รายงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* Mont.)

Diversity of Hed Khon Khao (*Lentinus squarrosulus* Mont.)

โดย

นางสาวชริดา ปุกหุต
นายโสภณ บุญลือ
นายประเสริฐ วุฒิคัมภีร์

พ.ศ. ๒๕๔๕

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปี ๒๕๔๒

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๔๒

ขอขอบคุณศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิกที่อนุเคราะห์สายพันธุ์เห็ดที่ใช้ในการเปรียบเทียบ ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการ วัสดุอุปกรณ์ และสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณผู้มีส่วนเกี่ยวข้องในการดำเนินการทุกท่าน

ชริดา ปุกหุต
โสภณ บุญลือ
ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์

กรกฎาคม ๒๕๔๕

บทคัดย่อ

เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* Mont.) เป็นเห็ดรับประทานได้ที่มีผู้นิยมบริโภคมากในภาคอีสานและภาคเหนือ สามารถเพาะได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ในเวลาสั้น สามารถเพาะได้ตลอดปี บริโภคได้ทั้งในรูปเห็ดสดและแห้ง

ได้รวบรวมเชื้อเห็ดขอนขาวจากพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานีจำนวน 19 ไอโซเลท สายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบมาจากแหล่งรวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ด 2 สายพันธุ์ และเห็ดบด 1 สายพันธุ์ นำมาศึกษาข้อมูลเบื้องต้นทางด้านชีววิทยา คือลักษณะดอก ครีบ สปอร์ การงอกของสปอร์และเส้นใย พบว่าดอกเห็ดอ่อนเป็นทรงกลมที่คลุมครีบไว้ทั้งหมด เมื่อเป็นดอกเจริญเต็มที่ขอบดอกจะบานออกทำให้ขอบดอกยกขึ้น กลางดอกยุบลง ทรงดอกจึงคล้ายกรวยตื้น ก้านดอกเป็นทรงกระบอกมีเกล็ดสีขาว ครีม หรือน้ำตาลอ่อนเช่นเดียวกับผิวหมวก เนื้อเห็ดบางและเป็น fibrous เบสิดิโอสปอร์ ใส มีผิวเรียบเป็นรูปทรงกระบอกที่มีติ่งที่ปลายข้างหนึ่ง เมื่อเบสิดิโอสปอร์รวมกันอยู่มากๆ มีสีขาวนวล เส้นใยที่เจริญจากเบสิดิโอสปอร์เป็น monokaryotic mycelia เส้นใยที่เจริญจากเนื้อเยื่อดอกเห็ดเป็น dikaryotic mycelia การแช่เบสิดิโอสปอร์ในน้ำกลั่นที่ 40 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำให้มีการงอก germ tube ประมาณ 98 % ของสปอร์ทั้งหมด โคโลนีของเส้นใยเห็ดขอนขาวในอาหาร potato dextrose agar ที่ 35 °C เป็นเวลา 7 วัน มีความแตกต่างในระหว่างแต่ละไอโซเลทอย่างชัดเจนและเป็นลักษณะที่จำเพาะของแต่ละไอโซเลท เส้นใยเห็ดขอนขาวเจริญในขี้เลื่อยผสมอาหารเสริม (สูตรมาตรฐาน) ได้เต็มถุงขนาด 0.5 กิโลกรัม ที่ 28 $\pm$ 2 °C ในเวลา 18-21 วัน และเต็มถุงขนาด 1 กิโลกรัม ที่อุณหภูมิเดียวกันในเวลา 40-45 วัน และเริ่มสร้างตุ่มเห็ดได้ในวันที่ 7 หลังจากได้รับความชื้น

จากการศึกษาความหลากหลายของเห็ดขอนขาวที่รวบรวมได้ด้วยรูปแบบไอโซไซม์ (isozyme pattern) ของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ o-Tolidine-Reacting Phenoloxidase (TRE) และ Esterase (EST) พบว่า เห็ดขอนขาวทุกไอโซเลทมีรูปแบบไอโซไซม์ คือ มีแถบ (band) ของ enzyme activity ที่จำเพาะของแต่ละไอโซเลทที่แตกต่างจากสายพันธุ์เปรียบเทียบและแตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆ ปรากฏรูปแบบ 20 รูปแบบจาก 21 ไอโซเลทที่รวบรวมได้ ซึ่งแสดงแถบของเอนไซม์ TRE ตั้งแต่ 1-6 แถบ และแถบของเอนไซม์ EST ตั้งแต่ 3-9 แถบ รูปแบบของเอนไซม์ EST มีความละเอียดกว่ารูปแบบของเอนไซม์ TRE รูปแบบของเอนไซม์ทั้งสองชนิดใช้ในการจำแนกเห็ดขอนขาวได้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(1)
สารบัญภาพ	(2)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	1
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	2
ผลการวิจัย	7
สรุปผล	34
ข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	35

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. เห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont. ที่เก็บรวมรวมได้ในจังหวัดอุบลราชธานี และสายพันธุ์เห็ดที่เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ	7
2. การเปรียบเทียบลักษณะดอกของเห็ดขอนขาว เห็ดตีนปล่อกและเห็ดบด	8
3. Zymogram จากการศึกษารูปแบบเอนไซม์ TRE ของ *Lentinus squarrosulus* Mont.	32
4. Zymogram จากการศึกษารูปแบบเอนไซม์ EST ของ *Lentinus squarrosulus* Mont.	33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ลักษณะดอกเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont. BUB-1 จากการเพาะเลี้ยงในถุงขี้เลื่อย	12
2.	ลักษณะดอกเห็ดขอนขาวแสดงส่วนประกอบของดอก และภาพตัดขวางของดอก	13
3.	ลักษณะของเกล็ดที่บนผิวหมวกสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า	14
4.	ดอกเห็ดขอนขาวตัดตามยาวแสดงลักษณะเส้นใยภายในที่เป็น fibrous (ศรชี้)	15
5.	ลักษณะของครีบที่ตัดตามขวาง และสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า	16
6.	ลักษณะของดอกเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont. เห็ดตีนปลอก *L. sajor-caju* Fr. และเห็ดบดหรือเห็ดลม *L. polychrous* Lev.	17
7.	สปอร์ของเห็ดขอนขาว สปอร์ที่แช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ	18
8.	ดอกเห็ดขอนขาวที่ปล่อยสปอร์จากครีบเป็นควันหรือฝุ่นสีขาวนวล (ศรชี้)	19
9.	สปอร์ที่ปลายครีบของเห็ดขอนขาว ที่ด้านนอกของครีบ และสปอร์ที่เกาะอยู่บนผิวพลาสติก	20
10.	สปอร์ที่งอกงอก germ tube และพัฒนาเป็นเส้นใยที่เป็น monokaryotic mycelia	21
11.	ลักษณะเส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ของเห็ดขอนขาว BUB-1	22
12.	ลักษณะของเส้นใยของเชื้อเห็ดขอนขาวที่เจริญในอาหาร PDA ที่ 35 °C เป็นเวลา 7 วัน	23
13.	วงจรชีวิตของเห็ดขอนขาวในธรรมชาติ	24
14.	เห็ดขอนขาว BUB-12 (ชื่อเดิม กรกมล) สร้างดอกจากถุงที่สร้างและไม่สร้างแผ่นสีน้ำตาล	25
15.	ดอกเห็ดขอนขาวจากการเพาะเลี้ยงเกิดในบริเวณด้านข้างถุงขนาด 1 กิโลกรัม	26
16.	ดอกเห็ดขอนขาว BUB-16 (ชื่อเดิม หนองหญ้า) มีลักษณะดอกผิดปกติโดยขอบดอกม้วนขึ้น ในสภาพที่ขาดอากาศ	27
17.	ดอกเห็ดขอนขาว BUB-10 (ชื่อเดิม หัวเรือ) ที่เป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ และเป็นกลุ่ม	28
18.	ดอกเห็ดขอนขาวระยะที่จำหน่ายทั่วไปในตลาดภาคอีสาน	29
19.	The pattern of extracellular o-tolidine-reacting phenoloxidase isozymes of *Lentinus squarrosulus*	30
20.	The pattern of intracellular esterase isozymes of *Lentinus squarrosulus*	31

บทนำ

เห็ดขอนขาวเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีผู้นิยมบริโภคมากในภาคอีสาน สามารถเพาะได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ในเวลาสั้น ปัจจุบันยังไม่พบรายงานข้อมูลเบื้องต้นทางด้านชีววิทยา การรวบรวมและจำแนกสายพันธุ์ ตลอดจนข้อมูลของเห็ดขอนขาวในจังหวัดอุบลราชธานี

เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* Mont.) เป็นเห็ดที่จัดอยู่ในวงศ์ Polyporaceae (ราชบัณฑิตสถาน, 2539) ชาวอีสานพบว่าเห็ดขอนขาวชอบขึ้นบนขอนไม้ตระกูลเต็งรัง มะม่วง ในฤดูฝนภาคกลางเรียกเห็ดชนิดนี้ว่า เห็ดมะม่วง ดอกเห็ดจะเป็นสีขาวนวลหรือครีม ระยะที่เหมาะกับการบริโภคคือ ระยะที่ขอบหมวกยังม้วนงอ คลุมครีบไว้ทำให้มองไม่เห็นครีบใต้ดอก ถ้าดอกเริ่มแก่ ขอบหมวกจะคลายออกและยกขึ้น ทำให้เห็นครีบได้ ตัวดอกจะมีลักษณะคล้ายถ้วยหรือจานก้นลึก ระยะนี้ดอกเห็ดจะเหนียว ไม่เหมาะกับการรับประทาน เห็ดขอนขาวที่นำไปประกอบอาหารมีรสชาดหวานเหนียวคล้ายเนื้อสัตว์ เป็นที่นิยมกันมากในภาคอีสานและภาคเหนือตอนบน (อัญชลี, 2539)

เห็ดขอนขาวสามารถเพาะได้ตลอดปีในวัสดุเพาะ (ขี้เลื่อยและอาหารเสริม) ด้วยขั้นตอนเดียวกับเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้ชนิดอื่นๆเช่น เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า สามารถบริโภคได้ทั้งในรูปเห็ดสดและแห้ง (ปราโมทย์ ไทยทัตกุล, 2537) การจำแนกสายพันธุ์เห็ดกลุ่มนี้ใช้วิธีทางสัณฐานวิทยา รูปแบบของ isozymes และ DNA (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์, 2539; Buchanan, 1993; Peberdy et al., 1993)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาข้อมูลเบื้องต้นทางด้านชีววิทยาของเห็ดขอนขาว
2. เพื่อรวบรวมและจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดขอนขาวในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. สายพันธุ์เห็ดขอนขาวและการเก็บรักษาเชื้อ

สายพันธุ์เห็ดขอนขาวที่ใช้เป็นสายพันธุ์เห็ดที่เก็บมาจากธรรมชาติและดอกเห็ดที่จำหน่ายตามท้องตลาด ซึ่งแยกเชื้อโดยวิธีการปลอดเชื้อ และเก็บรักษาเชื้อเส้นใยบริสุทธิ์ไว้ในอาหารวุ้น Potato dextrose agar (PDA)

2. การศึกษาลักษณะเบื้องต้นทางชีววิทยา

2.1 การเพาะเลี้ยงให้เกิดดอกเห็ด

ปลูกเชื้อเห็ดบริสุทธิ์จากอาหารวุ้นลงในขี้เลื่อยผสมอาหารเสริม (วิธีการตามภาคผนวก) ถุงละ 0.5 และ 1.0 กิโลกรัม ไอโซเลทละ 5 ซ้ำในถุงแต่ละขนาด บ่มให้เส้นใยเจริญเต็มถุงและพักเส้นใย เปิดดอกในสภาพที่ให้ความชื้น

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด และวงจรชีวิต

ศึกษาวงจรชีวิตแต่ละระยะของเชื้อเส้นใยเห็ด จนเจริญเป็นดอก โดยสังเกตการเดินของเส้นใย การสร้างแผ่นสีน้ำตาล การสร้างดอกเห็ด วัดขนาดส่วนประกอบของดอกเห็ด ศึกษาลักษณะของ เส้นใย สปอร์ ผิวหมวกและครีบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อเส้นใยและการเตรียม crude enzyme

เตรียมหัวเชื้อในอาหาร Yeast malt extract agar (YMEA) โดยถ่ายเชื้อจาก stock culture ลงอาหาร YMEA plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ถ่ายเชื้อจาก YMEA โดยใช้ cork borer ขนาด 3 mm เจาะบริเวณที่เป็น active mycelium จำนวน 20 ชิ้น แล้วย้ายลง Yeast malt extract broth (YMEB ปริมาตร 50 ml ในฟลาสก์ขนาด 250 ml) บ่มใน incubator shaker ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

แยกเส้นใยออกจากอาหารเหลวโดยใช้ vacuum filtration ด้วยกระดาษกรอง Whatman no. 3 เก็บส่วนใส (crude extracellular enzyme) ปริมาตร 1 ml ไว้ใน microfuge tube นำไปแช่เย็นที่ 4 °C เพื่อเตรียมไว้สำหรับการศึกษารูปแบบของเอนไซม์ 0-tolidine-reacting enzyme phenoloxidase (TRE)

บดเส้นใยที่แยกได้ด้วยไนโตรเจนเหลว แยกส่วนใสออกจากเศษเซลล์โดย centrifuge ที่ 10,000 rpm, 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้ว centrifuge อีกครั้งโดยสภาพเช่นเดียวกัน เก็บส่วนใส (crude intracellular enzyme) ปริมาตร 1 ml ไว้ใน microfuge tube นำไปแช่เย็นที่ 4 °C เพื่อเตรียมไว้สำหรับการศึกษารูปแบบของเอนไซม์ esterase (EST)

4. **การศึกษารูปแบบของเอนไซม์โดย** electrophoresis

นำ crude extracelllular enzyme และ crude intracelllular enzyme มาแยกโปรตีนโดยใช้วิธี native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) โดยใช้ความเข้มข้นของ running gel 8 % ด้วยระบบ discontinuous (Copeland, 1993) และใช้ไฟฟ้ากระแสตรงความต่างศักย์ 100 V

ตรวจสอบลักษณะของเอนไซม์สองชนิด คือ esterase (EST, EC 3.1.1.1) ทำตามวิธีของ Rosendahl and Sen (1992) และ o-tolidine-reacting enzyme phenoloxidase (TRE, EC 1.10.3.2) ทำตามวิธีของ Choi (1987)

5. **การตั้งชื่อไอโซไซม์และการศึกษารูปแบบของเอนไซม์**

ตั้งชื่อไอโซไซม์เป็นหมายเลขเรียงลำดับตามแถบที่ปรากฏขึ้นเมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยเริ่มจากขั้วบวกไปยังขั้วลบ เช่น เมื่อศึกษาเอนไซม์ EST E-3 จะปรากฏเป็นแถบที่ 3 จากขั้วบวก

ศึกษารูปแบบของไอโซไซม์โดยคำนวณ Relative mobility (Rf) ของโปรตีนแต่ละแถบ และนำมาจัด Zymogram

6. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ** YMEB **และ** YMEA

YMEB ประกอบด้วย yeast extract 2 g/l และ malt extráct 20 g/l ในน้ำกลั่น 1 ลิตร YMEA มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับ YMEB และเพิ่ม agar 15 g/l นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

7. **การเตรียมสารเคมี**

7.1 Acrylamide Stock Solution (10X)

ใช้เตรียม running gel และ stacking gel

ละลาย Acrylamide 30.0 g และ N,N'-methylene-bisacrylamide (bis) 8.0 g ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml เก็บที่ 4 °C ในขวดสีชา

ข้อควรระวัง Acrylamide ในรูป monomer เป็นพิษต่อระบบประสาท จำเป็นต้องใส่ถุงมือทุกครั้งที่ชั่ง และไม่ใช้ปากดูดปิเปต

7.2 Stacking Gel Buffer (4X Tris-Cl, pH 6.8)

ละลาย Tris base 3.0 g ใน Deionized Distilled Water (DDW) 25 ml

ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย HCl เข้มข้น

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ml เก็บที่ 4 °C

7.3 Running Gel Buffer (4X Tris-Cl, pH 8.8)

ละลาย Tris base 18.17 g ใน DDW 70 ml

ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย HCl เข้มข้น

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml เก็บที่ 4 °C

7.4 Electrophoresis Buffer

ละลาย Tris base 3.00 g และ Glycine 14.40 g ใน DDW 800 ml

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml ควรเตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง

7.5 Running Gel

เตรียม Running gel ความเข้มข้น 8 % เพื่อแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุล

โดยใช้ส่วนประกอบต่อไปนี้

Acrylamide Stock Solution	4.00 ml
Stacking Gel Buffer	3.75 ml
Deionized Distilled Water (DDW)	7.25 ml
Ammonium persulfate 10 %	50 µl
TEMED (N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine)	10 µl

ผสม Acrylamide Stock Solution, Running Gel Buffer, Ammonium persulfate และ DDW ในบีกเกอร์ขนาด 50 ml

เติม TEMED เพื่อเร่งปฏิกิริยา polymerization ระหว่าง Acrylamide และ Bis ควรเขย่าให้เข้ากันเบาๆ ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ แล้วเทลงในช่องระหว่างแผ่นกระจก

ข้อควรระวัง หลังจากผสม TEMED สารละลายจะเริ่มแข็งตัว

7.6 Stacking Gel

เตรียม Stacking gel ความเข้มข้น 4 % เพื่อให้เป็นเจลที่โปรตีนรวมกันเป็นแถบเดียวก่อนที่จะแยกตามขนาดโมเลกุลเมื่อเคลื่อนที่ผ่าน Running Gel โดยมีส่วนประกอบดังนี้

Acrylamide Stock Solution	0.65 ml
Stacking Gel Buffer	1.25 ml
DDW	3.05 ml
Ammonium persulfate 10 %	25 µl
TEMED (N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine)	5 µl

ผสม Acrylamide Stock Solution, Running Gel Buffer, Ammonium persulfate

และ DDW ในบีกเกอร์ขนาด 50 ml

เติม TEMED แล้วเขย่าให้เข้ากันเบาๆ ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

แล้วเทลงในช่องระหว่างแผ่นกระจก

7.7 Loading Dye Solution

ผสมกับตัวอย่างในอัตราส่วน 10 % เพื่อเป็นเครื่องหมายว่าควรหยุดกระแสไฟฟ้าเมื่อใด ประกอบด้วย

Gyycerol	30 %(v/v)
Bromophenol	0.01 %(w/v)
Stacking Gel Buffer	70 %(v/v)

การเตรียม marker dye solution ปริมาณน้อย อาจไม่ต้องคำนึงถึงปริมาณ

8. **สารละลายที่ใช้เก็บรักษาแผ่นเจล**

ใช้แช่แผ่นเจลหลังจากย้อมสีแล้วและต้องการเก็บไว้ในระยะเวลาหนึ่ง ประกอบด้วย

Acetic acid	7 ml
Glycerol	10 ml
Distilled Water	83 ml

9. Tris-HCl pH 7.1

เตรียมให้มีความเข้มข้น 0.1 M โดยละลาย Tris-HCl 3.94 g ใน Deionized Distilled Water (DDW) 200 ml ปรับ pH เป็น 7.1 ด้วย conc.HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 ml ด้วย DDW

10. **สีย้อมเอนไซม์** esterase

เตรียมสารละลายสับสเตรทที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ esterase ประกอบด้วย

0.1 M Tris-HCl pH 7.1	2.5 ml
α-naphthyl acetate	10 mg
β- naphthyl acetate	10 mg
Fast Blue BB Salt	25 mg
Deionized Distilled Water	22.5 ml

ละลายสับสเตรท α-naphthyl acetate และ β- naphthyl acetate ในสารละลาย acetone และ 0.1 M Tris-HCl (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 1 ml

ผสมสารละลายสับสเตรทกับ 0.1 M Tris-HCl และน้ำ Deionized Distilled Water 22.5 ml

ผสมกับ Fast Blue BB Salt แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.3
เตรียมสารละลายก่อนใช้ เนื่องจาก Fast Blue BB Salt เสื่อมสภาพได้เร็ว
การใช้สีย้อมที่แช่เย็นช่วยทำให้เห็นแถบของไอโซไซม์ที่มี activity น้อยๆ ได้ดีขึ้น

11. **สีย้อมเอนไซม์** o-tolidine reacting enzyme phenoloxidase (TRE)

เตรียมสารละลายสับสเตรทที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ TRE ประกอบด้วย

o-tolidine	0.25 g
95 % alcohol	5 ml
Acetic acid	1 ml
Glycine	0.05 g

ละลาย o-tolidine ในแอลกอฮอล์และ acetic acid เมื่อ o-tolidine ละลายแล้วจึงนำมาผสมกับ Deionized Distilled Water ซึ่งมี Glycine ละลายอยู่แล้ว ปรับปริมาตรเป็น 200 ml เก็บสารละลาย o-tolidine ในที่มืดเนื่องจากสารนี้สลายตัวได้เมื่อถูกแสงและความร้อน

ผลการวิจัย

1. การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นทางด้านชีววิทยาของเห็ดขอนขาว

สายพันธุ์ของเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont. ที่เก็บรวมรวมได้มาจากแหล่งธรรมชาติ 10 ไอโซเลท ซึ่งมาจาก 4 อำเภอ จากแหล่งเพาะเลี้ยง 9 ไอโซเลท ซึ่งมาจาก 6 อำเภอ และสายพันธุ์เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์ รวมทั้งสายพันธุ์เปรียบเทียบที่เป็นเห็ดบดหรือเห็ดลม *Lentinus polychrous* Lev. 1 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont. ที่เก็บรวมรวมได้ในจังหวัดอุบลราชธานีและสายพันธุ์เห็ดที่เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ

ลำดับ	รหัส	แหล่งที่มา	ชื่อเดิม	เชื้อเห็ดที่แยกได้มาจาก	
				ดอกเห็ดจากธรรมชาติ	ดอกเห็ดจากการเพาะเลี้ยง
1.	BUB-1	อ.วารินชำราบ	วาริน1		+
2.	BUB-2	อ.วารินชำราบ	ม.อบ 1	+	
3.	BUB-3	อ.วารินชำราบ	ม.อบ 2	+	
4.	BUB-4	อ.เดชอุดม	จิราพร 1	+	
5.	BUB-5	อ.เดชอุดม	จิราพร 2	+	
6.	BUB-7	อ.เดชอุดม	จิราพร 3		+
7.	BUB-8	อ.เดชอุดม	จิราพร 4		+
8.	BUB-9	อ.ตระการพืชผล	ตระการ		+
9.	BUB-10	อ.ม่วงสามสิบ	หัวเรือ		+
10.	BUB-11	อ.เมือง	บ้านดู่		+
11.	BUB-12	อ.วารินชำราบ	กรกมล	+	
12.	BUB-13	อ.เขื่องใน	เขื่องใน		+
13.	BUB-14	อ.วารินชำราบ	วาริน 2		+
14.	BUB-15	อ.โขงเจียม	KJ-11	+	
15.	BUB-16	อ.เมือง	หนองหญ้า		+
16.	BUB-17	อ.โขงเจียม	KJ-21	+	
17.	BUB-18	อ.โขงเจียม	KJ-401	+	
18.	BUB-19	อ.ศรีเมืองใหม่	SM-501	+	
19.	BUB-20	อ.ศรีเมืองใหม่	SM-502	+	
20.	C-9	ศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก			+
21.	C-11				+
22.	AK-K3		เห็ดบด ก-3 (*L. polychrous* Lev.)		+

เห็ดขอนขาวเป็นเห็ดที่มีรูปร่างดอกเป็นทรงกรวยตื้น (funnel-shaped) ขนาดดอก 1.0-11.5 ซม. ขอบดอกงอลง (enrolled) กลางดอกมีรอยบุ๋ม (depressed) ดอกเห็ดสีขาว มีเกล็ดเล็กๆ สีขาวนวล หรือน้ำตาลอ่อน เรียงกระจายจากศูนย์กลางออกไปยังขอบดอก (ภาพที่ 1) ลักษณะดอกเห็ดขอนขาว แสดงรายละเอียดในภาพที่ 2

เมื่อนำเกล็ดที่อยู่บนผิวหมวกมาสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าประกอบด้วยเส้นใยที่มัดกันเป็นแท่ง ตามภาพที่ 3 เนื้อดอกเห็ดขอนขาวบางและเหนียวแบบเป็น fibrous ตามที่จะสังเกตได้จากเนื้อด้านในของดอกเห็ดที่ผ่าตามยาว (ภาพที่ 4)

ครีบสีขาวแคบและเรียงตัวชิดกัน ครีบติดกับก้านดอกแบบ decurrent คือติดอยู่กับดอกเป็นแนวยาวตลอดจากขอบดอกไปยังก้านดอก ความยาวของครีบจากเนื้อหมวกถึงขอบครีบ 1-3 มม. เมื่อตัดครีบตามขวาง แล้วนำไปสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าประกอบด้วยเส้นใยเรียงตัวกันเป็นชั้น ปลายเส้นใยเป็นโครงสร้างเบสิเดียม (basidium) ที่มีก้านซูสปอร์หรือ sterigma ซึ่งมีเบสิดิโอสปอร์อยู่ที่ปลายก้าน ดังภาพที่ 5

ก้านดอกอยู่กลางดอก รูปร่างเป็นทรงกระบอกตัน เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ซม. ยาว 1-12.8 ซม. บนก้านมีเกล็ดลักษณะเช่นเดียวกับบนหมวก เรียงเป็นวงรอบผิวก้าน

เห็ดในจีนัส Lentinus บางชนิดมีลักษณะรูปร่างคล้ายกัน แต่สามารถบอกความแตกต่างของดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่ได้เช่น เห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont. (ภาพที่ 6-1, 6-2 และ 6-4) มีลักษณะแตกต่างจาก เห็ดตีนปลอก *Lentinus sajor-caju* Fr. (ภาพที่ 6-3) และเห็ดบดหรือเห็ดลม *Lentinus polychrous* Lev. (ภาพที่ 6-5 และ 6-6) จากการเปรียบเทียบลักษณะดอกของเห็ดกลุ่มนี้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบลักษณะดอกของเห็ดขอนขาว เห็ดตีนปลอกและเห็ดบด

เห็ด	ลักษณะดอก	ผิวหมวก	ก้าน
เห็ดขอนขาว	ทรงกรวยตื้น	มีเกล็ดสีขาวครีม น้ำตาลอ่อน	ไม่มีแหวน
เห็ดตีนปลอก	ทรงกรวยตื้น	ผิวเรียบสีครีม	มีแหวนที่โคนก้าน
เห็ดบด	ทรงกรวยลึก	มีเกล็ดสีน้ำตาลเข้ม	ไม่มีแหวน

สปอร์รูปทรงกระบอก ขนาด 2-2.5 x 6-8 um มีติ่งที่ปลายข้างหนึ่งซึ่งเป็นบริเวณที่สปอร์เคยติดกับก้านซูสปอร์ (sterigma) ผิวสปอร์เรียบ ผนังบาง ไม่มี decoration ที่ผิวสปอร์ เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ สปอร์เดียวจะใส ไม่มีสี สปอร์ของเห็ดขอนขาวมีลักษณะดังภาพที่ 7-1 และ 7-2 สปอร์ที่อยู่รวมกันมากๆ เป็นกลุ่มมีสีขาวนวล

เมื่อดอกเห็ดเจริญเต็มที่จะปล่อยสปอร์จากครีบออกมาเป็นควันหรือฝุ่นสีขาวนวล ดังภาพที่ 8 สปอร์อาจติดอยู่ที่ปลายครีบดังภาพที่ 9-1 หรือสะสมที่ด้านนอกของครีบดังภาพที่ 9-2 และ 9-3 ดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่แต่ละดอกสามารถสร้างแล้วปล่อยสปอร์ได้มากกว่าล้านสปอร์ จากการเจือจางสปอร์ที่ติดบนผิวในพื้นที่ 1 ซม^2 ด้วยน้ำกลั่นแล้วนับด้วย hemacyotmeter นำมาคำนวณปริมาณสปอร์ที่เกาะอยู่บนผิวพลาสติก (ภาพที่ 8-4) พบว่ามีปริมาณสปอร์เฉลี่ยประมาณ 4.7 X 10^5 สปอร์/ซม^2

การแช่สปอร์ที่อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำให้สปอร์บวมและมีขนาดใหญ่ขึ้นดังภาพที่ 7-3 และ 7-4 หลังจากนั้นสปอร์โดยเฉลี่ยประมาณ 98 % งอก germ tube ได้ตามลักษณะที่สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ในภาพที่ 10-1 ถึง 10-5 และพัฒนาเป็นเส้นใยที่เป็น monokaryotic mycelia ไม่พบการสร้าง clamp connection ตามภาพที่ 10-6

การแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อของดอกเห็ดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เส้นใยที่เจริญเป็นเส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีลักษณะเป็น dikaryotic mycelia พบการสร้าง clamp connection ดังภาพที่ 11 (ศรชี้) ซึ่งแสดงการรวมนิวเคลียสระหว่าง monokaryotic mycelia

ลักษณะของเส้นใยของเชื้อเห็ดขอนขาวที่เจริญในอาหาร PDA ที่ 35 °C เป็นเวลา 7 วัน ดังภาพที่ 12 แสดงความแตกต่างของลักษณะโคโลนีของแต่ละไอโซเลท BUB-2 เส้นใยบางที่จุดศูนย์กลางและหนาแน่นที่ริมโคโลนี BUB-11 และ BUB-16 เส้นใยหนาแน่นที่จุดศูนย์กลางและบางที่ริมโคโลนี BUB-15 เส้นใยหนาแน่นสม่ำเสมอทั่วทั้งโคโลนี เป็นวงรอบหรือโซน (zonation) คล้ายกับ BUB-17 แต่ไม่มีสีน้ำตาลเป็นวงรอบ BUB-9, BUB-12, C-11 เส้นใยหนาแน่นจับกันเป็นแผ่นในบางพื้นที่ และมีสีน้ำตาลเป็นหย่อมๆ BUB-13 เส้นใยหนาแน่นแบบเป็นกระจุกเล็กๆและมีสีน้ำตาลแทรกอยู่ทั่วไป

การเจริญของเส้นใยของเห็ดขอนขาวในถุงขี้เลื่อย (spawn run) ที่บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 °C พบว่าช่วงเวลาของการเจริญเต็มถุงขนาด 0.5 กิโลกรัม คือ 15-20 วัน และในถุงขนาด 1.0 กิโลกรัม คือ 28-45 วัน หลังจากพักเส้นใย 2 สัปดาห์ ได้นำไปให้ความชื้นและเปิดดอก ทุกไอโซเลทและสายพันธุ์เปรียบเทียบสามารถสร้างดอกเห็ดได้ โดยเริ่มมีตุ่มเห็ดที่สังเกตเห็น ตั้งแต่วันที่ 7 ที่ได้รับความชื้น

วงจรชีวิตของเห็ดขอนขาว ในสภาพธรรมชาติจะเป็นไปตามภาพที่ 13 โดยเริ่มจากดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่ปล่อยสปอร์ออกไปสู่ภายนอก สปอร์ที่ตกอยู่ในที่เหมาะสมงอก germ tube ซึ่งพัฒนาไปเป็นเส้นใยและได้รับสารอาหารเพื่อสร้างชีวมวลมากขึ้น จนเป็นตุ่มเห็ดที่พร้อมเป็นดอกเห็ด ดอกเห็ดขอนขาวระยะแรกเป็นทรงกลม มีก้านยาว มีขอบที่ม้วนปกคลุมครีบไว้ทั้งหมด ต่อมาหมวกจึงเริ่มแบนและขอบหมวกยกขึ้น จนกระทั่งเป็นดอกเห็ดทรงกรวย

เชื้อเห็ดบางไอโซเลท เช่น BUB-12 (ชื่อเดิม กรกมล) สร้างดอกได้ทั้งจากถุงที่มีและไม่มีแผ่นสีน้ำตาลแทรกอยู่ในเส้นใย ดังภาพที่ 14-1 และ 14-2 ส่วนไอโซเลทอื่นๆ เช่น BUB-11 และ BUB-13

สร้างดอกจากถุงที่มีแผ่นสีน้ำตาลแทรกอยู่ในเส้นใยเสมอดังภาพที่ 14-3 ในถุงขนาด 1.0 กิโลกรัม ดอกเห็ดสร้างได้ในบริเวณปากถุงและบริเวณที่ได้กรีดด้านข้างถุง ตามภาพที่ 15-1 และ 15-2

ถ้าดอกเห็ดอยู่ในสภาพที่ขาดอากาศ ดอกเห็ดจะมีลักษณะดอกผิดปกติ ดังภาพที่ 16 ดอกเห็ดไอโซเลท BUB-16 (ชื่อเดิม หนองหญ้า) มีขอบดอกที่ม้วนขึ้น กลับทิศทางกับดอกเห็ดที่เป็นปกติ

ดอกเห็ดขอนขาวไอโซเลท BUB-10 (ชื่อเดิม หัวเรือ) ที่เจริญจากวัสดุเพาะอาจเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ ตามภาพที่ 17-1 และ 17-2 หรือเป็นกลุ่มที่มีขนาดต่างๆ ที่ติดกันที่โคนก้านดอก ตามภาพที่ 17-4 ส่วนบางไอโซเลท เช่น BUB-11 (ชื่อเดิม บ้านดู่) ทุกถุงสร้างดอกเห็ดที่เป็นกลุ่ม ดังภาพที่ 17-3 ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าลักษณะการสร้างดอกเดี่ยวหรือกลุ่มขึ้นอยู่กับไอโซเลทของเห็ดและ/หรือ สารอาหารและสภาพแวดล้อม

ดอกเห็ดในระยะที่เป็นเห็ดเศรษฐกิจ ซึ่งเป็นเห็ดที่พบได้ตามตลาดสดในภาคอีสาน ตามภาพที่ 18 เป็นเห็ดขอนขาวที่จำหน่ายร่วมกับเห็ดบด ในตลาดสดอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี เมื่อเดือนมิถุนายน 2543

2. การศึกษารูปแบบของเอนไซม์โดย electrophoresis

การศึกษารูปแบบของเอนไซม์ (isozyme pattern) โดย electrophoresis ใช้วิธี native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ซึ่งไม่ทำลายโครงสร้างตามธรรมชาติของโปรตีนเพื่อให้สามารถศึกษา enzyme activity ของเอนไซม์ได้ การเลือกศึกษาเอนไซม์ Esterase (EST, EC 3.1.1.1) และ o-tolidine-reacting enzyme phenoloxidase (TRE, EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์เนื่องจาก EST เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเห็ดทุกชนิดและนำมาจำแนกความหลากหลายเห็ดกลุ่มนางรมนางฟ้าได้ (ประเสริฐ, 2539) และ TRE เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส และการสร้างดอกเห็ด (Choi etal, 1987; Savoie etal, 1995)

พบว่ารูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ TRE ของเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* จำนวน 21 ไอโซเลท และเห็ดลม *Lentinus polychrous* จำนวน 1 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันเป็น 21 รูปแบบ ดังภาพที่ 19 สายพันธุ์ BUB-9 มีรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ TRE น้อยที่สุดเพียง 1 แถบ (band) ส่วนสายพันธุ์ BUB-2 มีรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ TRE สูงสุดเป็น 6 แถบ และไอโซเลทอื่นๆ มีรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ TRE ตั้งแต่ 2-5 แถบ โดยที่รูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ TRE ดังกล่าวมีความแปรผันกันในทุกไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลท BUB-4 และ BUB-5 ที่ไม่แตกต่างกัน แม้ว่ามีความเข้มของแถบสีของ enzyme activity ที่แตกต่างกัน

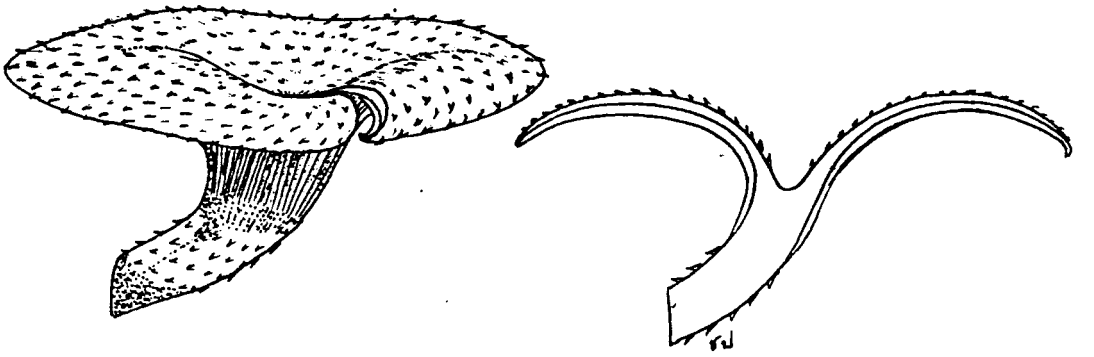
รูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST ของเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* จำนวน 21 ไอโซเลท และเห็ดลม *Lentinus polychrous* จำนวน 1 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันเป็น 20 รูปแบบ ดังภาพที่ 20 ไอโซเลท BUB-4 และ BUB-20 มีแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST ที่แตกต่างกันเพียง 3

แถบ ส่วนไอโซเลท BUB-2 มีแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST เป็น 9 แถบ และไอโซเลทอื่นๆ มีรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST ที่มี Rf แตกต่างกัน ระหว่าง 2-8 แถบ โดยที่รูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST ดังกล่าวมีความแปรผันกันในทุกไอโซเลท

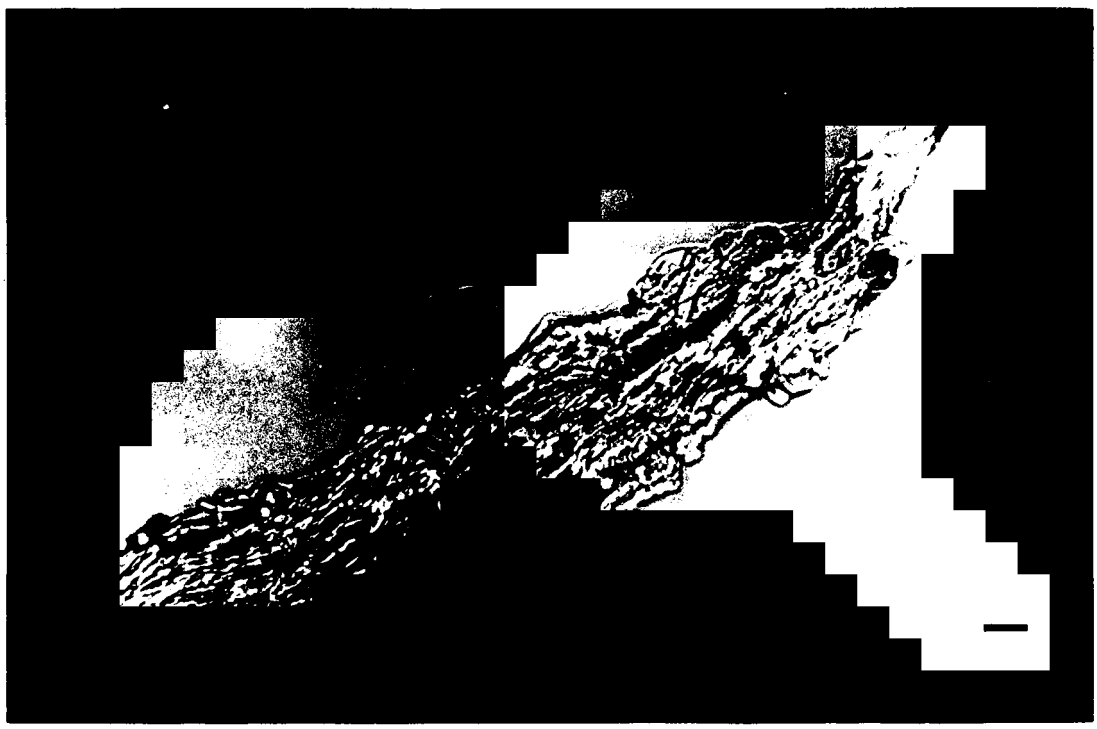
พบแนวโน้มว่าไอโซเลทที่มีแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ TRE จำนวนน้อยมีแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST จำนวนน้อยด้วย ส่วนไอโซเลทที่มีรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ TRE จำนวนมาก มีแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST จำนวนมากด้วย เช่น ไอโซเลท BUB-20 ซึ่งมีรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ TRE เพียง 2 แถบ มีแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST เพียง 3แถบ ไอโซเลท BUB-2 มีรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ TRE สูงสุดเป็น 6 แถบและมีรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST สูงสุด 9 แถบด้วย อย่างไรก็ตามยังมีบางไอโซเลทที่มีรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ TRE จำนวนน้อย มีแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST จำนวนมากได้ เช่น ไอโซเลท BUB-9 และ BUB-14 ซึ่งมีแถบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ TRE เพียง 1 และ 2 แถบตามลำดับ มีรูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ที่แตกต่างกันจำนวน 7 แถบเท่ากัน

รูปแบบของไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST มีจำนวนมากและหลากหลายกว่าเอนไซม์ TRE ดังที่เปรียบเทียบในตารางที่ 3 และ 4

ภาพที่ 1 ลักษณะดอกเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont. BUB-1 จากการเพาะเลี้ยง

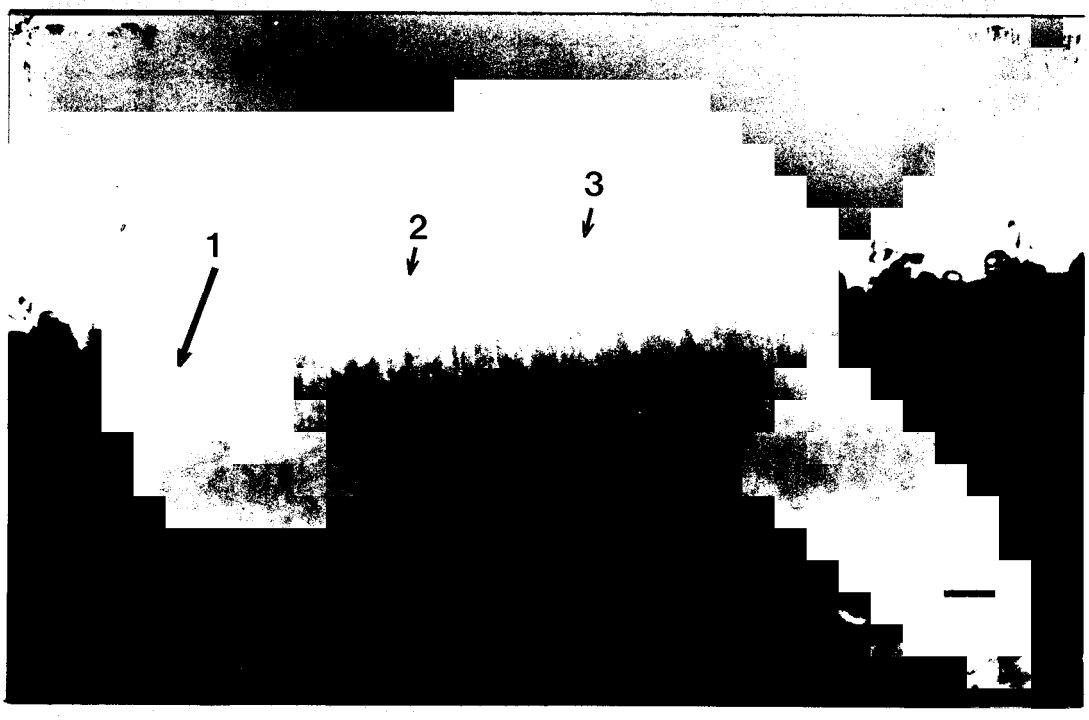


ภาพที่ 2 ลักษณะดอกเห็ดขอนขาวแสดงส่วนประกอบของดอก คือ หมวก ครีบ เกล็ด และก้าน และภาพตัดตามยาวของดอก



ภาพที่ 3 ลักษณะของเกล็ดที่บนผิวหมวกสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (bar = 10 μm)

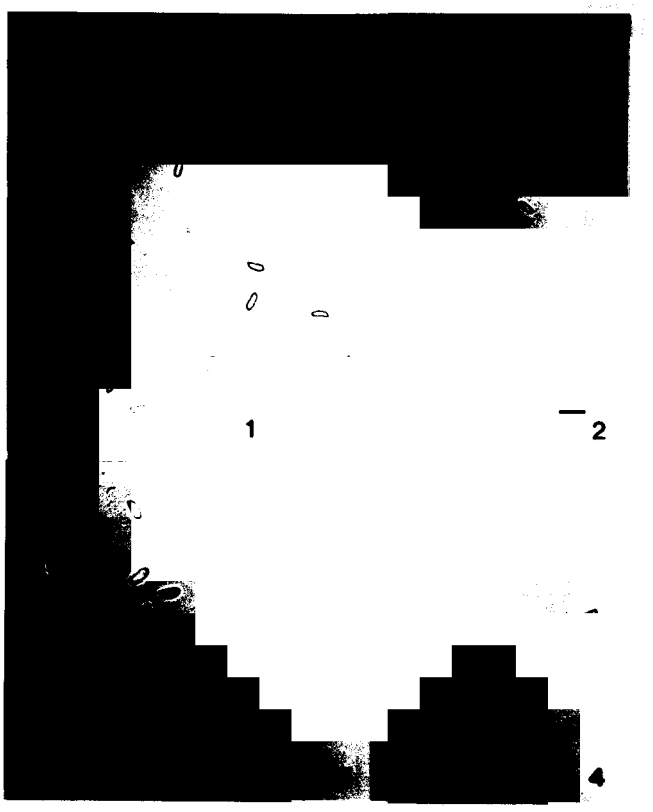
ภาพที่ 4 ดอกเห็ดขอนขาวตัดตามยาวแสดงลักษณะเส้นใยภายในที่เป็น fibrous (ศรชี้)



ภาพที่ 5 ลักษณะของครีบที่ตัดตามขวาง และสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า แสดงเบสิเดียม (basidium, 1) ก้านซูสปอร์ (sterigma, 2) และ เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore, 3)

(bar = 10 μm)

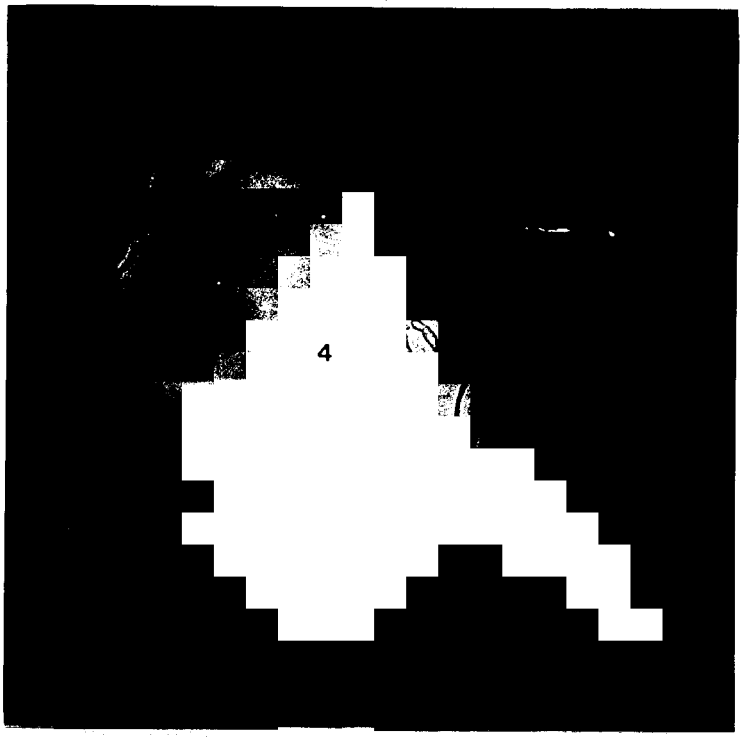
ภาพที่ 6 ลักษณะของเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont. (6-1, 6-2 และ 6-4) เห็ดตีนปลอก *Lentinus sajor-caju* Fr. (6-3) และเห็ดบดหรือเห็ดลม *Lentinus polychrous* Lev. (6-5 และ 6-6)



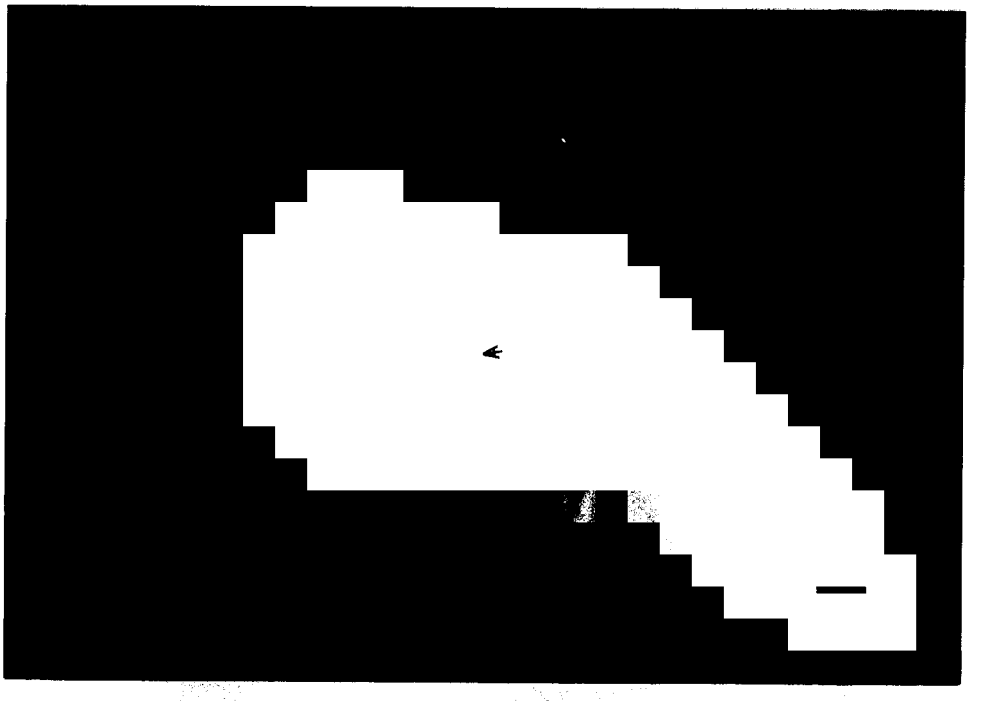
ภาพที่ 7 สปอร์ของเห็ดขอนขาว (7-1 และ 7-2) และสปอร์ที่แช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C เป็น เวลา 6 ชั่วโมง ทำให้สปอร์มีขนาดใหญ่ขึ้น (7-3 และ 7-4) สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (bar = 10 μm)

ภาพที่ 8 ดอกเห็ดขอนขาวที่ปล่อยสปอร์จากครีบเป็นควันหรือฝุ่นสีขาวนวล (ศรชี้)

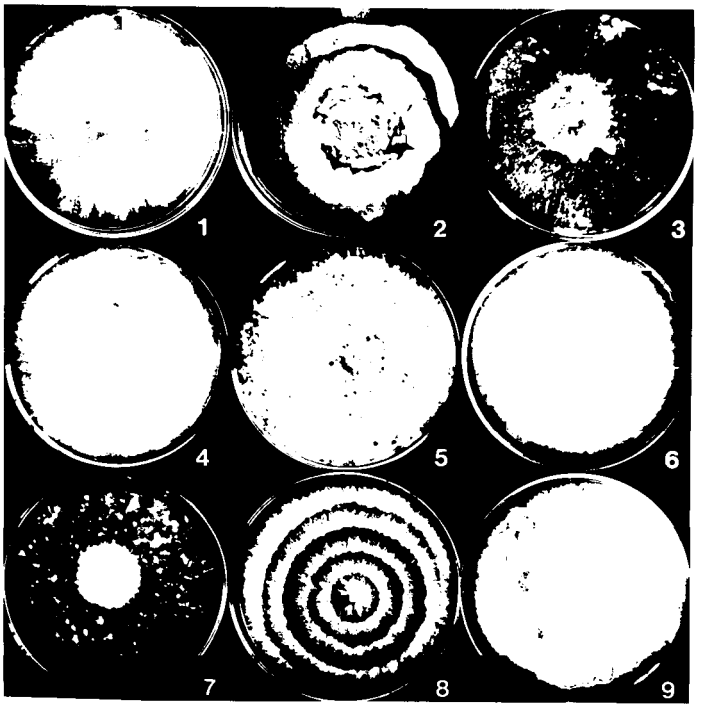
ภาพที่ 9 สปอร์ที่ปลายครีบของเห็ดขอนขาว (9-1) ที่ด้านนอกของครีบ (9-2 และ 9-3) และสปอร์ที่เกาะอยู่บนผิวพลาสติก (9-4)



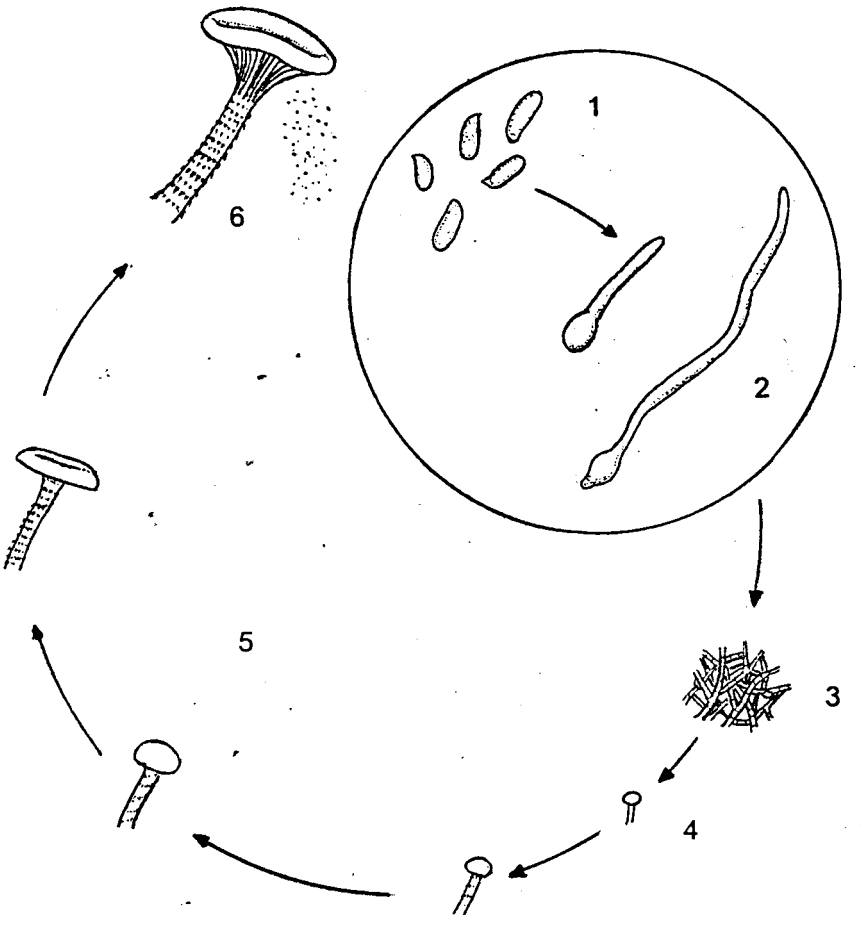
ภาพที่ 10 สปอร์ที่งอกงอก germ tube (10-1, 10-2,10-3,10-4, 10-5) และพัฒนาเป็นเส้นใยที่เป็น monokaryotic mycelia ซึ่งไม่พบ clamp connection ในบริเวณใดๆของเส้นใย (10-6) สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (bar = 10 μm)



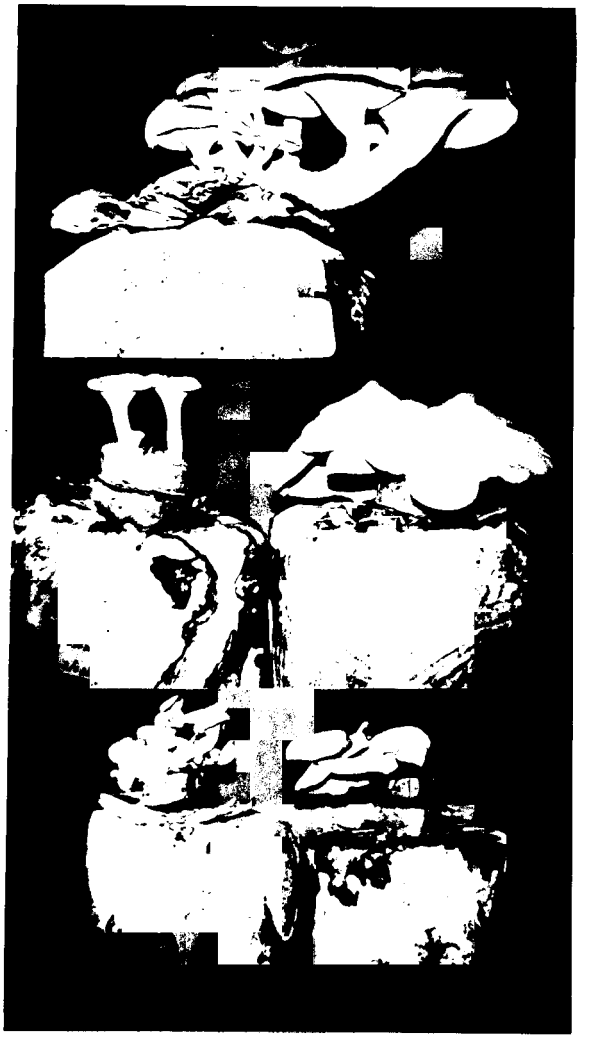
ภาพที่ 11 เส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ของเห็ดขอนขาว BUB-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีลักษณะเป็น dikaryotic mycelia พบการสร้าง clamp connection (ศรชี้)
สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (bar = 10 μm)



ภาพที่ 12 ลักษณะของเส้นใยของเชื้อเห็ดขอนขาวที่เจริญในอาหาร PDA ที่ 35 °C เป็นเวลา 7 วัน แสดงความแตกต่างของลักษณะโคโลนีของแต่ละไอโซเลท



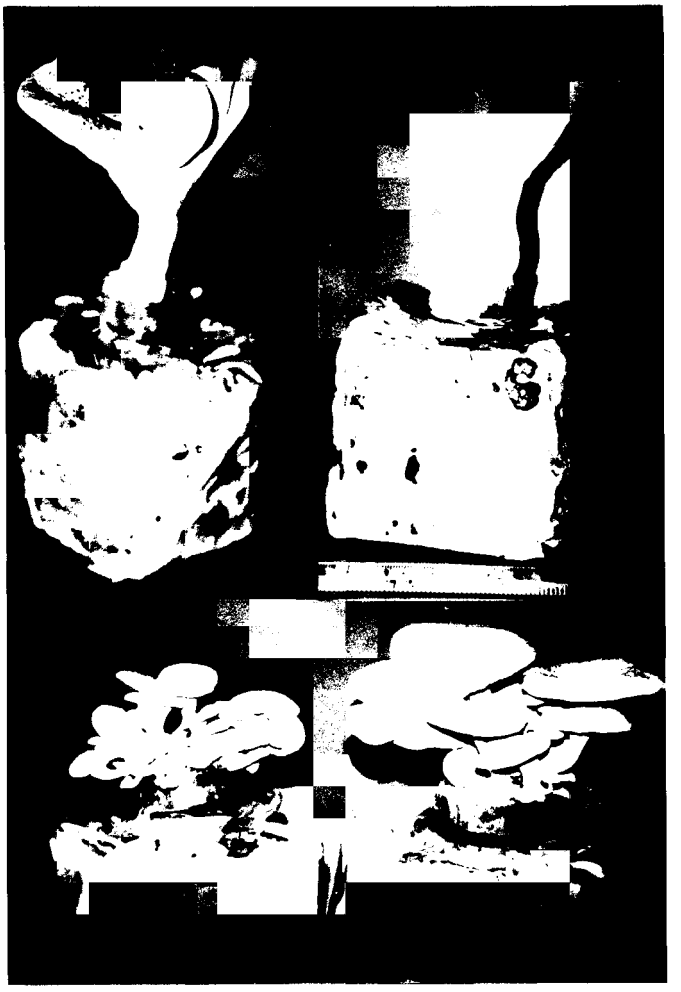
ภาพที่ 13 วงจรชีวิตของเห็ดขอนขาวในธรรมชาติ ระยะ 1 : spore, ระยะ 2 : germination, ระยะ 3 : mycelial network, ระยะ 4 : primordium, ระยะ 5 : fruiting body development, ระยะ 6 : mature fruiting body



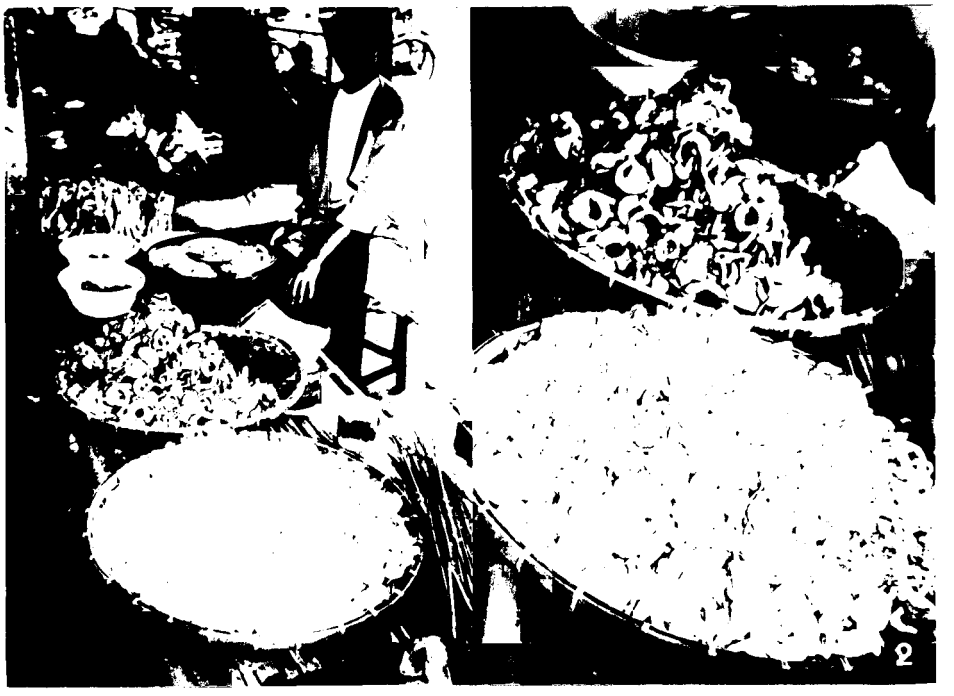
ภาพที่ 14 เห็ดขอนขาว BUB-12 (ชื่อเดิม กรกมล) สร้างดอกได้ทั้งจากถุงที่สร้างแผ่นสีน้ำตาล (14-2) และไม่สร้างแผ่นสีน้ำตาลในเส้นใย (14-1) BUB-11 (ซ้าย) และ BUB-13 (ขวา) สร้างดอกจากถุงที่มีแผ่นสีน้ำตาลแทรกอยู่ในเส้นใยเสมอ (14-3)

ภาพที่ 15 ดอกเห็ดขอนขาวที่สร้างจากบริเวณด้านข้างของถุงขี้เลื่อยขนาด 1 กิโลกรัม

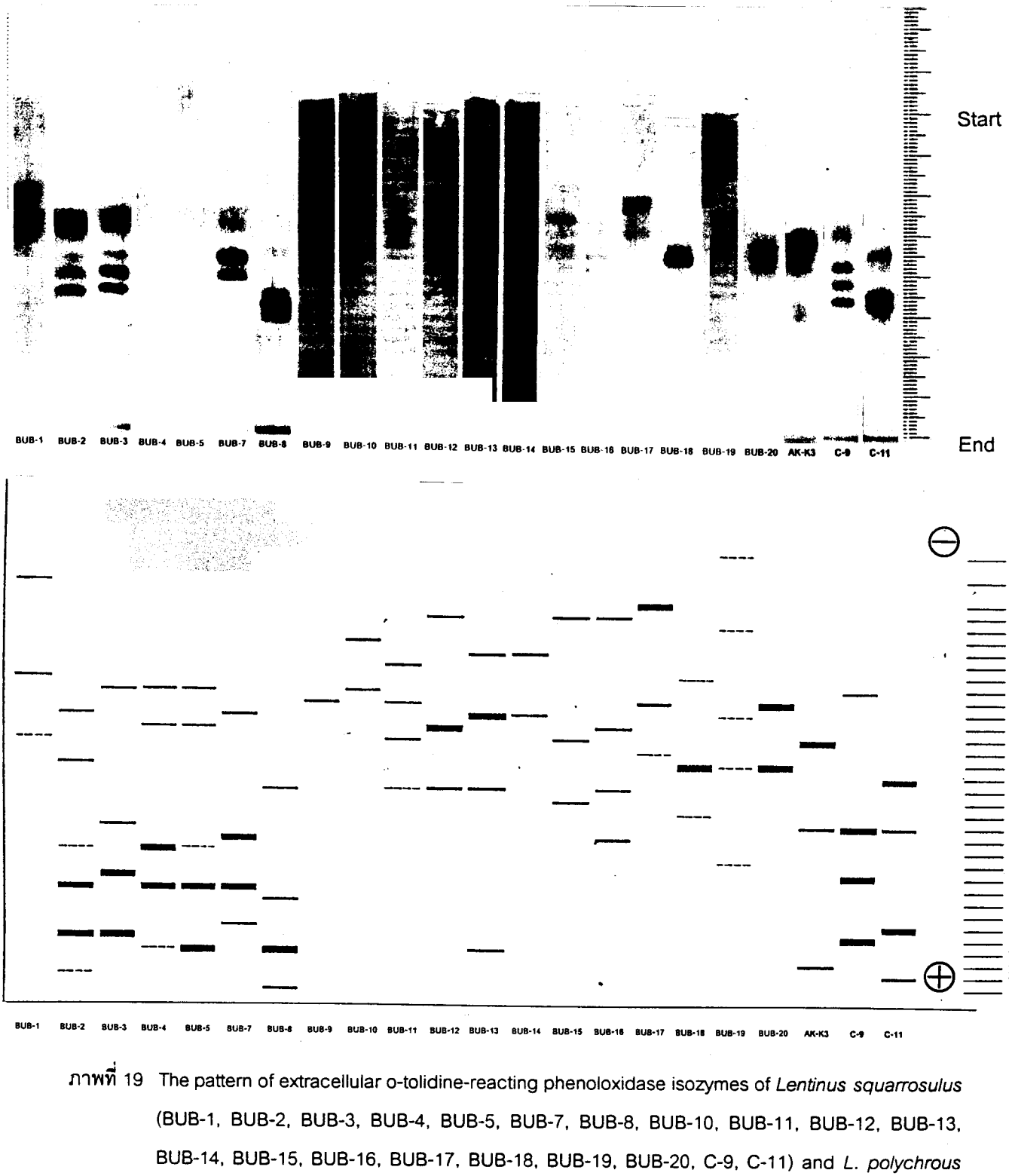
ภาพที่ 16 ดอกเห็ดขอนขาว BUB-16 (ชื่อเดิม หนองหญ้า) มีลักษณะดอกผิดปกติ คือขอบดอกม้วนขึ้นในสภาพที่ขาดอากาศ



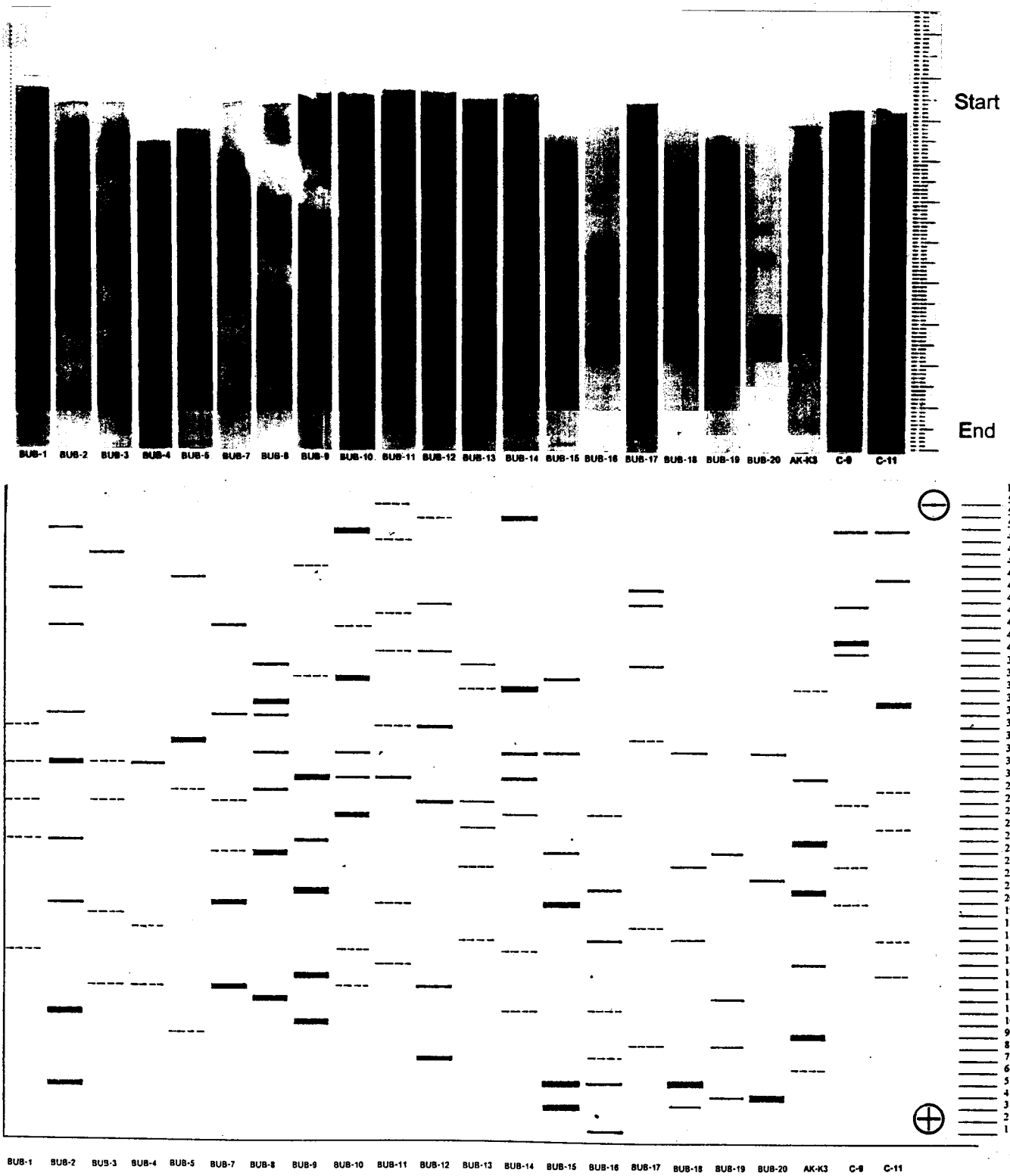
ภาพที่ 17 ดอกเห็ดขอนขาว BUB-10 (ชื่อเดิม หัวเรือ) ที่เป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ (17-1 และ 17-2) และเป็นกลุ่มที่มีขนาดต่างๆ ที่ติดกันที่โคนก้านดอก (17-4) ไอโซเลท BUB-11 (ชื่อเดิม บ้านดู่) สร้างดอกเห็ดที่เป็นกลุ่ม (17-3)



ภาพที่ 18 ดอกเห็ดขอนขาวระยะจำหน่ายทั่วไปในตลาดของภาคอีสาน ในภาพเป็นเห็ดขอนขาว (ดอกที่มีสีขาวกว่า) ที่จำหน่ายร่วมกับเห็ดบด (ดอกสีน้ำตาล) ในตลาดสดอำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี เมื่อมิถุนายน 2543



ภาพที่ 19 The pattern of extracellular o-tolidine-reacting phenoloxidase isozymes of *Lentinus squarrosulus* (BUB-1, BUB-2, BUB-3, BUB-4, BUB-5, BUB-7, BUB-8, BUB-10, BUB-11, BUB-12, BUB-13, BUB-14, BUB-15, BUB-16, BUB-17, BUB-18, BUB-19, BUB-20, C-9, C-11) and *L. polychrous* AK-K3. The assay was analyzed at 72 hours of incubation period by the native polyacrylamide gel electrophoresis. Staining was reacted with the mixture of o-tolidine, 95% alcohol, acetic acid and glycine. Sample of 50-100 μg protein was loaded in each slot.



ภาพที่ 20 The pattern of intracellular esterase isozymes of *Lentinus squarrosulus* (BUB-1, BUB-2, BUB-3, BUB-4, BUB-5, BUB-7, BUB-8, BUB-10, BUB-11, BUB-12, BUB-13, BUB-14, BUB-15, BUB-16, BUB-17, BUB-18, BUB-19, BUB-20, C-9, C-11) and *L. polychrous* AK-K3. The assay was analyzed at 72 hours of incubation period by the native polyacrylamide gel electrophoresis. Staining was reacted with the mixture of α-napthyl acetate, β-napthyl acetate and Fast Blue BB salt. Sample of 50-100 μg protein was loaded in each slot.

ตารางที่ 3 Zymogram จากการศึกษารูปแบบเอนไซม์ TRE ของ *Lentinus squarrosulus* (BUB-1, BUB-2, BUB-3, BUB-4, BUB-5, BUB-7, BUB-8, BUB-10, BUB-11, BUB-12, BUB-13, BUB-14, BUB-15, BUB-16, BUB-17, BUB-18, BUB-19, BUB-20, C-9, C-11) และ *L. polychrous* AK-K3.

รูปแบบ	จำนวนไอโซไซม์	ชื่อรหัสของไอโซไซม์	สายพันธุ์เห็ด
T_A	3	T_{21}, T_{26}, T_{34}	BUB-1
T_B	6	T_2, T_5, T_9, T_{12}, T_{19}, T_{23}	BUB-2
T_C	4	T_5, T_{10}, T_{14}, T_{25}	BUB-3
T_D	5	T_4, T_9, T_{12}, T_{22}, T_{25}	BUB-4, BUB-5
T_E	4	T_6, T_9, T_{13}, T_{23}	BUB-7
T_F	4	T_1, T_4, T_8, T_{17}	BUB-8
T_G	1	T_{24}	BUB-9
T_H	2	T_{25}, T_{29}	BUB-10
T_I	4	T_{17}, T_{21}, T_{24}, T_{27}	BUB-11
T_J	3	T_{17}, T_{22}, T_{31}	BUB-12
T_K	4	T_4, T_{17}, T_{23}, T_{28}	BUB-13
T_L	2	T_{23}, T_{28}	BUB-14
T_M	3	T_{16}, T_{21}, T_{31}	BUB-15
T_N	4	T_{13}, T_{17}, T_{22}, T_{31}	BUB-16
T_O	3	T_{20}, T_{24}, T_{32}	BUB-17
T_P	3	T_{15}, T_{19}, T_{26}	BUB-18
T_Q	5	T_{11}, T_{19}, T_{23}, T_{30}, T_{36}	BUB-19
T_R	2	T_{19}, T_{24}	BUB-20
T_S	3	T_3, T_{14}, T_{21}	AK-K3
T_T	4	T_5, T_{10}, T_{14}, T_{25}	C-9
T_U	4	T_2, T_6, T_{14}, T_{18}	C-11

ตารางที่ 4 Zymogram จากการศึกษารูปแบบเอนไซม์ EST ของ *Lentinus squarrosulus* (BUB-1, BUB-2, BUB-3, BUB-4, BUB-5, BUB-7, BUB-8, BUB-10, BUB-11, BUB-12, BUB-13, BUB-14, BUB-15, BUB-16, BUB-17, BUB-18, BUB-19, BUB-20, C-9, C-11) และ *L. polychrous* AK-K3.

รูปแบบ	จำนวนไอโซไซม์	ชื่อรหัสของไอโซไซม์	สายพันธุ์เห็ด
E_A	5	E_{15}, E_{24}, E_{27}, E_{30}, E_{33}	BUB-1
E_B	9	E_4, E_{10}, E_{19}, E_{24}, E_{30}, E_{34}, E_{41}, E_{44}, E_{49}	BUB-2
E_C	5	E_{12}, E_{18}, E_{27}, E_{30}, E_{47}	BUB-3
E_D	3	E_{12}, E_{17}, E_{30}	BUB-4
E_E	4	E_8, E_{28}, E_{32}, E_{45}	BUB-5
E_F	6	E_{12}, E_{19}, E_{23}, E_{27}, E_{34}, E_{41}	BUB-7
E_G	7	E_{11}, E_{23}, E_{28}, E_{31}, E_{34}, E_{35}, E_{38}	BUB-8
E_H	7	E_9, E_{13}, E_{20}, E_{24}, E_{29}, E_{37}, E_{46}	BUB-9
E_I	8	E_{12}, E_{15}, E_{26}, E_{29}, E_{31}, E_{37}, E_{41}, E_{49}	BUB-10
E_J	8	E_{14}, E_{19}, E_{29}, E_{33}, E_{39}, E_{42}, E_{48}, E_{51}	BUB-11
E_K	7	E_6, E_{12}, E_{27}, E_{33}, E_{39}, E_{43}, E_{50}	BUB-12
E_L	6	E_{16}, E_{22}, E_{25}, E_{27}, E_{36}, E_{38}	BUB-13
E_M	7	E_{10}, E_{15}, E_{26}, E_{29}, E_{31}, E_{36}, E_{50}	BUB-14
E_N	6	E_2, E_4, E_{19}, E_{23}, E_{31}, E_{37}	BUB-15
E_O	7	E_1, E_4, E_6, E_{10}, E_{15}, E_{20}, E_{26}	BUB-16
E_P	6	E_7, E_{17}, E_{32}, E_{38}, E_{43}, E_{44}	BUB-17
E_Q	5	E_2, E_4, E_{16}, E_{22}, E_{31}	BUB-18
E_R	4	E_3, E_7, E_{11}, E_{23}	BUB-19
E_S	3	E_3, E_{21}, E_{31}	BUB-20
E_T	7	E_5, E_8, E_{14}, E_{20}, E_{24}, E_{29}, E_{36}	AK-K3
E_U	7	E_{19}, E_{22}, E_{27}, E_{39}, E_{40}, E_{43}, E_{49}	C-9
E_V	7	E_{13}, E_{16}, E_{25}, E_{28}, E_{35}, E_{39}, E_{49}	C-11

สรุปผล

ได้ดำเนินการตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้คือ

1. รวบรวมสายพันธุ์เห็ดขอนขาวจากแหล่งต่างๆ ในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 19 ไอโซเลทและเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเส้นใย ดอกเห็ดและสปอร์ของเห็ดขอนขาว
3. จำแนกเห็ดขอนขาวที่รวบรวมได้กับสายพันธุ์เปรียบเทียบที่เป็นเห็ดขอนขาว 2 สายพันธุ์และเห็ดบด 1 สายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบรูปแบบของไอโซไซม์ o-tolidine-reacting phenoloxidase และ esterase พบความหลากหลายของรูปแบบของเอนไซม์สูงคือแต่ละไอโซเลทมีความจำเพาะ และรูปแบบของไอโซไซม์ทั้งสองชนิดนำมาใช้ในการจำแนกเห็ดขอนขาวได้

ข้อเสนอแนะ

โครงการนี้ได้เสนอข้อมูลบางประการทางชีววิทยาของเห็ดขอนขาว เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่อาจนำไปใช้ประโยชน์ต่อเนื่องในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเห็ดขอนขาว การเก็บรักษาสายพันธุ์ ฯ และได้เสนอแนวทางสำหรับการศึกษาความหลากหลายของเห็ดชนิดนี้โดยวิธีใช้ไอโซไซม์ ซึ่งนอกจากจะเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกสายพันธุ์ดีตามต้องการ แล้วยังสามารถใช้ในการระบุสายพันธุ์ของเห็ดอย่างจำเพาะเจาะจงเพื่อคุ้มครองสายพันธุ์ได้

เอกสารอ้างอิง

ราชบัณฑิตสถาน. 2539. เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย. กรุงเทพ. 180 น.

ปราโมทย์ ไทยทัตกุล. 2537. เห็ดป่าสู่เมือง. ข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด 2(1): 3-6.

ปราโมทย์ ไทยทัตกุล. 2539. การเพาะเห็ดในถุงพลาสติก. ใน เทคนิคการผลิตเห็ด. หน้า 8-13. กลุ่มพืชผัก กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร.

ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539. การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และผลผลิตของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดนางรมสีเทา. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพ.

อัญชลี เชียงกูล. 2539. เห็ดขอนขาว. ใน เทคนิคการผลิตเห็ด. หน้า 14-23. กลุ่มพืชผัก กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร.

Buchanan, P.K. 1993. Identification, Names and nomenclature of Common Edible Mushrooms. *In* Mushroom Biology and Mushroom Products. S.T. Chang, J.A Buswell and S-W. Chiu. (eds.). p. 21-32. The Chinese University of Hong Kong.

Choi, H.T., R.L. Wilk and I.K. Ross. 1987. Formation of sclerotia in liquid culture of *Coprinus congregatus* and their phenoloxidase isozyme. Mycologia 79 :166-172.

Peberdy, J.F., A.H. Hanifah and J.H. Jia. 1993. New Perspectives on the Genetics of *Pleurotus*. *In* Mushroom Biology and Mushroom Products. S.T. Chang, J.A Buswell and S-W. Chiu. (eds.) p. 55-62. The Chinese University of Hong Kong.

Rosendahl, R. and T. Sen. 1992. Isozyme analysis of mycorrhiza. Method in Microbiology 24 :169-192.

Savoie, J.-M., V. Cesbron and P. Delpach. 1995. Induction of polyphenol-oxidases in the mycelium of *Lentinus edodes*. Mushroom Science 2 : 787-792

ภาคผนวก

สูตรมาตรฐานของการเตรียมวัสดุเพาะเห็ด (ปราโมทย์, 2539)

ขี้เลื่อยไม้ยางพาราแห้ง	100 กิโลกรัม
รำละเอียด	5 กิโลกรัม
ปูนขาว ($CaCO_3$)	1 กิโลกรัม
ยิปซั่ม ($CaSO_4$)	2 กิโลกรัม
ดีเกลือ ($MgSO_4$)	0.2 กิโลกรัม

ปรับความชื้นในวัสดุเพาะประมาณ 60-65 %