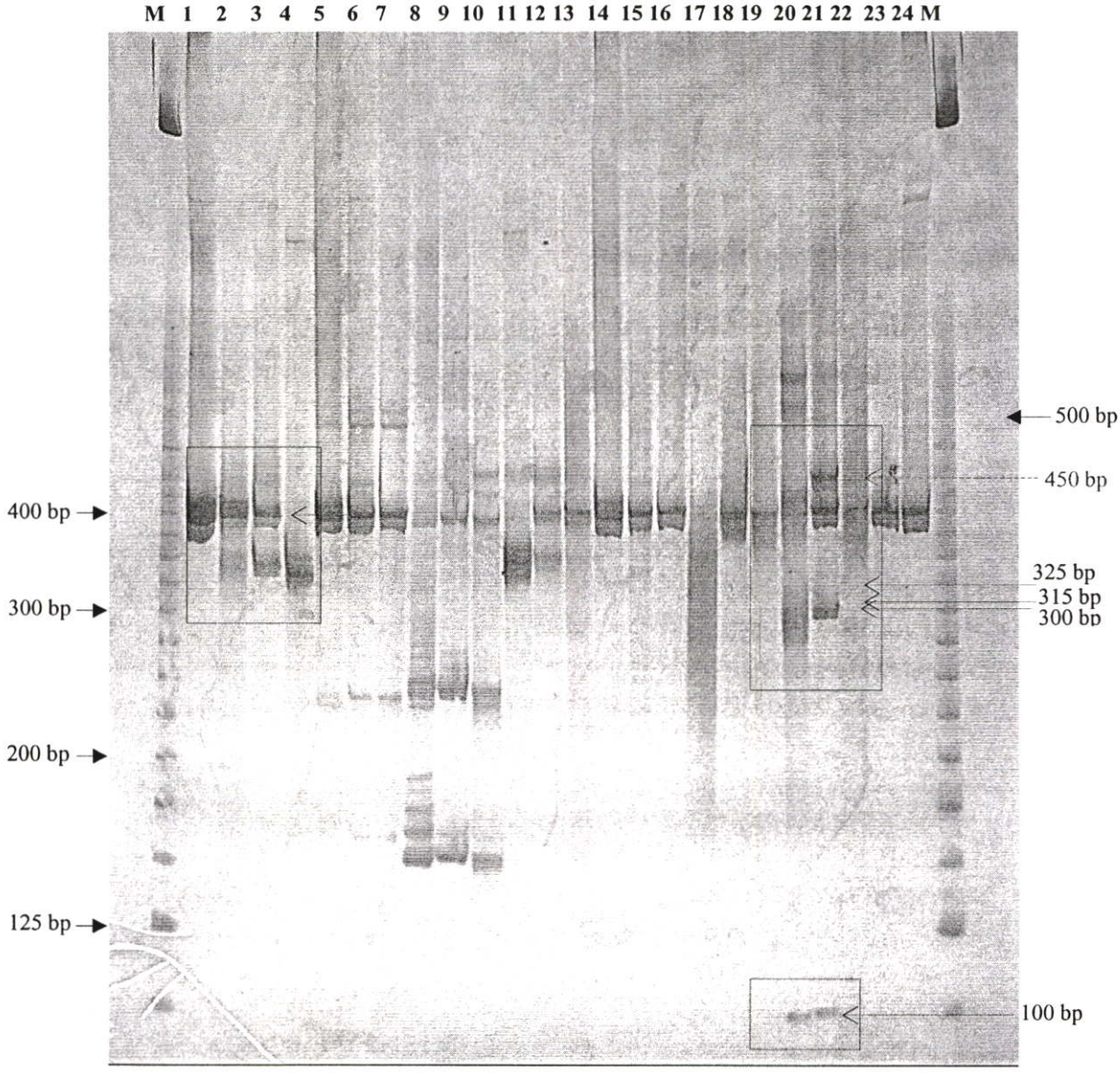
ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS14 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 เท่านั้น

เอนไซม์ *Hin*dIII และ *Hae*II ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ฟิวแซนท์ DPS12 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 (รูปที่ 4.31) แต่เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 115/355, 125/345, 145/325 และ 200/270 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS12 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 350/120 และ 375/95 คู่เบส เอนไซม์ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 165/305, 175/295, 180/290, 250/220 และ 370/100 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS12 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 165/305, 245/225, 250/220, 345/125 และ 370/100 คู่เบส ตัดดีเอ็นเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 165/305 และ 235/235 คู่เบส เอนไซม์ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 7 ชิ้นที่ตำแหน่ง 150/320, 165/305, 180/290, 240/230, 250/220, 255/215 และ 295/175 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS12 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 155/315, 250/220, 265/205, 275/195 และ 295/175 คู่เบส เอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 240/230, 245/225, 350/120 และ 370/100 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS12 ได้ 2 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/370 และ 360/110 คู่เบส และเอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดบดสายพันธุ์ P ได้ 4 ชิ้นที่ตำแหน่ง 100/370, 125/345, 275/195 และ 310/160 คู่เบส ตัดดีเอ็นเอฟิวแซนท์ DPS12 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ 5 ชิ้นที่ตำแหน่ง 105/365, 150/320, 290/180, 325/145 และ 350/120 คู่เบส แต่ทั้งหมดนี้ไม่สามารถบ่งชี้ความเป็นลูกผสมระหว่างเห็ดบดสายพันธุ์ P ฟิวแซนท์ DPS12 และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ได้ และเนื่องจากใช้เวลาในการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสนาน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI, *Dde*I, *Sau*3AI และ *Hae*III อาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหลุดเจลไป อย่างไรก็ตามผลของ PCR/RFLP ของคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ให้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS12 เหมือนกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 เท่านั้น



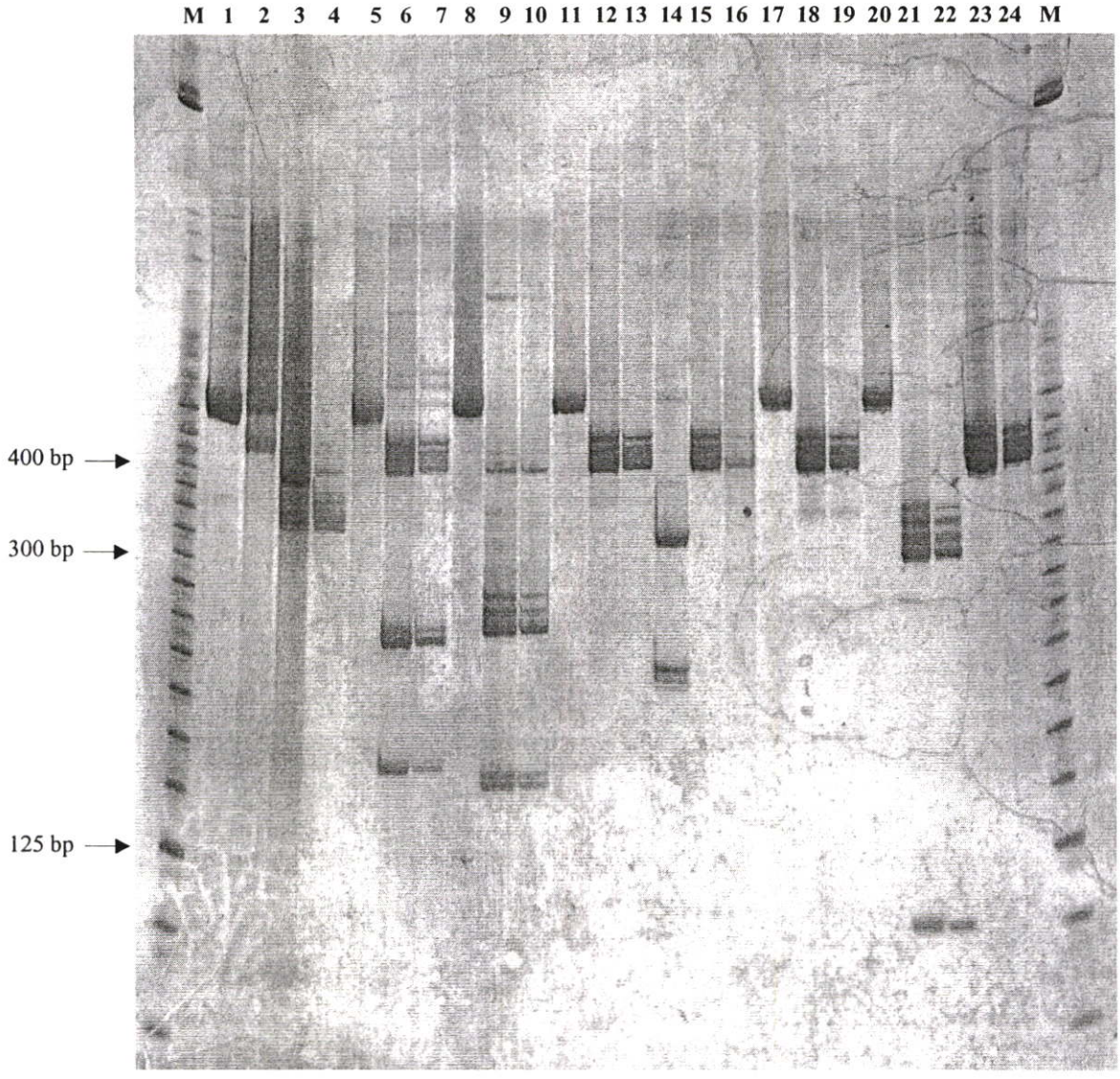
รูปที่ 4.24 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E, DES7 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DES7 (ตัวควบคุม), 24 = S3 (ตัวควบคุม)



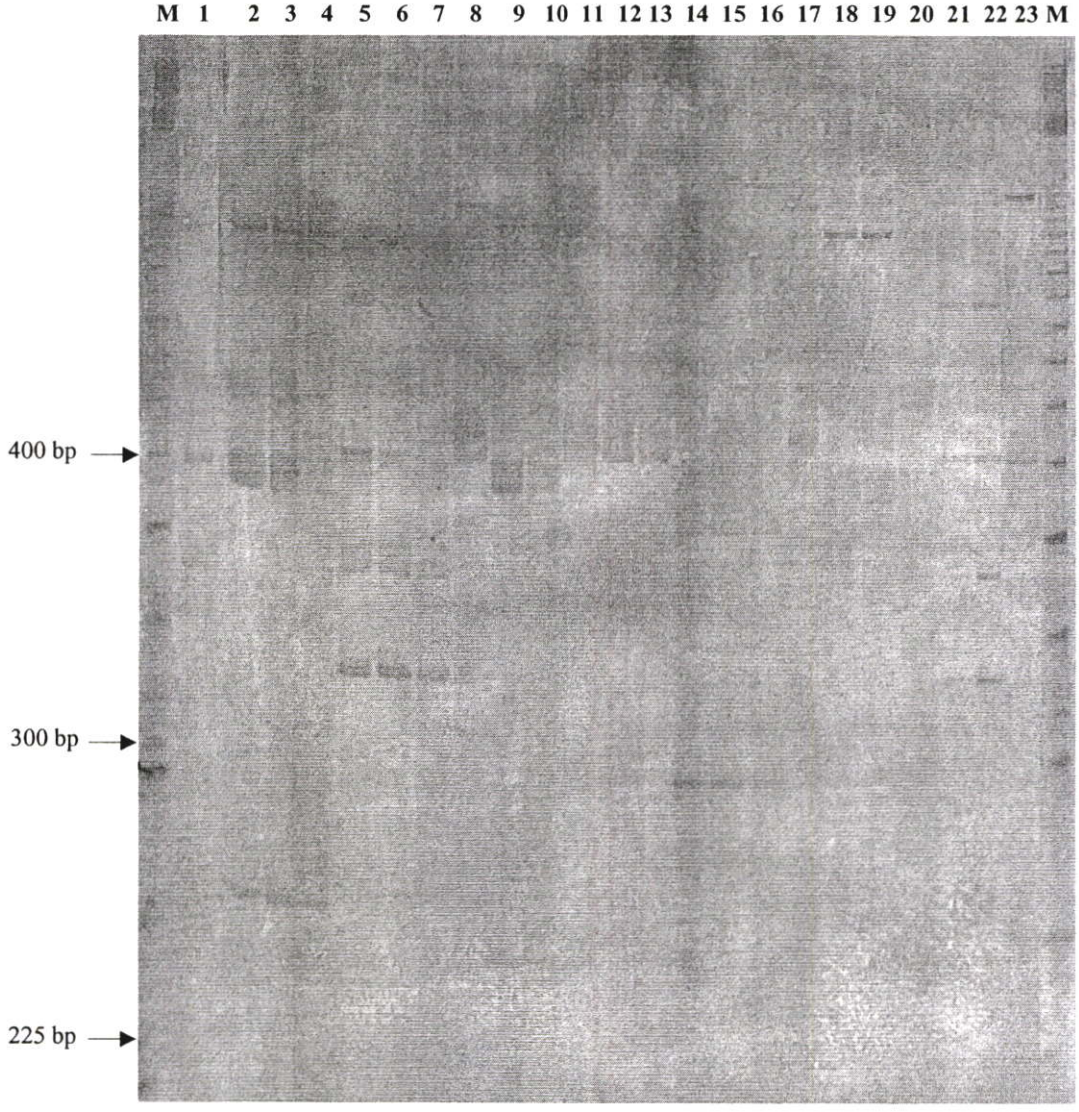
รูปที่ 4.25 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P, DPS8 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI และ *Hae*III และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DPS8 (ตัวควบคุม), 24 = S1 (ตัวควบคุม)



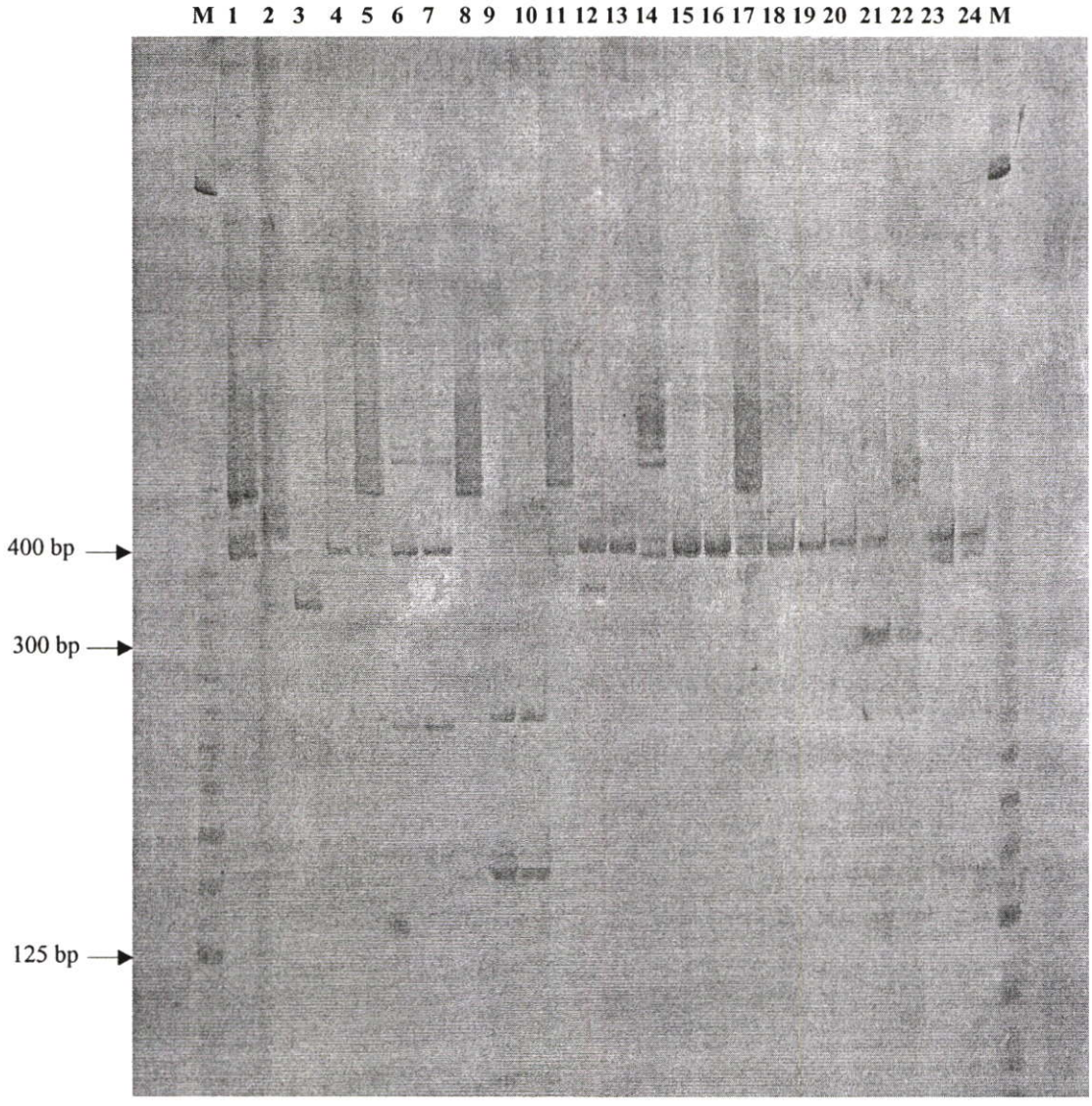
รูปที่ 4.26 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E22, MES6 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E22 (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = MES6 (ตัวควบคุม), 24 = S11 (ตัวควบคุม)



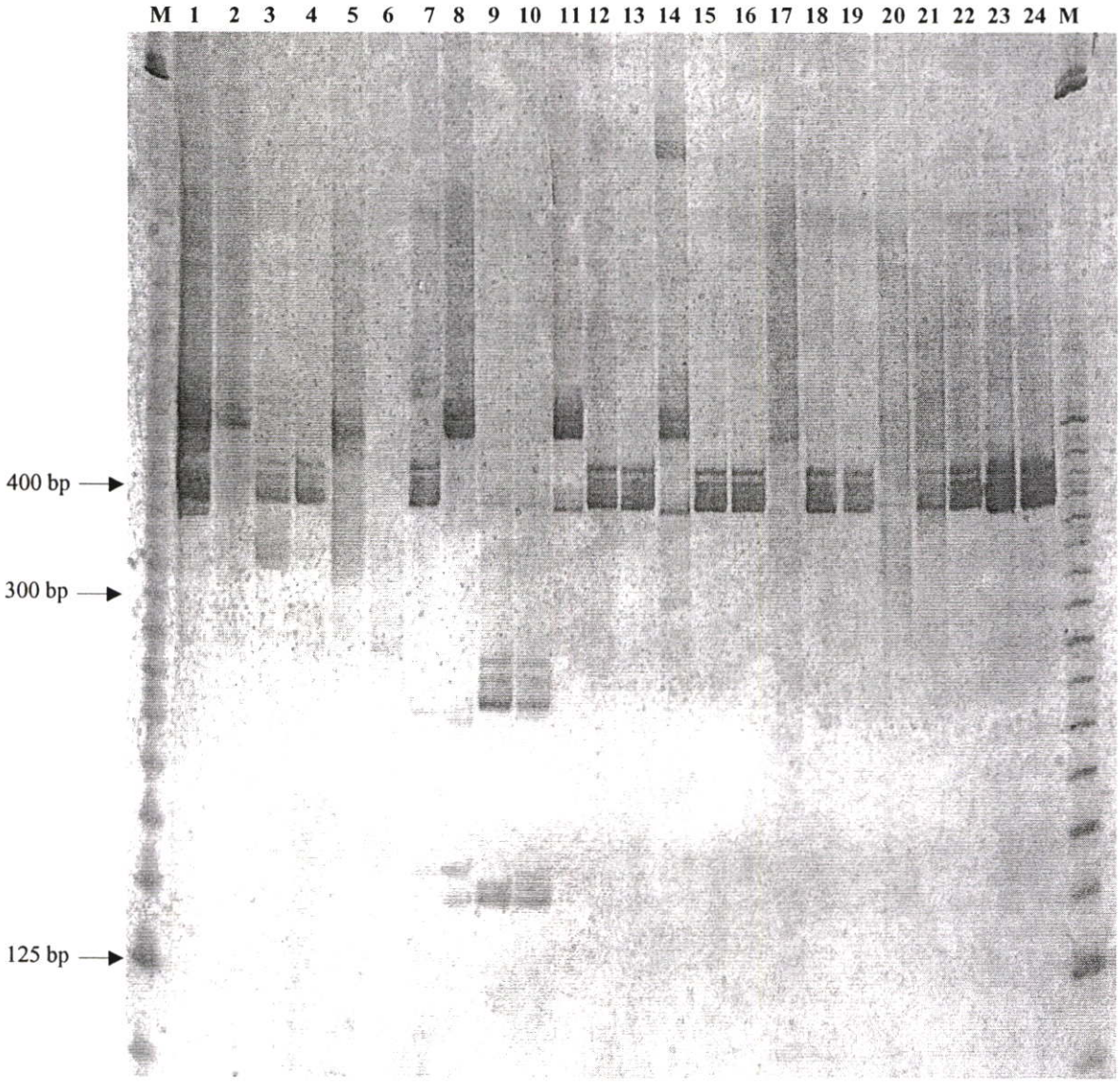
รูปที่ 4.27 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P7, MPS19 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P7 (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = H*ae*II, 20,21,22 = H*ae*III, 23 = S11 (ตัวควบคุม)



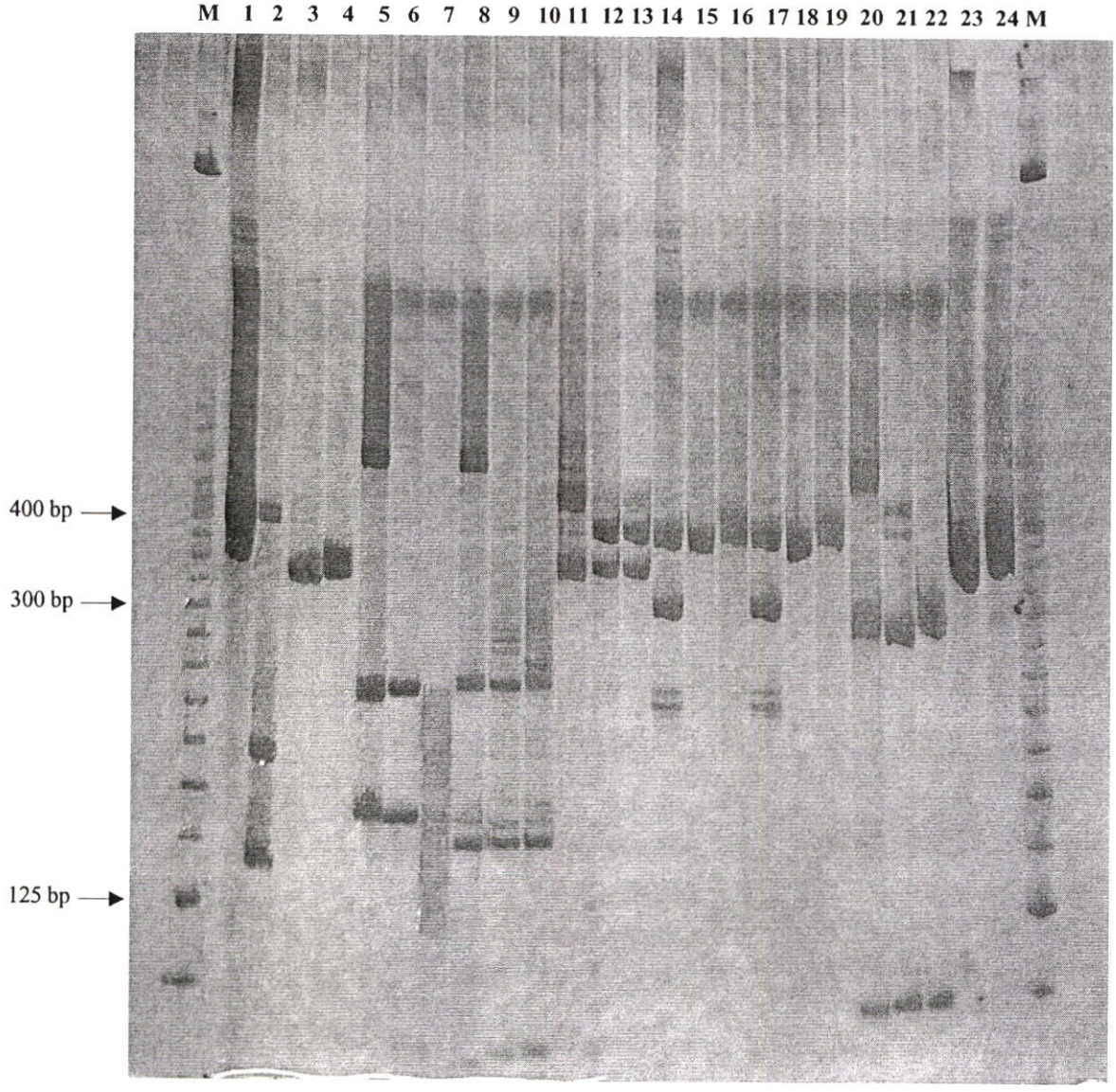
รูปที่ 4.28 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E, DES1 และ S1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DES1 (ตัวควบคุม), 24 = S1 (ตัวควบคุม)



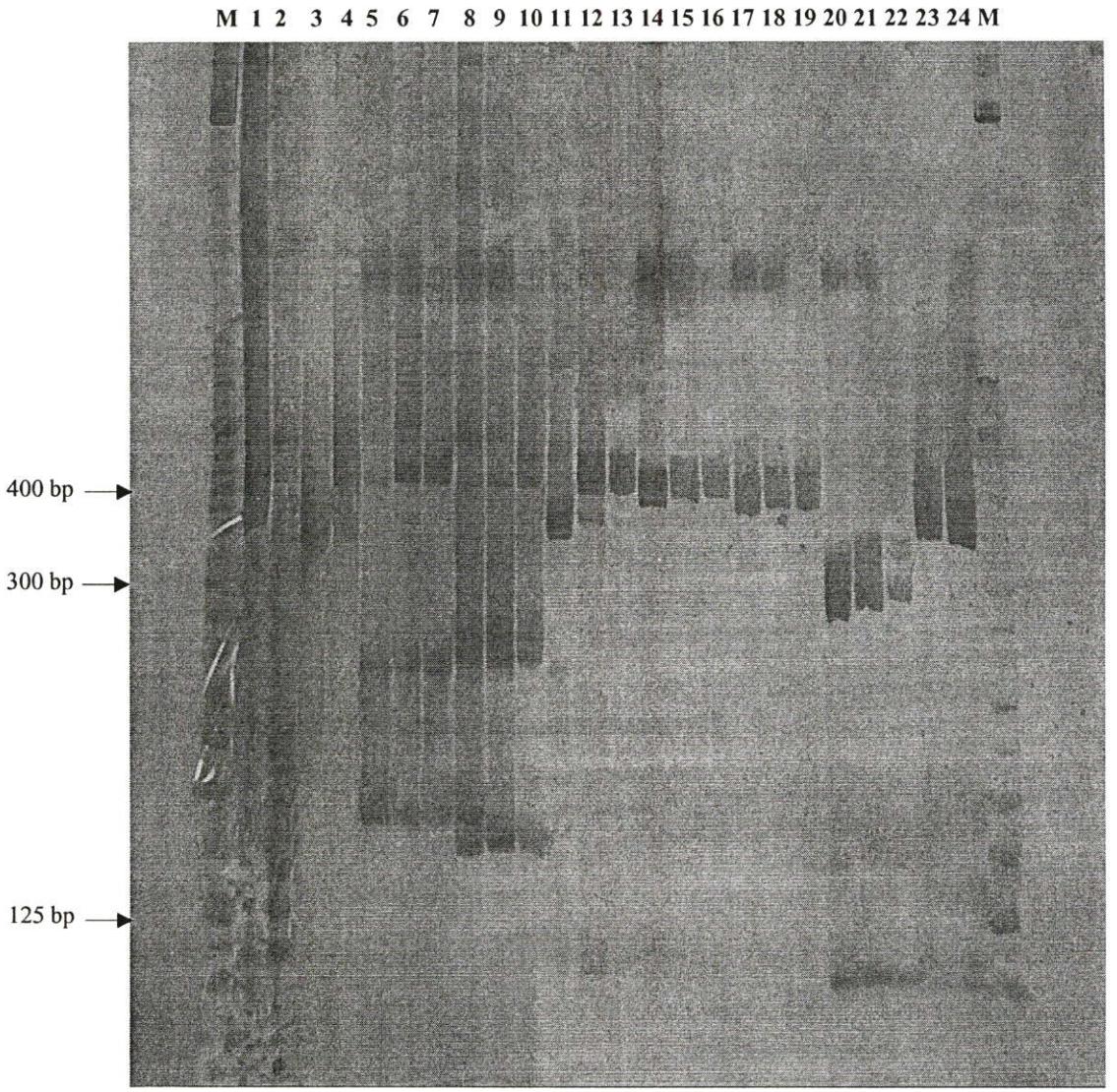
รูปที่ 4.29 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ E, DES5 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = E (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DES5 (ตัวควบคุม), 24 = S11 (ตัวควบคุม)



รูปที่ 4.30 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P, DPS14 และ S3 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DPS14 (ตัวควบคุม), 24 = S3 (ตัวควบคุม)



รูปที่ 4.31 ผลของอิเล็คโทรโฟรีแกรมจาก PCR/RFLP คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ของสายพันธุ์ P, DPS12 และ S11 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ และแยกขนาดด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

กำหนดให้ M = marker, 1 = P (ตัวควบคุม), 2,3,4 = *Hin*fI, 5,6,7 = *Dde*I, 8,9,10 = *Sau*3AI, 11,12,13 = *Eco*RI, 14,15,16 = *Hin*dIII, 17,18,19 = *Hae*II, 20,21,22 = *Hae*III, 23 = DPS12 (ตัวควบคุม), 24 = S11 (ตัวควบคุม)

ตารางที่ 4.10 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 ด้วยวิธี PCR/RFLP จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2

ฟิวแซนท์	ชนิดของเอนไซม์						
	*Hin*fI	*Dde*I	*Sau*3AI	*Eco*RI	*Hin*dIII	*Hae*II	*Hae*III
MES6	×	×	×	×	×	×	×
MPS19	×	×	×	×	×	×	×
DES1	×	×	×	×	×	×	×
DES7	×	×	×	×	×	×	×
DES5	×	×	×	×	×	×	×
DPS8	×	×	×	×	×	×	×
DPS14	×	×	×	×	×	×	×
DPS12	×	×	×	×	×	×	×

หมายเหตุ / สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

× ไม่สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตารางที่ 4.11 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 ด้วยวิธี PCR/RFLP จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4

ฟิวแซนท์	ชนิดของเอนไซม์						
	*Hin*fI	*Dde*I	*Sau*3AI	*Eco*RI	*Hin*dIII	*Hae*II	*Hae*III
MES6	×	×	/	×	×	×	×
MPS19	×	×	×	×	×	×	×
DES1	×	×	×	/	×	×	×
DES7	×	×	×	×	×	×	×
DES5	×	×	×	×	×	×	×
DPS8	×	×	×	×	×	×	×
DPS14	×	×	×	×	×	×	×
DPS12	×	×	×	/	×	×	×

หมายเหตุ / สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

× ไม่สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตารางที่ 4.12 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ MES6, MPS19, DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 ด้วยวิธี PCR/RFLP จากคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4

ฟิวแซนท์	ชนิดของเอนไซม์						
	*Hin*fI	*Dde*I	*Sau*3AI	*Eco*RI	*Hin*dIII	*Hae*II	*Hae*III
MES6	×	×	×	×	×	×	×
MPS19	×	×	×	×	×	×	×
DES1	×	×	×	×	×	×	×
DES7	×	×	/	×	×	×	×
DES5	×	×	×	×	×	×	×
DPS8	/	×	×	×	×	×	/
DPS14	×	×	×	×	×	×	×
DPS12	×	×	×	×	×	×	×

หมายเหตุ / สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

× ไม่สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซิสจาก PCR/RFLP ของสายพันธุ์เห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์ด้วยไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 พบว่าไม่สามารถบ่งชี้ความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ได้ ส่วนไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 สามารถบ่งชี้ความเป็นลูกผสมของ MES6 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI กับ DES1 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ DPS12 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และจากการใช้ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 พบว่าสามารถบ่งชี้ฟิวแซนท์ที่เป็นลูกผสมได้ใน DES7 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI และ DPS8 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI และ *Hae*III

ส่วนฟิวแซนท์ MPS19, DES5 และ DPS14 ไม่สามารถบ่งชี้ความเป็นลูกผสมเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซิสจาก PCR/RFLP บริเวณ ITS ได้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองนี้ได้ทำการสร้างเห็ดลูกผสมระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว เห็ดหอมกับเห็ดบดและเห็ดขอนขาวกับเห็ดบดด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional method) แบบ mon-mon mating และ di-mon mating จากสายพันธุ์โมโนคาริออนที่ทราบ mating type และสายพันธุ์ไดคาริออน แล้วคัดเลือกฟิวแซนท์จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ MES6 และ MPS19 เป็นฟิวแซนท์จากวิธี mon-mon mating ที่เกิดจากเห็ดหอมที่มี mating type เป็น A_2B_1 กับเห็ดขอนขาวที่มี mating type เป็น A_1B_2 และเห็ดบดที่มี mating type เป็น A_2B_1 กับเห็ดขอนขาวที่มี mating type เป็น A_1B_2 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่เกิดจากวิธี di-mon mating ได้แก่ DES1 DES7 และ DES5 เป็นฟิวแซนท์ที่เกิดจากเห็ดหอมสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวที่มี mating type เป็น A_1B_1 , A_2B_2 , A_1B_2 และสายพันธุ์ DPS8, DPS14 และ DPS12 เป็นฟิวแซนท์ที่เกิดจากเห็ดบดสายพันธุ์ไดคาริออนกับเห็ดขอนขาวที่มี mating type เป็น A_1B_1, A_2B_2 และ A_1B_2 ตามลำดับ

เมื่อนำเส้นใยฟิวแซนท์ MES6 ที่เกิดจากสายพันธุ์ที่มีชนิดของเพศต่างกันจึงสามารถผสมเข้ากันได้ มาขยายปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่าง ใช้เวลาในการเจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างประมาณ 5 วัน ซึ่งเร็วกว่าเห็ดหอมที่ใช้เวลา 20-25 วัน และเห็ดขอนขาวใช้เวลา 7 วัน ในการเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูป เมื่อเกิดดอกมีลักษณะสัณฐานส่วนใหญ่คล้ายเห็ดขอนขาวมากกว่าเห็ดหอม ฟิวแซนท์ MPS19 เกิดจากสายพันธุ์ที่มีชนิดของเพศต่างกันจึงสามารถผสมเข้ากันได้ และเกิดดอกมีลักษณะสัณฐานส่วนใหญ่เหมือนเห็ดขอนขาวและเห็ดบด พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ใช้เวลาในการออกดอกประมาณ 70-94 วัน ส่วนเส้นใย DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 ใช้เวลาเจริญจนเต็มบนอาหารแข็งประมาณ 5 วัน เมื่อนำเส้นใยฟิวแซนท์มาขยายปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่างใช้เวลาประมาณ 5 วัน และใช้เวลาในการออกดอกประมาณ 149-158 วัน จากผลการทดลองจะเห็นว่าฟิวแซนท์จากวิธี di-mom mating ใช้เวลาในการออกดอกนานกว่าฟิวแซนท์จากวิธี mom-mom mating ตามทฤษฎีแล้วฟิวแซนท์จากวิธี di-mon mating ควรพัฒนาเส้นใยจนสามารถเกิดดอกได้เร็ว เนื่องจากเป็นการจับคู่ผสมกันระหว่างเส้นใยไดคาริออนกับเส้นใยโมโนคาริออน ฟิวแซนท์ที่ได้จึงควรมีความสมบูรณ์แข็งแรง แต่ปรากฏว่าฟิวแซนท์จากวิธี di-mom mating ใช้เวลาในการเกิดดอกนานกว่าวิธี mom-mom mating ทั้งนี้ช่วงเวลาในการทำการทดลองน่าจะมีผลต่อการออกดอกของฟิวแซนท์ในห้องทดลอง โดยได้ทำการเพาะฟิวแซนท์จากวิธี mom-mom mating ในช่วงฤดูร้อน อุณหภูมิห้องเฉลี่ยประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเห็ดขอนขาวและเห็ดบด ในขณะที่เพาะฟิวแซนท์จากวิธี di-mom mating ในช่วงฤดูหนาว อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส ทำให้มีความชื้นในวัสดุเพาะมากเกินไป เส้นใยเห็ดจึงเจริญเติบโตช้าและเดินไม่เต็มก้อน

โดยความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดควรมีความชื้นระหว่างร้อยละ 60-75 เชื้อเห็ดจึงจะเจริญเติบโตได้ดี ด้วยเหตุนี้อาจทำให้การเจริญเติบโตของเส้นใยฟิวแซนท์ในก้อนเชื้อชะลอไปบ้าง อีกทั้ง Boulianne และคณะ (2000) ได้ศึกษาการเกิดดอก ของ *Coprinus cinereus* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม แสงที่พอเหมาะ และการที่เส้นใยใช้แหล่งอาหารในวัสดุเพาะจนหมดไป มีผลต่อการพัฒนาเส้นใยจนเกิดเป็นดอกเห็ดได้แตกต่างกันในเห็ดแต่ละชนิด และรายงานของ Stevens (ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์) ที่เพาะเห็ด *Coprinus lagopus* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืด 2 วัน แล้วย้ายไปวางที่อุณหภูมิประมาณ 26-27 องศาเซลเซียส ในที่มีแสง ปรากฏว่าเส้นใยสามารถเกิดดอกได้หลังจากนั้นประมาณ 7-10 วัน

ผลของคู่ผสมที่มีการสร้างแคลมป์สมบูรณ์ แต่ไม่สามารถพัฒนาเส้นใยต่อไปจนเกิดดอกได้ ได้แก่ ฟิวแซนท์สายพันธุ์ MES3 (เห็ดหอมที่มีชนิดของเพศเป็น A_2B_2 กับเห็ดขอนขาวที่เป็น A_1B_1) และสายพันธุ์ MPS16 (เห็ดขอนขาวที่มีชนิดของเพศเป็น A_1B_1 กับเห็ดบดที่เป็น A_2B_2) อาจเนื่องมาจากโปรตีนบางชนิดที่ควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับการผสมพันธุ์ในเห็ดรา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Stevens กล่าวว่าเส้นใยบางส่วนมีนิวเคลียสชนิดแฮพลอยด์ ทำหน้าที่เป็นตัวให้นิวเคลียสอย่างเดียว แต่ไม่สร้างเส้นใยตัวเองให้เป็นไดคาริออน จึงไม่สามารถพัฒนาเส้นใยต่อไปจนเข้าสู่ระยะตติยภูมิ และไม่พัฒนาเส้นใยให้กลายเป็นดอกเห็ด แม้เส้นใยของคู่ผสมจะเป็นเส้นใยที่มี mating type ต่างกันสามารถผสมเข้ากันได้ก็ตาม ส่วนฟิวแซนท์ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว และเห็ดหอมกับเห็ดบด พบว่าแตกต่างจากทฤษฎีของ Buller ใน Rapper (1966) เพราะฟิวแซนท์ที่ได้เกิดจากคู่ผสมที่มีการจับคู่กันของสายพันธุ์ที่มี mating type เหมือนกัน (incompatibility) โดยเป็น common-AB ได้แก่ MES1 และ MEP10 เป็น common-A ได้แก่ MES5 และ MPS9 และ common-B ได้แก่ MES2 และ MES8 ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการผสมพันธุ์ด้วยวิธี mon-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว และเห็ดหอมกับเห็ดบด ผลของการผสมพันธุ์เมื่อคำนึงถึงชนิดของเพศ (mating type) ของคู่ผสม จะไม่เหมือนกับผลของการผสมพันธุ์ของคู่ผสมที่เป็นเห็ดชนิดเดียวกัน (interspecific) ในขณะที่การผสมพันธุ์ด้วยวิธี mon-mon mating ระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดบด ผลของการผสมพันธุ์เมื่อคำนึงถึงชนิดของเพศของคู่ผสม จะเหมือนกับผลของการผสมพันธุ์ของคู่ผสมที่เป็นเห็ดชนิดเดียวกัน และจาก Flexer (1969) ได้รายงานผลการทดลองของ Berk. and Curt ที่เปรียบเทียบการผสมพันธุ์ของ *Hymenomycete sp.* กับ *Polyporus palustris* ที่เส้นใยมีความเข้ากันและไม่เข้ากัน ทำให้เกิดเส้นใยแบบไดคาริออน, และเส้นใยประเภทเฮทเทอโรคาริออนที่มี common (common-factor heterokaryons) ได้ และยังพบว่าการชนกันของเส้นใยที่ไม่เข้ากัน (incompatibility) จะเกิดนิวเคลียสภายในเส้นใยเป็นประเภทโฮโมคาริออน อีกทั้งการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสสามารถเกิดขึ้นได้หลายตำแหน่ง การจับคู่ การชนกันของเส้นใยและการแบ่งนิวเคลียสไม่สมบูรณ์ก็สามารถเกิดขึ้นได้ และยีนของ *P. palustris* อาจมีอัลลีลย่อยที่ทำให้เส้นใยที่ไม่เข้ากันสามารถผสมกันได้ แต่สาเหตุของผสมเข้ากันได้ยังไม่สามารถอธิบายได้ สอดคล้องกับ Swamy และคณะ (1984) พบว่าการผสมพันธุ์เห็ด *C. cinereus* มี

โอกาสที่ mating type ที่ตำแหน่งอัลลีล A และ B สามารถพัฒนาเส้นใยประเภทโฮโมคาริออนภายในอัลลีลของตัวเองให้ผสมกันได้ แล้วสร้างเส้นใยประเภทโฮโมคาริออนที่เกิดดอก แต่โอกาสที่จะเกิดขึ้นได้น้อยครั้งมาก และ Middleton (1964) รายงานว่าการผสมเส้นใยของนิวเคลียสแบบเฮทเทอโรคาริออนที่มีการชนกันแบบ common AB สามารถสร้างฟิวแซนท์ที่เกิดดอกได้ แต่จะเกิดได้ยากและใช้เวลานาน จากนั้นนำเส้นใยของฟิวแซนท์ที่เป็น common AB ไปเลี้ยงเชื้อต่อในอาหารสูตรปกติ 7 ครั้ง ภายในเวลา 10 เดือน พบว่าฟิวแซนท์ดังกล่าวก็ยังคงเกิดดอกได้ จึงเป็นไปได้ที่ยีนในระบบเพศของเห็ดรามีอัลลีลอีกประเภทหนึ่งที่ทำหน้าที่ควบคุมการผสมพันธุ์ แม้ยีนนั้นจะมีระบบเพศที่เข้ากันได้หรือไม่เข้ากันก็ตาม จึงทำให้เกิดฟิวแซนท์จากคู่ผสมของสายพันธุ์ที่มี mating type เหมือนกันและต่างกัน อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับความแปรปรวนของ multiple alleles ที่ควบคุมความเข้ากันได้ทางเพศในเห็ดรา ดังรายงานที่พบว่าเห็ดราในชั้น hymenomycetes มีความแปรปรวนของ multiple alleles มากกว่า 100 อัลลีล (Whitehouse. 1949) และคู่ผสมพันธุ์ที่ฟิวแซนท์เกิดจาก mating type เหมือนกันและต่างกันบางสายพันธุ์ มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นเล็กมาก ไม่สมบูรณ์ และเกิดแคลมป์เทียมเส้นใยจะมีลักษณะผอม เล็ก คล้ายเส้นใยโมโนคาริออน ฟิวแซนท์จึงไม่สมบูรณ์ อ่อนแอ ไม่มีความเสถียรและไม่เกิดดอกเมื่อทำการต่อเชื้อในรุ่นถัดไป เพราะนิวเคลียสที่เกิดการรวมกันระหว่างคู่ผสมพันธุ์ อาจมีการสลายตัวไปกลายเป็นเส้นใยโมโนคาริออนได้ Stevens พบว่าคู่ผสมพันธุ์ที่เป็น common B heterokaryons เส้นใยจะสร้างแคลมป์เทียม โดยเฉพาะที่ปลายเส้นใยนิวเคลียสจะมีสภาพเป็นเฮทเทอโรคาริออน แต่ส่วนอื่นของเส้นใยนิวเคลียสจะเป็นโฮโมคาริออน สอดคล้องกับ Jennings (1996) กล่าวว่านิวเคลียสที่มีอัลลีลแตกต่างกันมารวมกัน และอัลลีลของตัวมันเองไม่สัมพันธ์กัน อัลลีลนั้นจึงเข้ากันไม่ได้ นิวเคลียสอาจเคลื่อนตัวอยู่ห่างกันออกไป เนื่องจากนิวเคลียสมีการแลกเปลี่ยนกันตลอดชั่วอายุของตลอดเส้นใย เมื่อมีการแบ่งนิวเคลียสในระยะไมโอซิสหลายๆ ครั้ง อาจทำให้อัตราส่วนของเส้นใยไดคาริออนลดลงได้ ตามทฤษฎีของ Buller (1966) ได้อธิบาย somatic recombination ที่ไม่เข้ากันจากวิธี di-mon mating ไว้ว่า เมื่อนำเส้นใยคู่ผสมที่มี mating type ไม่เข้ากันมาผสมกัน เส้นใยรุ่นลูกที่มียีน A อัลลีลของยีน A สามารถเคลื่อนที่ไปจับกับอัลลีลใดๆได้อย่างอิสระ แต่ยีน B กับอัลลีลของยีน B จะมีการเคลื่อนที่ไม่สม่ำเสมอแตกต่างกัน ทำให้เส้นใยไม่สามารถผสมกันได้ ซึ่งตรงกับ Gans และ Homme (1958) ที่ทดลองกับ *C. fimetarius*

จากการนำเส้นใยเห็ดทุกสายพันธุ์มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 แล้วตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอบนเจลอะกาโรส พบว่าเส้นใยจากเห็ดหอมสายพันธุ์ E มีขนาด 650 และ 717 คู่เบส เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 มีขนาด 400 และ 470 คู่เบส แสดงว่าเห็ดหอมสายพันธุ์ E มีเส้นใยเป็นแบบไดคาริออนที่มีนิวเคลียสภายในเซลล์ 2 นิวเคลียสที่ต่างชนิดกัน คือเป็นเส้นใยประเภทเฮทเทอโรคาริออน (พรรณี ฐิตาภิชิต. 2548)

เมื่อตรวจสอบฟิวแซนท์ 8 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับเห็ดหอม เห็ดขอนขาวและเห็ดบด ด้วยวิธี PCR/RFLP จากคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ปรากฏว่าสายพันธุ์ MES6 สามารถตรวจความเป็นลูกผสม

ได้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI โดยตรวจพบแถบดีเอ็นเอ MES6 ที่ตรงกับแถบดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 ที่ตำแหน่ง 250 คู่เบส และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 ที่ตำแหน่ง 256 คู่เบส สายพันธุ์ DES1 ตรวจความเป็นลูกผสมได้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ตรวจพบตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ตรงกับเห็ดหอมสายพันธุ์ E ที่ตำแหน่ง 588 คู่เบส และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ที่ตำแหน่ง 330, 345, 570, 600 และ 605 คู่เบส สายพันธุ์ DPS12 ตรวจความเป็นลูกผสมได้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ตรวจพบตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ตรงกับเห็ดบดสายพันธุ์ P ที่ตำแหน่ง 325 คู่เบส และเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S11 จำนวน 2 ตำแหน่งคือ 350 และ 375 คู่เบส ส่วนคู่ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 สามารถตรวจความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ DES7 ได้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI โดยตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ E ที่ตำแหน่ง 275 คู่เบส และตรงกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S3 ที่ตำแหน่ง 160, 165 และ 240 คู่เบส อีกทั้งตรวจพบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ DPS8 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับเห็ดบดสายพันธุ์ P ที่ ตำแหน่ง 400 คู่เบส แสดงว่าฟิวแซนท์ DPS8 มีดีเอ็นเอของเห็ดบดจึงยืนยันความเป็นลูกผสมระหว่างเห็ดบดสายพันธุ์ P กับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ได้ ในขณะที่เอนไซม์ชนิดอื่นตัดดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ DPS8 ตรงกับแถบดีเอ็นเอของเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 และเอนไซม์ *Hae*III สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับเห็ดบดสายพันธุ์ P ที่ตำแหน่ง 100, 300, 315, 325 และ 400 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ S1 ที่ตำแหน่ง 450 คู่เบส

จากการตรวจสอบลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดหอม เห็ดขอนขาวและเห็ดบดโดยใช้สัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล สามารถยืนยันความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ได้ตรงกัน 2 สายพันธุ์คือ MES6 กับ DES7 ในขณะที่ผลการตรวจสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ไม่สามารถตรวจความเป็นลูกผสมได้ อาจเนื่องมาจากบริเวณระหว่างไพรเมอร์ ITS1 กับระหว่างไพรเมอร์ ITS2 บนสายดีเอ็นเอเป็นช่วงที่มีความแปรปรวนต่ำและมีขนาดสั้น ทำให้มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวนน้อยชนิดที่สามารถจดจำได้ ดังรายงานของ Vilgalys Lab (1999) สนับสนุนว่าไพรเมอร์บริเวณ ITS เหมาะกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา และเห็ดราในชั้นแบซิดิโอมัยซิทิสที่อยู่ในระหว่างสกุลหรือภายในชนิดได้ดี เช่น เชื้อราในกลุ่มเอคโตมัยคอไรซา ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นไพรเมอร์ที่ลอกรหัสยีนบริเวณระหว่าง SSU และ LSU ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ Uetake และคณะ (2002) รายงานว่าเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นของเชื้อราก่อโรครากเน่าม่วงบริเวณ ITS ระหว่างไรโบโซมอลชนิด 5.8S rDNA ซึ่งเป็นบริเวณที่มีจำนวนชุดซ้ำกันสูง มีความหลากหลายของลำดับเบสประมาณ 490-512 คู่เบส และเบสมีช่วงความเหมือนตั้งแต่ร้อยละ 81.8-98.2 แต่ไพรเมอร์ ITS1 เป็นส่วนที่ลำดับเบสมีความหลากหลายเพียง 124-131 คู่เบส และเบสมีความเหมือนประมาณร้อยละ 82.8-97.7 ส่วน ITS2 มีลำดับเบสประมาณ 212-241 คู่เบส และมีความเหมือนประมาณร้อยละ 69.7 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและแม่ด้วยไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 จึงอาจลอกรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ที่น่าจะมียีนของเห็ดสายพันธุ์แม่ และสายพันธุ์ฟิวแซนท์ที่มียีนส่วนของแม่ได้มากกว่า อีกทั้ง

Kuhls และคณะ (1996) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของราที่มีความแตกต่างระหว่างชนิด (intraspecific) ของ *Trichoderrma reesei* และ *Hypocrea jecorina* ด้วยวิธี PCR fingerprinted แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ribosomal DNA ระหว่าง ITS1 กับ ITS2 และยีนบริเวณ *rRNA* พบว่าราทั้ง 2 ชนิดจัดอยู่ในชั้นเดียวกัน และจากการทำ phylogenetic ระหว่าง *T. reesei* กับ *H. jecorina* และ *T. longibrachiatum* พบว่า *T. reesei* มีวิวัฒนาการมาจาก clone line ที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของ *H. jecorina* ส่วนการตรวจสอบเห็ดราภายในชนิดเดียวกัน (interspecific) ด้วย ITS1 กับ ITS2 พบว่าสามารถตรวจสอบความสัมพันธ์กันได้น้อยมาก จึงคาดว่าการตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 กับ ITS2 ของยีน 5.8S rRNA อาจไม่เหมาะสมกับการตรวจสอบความสัมพันธ์ของราที่มีความแตกต่างภายในชนิด (interspecific) แต่สามารถจำแนกได้ดีกับราที่มีความแตกต่างระหว่างชนิด (intraspecific) ในขณะที่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 จะลอกรหัสยีน *rRNA* ขนาด 5.8S ซึ่งเหมาะกับเชื้อรากลุ่ม dikaryomycota โดยดีเอ็นเอเป้าหมายจะเริ่มจับกับไพรเมอร์ ITS1 และไปสิ้นสุดที่ไพรเมอร์ ITS4 อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่จำแนกได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น เชื้อราในชั้นแอสโคมัยซิทิสและพืชได้อีกหลายชนิด (Martin and Rygiewicz. 2005) Gonzalez และ Labarere (2000) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของยีนจาก *Pleurotus* sp. โดยตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณ mitochondrial SSU ของ rRNA ชนิด 18S-28S สามารถจำแนกสัณฐานและตรวจสอบ phylogeny ของ *Pleurotus* sp. แต่ละชนิดในระดับ basidiomycota ได้ดี เพราะสามารถจำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ ตำแหน่งที่เป็นเครื่องหมายเฉพาะของเห็ดราแต่ละชนิดได้ดี ส่วน Glen และคณะ (2001) ได้จำแนกชนิดของเชื้อราในกลุ่มเอคโตมัยคอไรซ่า จากป่ายูคาลิปตัสในประเทศออสเตรเลีย ด้วยวิธี PCR/RFLP ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก *rRNA* บริเวณ LSU และสามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ 91 ชนิดจาก 28 ตระกูล

แต่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ มีส่วนในการตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมของเห็ดสายพันธุ์ฟิวแซนท์เปรียบเทียบกับพ่อแม่ เพราะเอนไซม์แต่ละชนิดมีความเฉพาะในการใช้งานกับเชื้อราต่างชนิดกัน (Barsotti *et.al.* 2002) โดยเมื่อนำผลผลิตจาก PCR/RFLP ของเห็ดฟิวแซนท์มาตรวจสอบบนเจลอะคริลาไมด์ ทำให้เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์กับพ่อและแม่ได้ จาก Chiu และคณะ (1996) ได้หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเห็ดหอม 19 สายพันธุ์ในประเทศจีน พบว่าเห็ดหอมสายพันธุ์ป่ามียีนที่เหมือนกับยีนในเห็ดหอมพันธุ์การค้า *Agaricus bisporus* และ *Volvariella volvacea* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

ส่วนผลการตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมของเห็ดหอม เห็ดบด เห็ดขอนขาวสายพันธุ์ต่างๆ และฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์ ปรากฏว่าเอนไซม์ทั้ง 7 ชนิดตัดชิ้นส่วนดีเอ็นของฟิวแซนท์ตรงกับขนาดดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดหอม เห็ดขอนขาว หรือเห็ดบดเท่านั้น อาจเป็นเพราะเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่แล้ว ทำให้ขยายปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดแตกต่างกันระหว่างเห็ดต่างสกุลและต่างชนิด เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงเป็นการยากที่จะตัดลำดับเบสของเห็ดฟิวแซนท์ได้ตรงกับเห็ดหอม เห็ดขอนขาว หรือเห็ดบด จากผลการทดลองพบว่าฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์

สามารถตรวจความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค PCR/RFLP ได้ 5 สายพันธุ์ได้แก่ MES6, DES1, DES7, DPS8 และ DPS12 ส่วน MPS19, DES5 และ DPS14 ไม่สามารถตรวจความเป็นลูกผสมได้ อาจเป็นเพราะฟิวแซนท์ดังกล่าวเกิดจากการรวมนิวเคลียสกันเอง ของสายพันธุ์เห็ดขอนขาวกับเห็ดขอนขาวหรือเห็ดบดกับเห็ดบด ทำให้ดอกเห็ดของฟิวแซนท์มีลักษณะของเห็ดขอนขาวหรือเห็ดบดเท่านั้น ดังนั้นหากเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมที่เกิดจาก *Lentinula edodes*, *Lentinus squarosulus* และ *L. polychrous* ด้วยวิธี AFLP หรือวิธีอื่น และประยุกต์ใช้ร่วมกับไพรเมอร์ชนิดอื่นน่าจะประสบความสำเร็จมากขึ้น

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. ฟิวแซนท์จากวิธี mon-mon mating และ di-mon mating ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวและเห็ดหอมกับเห็ดบด เกิดจากคู่ผสมที่มี mating type ตรงและต่างกัน ฟิวแซนท์ระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดบดเกิดจากคู่ผสมที่มี mating type ต่างกัน อาจเนื่องมาจากเห็ดหอมมียีนที่ควบคุมระบบเพศมากกว่า 1 ยีน

2. เส้นใยฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์ใช้เวลาประมาณ 5 วัน เจริญเต็มจานอาหารซึ่งเร็วกว่าเห็ดหอม เห็ดขอนขาวและเห็ดบดที่ใช้เวลาประมาณ 7 วัน และฟิวแซนท์ MES6 กับ MPS19 ใช้เวลาประมาณ 70-89 วันในการออกดอก ในขณะที่ฟิวแซนท์ DES1, DES7, DES5, DPS8, DPS14 และ DPS12 ใช้เวลาประมาณ 114-122 วันในการออกดอก และดอกเห็ดฟิวแซนท์ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวมีขนาดใหญ่กว่าดอกเห็ดขอนขาวจากสายพันธุ์คู่ผสมทั่วไป มีลักษณะคล้ายกับทั้งเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว ส่วนดอกเห็ดฟิวแซนท์ระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดบด ดอกมีลักษณะบานใหญ่กว่าเห็ดขอนขาวแต่เล็กกว่าเห็ดบดทั่วไป

3. เมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าฟิวแซนท์สายพันธุ์ MES6 ดอกมีรูปร่างกรวยตื้น ดอกเล็กบานสีขาวครีม สปอร์สีครีมอมน้ำตาล สปอร์รูปร่างยาวรี มีความคล้ายกับเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว ส่วน DES7 ดอกมีรูปร่างกรวยตื้น ดอกขนาดปานกลางสีน้ำตาลอ่อน สปอร์สีเหลืองครีม สปอร์รูปร่างยาวรี มีความคล้ายกับเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว และ DPS12 ดอกมีรูปร่างกรวยตื้น ดอกขนาดเล็กสีครีมเทา สปอร์สีเหลืองครีมอมน้ำตาล สปอร์รูปร่างยาวรี มีความคล้ายกับเห็ดขอนขาวและเห็ดบด

4. จากการตรวจสอบสายพันธุ์เห็ด E, E22, D, P7, S1, S3, S11 และฟิวแซนท์ทั้ง 8 สายพันธุ์ด้วยไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2, ITS1 กับ ITS4 และ ITS3 กับ ITS4 พบว่า

- ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 ดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 มีขนาดประมาณ 325 คู่เบส ส่วนเห็ดสายพันธุ์อื่นมีขนาดประมาณ 300 คู่เบส
- ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 ดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E มีขนาดประมาณ 650 และ 717 คู่เบส โดยนิวเคลียสภายในเซลล์มี 2 นิวเคลียสที่ต่างกันเป็นแบบเฮทเทอโรคาริออน และเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 มีขนาด 717 คู่เบส ส่วนเห็ดสายพันธุ์อื่นมีขนาดประมาณ 650 คู่เบส
- ไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 ดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ E มีขนาดประมาณ 400 และ 470 คู่เบส โดยนิวเคลียสภายในเซลล์มี 2 นิวเคลียสที่ต่างกันเป็นแบบเฮทเทอโรคาริออน

และเห็ดหอมสายพันธุ์ E22 มีขนาด 470 คู่เบส ส่วนเห็ดสายพันธุ์อื่นมีขนาดประมาณ 400 คู่เบส

5. จากการตรวจสอบ PCR/RFLP ของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์จากไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS2 พบว่าไม่สามารถบ่งชี้ความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ได้

6. จากการตรวจสอบ PCR/RFLP ของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์จากไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 พบว่าสามารถบ่งชี้ความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ MES6 เมื่อใช้เอนไซม์ *Sau*3AI กับ DES1 เมื่อใช้เอนไซม์ *Eco*RI และ DPS12 เมื่อใช้เอนไซม์ *Eco*RI

7. จากการตรวจสอบ PCR/RFLP ของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบดและฟิวแซนท์จากไพรเมอร์ ITS3 กับ ITS4 พบว่าสามารถบ่งชี้ความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ DES7 เมื่อใช้เอนไซม์ *Sau*3AI และ DPS8 เมื่อใช้เอนไซม์ *Hin*fI และ *Hae*III

8. ฟิวแซนท์ MPS19, DES5 และ DPS14 ไม่สามารถบ่งบอกความเป็นลูกผสมได้เมื่อตรวจสอบด้วย PCR/RFLP บริเวณ ITS

ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อให้ผลการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างเห็ดต่างชนิด หรือต่างสกุล หรือความเป็นลูกผสมมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ควรตรวจสอบบริเวณระหว่างชุดของยีน *rRNA* ที่เรียกว่า intergenic spacer (IGS) ร่วมด้วย หรืออาจใช้วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบบริเวณ ITS

2. การตรวจสอบสายพันธุ์ฟิวแซนท์ต่างๆ ที่เกิดจากสายพันธุ์เห็ดคู่เดียวกัน ควรใช้เทคนิคที่ให้รายละเอียดมาก เช่น เทคนิค AFLP (amplified fragment length polymorphism)

บรรณานุกรม

เกษม สร้อยทอง. 2529. **เห็ดราขนาดใหญ่ในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ. ศิริธรรมการพิมพ์.

จันทิมาภรณ์ นววงศ์วิวัฒน์. 2546. "สัณฐานวิทยาและระบบเพศของเห็ดบางชนิดในสกุล *Lentinus*." วิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นันทวดี คำสงค์. 2546. "การศึกษาระบบเพศของเห็ดบด." ปัญหาพิเศษ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ประภัสสร โชคสวนทรัพย์. 2540. "การผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว." วิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ. 2543. **พันธุศาสตร์.** ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรรณี ฐิตาภิชิต. 2548. "ระบบเพศของเห็ดรา." **;วารสารวิทยาศาสตร์ มก.** 23 (2-3) : 42-47.

พรรณี ฐิตาภิชิตและประภัสสร โชคสวนทรัพย์. 2539. "การแสดงเอกลักษณ์, การเพาะให้เกิดดอกและการแยกโปรโตพลาสต์ในเห็ดขอนขาว." **วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง.** 48-54.

พรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา. 2546. "การตรวจสอบลูกผสมสามสายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมเซลล์ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องบ่งชี้ทางโมเลกุล." วิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ภัทราภรณ์ อิสระทะ. 2540. "การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมสีเทาโดยการผสมพันธุ์." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

รัตเขตร์ เชยกลิ่น. 2545. "ความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดราขนาดใหญ่ในเขตศูนย์ศึกษาธรรมชาติและสัตว์ป่าเขาเขียว จังหวัดชลบุรี." วิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิริพร เดชะอูป. 2544. "การปรับปรุงพันธ์เห็ดหอมโดยการผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยนิวเคลียสคู่กับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สาทินี ซื่อตรง. 2546. "ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดกินได้บางชนิดในสกุล *Pleurotus*." วิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุมาลี พิชญางกูร (โตสุนทร). 2541. **เห็ดโคนและลูกผสมฟิวแสนท์.** โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. กรุงเทพฯ. 99-108.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุไรวรรณ วิจารณกุล. 2545. **ดีเอ็นเอเทคโนโลยี.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม, กรุงเทพฯ.

Aimi, T. *et. al.* 2002. "Cytological analysis of anastomoses and vegetative incompatibity reaction in *Helicobasidium mompa*." **Current microbiology.** 44 : 148-152.

Alexopoulos, C. J. and Mims, C. W. 1979. **Introductory Mycology.** 3rd ed. New york. : John Wiley & Sons.

Alexopoulos, C. J., Mims, C.W. and M. Blackwell. 1996. **Introductory Mycology.** New york. : John Wiley & Sons.

Anderson, L. 1998. "Identification and phylogeny of spore-cyst (*Ascosphaera* spp.) using ribosomal DNA sequences." **Mycological research.** 102 : 541-547.

Arima, T. and Morinaga, T. 1993. "Electrophoretic karyotype of *Lentinus edodes*." **Trans. Mycol.Soc.Japan.** 34 : 481-485.

Barsotti, O. *et.al.* 2002. "Identification of *Streptococcus mitis* group species by RFLP of the PCR-amplified 16S-23S rDNA Intergenic spacer." **Research in Microbiology.** 153 : 687-691.

Borchrs, A.T., *et.al.* 1999. "Mushrooms, tumors and immuniy." **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.** [Online]. Available : http://www.google.com

Boulianne, R. P. 2000. "Fruiting body development in *Coprinus cinereus* : regulated expression of two galectins secreted by a non-classical pathway." **Microbiology.** 146 : 1841-1853.

Buller. 1966. **The Buller Phenomenon, Internuclear Selection and Somatic Recombination in Genetics of Sexuality in Higher Fungi. In Raper, J. R. 1966.** New York : Harvard University ; The Ronald press.

Casselton, L. A. 2002. "Mate recognition in fungi." **Heredity.** 88 : 142-147.

Damono, T.W. and Burdsall Jr., H.H. 1992. "Morphological Characteristics of Incompatibility Reactions and Evidence for Nuclear Migration in *Armillaria mellea*." **Mycologia**. 84(3) : 367-375.

Drogemuller, M. *et.al.* 2004. "Amplification of ribosomal DNA of *Anoplocephalidae* : *Anoplocephala perfoliata* diagnosis by PCR as a possible alternative to coprological methods." **Veterinary Parasitology.** 124 : 205-215.

Fell, J.W. and Tallman, A. S. 1982. "Multiple Allelic Incompatibility Factors among Bifactorial Strains of Yeast *Leucosporidium* (candida) *Scotti*." **Current Microbiology (Historical Archive).** 7(4) : 213-215.

Flexer, A. S. 1969. "Bipolar Incompatibility in the *Hymenomycete Polyporus palustris.*" **American Journal of Botany.** 56 (4) : 410-417.

Fukuda, M. and Mori, Y. 2003. "Genetic difference in wild strain of *Lentinus edodes* collected from a single fallen tree." **Mycoscience.** 44(5) : 365-368.

Gonzalez, P. and Labarere, J. 2000. "Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit *rRNA* V4, V6 and V9 domains." **Microbiology.** 146 : 209-221.

Hughes, K.W. n.d. "Fungal Laboratory Techniques." Mycology homepage. [online]. Available : http:// www.google.com

Hull, C.M. Dividson, R.C. and Heitman, J. 2002. "Cell Identity and Sexual Development in *Cryptococcus neoformans* are controlled by the Mating type–Specific homeodomain protein Sxilα." **Genes & Development.** 12 : 3046-3060.

Ikeda, K.I. *et..al.* 2003. "Mycelial incompatibility operative in pairings between single basidiospore isolates of *Helicobasidium mompa.*" **Mycological research.** 107(7) : 847-853.

Jennings, D.H. 1998. "Fungal Biology:Understanding the fungal lifestyle." Bios scientific publishers. 107-114.

Jim Deacon. 1997. "The Microbial World : Basidiomycota ; activities and lifestyle." Modern Mcology. Blackwell Science.

Kauserud, H. and Schumacher, T. 2003. "Ribosomal DNA variation, recombination and inheritance in the Basidiomycete *Trichaptum abietinum* : implications for reticulate evolution." **Heredity.** 91 : 163-172.

Kothe Erika. 2001. "Mating-type genes for basidiomycete strain improvement in mushroom farming." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 56 (5-6) : 602-612.

Kuhls, K. *et..al.* 1996. "Molecular Evidence that the Asexual Industrial Fungus *Trichoderma reesei* Is a clonal Derivative of the Ascomycete *Hypocrea jecorina*." **National Academy of Sciences.** 23 : 7755-7760.

Liu, Y. *et..al.* 2006. "An essential gene for fruiting body initiation in the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea* is homologous to bacterial cyclopropane fatty acid synthesis gene." **Genetics.** 172 (2) : 873-884.

Luis M. Larraya., e*t.al.* 2001. "Reltionship between Monokaryotic Growth Rate and Mating Type in the Edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus.*" **Applied and Environment Microbiology.** 67 (8) : 3385-3390.

Martin, K.J. and Rygiewicz, P.T. 2005. "Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts." **BMC Microbiology.** 5(28)

Middleton, R. B. 1964. "Sexual and somatic recombination in common-AB heterokaryons of *Schizophyllum commune.*" **Genetics.** 50 : 701-710.

Mile, P.G. and Chang,S. T. 1987. "The Collection and Conservation of Genes of *Lentinus.*" **Cultivating Edible Fungi.** Amsterdam. The netherland. Elsevier Science publishers B.V.

Papazian,. H.P. 1950. "Physiology of the Incompatibility Factors in Schizophyllum Commune." **The Botanical Gazette.** 112 : 143-163.

Pornthap Thanonkeo. *et. al.* 2003. "Cultural Optimization for Growth of *Lentinus polychrous* Le'v." Proceedings. 279-284.

Raper,. C.A. 1978. "Sexuality and breeding. P.83-117. In Chang, S.T. and Hayes, (eds) W.A.." The Biology and Cultivation of Edible Mushroom. Academic Press. New York :

Ross, I.K. 1976. "Nuclear Migration Rates in *Coprinus congregatus* : A New Record." **Mycologia.** 68 : 418-422.

Roxon, J.L. and Jong, S.C. 1977. "Sexuality of an Edible Mushroom, *Pleurotus Sajor-Caju.*" **Mycologia.** 69 : 203-205.

Saito, T. Tanaka,N. and Shinizawa, T. 2002. "Characterization of Subrepeat Regions within rDNA IntergenicSpacers of the Edible Basidiomycete *Lentinus edodes.*" **Bioscience Biotechnology Biochemical.** 66(10) : 2125-2133.

Snider J. Philip.. Raper R. John. 1958. "Nuclear Migration in basidiomycete *Schizophyllum comune*." **American Journal of Botany**. 45 : 538-546.

Somashekar, D. Rati,E.R. and Candrashekar, A. 2004. "PCR-Restriction Fragment Length analysis of *afl*R gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize." **International Journal of Food Microbiology.** 93 : 101-107.

Stevens, R. B. "Fungus genetics. P.531-547." Mycology Guidebook. Seattle and London : University of Washington Press.

Tyagi, R. Lai,R. and Duggleby, R.G. 2004. "A new approach to 'megaprimer' polymerase chain reaction mutagenes is without an Intermediate gel purification step." **BMC Biotechnology.** 4(2) : [online]. Available : http:// www.biomedcentral.com

Uetake, Y. *et.al.* 2001. "Genetic relationship among violet root rot fungi as revealed by hyphal anastomosis and sequencing of the rDNA ITS regions." **Mycological Research.** 106(2) : 156-163.

Unite. 2005. **A Molecular database for the Identification of ectomycorrhizal fungi.** [online]. Available : http:// www.Unite.zbi.ce/primers.php3

USDA Nutrition database. n.d. [online]. Available : http://www.google.com

Vilgalys Lab. 1999. **Conserved Primer Sequencing from nuclear ribosomal RNA.** [online]. Available :http://www.google.com

White, T. J. ,T. Bruns, S. Lee, and W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogentics. Pp.315-322. In : PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. New York. Academic Press, Inc.,

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งมอลต์สกัด (MEA, malt extract agar)

น้ำตาลกลูโคส	20.0	กรัม
มอลต์สกัด	20.0	กรัม
เปปโตน	1.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับพีเอชด้วย 1N HCl และ 1N NaOH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลวมอลต์สกัด (malt extract broth)

น้ำตาลกลูโคส	20.0	กรัม
มอลต์สกัด	20.0	กรัม
เปปโตน	1.0	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน บรรจุลงขวดอาหาร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมบัฟเฟอร์และสารเคมีในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1. 3M sodium acetate, pH 5.2

ละลาย $CH_3COONa{\cdot}3H_2O$ จำนวน 408.1 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.2 ด้วย glacial acetic acid ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS 0.5 กรัมในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชเป็น 7.2 ด้วย 1N HCl และปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3. 0.5M EDTA

ละลาย sodium ethylene diamine tetraacetate จำนวน 186.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer ในการหมุนเพื่อช่วยให้ละลาย ปรับพีเอชให้เป็น 8.0 ด้วย NaOH ชนิดเข้มข้น (ชนิดเม็ด) และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4. 5M NaCl

ละลาย sodium chloride 292.2 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5. 1M Tris-HCl

ละลาย Tris-base 121.1 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วย 1M HCl ในปริมาตรดังนี้

พีเอช	7.4	7.6	8.0
HCl (มล.)	70	60	42

ขณะที่ปรับพีเอช ควรให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง เนื่องจากพีเอชของ Tris-HCl จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส พีเอชของสารละลายจะลดลง 0.03 ยูนิต จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

6. Tracking dye

เตรียมโดยนำ Tris-HCl 1 โมลาร์ พีเอช 7.6 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร EDTA 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer ในการหมุน เพื่อช่วยให้ละลาย แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร 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 20มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

8. TE-EDTA buffer (TE-buffer)

เตรียมด้วยการนำ 1M Tris-HCl 1โมลาร์ พีเอช 8.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ EDTA 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ตามลำดับ

9. Extraction buffer

นำ Tris-HCl 1 โมลาร์พีเอช 8.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรมาผสมกับ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 NaCl 5 โมลาร์ และ SDS ร้อยละ 0.5 อย่างละ 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ100 มิลลิลิตร ก็จะได้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น Tris-HCl 200 มิลลิโมลาร์ NaCl 250 มิลลิโมลาร์ EDTA 25 มิลลิโมลาร์ และ SDS ร้อยละ 0.5 ตามลำดับ

ภาคผนวก ค

การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

อะกาโรสเจลความเข้มข้น ร้อยละ 2

1. เตรียมถาดสำรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย
2. ชั่งผงอะกาโรส 2.0 กรัม มาเติม TBE buffer 100 มิลลิลิตร
3. หลอมอะกาโรสเจลให้ละลายให้หมดด้วยการอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟ
4. เมื่อเจลเย็นพอสัมผัสได้ ให้เทเจลลงในถาดที่เตรียมไว้ หนาประมาณ 0.5 มิลลิเมตร เสียบหวีลงในเจลเพื่อให้เกิดช่องสำหรับหยอดสารละลายตัวอย่าง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ให้เจลแข็งตัว
5. เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว ให้ค่อยๆดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็คโทรโฟรีซิส จากนั้นเทบัฟเฟอร์ TBE buffer ให้ท่วมแผ่นเจลสูงกว่าประมาณ 2-3 มิลลิเมตร
6. ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตรให้เข้ากัน
7. จากนั้นหยอดสารละลายดีเอ็นเอลงในช่องของแผ่นเจล โดยกำหนดให้ช่องแรกของแผ่นเจลเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน สำหรับใช้เปรียบเทียบ
8. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็คโทรโฟรีซิส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้า 60 วัตต์เป็นเวลาประมาณ 30 นาที
9. เมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่ลงมาเป็นระยะทางสามในสี่ส่วนของแผ่นเจลแล้ว ให้ปิดเครื่อง
10. นำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วนำไปส่องดูขนาดดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วบันทึกภาพเก็บเอาไว้

ภาคผนวก ง
การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซิส

เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ดีเอ็นเอตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ H*inf*I D*de*I S*au*3AI E*co*RI *Hin*dIII H*ae*II และ H*ae*III แล้ว จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวมาเตรียมพร้อมสำหรับหยอดลงช่องโพลีอะคลิลาไมด์เจล

1. การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล (สุรินทร์ ปิยะโชคณากูล. 2545)

1.1 นำกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอธานอลร้อยละ 95 ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น

1.2 เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และเอธานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อให้เจลเกาะติดแผ่นกระจก

1.3 กระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นรูปหูกระต่าย เช็ดให้ทั่วด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที

1.4 นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิบหนีบยึดให้อยู่คงที่ ใช้เทปกาวติดกระจก 3 ด้านเพื่อกันไม่ให้เจลรั่วซึมออกมาก่อนใช้คลิปหนีบอีกครั้ง

2. การเตรียมโพลีอะคลิลาไมด์เจลร้อยละ 6

2.1 ชั่งยูเรีย 6.75 กรัมใส่บิกเกอร์ มาเติม 5x TBE 3 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 375 มิลลิลิตร แล้วนำไปอุ่นไฟอ่อนๆให้ละลาย

2.2 จากนั้นนำบิกเกอร์มาแช่น้ำให้เย็น

2.3 ใส่ acrylamide ร้อยละ 30 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2.4 เติม APS ร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ TEMED 7.5-10 ไมโครลิตร ให้เจลค่อยๆแข็ง เทเจลใส่กระจกที่เตรียมไว้ อย่าให้มีฟอง แล้วใส่หวี

3. การทำอิเล็คโทรโฟรีซิส

3.1 นำกระจกที่มีเจลที่เตรียมไว้มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แล้วค่อยๆ ถอดหวี ออก

3.2 เตรียมดีเอ็นเอที่จะหยอด โดยดูดสี (loading dye 6x) มา 1 ไมโครลิตรผสมกับดีเอ็นเอ 4 ไมโครลิตรใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์

3.3 เตรียม DNA marker (25bp) โดยดูด 25bp มา 1 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่น 4 ไมโครลิตร และสี 2.5 ไมโครลิตร

3.4 นำกระจกที่มีเจลที่เตรียมไว้แล้วมาประกบกับชุดเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส ใช้คลิบหนีบขอบบนของกล่องให้แน่นไม่ให้รั่ว เติมบัฟเฟอร์ 1x TBE ให้ท่วมช่องด้านบนและด้านล่าง

3.5 ใช้เข็มฉีดยาไล่ฟูเรียตามช่องหวีของเจลออกมา

3.6 ดูดสารละลายดีเอ็นเอใส่ลงไปในช่องหวีของเจล

3.7 ใส่ DNA marker 25bp แล้วเปิดเครื่องที่ 300 โวลต์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง (จนสีบนเคลื่อนตัวลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล)

3.8 ปิดเครื่อง นำกระจกมาล้างด้วยน้ำประปา แล้วแกะกระจกหูกระต่ายออก

4. การย้อมเจลด้วย Silver strain

4.1 นำกระจกที่มีเจลติดอยู่ แช่ในน้ำกลั่น 10 นาที (หรือล้างจนกว่าแถบสีจะจาง)

4.2 เตรียม CTAB ร้อยละ 0.1 (ชั่ง CTAB 0.25 กรัม เติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร) ใส่แท่งแม่เหล็กแล้วนำไปปั่นให้ละลาย นำกระจกมาแช่เป็นเวลา 30 นาที เขย่าตลอดเวลา

4.3 เตรียมแอมโมเนียร้อยละ 0.3 (Conc. Amonia 750 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร) นำกระจกมาแช่เป็นเวลา 15 นาที

4.4 เตรียมสารละลายซิลเวอร์ (ชั่ง A_gNO_3 0.4 กรัม เติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตรและ NaOH 3M 335 ไมโครลิตร) จะได้สารละลายขุ่นสีน้ำตาล

4.5 ค่อยๆเติม Ammonia 960 ไมโครลิตรจนได้สารละลายใส แล้วเติมเพิ่มไป 2 หยด แล้วนำกระจกมาแช่เป็นเวลา 20 นาที

4.6 จากนั้นนำกระจกมาจุ่มในน้ำกลั่น แล้วนำไปใส่ใน developer เขย่าจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัด

4.7 นำกระจกมาจุ่มน้ำกลั่น แล้วหยุดปฏิกิริยา โดยแช่ในกลีเซอรอลร้อยละ 3 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาผึ่งให้แห้ง

5. การเตรียม Developer (2% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde)

ชั่ง sodium carbonate 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายแล้วนำไปแช่เย็น ก่อนใช้ให้เติม formaldehydeร้อยละ 40 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ขนาดเส้นใยเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบด และฟิวแซนท์ MES6 MPS19 DES1 DES7 DES5 DPS8 DPS14 และDPS12 เมื่ออายุ 3วัน

ANOVA

X1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	110.502	14	7.893	9.007	.000
Within Groups	26.288	30	.876		
Total	136.790	44			

X1

Duncan [a]

		Subset for alpha = .05			
TYPE	N	1	2	3	4
2.00	3	.5267			
1.00	3	1.2233			
4.00	3		3.5900		
5.00	3		3.7633	3.7633	
7.00	3		4.6367	4.6367	4.6367
9.00	3		4.9400	4.9400	4.9400
8.00	3		4.9567	4.9567	4.9567
13.00	3		4.9967	4.9967	4.9967
3.00	3		5.0133	5.0133	5.0133
12.00	3		5.0167	5.0167	5.0167
10.00	3		5.3933	5.3933	5.3933
6.00	3			5.4167	5.4167
11.00	3			5.5700	5.5700
15.00	3				5.6600
14.00	3				6.4033
Sig.		.369	.051	.052	.058

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ขนาดเส้นใยเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดบด และฟิวแซนท์ MES6 MPS19 DES1 DES7 DES5 DPS8 DPS14 และDPS12 เมื่ออายุ 5วัน

ANOVA

X2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	261.225	14	18.659	163.474	.000
Within Groups	3.424	30	.114		
Total	264.649	44			

X2

Duncan [a]

		Subset for alpha = .05			
TYPE	N	1	2	3	4
2.00	3	1.7133			
1.00	3	1.8400			
5.00	3		6.4200		
4.00	3			7.3767	
3.00	3				8.5333
6.00	3				8.6500
8.00	3				8.6767
13.00	3				8.8500
7.00	3				8.8733
12.00	3				8.9167
9.00	3				9.0000
10.00	3				9.0000
11.00	3				9.0000
14.00	3				9.0000
15.00	3				9.0000
Sig.		.649	1.000	1.000	.161

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนันทวดี คำสงค์ เกิดเมื่อ 10 เมษายน 2518 ที่จังหวัดสกลนคร เป็นบุตรคนที่ 3 ของนายสังคมศักดิ์ กับนางวนิดา คำสงค์ สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) จากสาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2541 จากนั้นเข้าศึกษาต่อสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตั้งแต่ปีการศึกษา 2545 กิจกรรมที่ชอบคือ อ่านหนังสือ ดูหนังฟังเพลง เลี้ยงสุนัข