รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จรัญญา เงินประเสริฐศิริ. 2528. การตัดต่อและการแสดงออกของยีนเพนนิซิลลินเอซิเลสจากเอสเคอริเคีย โคไล. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 44-52.

ฐิติมา ตันติกาญจน์. 2529. การศึกษาพันธุศาสตร์ของเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวและผลของสิ่งแวดล้อมต่อดอกของเห็ดหอม (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) บางสายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 1-9.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ์. 2525. การเพาะเห็ดและเห็ดบางชนิดในประเทศไทย. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 114-124.

ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร. 2530. การติดฉลากกรดนิวคลีอิค เพื่อใช้เป็นตัวตรวจสอบทางพันธุศาสตร์. การฝึกอบรมพันธุวิศวกรรม เรื่อง DNA probe ในการตรวจสอบสารทางพันธุวิศวกรรมวินิจฉัยเชื้อโรคและพาหะ. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 3.1-3.22.

พิมพ์กานต์ อร่ามพงษ์พันธ์ และ อุทัย จันผกา. 2526. เห็ดหอม. เอกสารเผยแพร่ของกรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-15.

———— , สมพงษ์ อังโชรมย์, อุทัย ทองมี และ พันธุ์ทวี ภักดีดินแดน. 2529. การศึกษาระยะเวลาการบ่มเส้นใยเห็ดหอมต่างสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการเพาะในอาหารขี้เลื่อย. เอกสารงานวิจัยของกลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 125-132.

———— . 2529. อิทธิพลของแสงที่มีผลต่อการเจริญของเห็ดห่อมที่เพาะในอาหารขี้เลื่อย. เอกสารงานวิจัยกลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 146-152.

สกล พันธุ์ยิ้ม และคณะ. 2528. เทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม. การประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องเทคนิคการขยายยีนและการตัดต่อยีน. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ร่วมกับ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์และศูนย์อณูพันธุ์ศาสตร์-พันธุวิศวกรรม มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 57-73.

สุทธพรรณ ตรีรัตน์ และ อรุณี จันทรสนิท. 2528. การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและความต้องการในงานวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับการใช้วัสดุจากการเกษตรเพื่อเพาะเห็ดหอมในประเทศไทย.

เอกสารงานวิจัย. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และการพลังงาน. หน้า 36.

——— และคณะ. รายงานการวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อเพาะเห็ดหอม Development of biotechnology for cultivation of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). เสนอศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ. หน้า 66-136.

สุมาลี ตั้งประดับกุล, สุขกิจ ยะโสธรศรีกุล และ สกล พันธุ์ยิ้ม. 2530. การประยุกต์ใช้ DNA probe ในการตรวจสอบยุงพาหะ. การฝึกอบรมพันธุวิศวกรรมเรื่อง DNA Probe ในการตรวจสอบสารพันธุวิศวกรรมวินิจฉัยเชื้อโรคและพาหะ. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 9.1-9.8.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 219-230.

ภาษาต่างประเทศ

Anderson, J.B., Petsche, D.M., and Smith, M.L. 1987. Restriction fragment polymorphisms in biological species of *Amillaria mellea*. Mycologia. 79(1): 69-76.

Ausubel, F.M., et al. 1989. Enzymatic Manipulation of DNA and RNA. Current protocols in Molecular Biology. Chapter 3. New York: Green Publishing Associates and Wiley-Intersciences.

Birnboim, H.C., and Doly,J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res. 7: 1513-1523.

Boehringer Mannheim Biochemica. 1993. The DIG System User's Guide for filter hybridization.

Castle, A.J., Horgan, P.A., and Anderson, J.B. 1987. Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. Applied and Environmental Microbiology. 53: 816-822.

Chang, S.T., and Miles, P.G. 1989. Edible Mushroom and Their Cultivation. 190 pp. United States: CRC Press.

Chihara, G., Humuro, J., Maeda, Y., Arai, Y., and Fukuoka, F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with markered antitumor activity especially lentinan from *Lentinus edodes*. Cancer Res. 30: 2776.

———, Maeda, Y., Humuro, J., Sasaki, T., and Fukuoka, F. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*. Nature. 222: 687.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., and Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistances in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc.Natl. Acad.Sci. 69: 2110.

Flynn, V.T. 1991. Is the Shiitake mushroom an aphrodisiac and a cause of longevity? pp. 345-357. Maher(ed.), Science and Cultivation of Edible Fungi. Baikema, Rotterdam: n.p.

Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F., and Ishida, N. 1978. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture media of *Lentinus edodes*. J. Antibioti. 31: 1079.

Gene Transfer Technology. Seminar and Workshop Documentation. 22-26 June, 1992. 208 pp. Bangkok: Faculty of science, Kasetsart University.

Hamuro, J., Maeda, Y., Fukuoka, F., and Chihara, G. 1976. Antitumor polysaccharide, lentinan and pachymaran as immunopotentiators. Mushroom Science IX (partI).: 477-489.

Han, Y.H., Ueng, W.T., Chen, L.C., and Sheng, S. 1981. Physiology and ecology of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.. Mushroom Science.: 623-684.

Hintz, W.E.A., Anderson, J.B., and Horgan, P.A. 1988. Nuclear migration and mitochondrial inheritance in the mushroom *Agaricus bitorquis*. Genentic. 119: 35-41.

Ishii, T. 1992. Nonradioactive labelling and detection protocol for rice RFLP analysis. second edition. Plant Breeding, Genetic, and Biochemistry Division. Manil: International Rice Research Institute.

Khan, S.M., Mirza, J.H., and Khan, H.A. 1991. Studies on shiitake mushroom (*Lentinula edodes* (Berk.)Pegler). Maher(ed.), Science and Cultivation of Edible Fungi. Baikema, Rotterdam: n.p.

Kimura, Y., Asada, Y., and Kuwakara, M. 1990. Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe. Appl.Microbiol.Biotechnol. 32: 436-442.

Kirby, L.T. 1992. DNA fingerprinting. New York: W.H. Freeman and Copany.

Klich, M.A., and Mullaney, E.J. 1987. Restriction fragment length polymorphism

as a tool for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae*. Experimental Mycology. 11: 170-175.

Lang, B., Burger, G., Doxiadis, I., Thomas, D.Y., Bandlow, W., and Kaudewitz, F. 1977. A simple method of the large-scale preparation of mitochondria from microorganisms. Analytical Biochemistry. 77: 110-121.

Leatham, G.F., and Leonard, T.J. 1989. Biology and physiology of Shiitake mushroom cultivation. Shiitake mushrooms : A National Symposium and Trade Show, May 3-5. University of Minnesota, St. Paul: n.p.

Luria, S.E., Adam, J.N., and Teng, R.C. 1960. Transduction of lactose utilization ability among strains of *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. Virology. 12: 348-390.

Mandel, M., and Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol.Biol. 53 : 159.

Maniatis, T., Sambrook, J., and Fritsch, E.F. 1982. Molecular cloning A labolatory Mannual. New York: Cold Spring Harbor Labolatory Press.

Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. Methods Enzymol. 101: 20-78.

Myra, C-C. 1984. Cultivation of edible forest mushroom. Mushroom Newsletter for the Tropics. 5(1): 8-11.

New England Biolabs. 1993. New England Biolabs 1993/1994 Catalog. 221 pp. U.S.A.: n.p.

Pegler, D.N. 1983. The genus *Lentinula* (Tricholomataceae tribe Collybieae). Sydowia. 36: 227-239. In Przybylowicz, P., and Donoghue, J. 1988. Shiitake Growers Handbook (The Art and Science of Mushroom Cultivation). 217 pp. U.S.A.: Kendall/Hunt Pubilshing Company.

Promaga. 1991. Promaga Protocals and Applications Guide (second edition). Promaga corporation. 422 pp. U.S.A.: n.p.

Przybylowicz, P., and Donoghue, J. 1988. Shiitake Growers Handbook (The Art and Science of Mushroom Cultivation). 217 pp. U.S.A.: Kendall/Hunt Pubilshing Company.

Robert, C.G., and Yoder, O.C. 1983. Isolation of filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondria, ribosomal and plasmid components. Analytical Biochemistry. 135: 416-422.

Rodriguez, R.T., and Tait, R.C. 1983. Recombinant DNA Techniques: An Introduction.: pp. 45-46. Addison-Wasley Publishing.

Royse, D.J. 1989. Factor influencing the production rate of shiitake. MUSH.J.Tropics. 9: 127-138.

————, and May, B. 1987. Identification of shiitake genotypes by multilocus enzyme electrophoresis: catalog of lines. Biochemical Genetics. 25(9/10): 705-715.

Sim, B.K.L., Piessens, W.F., and Wirth, D.F. 1986. A DNA probe cloned in *Escherichia coli* for the identification of *Brugia malayi*. Molecular and Biochemical Parasitology. 19: 117-123.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. J.Mol.Biol. 98: 503-517.

Sugano, N., Hibinno, Y., Chaji, Y., and Maeda, H. 1982. Anticarcinogenic actions of water-soluble and alcohol insoluble fractions from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. Cancer Lett. 17: 109.

Suzuki, S., and Oshima, S. 1976. Influence of shiitake (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. MUSH. Sci. 9 (part I): 463.

Toyomasu, T., Takazawa, H., and Zennyozi, A. 1992. Restriction Fragment polymorphisms of mitochondrial DNAs from the basidiomycetes *Pleurotus* species. Biosci. Biotech.Biochem. 56(2): 359-361.

————, and Zennyozi, A. 1981. On the appilcation of isozyme electrophoresis to identification of strains in *Lentinus edodes* (Shiitake). MUSH. Sci. 9: 975-984.

Triratana, S., and Osathapant, P. 1988. The cultivation of shiitake (*Lentinus edodes*) in sawdust substratefrom different trees and agricultural wastes. In Chang, S.T., Chan, K.Y., and Woo, N.Y.S. 1988. Recent Advances in Biotechnology and Applied Biology. Proceeding of eighth international conference on global impacts of applied microbiology and international conference on applied biology and biotechnology.: 531-541. Hong Kong: The Chinese University Press.

————, Suwanuraks, R., and Tantikanjana, T. 1992. Effects of *Lentinus edodes* extracts on platelet aggregation. Thai Journal of Health Ressearch. 6(1): 1-6.

Tsunoda, A., and Ishida, N. 1969. A mushroom extract as an interferon inducer. Ann. N.Y. Acad. Sci.: 173-179.

Vincent, R.D., Goewert, R., Glodman, W.E., Kobayashi, G.S., Lambowitz, A.M., and Medoff, G. 1986. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragment polymorphisms. Journal of Bacteriology. 165(3): 813-818.

Wren, B.W., Clayton, C.L., Castiedine, N.B., and Tabaqchali, S. 1990. Identification of toxigenic *Clostridium difficile* strains by using a toxin A. J.Clin.Microbiol. 28: 1808-1812.

Yanish-Perron, C., Yiera, J., and Messing, J. 1985. Gene. 33: 103-119. In Promaga. 1991. Promaga Protocals and Applications Guide (second edition). 422 pp. U.S.A.: Promaga corporation.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก. ชีววิทยาของเห็ดหอม

เห็ดหอมมีชื่อสามัญ (common name) ว่า Black mushroom หรือนิยมเรียกในภาษาญี่ปุ่นว่า Shiitake มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. จัดอยู่ในอันดับดังนี้ (Przybylowicz และ Donoghue, 1988.)

Class Basidiomycetes

Subclass Homobasidiomycetidae

Order Agaricales

Family Tricholomataceae

Genus *Lentinula*

เนื่องจากเห็ดหอมเป็นเห็ดที่รู้จักกันมาอย่างกว้างขวางเป็นเวลานาน จึงเป็นที่รู้จักในชื่อต่างๆกัน ดังแสดงในตารางที่ 9 (Przybylowicz และ Donoghue, 1988.)

สัณฐานวิทยาของเห็ดหอม (ฐิติมา, 2529.)

หมวก (pileus) กว้างประมาณ 5-12 เซนติเมตร มีรูปร่างนูน (convex) จนถึงเกือบแบนราบ ผิวแห้ง ส่วนเคลือบผิว (cuticle) มีสีน้ำตาลออกแดงตั้งแต่อ่อนจนถึงเข้ม อาจแตกเป็นร่อง เนื้อมีสีขาวหรือออกสีน้ำตาลในบริเวณใกล้ส่วนเคลือบผิว อาจมีขนหรือไม่มีก็ได้ ดอกที่มีอายุมากจะมีเนื้อเหนียวกว่าดอกที่ยังอ่อนอยู่

ครีบ (lamellae) มีสีขาว เมื่อถูกกระทบกระเทือนจะมีจุดสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้น และเมื่อดอกมีอายุมากขึ้นสีของครีบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ครีบมีการติดกับก้านแบบ adnate จนถึง adnexed มีเป็นจำนวนมาก กว้างปานกลาง ขอบมีลักษณะ serrate จนถึง denticulate เนื้อเยื่อของครีบ (gill trama) เป็นเส้นใยที่มีผนังหนาไม่มีสี กว้างประมาณ 5-7 ไมโครเมตร

ก้าน (stipe) ยาวประมาณ 3-5 เซนติเมตร กว้างประมาณ 8-13 มิลลิเมตร มีความกว้างเกือบเท่ากันตลอดทั้งก้าน หรืออาจใหญ่ตรงโคนก้าน เนื้อแข็งและเหนียว บริเวณผิวมีเยื่อบางๆ คล้ายขน ปกคลุม

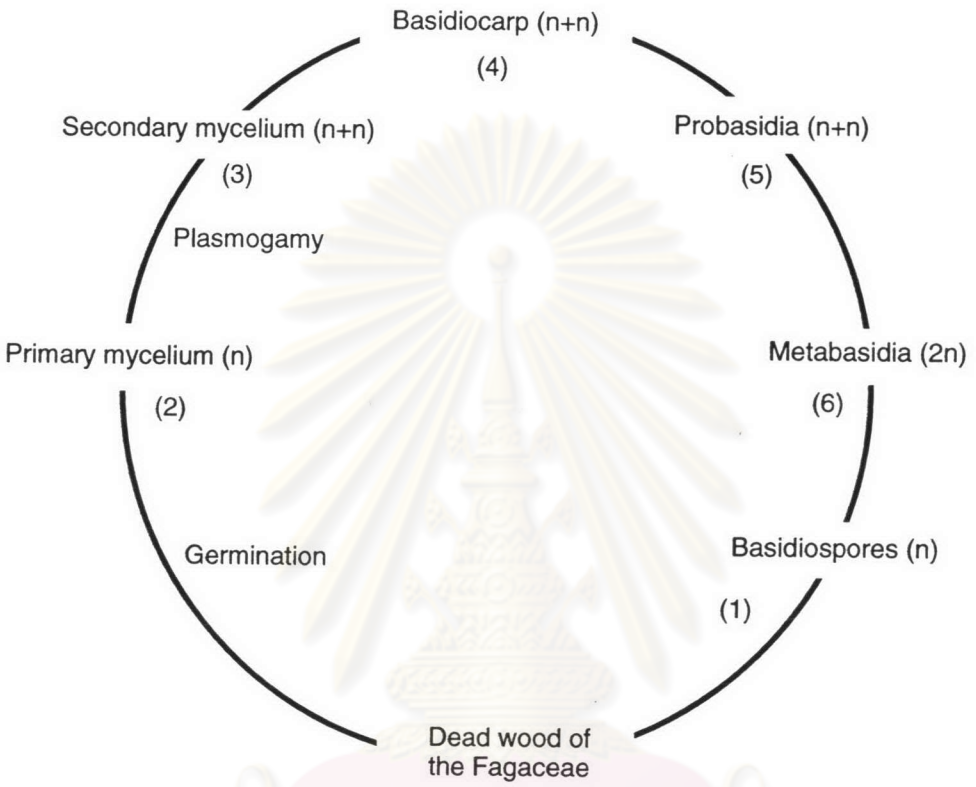
สปอร์ (spore) มีขนาด 3.0-3.5x5.5-6.5 ไมโครเมตร มีรูปร่างเป็น subcylindric nonamyloid ผิวเรียบ ผนังบาง หนึ่งเบสิเดีย (basidia) มีสี่เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ในแถวของ ไฮมีเนียม (hymenium) ไม่มีซิสทิเดีย (cystidia)

ตารางที่ 9 Synonyms for *Lentinula edodes* (Shiitake).

Name	Year Assigned
Agaricus edodes	1877
Collybia shiitake	1886
Armillaria edodes	1887
Agaricus russaticeps	1888
Lepiota shiitake	1889
Lentinus tonkinensis	1890
Mastaleucomyces edodes	1891
Pleulotus russaticeps	1891
Cortinellus shiitake	1899
Tricoloma shiitake	1918
Cortinellus berkeleyanus	1925
Lentinus shiitake	1936
Cortonellus edodes	1938
Lentinus edodes	1941
Lentinula edodes	1975

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วงชีพของเห็ดหอม



วงชีพของเห็ดหอมมีขั้นตอนที่สำคัญ (Przybylowicz และ Donoghue, 1988. และ ฐิติมา, 2529.) คือ

(1) เบสิดิโอสปอร์ของเห็ดหอมที่เจริญเต็มที่จะถูกปล่อยออกจากดอก โดยกระจายไปกับสายลม สปอร์ส่วนใหญ่จะถูกทำลายเนื่องจากมีผนังที่บางและสลายตัวง่ายเมื่อถูกแสงอาทิตย์

(2) สปอร์เกิดการเจริญอย่างรวดเร็วไปเป็นเส้นใยระยะที่ 1 (primary mycelium หรือ monokaryotic mycelium) มีนิวเคลียสแบบแฮพลอยด์ (haploid) (n) ไม่มี clamp connection ในระยะนี้ถ้าสปอร์ตกลงในที่ที่มีอาหารไม่เพียงพอหรือไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ก็จะใช้อาหารที่สะสมไว้ภายในตัวสปอร์เอง เมื่ออาหารที่สะสมไว้หมดก็จะตายในที่สุด เส้นใยระยะที่ 1 นี้ไม่มีการสร้าง clamp connection และไม่สามารถรวมตัวกันเกิดเป็นดอกเห็ดได้

(3) เส้นใยระยะที่ 1 ที่มีนิวเคลียส และปัจจัยทางพันธุกรรมที่เหมาะสมเจริญมาพบกันจะเกิดการรวมตัวกันของไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสกลายเป็นเส้นใยระยะที่ 2 (secondary mycelium) มีสภาพเป็น dikaryon (n+n) (หรือ heterokaryon) มีการสร้าง clamp connection ขึ้น ทำให้สภาพของเส้นใยระยะที่ 2 นี้สามารถเกิดขึ้นได้เรื่อยๆ

(4)-(6) เมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง หรือถูกกระตุ้นด้วยสิ่งกระตุ้นบางชนิด เช่น อุณหภูมิ แสง หรือความสมบูรณ์ของอาหาร เส้นใยระยะที่ 2 จะเกิดการรวมตัวกันเป็นตุ่มดอกอยู่ภายใน เรียกว่า primodia (เอกพจน์คือ primodium) หรือ pins ซึ่งจะเจริญเป็นดอกเห็ด ภายในดอกเห็ดนี้เองจะมีเส้นใยในเนื้อเยื่อของครีบ ซึ่งแต่ละเซลล์มีสองนิวเคลียสจะเกิดการรวมกันของนิวเคลียส และเกิดการแบ่งตัวแบบไมโอซีส (meiosis) ได้สี่นิวเคลียส แล้วเจริญเป็นสปอร์ที่เรียกว่าเบสิดิโอสปอร์ เพื่อใช้ในการแพร่พันธุ์ต่อไป

การเจริญของเบสิเดียในเห็ด Order Agaricales มีแบบแผนคล้ายๆกัน ดังแสดงในรูปที่ 36

ก-ค เส้นใยภายในเนื้อเยื่อของครีบมีสภาพ dikaryon

ง เบสิเดียมระยะเริ่มแรกมีรูปร่างเป็นทรงกระบอกแคบๆ

จ-ช เบสิเดียมขยายขนาดจนมีรูปร่างคล้ายกระบอง แล้วจึงเกิดการรวมตัวกันของนิวเคลียสทั้งสองได้นิวเคลียสชนิดดิพลอยด์ ตามด้วยการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซีสได้นิวเคลียสชนิดแฮพลอยด์ 4 อัน ระหว่างการรวมนิวเคลียสและการแบ่งไมโอซีส จะมีการเพิ่มจำนวนของแวคิวโอล (vacuole) และบางแวคิวโอล จะเกิดการรวมตัวกันทำให้ได้แวคิวโอลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เริ่มปรากฏสเทอริกมา (sterigma) ขึ้นที่ส่วนบนของ เบสิเดียม ปลายของสเทอริกมาจะพองออกเกิดเป็นเบสิดิโอสปอร์ การเจริญของเบสิดิโอสปอร์จะพัฒนาไปพร้อมๆ กับการเกิดแวคิวโอลในเบสิเดียม ภายในไซโตพลาสซึมของเห็ดหอมในระยะนี้จะมีการเพิ่มจำนวนของ glycogen granule มาก การสะสมของ glycogen granule นี้จะเห็นได้ชัดภายหลังการแบ่งแบบไมโอซีสสมบูรณ์แล้ว

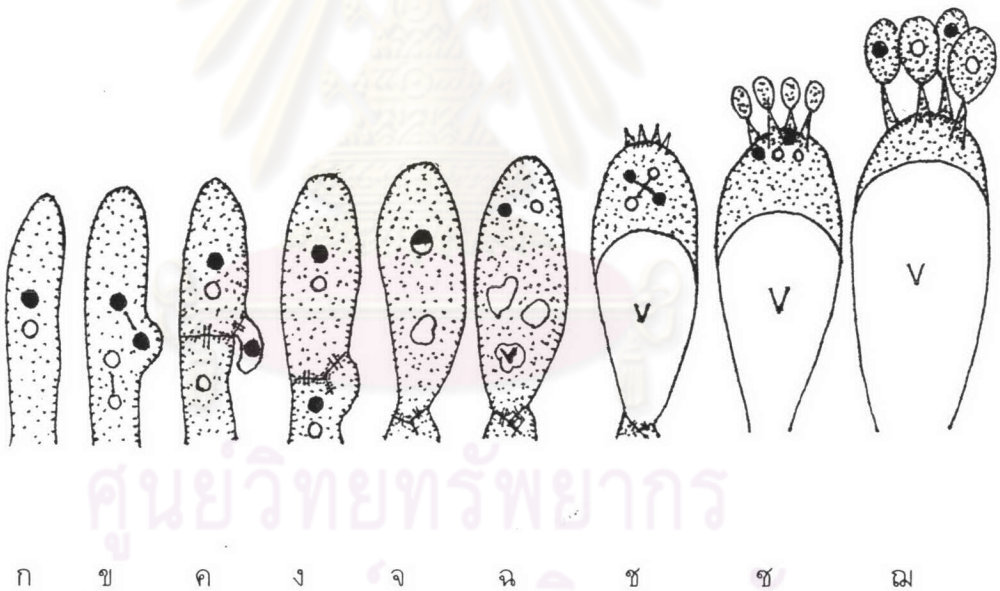
ช-ฌ เบสิดิโอสปอร์ที่อยู่ส่วนบนของสเทอริกมาเกิดการขยายขนาดจนมีรูปร่างคล้ายไข่ เมื่อมีขนาดประมาณ 3x5 ไมโครเมตร นิวเคลียสทั้งสี่จะเคลื่อนที่ผ่านสเทอริกมาไปยังเบสิดิโอสปอร์ ในเห็ดหอมนิวเคลียสเหล่านี้จะเกิดการแบ่งตัวแบบไมโตซีสอีกครั้งหนึ่ง นิวเคลียสอันหนึ่งจะเคลื่อนที่กลับไปยังเบสิเดียม คงเหลือนิวเคลียสในเบสิดิโอสปอร์เพียงหนึ่งนิวเคลียส

การแบ่งตัวของโซมาติกนิวเคลียส(somatic nucleus)ของเส้นใยระยะที่ 2 พบว่าเป็นแบบไมโตซีส การแบ่งตัวนี้จะเกิดขึ้นพร้อมกันกับการเกิด clamp connection เห็ดหอมมีโครโมโซม n= 8 เมื่อการแบ่งตัวของนิวเคลียสสิ้นสุดลงนิวเคลียสที่อยู่ปลายสุดของแต่ละเซลล์จะเคลื่อนเข้าไปยัง clamp แล้วเกิดการแลกเปลี่ยนนิวเคลียสของทั้งสองเซลล์ การสร้าง clamp นี้จะเริ่มเกิดในระยะเมตาเฟส (metaphase) และเสร็จสมบูรณ์ในระยะเทโลเฟส (telophase) ดังแสดงในรูปที่ 37

<u>แบบแผนการผสมพันธุ์</u>

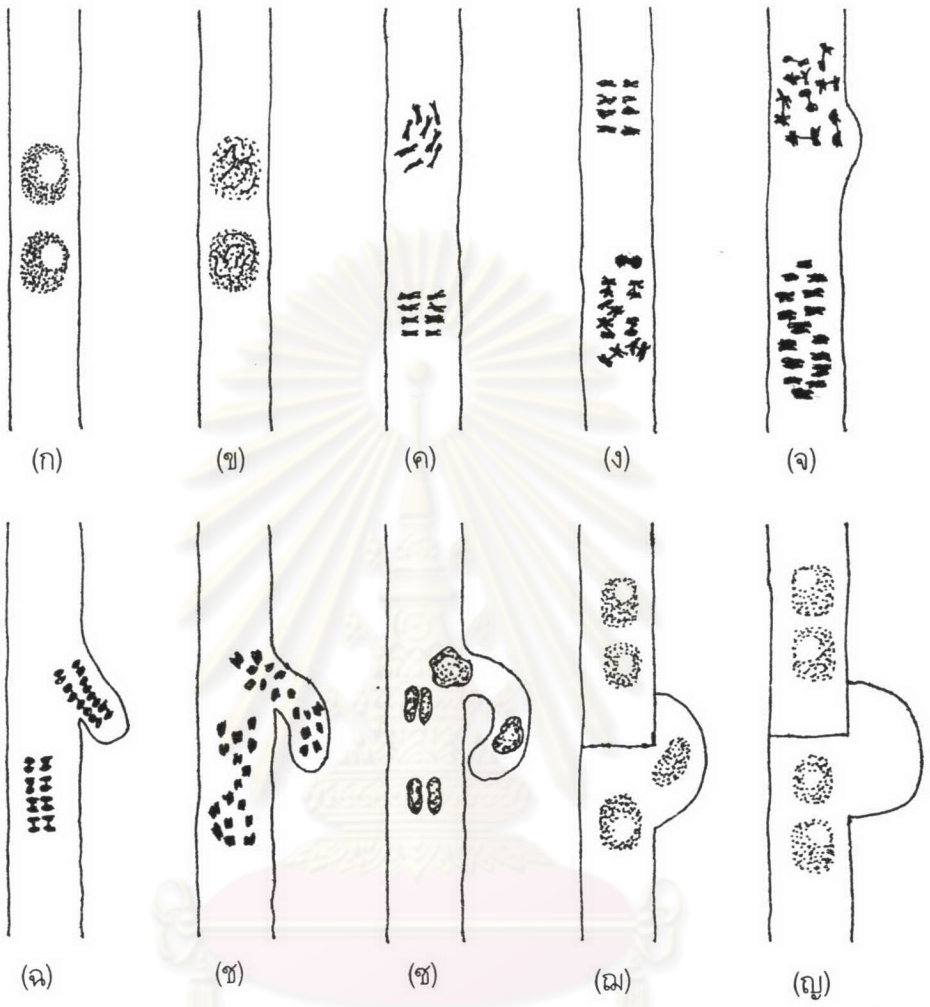
ปัจจัยทางพันธุกรรม (genetic factor) ที่เกี่ยวข้องกับการผสมพันธุ์และเป็นตัวกำหนดว่าการรวมตัวของเส้นใยระยะที่ 1 สามารถเกิดเป็นเส้นใยระยะที่ 2 ได้หรือไม่ เรียกว่า "Incompatibility Factor" ในเห็ดหอมมีแฟคเตอร์ที่ควบคุมนี้อยู่ 2 ชนิด คือ A และ B ทั้งสองแฟคเตอร์อยู่บนโครโมโซมคนละแท่ง แฟคเตอร์ A ควบคุมเกี่ยวกับการจับคู่ของนิวเคลียส (nuclear pairing) และการสร้าง clamp

connection ส่วนแฟคเตอร์ B ควบคุมการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส (nuclear migration) และการเชื่อมต่อกันของ clamp connection เส้นใยที่มีแฟคเตอร์ A และแฟคเตอร์ B ในนิวเคลียสทั้งสองต่างกัน ($A_1A_2B_1B_2$) จึงจะสามารถเกิด clamp connection และมีการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสตามปกติได้ (ฐิติมา, 2529.) ผลของการแบ่งแบบไมโอซีสทำให้เบสิดิโอสปอร์ที่เกิดจากเส้นใยชนิดนี้มี incompatibility factor ต่างกัน 4 แบบ คือ A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1 และ A_2B_2 ดังนั้นจึงอาจเรียกพวกที่มีแฟคเตอร์ 2 ชนิดนี้ว่า tetrapolar incompatibility factor



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 36 การเจริญของเบสิเดียในเห็ด Order Agaricales



รูปที่ 37 การแบ่งนิวเคลียสในเส้นใยระยะที่ 2 ของ *Lentinula edodes*

ก interphase

ข prophase

ค และ ง metaphase

จ, ฉ และ ช anaphase

ซ และ ฌ telophase

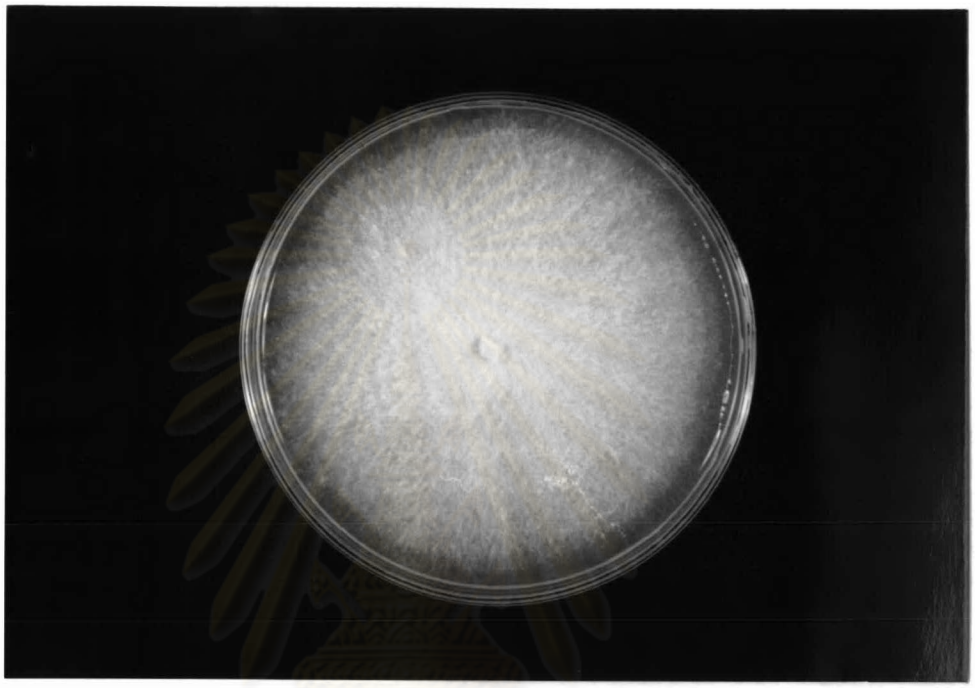
ญ early interphase

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

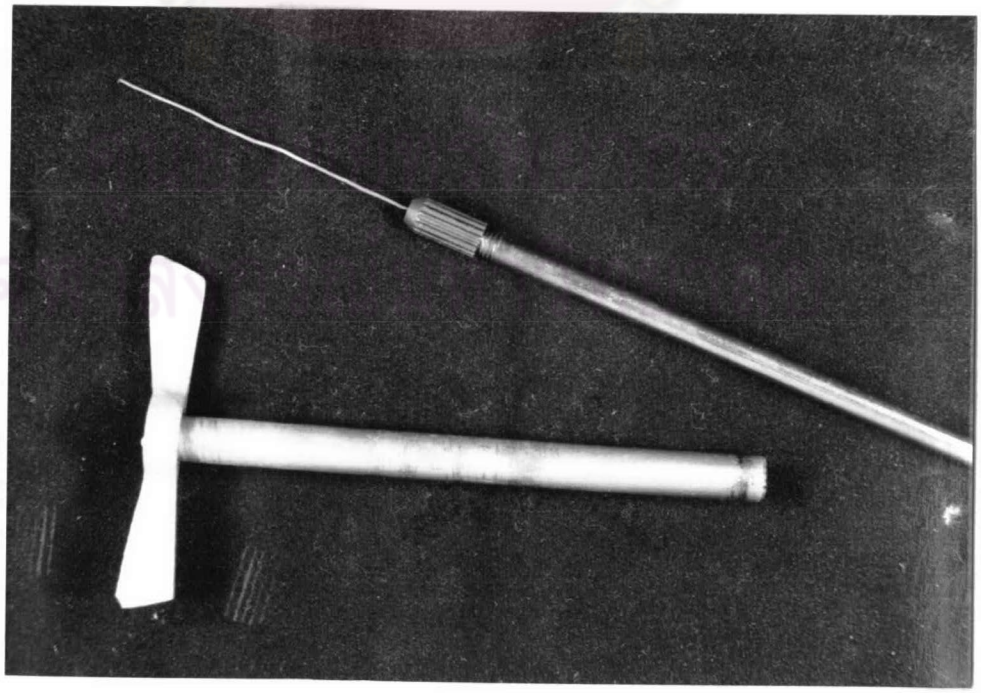
ภาคผนวก ข. แสดงเครื่องมือเจาะวุ้นและลักษณะการลอยชิ้นเส้นใยตั้งต้น

ก เส้นใยเห็ดหอมที่เจริญจนเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

ข เครื่องมือเจาะวุ้นและตะขอเกี่ยวชิ้นวุ้น



(ก)

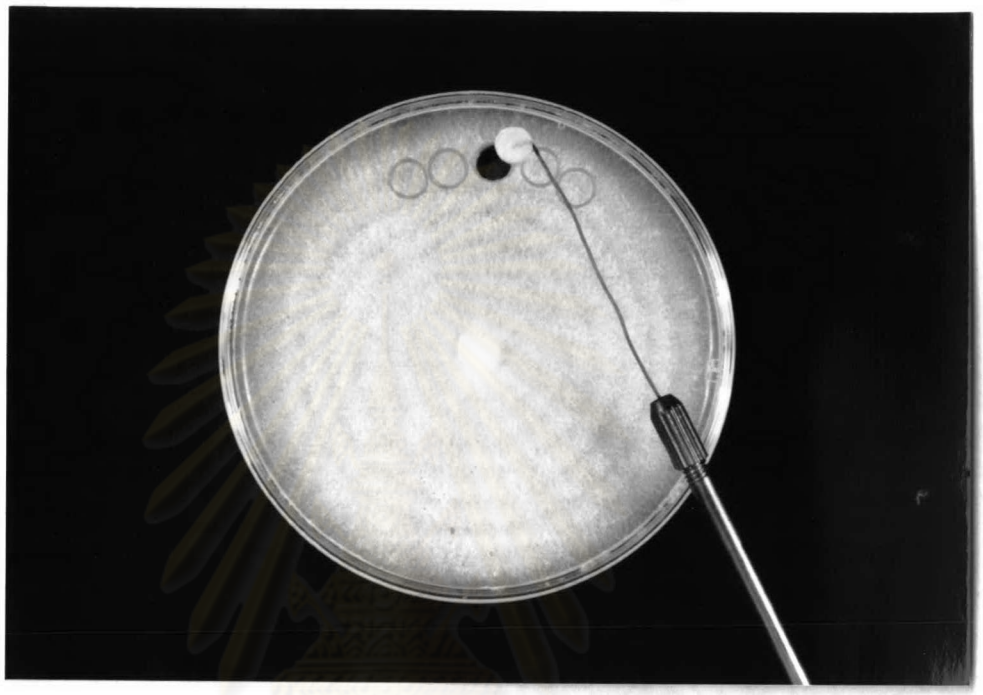


(ข)

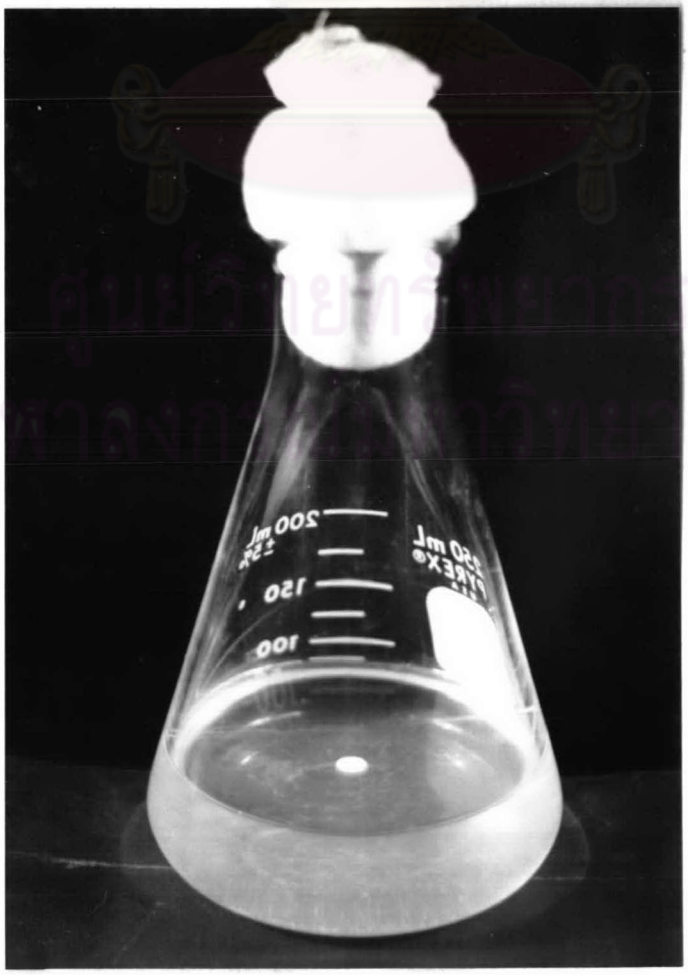
ภาคผนวก ข.(ต่อ) แสดงเครื่องมือเจาะวุ้นและลักษณะการลอยชิ้นเส้นใยตั้งต้น

ค ลักษณะวุ้นที่ถูกเจาะและการเกี่ยวชิ้นวุ้น

ง การลอยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยตั้งต้นในขวดอาหารสูตร PDB ที่ใช้เลี้ยงเส้นใย

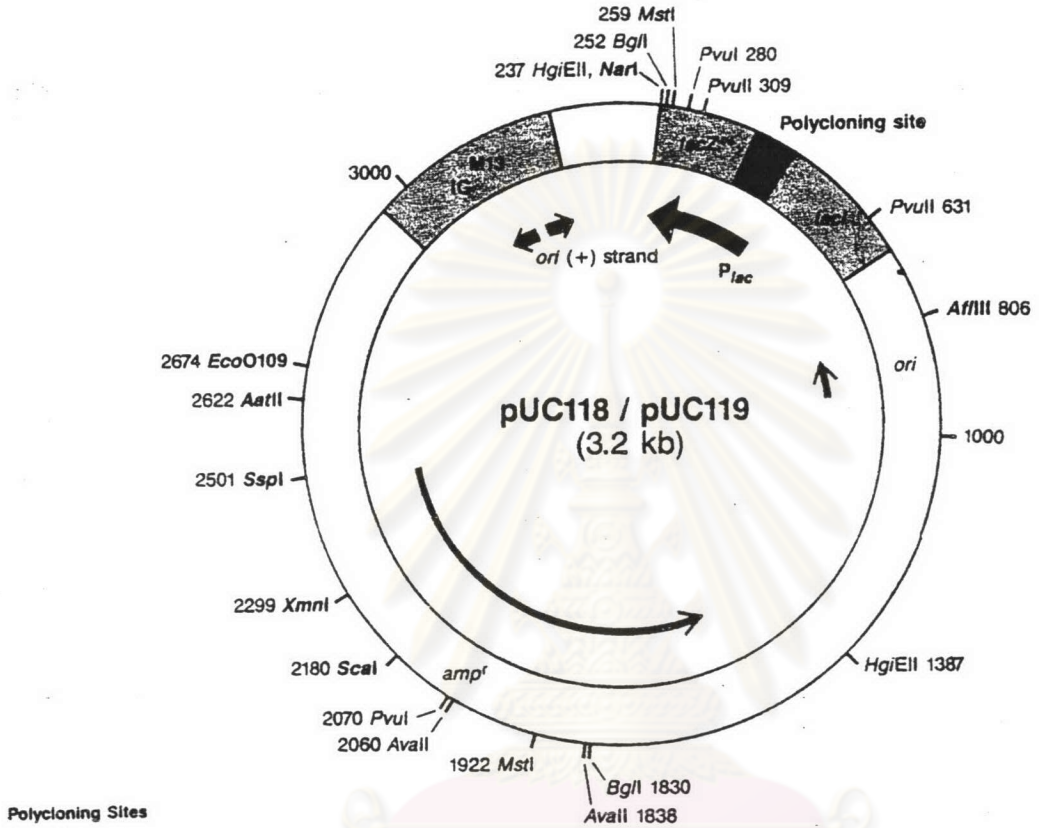


(ค)



(ง)

ภาคผนวก ค. แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC118 (Gene Transfer Technology, 1992.)



Polycloning Sites

pUC118

						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	7	8
		Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Ser	Thr	Cys	Arg	His	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCG	AGC	TCG	GTA	CCC	GGG	GAT	CCT	CTA	GAG	TCG	ACC	TGC	AGG	CAT	GCA	AGC	TTG	GCA	CTG	GCC	

EcoRI *SacI* *KpnI* *SmaI* *XmaI* *BamHI* *XbaI* *SalI* *AccI* *HincII* *PstI* *SphI* *HindIII*

pUC119

						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	5	6	7	8
		Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	His	Ala	Cys	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Pro	Arg	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Ala
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	CAT	GCC	TGC	AGG	TCG	ACT	CTA	GAG	GAT	CCC	CGG	GTA	CCG	AGC	TCG	AAT	TCA	CTG	GCC	

HindIII *SphI* *PstI* *SalI* *AccI* *HincII* *XbaI* *BamHI* *SmaI* *XmaI* *KpnI* *SacI* *EcoRI*

In pUC118, the *Eco*RI site lies immediately downstream from P_{lac}. In pUC119, the *Hin*dIII site lies immediately downstream from P_{lac}.

ภาคผนวก ค. (ต่อ) ลักษณะฟีโนไทป์ของเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* K12 สายพันธุ์ JM101

JM101 : *sup*E, thi, (*lac-pro*AB), [F', *tra*D36, *pro*AB, *lacI*^{q} ZM15]

Symbol	Description	Effect
*sup*E	Suppresser mutation	Suppress amber (UAG) mutation
thi^{-1}	Mutation in thiamine metabolism	Thiamine required for growth in minimal media
*pro*AB	Mutation in proline metabolism	Requires proline for growth in minimal media
*tra*D36	Transfer factor mutation	Prevents transfer of F' episome
lacI^{q}	Overproduction of the *lac* repressor protein	Leads to high levels of the *lac* repressor protein, inhibiting transcription from the *lac* promoter
lacZM15	Partial deletion of β-D-galactosidase gene	Allows complementaion of β-galactosidase activity by α-complementation sequence in pUC vectors. Allows blue/white selection for recombinant colonies when plated on X-gal

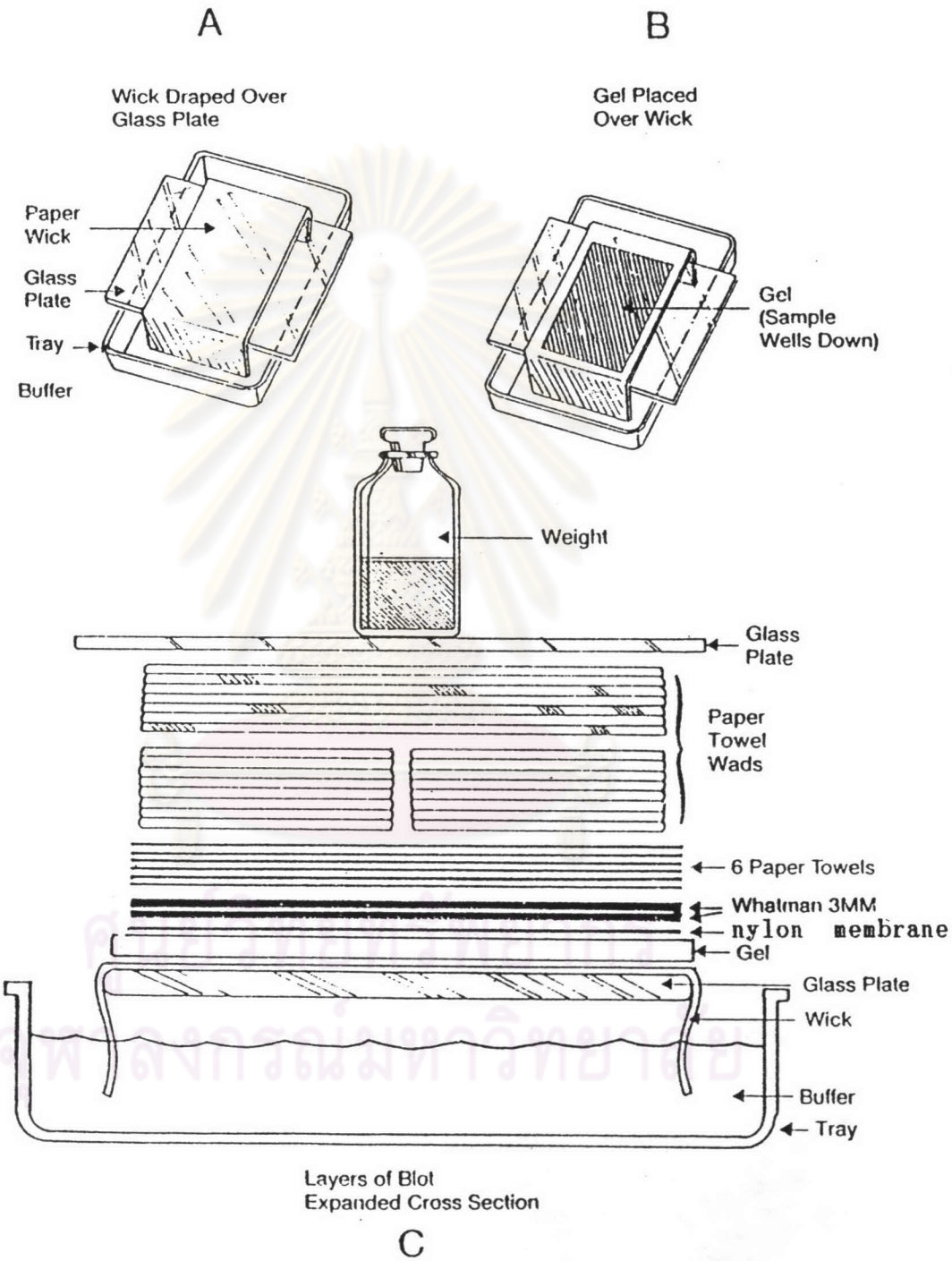
F' : Host contains an F' episome with the stated features.

ภาคผนวก ง. สภาวะและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอ ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

เอนไซม์	Tris-HCl pH7.4(mM)	Tris-HCl pH8.0(mM)	NaCl (mM)	$MgCl_2$ (mM)	KCl (mM)	อุณหภูมิ (°ซ)
*Alu*I	-	50	-	10	-	37
*Bam*HI	-	50	100	10	-	37
*Eco*RI	-	50	100	10	-	37
*Hae*III	-	50	50	10	-	37
*Hind*III	-	50	50	10	-	37
*Nde*I	-	50	50	10	-	37
*Pvu*II	50	-	50	6	50	37
*Sau*3AI	20	-	-	5	50	37
*Sca*I	50	-	50	6	50	37
*Tag*I	-	50	50	10	-	37

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ. ขั้นตอนการทำ Southern-blot Transfer (Southern, 1975.)



(A) Position of wick over glassplate. (B) Gel is placed on wick.

(C) Schematic illustration of complete Southern bloting set-up.

ภาคผนวก ฉ. สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายที่ใช้สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดหอม *L. edodes*

สารละลายบัฟเฟอร์สกัดเส้นใย : น้ำตาลซูโครส 15 เปอร์เซนต์, Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0, EDTA 0.2 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

สารละลาย SDS 25 เปอร์เซนต์

สารละลายโปแทสเซียมอะซีเตท 5 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

สารละลายโซเดียมอะซีเตท 3 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

สารละลายบัฟเฟอร์ TE : Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

สารละลายบัฟเฟอร์ TE-RNase : สารละลายบัฟเฟอร์ TE ใส่เอนไซม์ Rnase ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายเอนไซม์โปรเนสเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายฟีนอล : สารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8.0

สารละลายคลอโรฟอร์ม : สารละลายคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลอัลกอฮอล์อัตราส่วน 24 ต่อ 1

เอทธานอลแอบโซลูท

สารละลายเอทธานอล 70 เปอร์เซนต์

2-ไอโซโพรพานอล

สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอของพลาสมิดด้วยวิธีอัลคาไลน์ (Alkaline extraction)

สารละลาย Solution I (Lysis Buffer) : น้ำตาลกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl 25 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0, EDTA 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ก่อนใช้ใส่ไลโซไซม 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลาย Solution II : โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ และ SDS 1 เปอร์เซนต์

สารละลาย SolutionIII : โซเดียมอะซีเตท 3 โมลาร์ พีเอช 4.8 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

สารละลายบัฟเฟอร์ TE : Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

สารละลายบัฟเฟอร์ TE-RNase : สารละลายบัฟเฟอร์ TE ใส่เอนไซม์ Rnase ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายฟีนอล : สารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8.0

คลอโรฟอร์ม

ไดเอทธิลอีเธอร์

เอทธานอลแอบโซลูท

สารละลายเอทธานอล 70 เปอร์เซนต์

สารละลายสำหรับเทคนิค Nucleic Acid Hybridization

สารละลาย EDTA 0.2 โมลาร์ พีเอช 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

สารละลายลิเทียมคลอไรด์ 4 โมลาร์

สารละลาย Depurination Solution : สารละลายกรดไฮโดรคลอริค 0.25 โมลาร์

สารละลาย Denaturing for Dot-blot Hybridization Solution : โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 โมลาร์ และ EDTA 100 มิลลิโมลาร์

สารละลาย Denaturingfor Southern-blot Hybridization Solution : โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์

สารละลายบัฟเฟอร์ Transfer : โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.25 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลาร์

สารละลายบัฟเฟอร์ 20xSSC : โซเดียมคลอไรด์ 3 โมลาร์และไตรโซเดียมซิเตรท 0.3 โมลาร์ พีเอช 7.0

สารละลายบัฟเฟอร์ 5xSSC : เจือจางมาจากสารละลายบัฟเฟอร์ 20xSSC

สารละลาย Standard Prehybridization Solution : สารละลายบัฟเฟอร์ 5xSSC, N-lauroylsarcosine 0.1 เปอร์เซนต์, SDS 0.02 เปอร์เซนต์ และ Blocking Reagent 1 เปอร์เซนต์ เก็บที่ -20°ซ

สารละลาย 2x Washing Solution : เจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ 20xSSC จนเป็น 2xSSC และ SDS 0.1 เปอร์เซนต์

สารละลาย 0.5x Washing Solution : เจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ 20xSSC จนเป็น 0.5xSSC และ SDS 0.1 เปอร์เซนต์

สารละลายบัฟเฟอร์ Genius 1 : โซเดียมคลอไรด์ 150 มิลลิโมลาร์ และ Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.4 ไมโครเมตร

สารละลายบัฟเฟอร์ Genius2 : Blocking Reagent 2 เปอร์เซนต์ในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 1

สารละลายบัฟเฟอร์ Genius 3 : Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์และโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์ ปรับพีเอชเป็น 9.5 แล้วเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.4 ไมโครเมตร

สารละลายบัฟเฟอร์ Genius 4 : สารละลายบัฟเฟอร์ TE

สารละลายบัฟเฟอร์ TE : Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายสีตั้งต้น(Color Substrate) : NBT และ X-phosphate อย่างละ 45 ไมโครลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารละลายสารเรืองแสง : Lumigen PPD เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Genius 3 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 100

DMF : N,N-dimethylformamide 100 เปอร์เซนต์

สารละลาย Probe-stripping Solution : DMF 60 เปอร์เซนต์, Tris-HCl 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 และ SDS 1 เปอร์เซนต์

สารละลาย Reprobe : โซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 มิลลิโมลาร์ และ SDS 0.1 เปอร์เซนต์

เอทธานอลแอบโซลูท

สารละลายเอทธานอล 70 เปอร์เซนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวศลยา สุขสอาด เกิดวันที่ 20 มีนาคม พ.ศ. 2511 ณ.จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2532 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2533

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย