

พฤติกรรมการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสของ *Coprinopsis cinerea* ในระหว่าง
การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออน และความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน
แคลมป์เซลล์ต่อการเกิดดอกเห็ด

**Nuclear migration behavior of *Coprinopsis cinerea*, during the mono-
karyotic mating and the relationship between the clamp cell number and
fruiting body formation**

ประยูกรต์ ศรีวิไล* อัญญพร พรหมเมตตา และ พนิดา เล้าชาญวุฒิ

Prayook Srivilai*, Ananyaphon Prommetta and Panida Loutchanwoot

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44150

Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44150

*Corresponding author: prayook.s@msu.ac.th

บทคัดย่อ

Coprinopsis cinerea เป็นเห็ดต้นแบบที่ใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโต การพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดและระบบพันธุกรรมของเห็ดในกลุ่มเบสิดิโอะไมซิทีส งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนย้ายนิวเคลียส ในระหว่างการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนของ *C. cinerea* 9 สายพันธุ์ ได้แก่ PS001, PS002, PS001-1, PS002-1, 218, AT8, Uv-6031, MK54 และ Okayama7 ผลการศึกษาพบว่าพฤติกรรมการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสมี 3 รูปแบบ คือ ผู้ให้นิวเคลียส ผู้รับนิวเคลียส และทั้งให้และรับนิวเคลียส โดยพฤติกรรมการให้และการรับนิวเคลียสของ *C. cinerea* แต่ละสายพันธุ์มีความแปรผันขึ้นอยู่กับคู่ผสม โดยยีนผสมพันธุ์ B มีอิทธิพลต่อการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสในเห็ด *C. cinerea* และจาก

การหาตำแหน่งนิวเคลียสในระหว่างการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนโดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสารเรืองแสง 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) พบว่าตำแหน่งของนิวเคลียสที่อยู่ภายในเส้นใยมีความแปรผันในแต่ละสายพันธุ์ และยิ่งกว่านั้นยังพบว่ารูปแบบการเชื่อมกันของเส้นใยโมโนคาริออนมีอย่างน้อย 2 รูปแบบ คือ การเชื่อมกันทางด้านปลาย และการเชื่อมกันทางด้านข้าง ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าจำนวนแคลมป์เซลล์ไม่ได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนของดอกเห็ดที่เกิดขึ้น แต่กลับพบว่าไดคาริออนที่เกิดจากการผสมของโมโนคาริออน มีผลทำให้เกิดดอกเห็ดมากกว่าในโฮโมคาริออน AmutBmut

ABSTRACT

Coprinopsis cinerea is a model mushroom

used for studying the growth, development, fruiting body formation and genetic systems of the basidiomycetous mushrooms. This research aimed to study the nuclear migration behavior during the monokaryotic mating of 9 strains of *C. cinerea* namely PS001, PS002, PS001-1, PS002-1, 218, AT8, Uv-6031, MK54 and Okayama7. The results revealed that there are three patterns of nuclear migration, which are nuclear donor, nuclear recipient and both nuclear donor and recipient. The behavior of nuclear donor or recipient of each *C. cinerea* strain varied depending upon the mating partners, as the *B* mating type gene exerted clear effects on nuclear migration. During the monokaryotic mating, the positions of nuclei in the hypha were located by staining with the fluorogenic dye 4',6-Diamidino-2-phenyl indole dihydrochloride (DAPI). The results showed that the nuclear positions within the hypha varied in each *C. cinerea* strain. Moreover, at least two types of hyphal fusion were observed, the hyphal tip fusion and lateral fusion. This study also found that the numbers of clamp cells did not correlate with the numbers of fruiting bodies. In addition, the dikaryons obtained from the monokaryotic matings resulted in a higher number of fruiting bodies than those of the homokaryon AmutBmut.

คำสำคัญ: *Coprinopsis cinerea*, การเคลื่อนย้าย นิวเคลียส, แคลมป์เซลล์, DAPI, การเกิดดอกเห็ด

Keywords: *Coprinopsis cinerea*, nuclear migration, clamp cell, DAPI, fruiting body formation

บทนำ

Coprinopsis cinerea เป็นเห็ดที่จัดอยู่ในชั้นโฮโมเบสิดิโอไมซีทีส (Homobasidiomycetes) เห็ดชนิดนี้มีรูปทรงคล้ายร่มและมีสีเทาดำ จึงเรียกชื่อเห็ดชนิดนี้อีกอย่างว่า “ink mushroom” ปัจจุบันมีการนำเอา *C. cinerea* มาใช้เป็นเห็ดต้นแบบ เพื่อศึกษาการเจริญและการพัฒนาของดอกเห็ดในกลุ่มเบสิดิโอไมซีทีส (basidiomycetous mushroom) และยังใช้ในการวิเคราะห์พันธุกรรม เนื่องจาก *C. cinerea* มีวงจรชีวิตสั้นสามารถเจริญได้ดีบนอาหารเพาะเลี้ยง และสามารถเกิดดอกเห็ด (fruiting body) ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการได้ โดยสามารถสร้างสปอร์ได้เป็นจำนวนมาก (Kües, 2000; Redhead *et al.*, 2001; Kamada, 2002) ยิ่งไปกว่านั้นจีโนมของเห็ดชนิดนี้มีการศึกษาครบถ้วนสมบูรณ์ และสามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูลสากลเฉพาะ (*Coprinopsis cinerea* Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT; <http://www.broadinstitute.org/>) ปัจจุบันพบว่าการศึกษาพันธุกรรมของ *C. cinerea* สามารถทำให้เข้าใจถึงการเจริญและการพัฒนา ตลอดจนยีนที่ควบคุมการเจริญของเห็ดชนิดอื่นๆ ได้ โดยเฉพาะในกลุ่มเบสิดิโอไมซีทีสด้วยกัน (Srivilai, 2006; Srivilai and Louchanwoot, 2009) วงชีวิตของ *C. cinerea* นั้นประกอบด้วยเส้นใยที่สำคัญสองชนิดคือ 1) เส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) คือเส้นใยที่มีหนึ่งนิวเคลียสต่อหนึ่งเซลล์เส้นใย (hyphal cell) หรือโมนาคาริออน (monokaryon) และ 2) เส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) หรือไดคาริออน (dikaryon) ซึ่งประกอบด้วย 2 นิวเคลียส ภายใน

หนึ่งเซลล์เส้นใย โดยนิวเคลียสมีแอลลีลที่จำเพาะเจาะจงต่อกัน เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมที่มีการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงสลับกับการไม่ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน ไดคาริออนสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด การเข้ากันได้ (compatible) หรือการเข้ากันไม่ได้ (incompatible) ของโมโนคาริออน และการพัฒนาไดคาริออนของ *C. cinerea* ถูกควบคุมโดยยีน 2 ยีน คือ ยีน A mating type และยีน B mating type (Casselton, 1998; Casselton and Olesnicky 1998; Kües, 2000; Kües *et al.*, 2002; James *et al.*, 2006) ยีน B mating type ทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสผ่านเส้นใย โดยนิวเคลียสจะเคลื่อนย้ายไปยังปลายเส้นใย เพื่อที่จะเคลื่อนย้ายไปยังเส้นใยที่มียีน mating type ตรงข้ามกัน (Kües, 2000; Kamada, 2002; Badalyan, 2004) หลังจากนั้นการแบ่งนิวเคลียสจะเกิดขึ้นในเวลาเดียวกันกับการสร้างผนังกัน (septum) ของแคลมป์เซลล์ เพื่อเป็นตัวขวางกั้นนิวเคลียสในแคลมป์เซลล์ ซึ่งการสร้างผนังกันในแคลมป์เซลล์ถูกควบคุมโดยยีน A mating type และยีนนี้ยังควบคุมการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศในโมโนคาริออนและไดคาริออนอีกด้วย (Kertesz-Chalouková *et al.*, 1998; Srivilai *et al.*, 2009) ยีน A mating type ประกอบด้วยยีน 2 ยีนที่สำคัญคือ *HD1* และ *HD2* ซึ่งถอดรหัสได้เป็นโปรตีน homeodomain transcription factor (โปรตีน HD1 และ HD2) ในการเกิดขึ้นของไดคาริออน โปรตีน HD1 และ HD2 ที่เป็นคู่กันและมาจากต่างโมโนคาริออนจะเข้าคู่กัน โดยโปรตีนทั้งสองตัวจะจับกันกลายเป็นเฮเทอโรไดเมอร์โปรตีน (heterodimeric protein) (Bharathan *et al.*, 1997; Asante-Owusu *et al.*, 1996; Pardo *et al.*, 1996; Casselton and Olesnicky, 1998) แล้วไปกระตุ้น G-protein ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีผลต่อโปรตีนตัวอื่นในรูปการนำส่งสัญญาณ (signal transduction) อันนำไปสู่การ

เปลี่ยนสภาพของเซลล์ (cell differentiation) และการเจริญของเส้นใย ตลอดจนการพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่สมบูรณ์ (mature fruiting body) (Kües and Casselton, 1992; Kües, 1994; Kües *et al.*, 1994; Kües *et al.*, 2002) ในขณะที่ยีน B mating type ประกอบด้วยยีนที่สำคัญ 2 ยีน คือ ยีน *phb1* และ *rcb1* ซึ่งทำหน้าที่สร้างฟีโรโมนและฟีโรโมนรีเซพเตอร์ ตามลำดับ โดยที่ฟีโรโมนและฟีโรโมนรีเซพเตอร์ของโมโนคาริออนสายพันธุ์หนึ่ง จะเข้าคู่กับฟีโรโมนรีเซพเตอร์และฟีโรโมนของโมโนคาริออน ของอีกสายพันธุ์หนึ่ง (Suzanne, 1998) ในระหว่างการผสมของเส้นใยโมโนคาริออนของ *C. cinerea* พบว่ายีน B mating type จะเป็นตัวควบคุมการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส (nuclear migration) โดยยีน A mating type อาจมีผลต่อการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสรวมด้วย และพบว่าการแลกเปลี่ยนนิวเคลียสระหว่างเส้นใยเกิดขึ้นได้ แต่จะไม่มีการถ่ายไซโทพลาสซึมและไมโทคอนเดรียระหว่างสองเส้นใย (Casselton and Economou, 1985; Hurst and Hamilton, 1992; Elliott, 1994; Harder and Annen, 2009) Unilateral Nuclear Migration (UNM) เป็นปรากฏการณ์การเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสในทิศทางเดียว ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ในยีนฟีโรโมนและฟีโรโมนรีเซพเตอร์ Harder และ Annen (2009) กล่าวว่าในการผสมของสองโมโนคาริออน โมโนคาริออนสายพันธุ์หนึ่งจะพัฒนาเป็นเส้นใยไดคาริออน ในขณะที่โมโนคาริออนคู่ผสมไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Harder and Annen, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญและลักษณะของเส้นใยของโมโนคาริออนและไดคาริออน มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน เนื่องจากเส้นใยไดคาริออนจะมีแคลมป์เซลล์ปรากฏอยู่ ขณะที่เส้นใยโมโนคาริออนจะไม่พบแคลมป์เซลล์ (O'Shea *et al.*, 1998; Halsall *et al.*, 2000; Badalyan, 2004; James *et al.*, 2006, Harder and Annen, 2009; Srivilai and

Louchanwoot, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่า เส้นใยไคคาริออนสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว โฮโมคาริออน AmutBmut ซึ่งเป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งของ *C. cinerea* ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งของยีน A mating type และยีน B mating type โดยมีลักษณะเส้นใยและการเจริญเติบโตของเส้นใย คล้ายเส้นใยไคคาริออนทั่วๆ ไป หรือเรียกว่าเป็น “dikaryon-like” (Kamada, 2002) ส่วนวงจรชีวิตของโฮโมคาริออน AmutBmut ประกอบด้วยเส้นใยโฮโมคาริออนที่มีสองนิวเคลียสในหนึ่งเซลล์เส้นใยเส้นใยมีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ภายใน 2 สัปดาห์ โดยที่ไม่ต้องการการผสมจาก *C. cinerea* สายพันธุ์อื่น เนื่องจากยีน A mating type และยีน B mating type มีการกลาย (Swamy et al., 1984) อย่างไรก็ตามพบว่าโฮโมคาริออน Amut Bmut เป็นสายพันธุ์ของ *C. cinerea* ที่มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศได้จำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับไคคาริออนกลุ่มสมอื่น หรือโมโนคาริออนของสายพันธุ์อื่น (Kertesz-Chaloukova et al., 1998; Srivilai et al., 2009) แต่พบว่าเมื่อให้แสงตลอดเวลา จะเพิ่มการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเพิ่มขึ้นจำนวนมาก ในการศึกษาการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสพบว่านิวเคลียสของ *C. cinerea* มีอัตราการเคลื่อนย้ายเฉลี่ย 0.2 μm ต่อวินาที โดยมีทิศทางการเคลื่อนย้ายจากทางด้านโคนเส้นใยไปยังปลายของเส้นใย และยังไม่พบการแบ่งนิวเคลียสเกิดขึ้นภายในเส้นใย และที่สำคัญพบว่า Ras โปรตีนมีผลต่อการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยในเห็ดต้นแบบ *C. cinerea* และ *Shizophyllum commune* โดย Ras โปรตีนที่ผิดปกติมีผลต่อการให้และรับนิวเคลียสของทรานส์ฟอร์มแมนท์ (transformant) ใน *C. cinerea* (Schubert et al., 2006; Srivilai, 2006) และพบว่ายีน B mating type ส่งผลให้เกิดโปรตีน B-factor ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญ และเป็นที่ต้องการของการเคลื่อนย้าย

นิวเคลียส และการเชื่อมกันของเส้นใย (Giesy and Day, 1965) ในการศึกษาเฮเทอโรคาริออน พบว่าในกรณีที่ยีน A mating type เหมือนกัน แต่ยีน B mating type ของกลุ่มสมแตกต่างกันเรียกว่า “common A heteronkaryon” ซึ่งพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเส้นใย ขณะที่ใน *S. commune* พบเส้นใยที่มีลักษณะ “flat” (Koltin and Flexer, 1969) ปัจจุบันการศึกษาพฤติกรรมของนิวเคลียสสามารถทำได้ โดยย้อมนิวเคลียสด้วยสารเรืองแสง 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) เพื่อตรวจหานิวเคลียสในเส้นใยของ *Phellinus igniarius* (อนัญพร และคณะ, 2554) ในการศึกษาการผสมระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ ของ *C. cinerea* เพื่อดูการรับหรือการให้ของนิวเคลียสในแต่ละกลุ่มสม พบว่าอัตราการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส จะเป็นอิทธิพลหนึ่งที่มีผลต่อพฤติกรรม การรับ หรือการให้นิวเคลียสของแต่ละสายพันธุ์ของ *C. cinerea* (Spit et al., 1998) การให้และการรับนิวเคลียสของกลุ่มสมระหว่างโมโนคาริออนต่างสายพันธุ์ เป็นกระบวนการที่เส้นใยโมโนคาริออน จะพัฒนาไปเป็นเส้นใยไคคาริออน แคลมบี้เซลล์ถูกสร้างขึ้น เพื่อเป็นโครงสร้างสำหรับการเคลื่อนย้ายผ่านของนิวเคลียส อีกนัยหนึ่งสามารถแสดงถึงการเข้าคู่กันได้ของกลุ่มสม และยังบ่งบอกถึงการเป็นเส้นใยไคคาริออนที่สมบูรณ์ สำหรับแคลมบี้เซลล์ที่พบในเส้นใยไคคาริออนมีอยู่ 2 ลักษณะที่สำคัญ คือ แคลมบี้เซลล์ที่มีการพัฒนาอย่างสมบูรณ์ โดยปลายที่ยื่นออกมาของแคลมบี้เซลล์โค้งเชื่อมกับเส้นใยได้อย่างสมบูรณ์ โดยที่ไม่มีผนังกันระหว่างปลายของแคลมบี้เซลล์และเส้นใย เรียกว่า “fused clamp cell” แคลมบี้เซลล์ที่มีโครงสร้างที่สมบูรณ์นี้ จะเป็นช่องทางให้นิวเคลียส ไซโทพลาสซึมและไมโทคอนเดรีย สามารถผ่านไปยังเซลล์เส้นใยถัดไปได้ แสดงว่าเส้นใยทั้งสองเกิดการผสมพันธุ์ที่สมบูรณ์ สำหรับโครงสร้างแคลมบี้เซลล์ที่ยังไม่สมบูรณ์นั้น คือปลาย

ของแคลมป์เซลล์ยังไม่เชื่อมกับผนังเส้นใย เรียกโครงสร้างนี้ว่า “unfused clamp cell” นิวเคลียสไม่สามารถผ่านได้ (Kües, 2000; Srivilai and Louchawoot, 2009) เส้นใยไคคาริออนที่มีแคลมป์เซลล์สมบูรณ์เชื่อว่า จะส่งผลต่อการสร้างและเพิ่มปริมาณของกระจุกดอกเห็ด หรือไพรเมอร์เดีย (primordia) และดอกเห็ดที่สมบูรณ์ ได้อย่างไรก็ตามยังไม่พบงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแคลมป์เซลล์ต่อปริมาณการสร้างดอกเห็ด

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤติกรรมและการเคลื่อนย้ายนิวเคลียส ระหว่างการผสมพันธุ์ของ *C. cinerea* 9 สายพันธุ์ โดยตรวจสอบว่ามีพฤติกรรมการเป็นผู้ให้ (donor) ผู้รับ (recipient) หรือเป็นทั้งผู้ให้และผู้รับนิวเคลียส (donor/recipient) ในเห็ดต้นแบบ *C. cinerea* ตลอดจนศึกษาอิทธิพลของยีน mating type มีผลต่อการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส นอกจากนั้นยังตรวจสอบรูปแบบของการเชื่อมกันของเส้นใยระหว่างการผสมของสองโมโนคาริออนผสม และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของแคลมป์เซลล์ที่เกิดขึ้นภายในโคโลนีของไคคาริออน ต่อการเกิดดอกเห็ดของ *C. cinerea*

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเพาะเชื้อ

นำ *C. cinerea* สายพันธุ์ PS001 (A42B42), PS001-1 (A42B42), PS002 (A3B1), PS002-1 (A3B1), 218 (A3B1, *trp-1.1,1.6*), MK45 (A42B1), Okayama7 (A43B43), AT8 (A43 B43, *trp-3, ade-8*), Uv-6031 (A43mutB43mut, *pab-, skn*) และไฮโมคาริออน AmutBmut (A43mut B43mut, *pab-*) มาเพาะเลี้ยงลงในอาหาร yeast malt glucose/tryptophan (YMG) (ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อเห็ดจาก Professor Dr. Ursula Kües, Institute for

Forest Botany, Georg-August-University, Göttingen ประเทศเยอรมนี) โดยใช้เข็มเย็บตัดอาหารวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อเห็ดของแต่ละสายพันธุ์ ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยม ขนาด 1 x 1 เซนติเมตร จากนั้นนำมาวางกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วย้ายไปเก็บในกล่องพลาสติกที่รองด้วยกระดาษชำระที่ชุ่มน้ำ จากนั้นปิดฝากล่องโดยเผยอเล็กน้อย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ตรวจสอบการให้และรับนิวเคลียสของแต่ละโมโนคาริออน

นำเชื้อ *C. cinerea* ที่เจริญใหม่แต่ละสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงไว้ มาผสมเชื้อระหว่างโมโนคาริออน *C. cinerea* สายพันธุ์ต่างๆ เพื่อที่จะศึกษาการให้และรับนิวเคลียส โดยตัดชิ้นอาหารที่มีเส้นใยขนาด 1 x 1 เซนติเมตร ของโมโนคาริออนแต่ละสายพันธุ์ โดยแต่ละชิ้นวางตรงกลางจานเพาะเชื้อให้ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร โดยผสมแต่ละคู่ดังนี้ PS001(A42 B42) x PS002 (A3B1), PS001-1 (A42B42) x PS002-1 (A3B1), 218 (A3B1, *trp-1.1,1.6*) x PS001 (A42B42), 218 (A3B1, *trp-1.1,1.6*) x PS001-1 (A42B42), 218 (A3B1, *trp-1.1,1.6*) x MK 54 (A42B1), Okayama7 (A43B43) x PS001 (A42B 42), Okayama7 (A43B43) x PS002 (A3B1), Okayama7 (A43B43) x PS001-1(A42B42), Okayama 7(A43B43) x PS002-1 (A3B1), Okayama7 (A43 B43) x 218 (A3B1, *trp-1.1,1.6*), AT8 (A43 B43, *trp-3, ade-8*) x Okayama7 (A43B43), AT8 (A43B43, *trp-3, ade-8*) x PS001 (A42B42), AT8 (A43B43, *trp-3, ade-8*) x PS001-1 (A42B42), AT8 (A43B43, *trp-3, ade-8*) x PS002 (A3B1), AT8 (A43 B43, *trp-3, ade-8*) x PS002-1(A3B1), AT8 (A43B4 3, *trp-3, ade-8*) x MK54 (A42 B1), Uv-6031 (A43mutB

43mut, *pab*⁻, *skn*) x PS001 (A42 B42), Uv-6031 (A43mut B43mut, *pab*⁻, *skn*) x PS001-1(A42 B42), Uv-6031 (A43mut B43mut, *pab*⁻, *skn*) x PS002 (A3 B1), Uv-6031 (A43mut B43mut, *pab*⁻, *skn*) x PS00 2-1 (A3B1), Uv-6031 (A43mut B43mut, *pab*⁻, *skn*) x 218 (A3B1, *trp*-1.1,1.6) และ Uv-6031 (A43mut B43mut, *pab*⁻, *skn*) x AT8 (A43B43, *trp*-3, *ade*-8)

จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อคู่ผสมดังกล่าวเก็บในกล่องพลาสติกที่มีกระดาษชำระชุ่มน้ำ จากนั้นปิดฝากล่องโดยเผยอเล็กน้อย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สังเกตการเจริญในแต่ละวัน ตรวจสอบผลโดยสังเกตว่า ถ้าเส้นใยของโมโนคาร์บอนได้มีการเติบโตมากกว่าด้านใดด้านหนึ่ง แสดงว่าด้านนั้นได้รับนิวเคลียสจากอีกสายพันธุ์หนึ่ง (recipient) และสำหรับด้านที่เส้นใยของโมโนคาร์บอนเติบโตน้อยกว่า แสดงว่าเป็นสายพันธุ์ตัวให้นิวเคลียส (donor) หรือถ้าเส้นใยของโมโนคาร์บอนทั้งสองด้านเจริญดีเท่าๆ กัน แสดงว่าทั้งสองโมโนคาร์บอนเป็นทั้งผู้ให้และผู้รับนิวเคลียส (donor/recipient) (Srivilai, 2006)

ตรวจสอบลักษณะการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสระหว่างการผสมพันธุ์

ผสมคู่ผสมใหม่อีกครั้งโดยตัดชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยเจริญอยู่ ขนาด 1 x 1 เซนติเมตรของแต่ละสายพันธุ์ โดยวางแต่ละชิ้นชิดกับขอบจานเพาะเลี้ยง YMG2 โดยเชื้อโมโนคาร์บอนแต่ละคู่ผสมวางตรงข้ามกัน เพื่อให้มีพื้นที่ในการเคลื่อนย้ายของเส้นใยทั้งสอง จากนั้นนำไปเก็บในกล่องพลาสติกที่รองด้วยกระดาษชำระชุ่มน้ำ ปิดฝากล่องโดยเผยอเล็กน้อย นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส สังเกตตำแหน่งของนิวเคลียสในแต่ละเส้น

ใยของโมโนคาร์บอนของแต่ละคู่ผสม โดยทำสไลด์และย้อมด้วยสี 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) โดยการใช้เข็มเย็บติดชิ้นวัน ขนาดประมาณ 2 x 2 มิลลิเมตร ตรงปลายสุดของเส้นใยที่เจริญเข้าหากันระหว่างโมโนคาร์บอนทั้งสอง วางชิ้นวันตรงกลางสไลด์ ตูตสารละลายสี DAPI ประมาณ 10 ไมโครลิตร หยดบนเส้นใยเชื้อรา ปลอยทิ้งไว้ 5-10 นาที ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ จากนั้นก็นำไปตรวจสอบตำแหน่งนิวเคลียส ด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ภายในห้องที่ควบคุมแสง (Hamada and Fujita, 1983; Srivilai, 2006)

ตรวจสอบลักษณะการเชื่อมกันของเส้นใยของแต่ละโมโนคาร์บอน

ทำสไลด์โดยใช้เข็มเย็บติดชิ้นวันขนาดประมาณ 2 x 2 มิลลิเมตร ในตำแหน่งที่เส้นใยมาชนกันพอดี (interaction zone) วางบนสไลด์ และปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ค้นหาลักษณะการเชื่อมกันของทั้งสองเส้นใยในแต่ละคู่ผสม ถ่ายภาพการเชื่อมกันของเส้นใยทั้งสองด้วยกล้องดิจิทัล

หาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแคลมป์เซลล์ในเส้นใยไดคาร์บอน และไฮโมคาร์บอน Amut Bmut ต่อการเกิดของดอกเห็ด

นำไดคาร์บอนที่ได้จากการผสมโมโนคาร์บอนแต่ละคู่ผสม (PS001-1 x PS002-1, PS001-1 x AmutBmut, PS001-2 x AmutBmut) และไฮโมคาร์บอน AmutBmut เพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร YMG2 โดยทำ 6 ข้ำ จากนั้นนำแต่ละจานเพาะเชื้อ ใส่ในกล่องพลาสติกที่มีกระดาษชำระชุ่มน้ำ ปิดฝากล่องโดยการเผยอเล็กน้อย นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำจานเพาะเชื้อ

ที่เส้นใยเจริญจนเกือบเต็มจาน ไปศึกษาจำนวน แคลมป์เซลล์ในแต่ละไคคารีออน โดยการทำสไลด์ ภายในตู้ปลอดเชื้อ โดยใช้เข็มเย็บตัดวันบางๆ ขนาดประมาณ 2 x 2 มิลลิเมตร บริเวณปลายสุดของเส้นใย และนำสไลด์ไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) นับจำนวนโครงสร้างแคลมป์เซลล์ที่สมบูรณ์และไม่สมบูรณ์ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปทดสอบการเกิดดอกเห็ด โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส และให้แสง 12 ชั่วโมง และสลบไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง นับจำนวนของไพรเมอร์เดียว และดอกเห็ดต่อจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดลอง

พฤติกรรมการให้และรับนิวเคลียสของโมโนคารีออนแต่ละสายพันธุ์

จากการศึกษาการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสในระหว่างการผสมพันธุ์ของ *C. cinerea* สายพันธุ์ต่างๆ โดยผสมโมโนคารีออนแบบผสมไขว้ (inter-cross) ภายในโมโนคารีออนทุกสายพันธุ์ที่มีจีโนมไทป์เข้าคู่กันได้ ผลการทดลองพบว่าโมโนคารีออนสายพันธุ์โคไอโซเจนิก (co-isogenic strain) PS001, PS001-1, PS002 และ PS002-1 จะเป็นผู้ให้นิวเคลียส แก่โมโนคารีออนสายพันธุ์ 218, Uv-6031, AT8 และ Okayama7 ยกเว้นการผสมพันธุ์ในสายพันธุ์โคไอโซเจนิกด้วยกัน พบว่า PS001 และ PS001-1 เป็นตัวให้นิวเคลียสแก่ PS002 และ PS002-1 โมโนคารีออนสายพันธุ์ MK54 เป็นตัวให้นิวเคลียสแก่โมโนคารีออนสายพันธุ์ AT8 โดยพบการเจริญของเส้นใยด้านโมโนคารีออน AT8 เจริญอย่างรวดเร็ว ขณะที่ทางด้านเส้นใยของ MK54 มีการเจริญช้า เช่นเดียวกับกับโมโนคารีออนสายพันธุ์ Okayama7 เนื่องจากเป็นตัวให้นิวเคลียสแก่โมโนคารีออนสายพันธุ์ AT8 และ 218 ตามลำดับ สำหรับไฮโมคารีออน Uv-6031 ให้นิวเคลียสแก่โมโน

คารีออนสายพันธุ์ 218 และรับนิวเคลียสจากโมโนคารีออน PS001-1, PS001 และ PS002 และพบว่า มีคู่ผสมที่ทั้งสองสายพันธุ์เป็นทั้งผู้ให้และผู้รับนิวเคลียส (donor-recipient/monokaryon) ได้แก่ PS002-1 x Uv-6031, PS002-1 x AT8, PS002 x AT8 และ PS002 x Okayama7 (Table 1)

ในการผสมพันธุ์ของโมโนคารีออนสองสายพันธุ์ของ *C. cinerea* ผสมกันได้ ขึ้นอยู่กับกับการเข้ากัน ของยีน A และ B mating type ในการผสมกันแบบไขว้ของโมโนคารีออนทั้ง 9 สายพันธุ์ พบว่ามีลักษณะการให้นิวเคลียส โดยโมโนคารีออนสายพันธุ์ตัวให้นิวเคลียส จะเจริญไม่ดีเท่ากับสายพันธุ์ตัวรับ ขณะที่ตัวรับนิวเคลียสจะมีการเจริญเติบโตของเส้นใยอย่างรวดเร็ว ดัง Figure 1A และ 1C และแสดงลักษณะของการเป็นเส้นใยไคคารีออน ออกมาอย่างชัดเจน ซึ่งให้เห็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเส้นใย โดยเส้นใยมีขนาดใหญ่ขึ้น มีการเจริญดีและเร็วกว่าเส้นใยโมโนคารีออน ขณะที่บางคู่ผสมโมโนคารีออนทั้งสองด้าน มีการเจริญเติบโตดี เส้นใยมีขนาดใหญ่ เป็นเส้นใยไคคารีออน จนกลายเป็นเส้นใยกลุ่มเดียวกัน นั่นคือ โมโนคารีออนทั้งสองมีการให้และรับนิวเคลียสพร้อมกัน (Figure 1B)

การเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสระหว่างการผสมของเส้นใยโมโนคารีออน

เทคนิค DAPI ถูกนำมาใช้เพื่อการติดตามการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส ในระหว่างการผสมพันธุ์ของกลุ่มผสมในแต่ละสายพันธุ์ โดยการนำเส้นใยในแต่ละระยะช่วงเวลาการเจริญของเส้นใยมาตรวจสอบ และติดตามการเคลื่อนย้ายและตำแหน่งของนิวเคลียส โดยตรวจสอบในวันที่ 2, 3 และ 4 ของการผสม พบว่าการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสของแต่ละโมโนคารีออน ระหว่างการผสมพันธุ์

Table 1 Nuclear migration behavior of mating pairs of *C. cinerea* monokaryons.

Crosses	Nuclear donor	Nuclear recipient	Nuclear donor/recipient
PS001-1 × PS002-1	PS001-1	PS002-1	-
PS001-1 × 218	PS001-1	218	-
PS001-1 × Uv-6031	PS001-1	Uv-6031	-
PS001-1 × AT8	PS001-1	AT8	-
PS001-1 × Okayama7	PS001-1	Okayama7	-
PS002-1 × Uv-6031	-	-	PS002-1/ Uv-6031
PS002-1 × AT8	-	-	PS002-1/AT8
PS002-1 × Okayama7	PS002-1	Okayama7	-
PS001 × PS002	PS001	PS002	-
PS001 × 218	PS001	218	-
PS001 × Uv-6031	PS001	Uv-6031	-
PS001 × AT8	PS001	AT8	-
PS001 × Okayama7	PS001	Okayama7	-
PS002 × Uv-6031	PS002	Uv-6031	-
PS002 × AT8	-	-	PS002/AT8
PS002 × Okayama7	-	-	PS002/Okayama7
Uv-6031 × 218	Uv-6031	218	-
AT8 × MK54	MK54	AT8	-
Okayama7 × 218	Okayama7	218	-

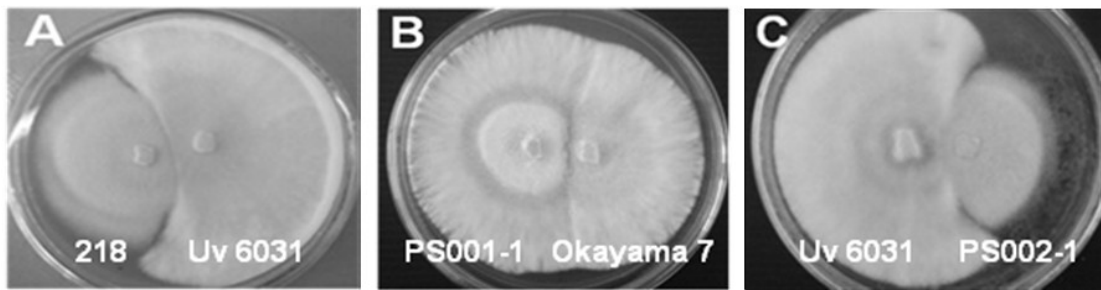


Figure 1 Mating behavior of *C. cinerea* monokaryons. (A) *C. cinerea* Uv-6031 accepted nuclei from *C. cinerea* monokaryon 218, (B) *C. cinerea* PS001-1 and Okayama7 were both nuclear donor and recipient, (C) *C. cinerea* Uv-6031 accepted nuclei from a monokaryon PS002-1.

ในวันที่ 2 พบว่าส่วนใหญ่ตำแหน่งของนิวเคลียสในเส้นใยโมนอคาร์รียนของแต่ละสายพันธุ์ จะอยู่ก่อนจากกิ่งกลางเส้นใยเพียงเล็กน้อย ในทิศทางไปทางด้านปลายของเส้นใย (Figure 2) ส่วนในวันที่ 3 ของการติดตามการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสในแต่ละโมนอคาร์รียนของแต่ละกลุ่ม พบว่าตำแหน่งของนิวเคลียสในเส้นใยของสายพันธุ์ที่ตรวจสอบ อยู่ทางด้านปลายของเส้นใย และบางส่วนยังพบที่ตรง

กลางเส้นใย ในวันที่ 4 เป็นวันที่เส้นใยโมนอคาร์รียนของแต่ละกลุ่มสมชนกัน จากการตรวจสอบเส้นใยของแต่ละกลุ่มสมในตำแหน่งที่ชนกันในแต่ละกลุ่มสม ยังไม่พบการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสจากเส้นใยโมนอคาร์รียนตัวหนึ่ง ไปยังเส้นใยโมนอคาร์รียนของอีกตัวหนึ่ง ได้อย่างชัดเจนพบเพียงเส้นใยทั้งสองมีการเชื่อมกัน (Figure 3)

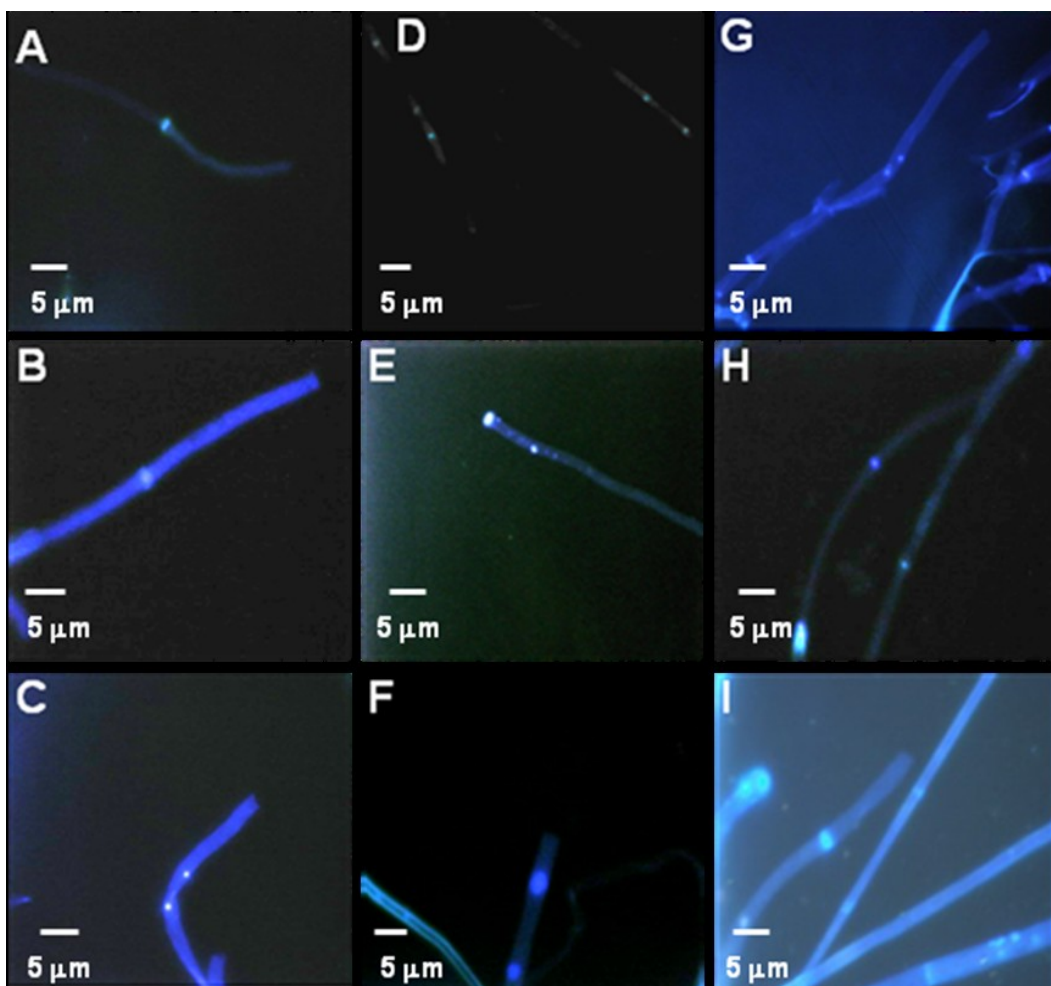


Figure 2 The position of nuclei in the monokaryons of each *C. cinerea* strains PS001 (A), AT8 (B), MK54 (C), PS002 (D), PS002-1(E), PS001-1 (F), Uv-6031 (G), 218 (H) and Okayama 7 (J) which visualized by DAPI staining. See color figure on the website.

ลักษณะการเชื่อมกันของเส้นใยระหว่างการผลิตพันธุ์

ในการผสมกันของเส้นใยโมโนคาริออนของแต่ละคู่ผสม พบว่าในวันที่ 4 ของการผสมเส้นใยของแต่ละโมโนคาริออน มีการเจริญมาชนและเชื่อมกัน เพื่อที่จะให้นิวเคลียสเคลื่อนเข้าไปในเส้นใยของกลุ่มผสมด้านตรงข้าม โดยการเชื่อมกันของแต่ละเส้นใย เกิดขึ้นที่บริเวณปลายของเส้นใยของทั้งสองสายพันธุ์ ที่มี mating type ตรงข้ามกัน และยิ่งกว่านั้นพบว่าการเชื่อมกันของโครงสร้าง ที่ยื่นออกมาจากทางด้านข้างของเส้นใยโมโนคาริออน และเชื่อมกับด้านข้างของเส้นใยโมโนคาริออน (lateral hyphae) อีกสายพันธุ์ที่เป็นคู่ผสมกัน (Figure 4B) การเชื่อมกันของเส้นใยทั้งสองลักษณะพบได้ในทุกคู่ผสมที่มี mating type ที่เข้ากันได้ เช่น PS001-1 x PS002-1, 218 x PS001, Uv-6031 x PS002-1, Okayama7 x PS001-1, AT8 x PS001 และ PS001 x PS002 แสดงให้เห็นว่านอกจากการเชื่อมกันระหว่างปลายของเส้นใยแล้ว ยังพบการเชื่อมกันของเส้นใยทั้งสองทางด้านข้างอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่านิวเคลียสเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณปลายของเส้นใยคู่ผสม (Figure 3C และ 3F)

ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแคลมป์เซลล์โฮโมคาริออน AmutBmut และไดคาริออนต่อการเกิดดอกเห็ด

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแคลมป์เซลล์ต่อการเกิดขึ้นของดอกเห็ด พบว่า จำนวนแคลมป์เซลล์ที่สมบูรณ์ในไดคาริออนคู่ผสม PS001-1 x PS002-1, PS001-1 x AmutBmut และ PS001-2 x AmutBmut มีค่าใกล้เคียงกับโฮโมคาริออน AmutBmut ขณะที่ไดคาริออนคู่ผสม PS001-1 x PS002-1 พบจำนวนแคลมป์เซลล์ที่ไม่สมบูรณ์มากกว่าแคลมป์ที่สมบูรณ์ และมี

การสร้างดอกเห็ดเฉลี่ย 8 ดอกต่อจานเพาะเชื้อ บางจานเพาะเชื้อมีมากกว่า 12 ดอก ขณะที่ไดคาริออนคู่ PS001-1 x AmutBmut มีจำนวนแคลมป์เซลล์โครงสร้างที่ไม่สมบูรณ์มากถึง 64 แคลมป์เซลล์ แต่พบดอกเห็ดที่สมบูรณ์เฉลี่ยเพียง 7 ดอกต่อจานเพาะเลี้ยงเชื้อ หรือเพียง 21 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณไพรเมอร์เดียวทั้งหมด อย่างไรก็ตามพบว่ามีโฮโมคาริออน AmutBmut มีจำนวนการสร้างดอกเห็ดที่

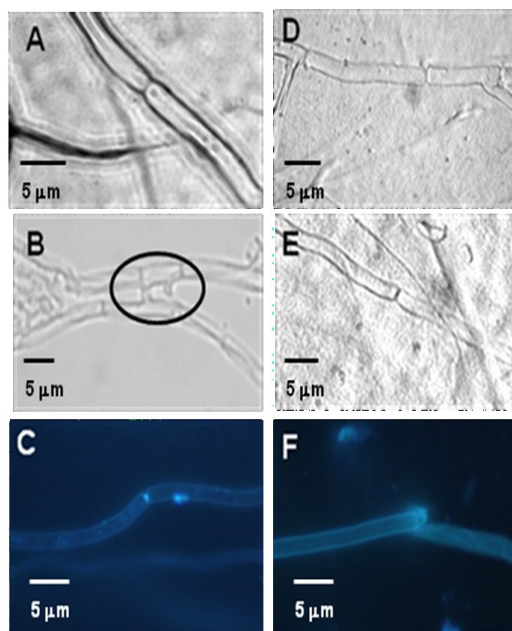
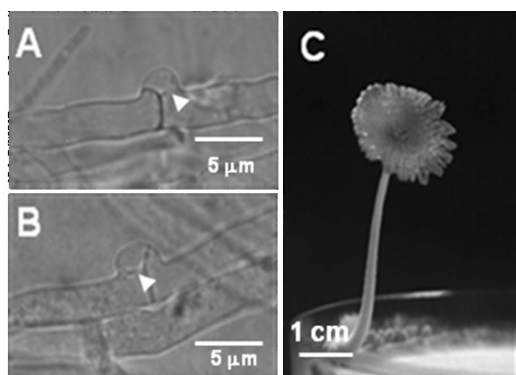


Figure 3 Hyphal tip fusion between monokaryotic hyphae in each mating pairs PS001-1 x PS002-1 (A), 218 x PS001 (B), Okayama7 x PS001-1 (C and D) and AT8 x PS001 (E). Appearance of lateral fusion was occurred in a mating pair 218 x PS001 (B). DAPI was stained the mycelium which grown in day 4 of each mating pairs of Okayama7 x PS001-1 (C) and PS001 x PS002 (F). See color figure on the website.

Table 2 Average numbers of unfused and fused clamp cells in each mating pairs (dikaryons) and numbers of primordia and fruiting bodies per a culture plate.

Crosses	Unfused clamp cells per a slide	Fused clamp cells per a slide	Average of numbers primordia per a culture plate	Average of numbers of fruiting bodies per a culture plate
PS001-1 x PS002-1	36 (± 3.10)	11 (± 1.00)	28 (± 3.60)	8 (± 2.00) (29%)
PS001-1 x AmutBmut	64 (± 2.98)	12 (± 2.00)	32 (± 4.72)	7 (± 2.00) (21%)
PS002-1 x AmutBmut	39 (± 7.54)	10 (± 2.64)	30 (± 2.00)	6 (± 1.52) (20%)
AmutBmut	35 (± 4.04)	9 (± 1.52)	28 (± 5.56)	4 (± 1.00) (14%)

**Figure 4** Morphological feature of fused clamp cell structure (arrowed) (A), unfused-clamp cell structure (arrowed) (B) and a fruiting body of *C. cinerea* and primordia formed on the edge of a culture plate (C).

สมบูรณ์น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับไตคาริออนคู่อื่น (Table 2)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสในระหว่างการผสมพันธุ์ของโมโนคาริออนของ *C. cinerea* สายพันธุ์ต่างๆ พบปรากฏการณ์การ

เคลื่อนย้ายนิวเคลียสทั้งหมด 3 แบบ คือการให้นิวเคลียสของโมโนคาริออน การรับนิวเคลียส และการให้ และการรับนิวเคลียส ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในสายพันธุ์ที่ให้นิวเคลียสนั้น อาจจะมีการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสที่เร็วกว่าสายพันธุ์ที่รับนิวเคลียส หรืออาจเป็นผลมาจากอิทธิพลของยีน A และ B mating type นั้น คือ ยีน A mating type จะให้โปรตีน HD1 และ HD2 ซึ่งเป็นไปได้ว่าโปรตีนทั้งสองอยู่ในสภาพที่พร้อมทำงาน (active/dominant) เมื่อต้องปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน HD2 และ HD1 ของโมโนคาริออนที่เป็นคู่ผสม จึงแสดงลักษณะเป็นสายพันธุ์ที่ให้นิวเคลียส ในขณะที่โมโนคาริออนตัวรับนิวเคลียสนั้น เป็นไปได้ว่าโปรตีน HD1 และ HD2 อยู่ในสภาพไม่ทำงาน (inactive/recessive) เมื่อทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน HD2 และ HD1 ของโมโนคาริออนที่เป็นคู่ผสม ในขณะที่ทั้งสองโมโนคาริออนที่เป็นทั้งตัวให้และรับนิวเคลียส นั่นคือโปรตีนทั้งสองชนิดของคู่ผสมของโมโนคาริออน อยู่ในสภาพที่พร้อมทำงาน (co-activate) ของทั้งสองโปรตีน (Asante-Owusu *et al.*, 1996; Casselton and Olesnick, 1998) ในขณะที่ยีน B mating type จะมีการสร้างโปรตีนฟีโรโมน และฟีโรโมนรีเซพเตอร์

โดยโมโนคาริออนที่เป็นผู้ให้นิวเคลียส มีโปรตีนฟีโรโมน และฟีโรโมนรีเซพเตอร์ อยู่ในสภาพที่พร้อมทำงาน ส่วนโมโนคาริออนของตัวรับนิวเคลียสนั้น โปรตีนฟีโรโมน และฟีโรโมนรีเซพเตอร์ อาจอยู่ในสภาพที่ไม่ทำงาน ในขณะที่ตัวให้และรับนิวเคลียสนั้นพบว่าโปรตีนฟีโรโมน และฟีโรโมนรีเซพเตอร์ ของทั้งสองโมโนคาริออนที่เป็นคู่ผสม อยู่ในสภาพที่ทั้งสองโปรตีนทำงานร่วมกัน เช่นเดียวกับในยีน A mating type (Kües *et al.*, 1992; Kües, 1994; Pardo *et al.*, 1996; O'Shea *et al.*, 1998; Halsall *et al.*, 2000; James *et al.*, 2006) เห็น *Pleurotus ostreatus* มียีนผสมพันธุ์ 2 ตำแหน่งคือ *matA* และ *matB* ทำหน้าที่ควบคุมการเชื่อมกันของเส้นใย การเคลื่อนย้ายนิวเคลียส และการแยกตัวของนิวเคลียส

ระหว่างการเกิดขึ้นของเส้นใยไดคาริออน (Larraya *et al.*, 2001) จากผลของการให้ และการรับนิวเคลียสในกลุ่มผสมโมโนคาริออน (Table 1) สามารถสรุปการแสดงออกของแอลลีลของแต่ละยีน และแต่ละสายพันธุ์ได้ดังนี้ คือ แอลลีลต่างๆ ของยีน A และ B mating type ในแต่ละคู่ผสมแสดงลักษณะการเป็นแอลลีล Ax ที่แสดงการข่ม (active/dominant) ต่อแอลลีล Ay หรือเป็นแอลลีล Ax ที่แสดงการถูกข่ม (inactive/recessive) จากแอลลีล Ay ที่เป็นคู่ผสมกันหรือเป็นแอลลีล Bx ที่แสดงการข่มต่อแอลลีล By หรือเป็นแอลลีล Bx ที่แสดงการถูกข่ม จากแอลลีล By ในแต่ละคู่ผสม โดย x และ y แทนตัวเลขของแต่ละแอลลีลเป็น 1, 3, 42 และ 43 (Table 3)

Table 3 Allele function of the mating A and B genes in each mating pairs.

Gene alleles of mating pairs	Dominant alleles	Recessive alleles
A42 x A3	A42	A3
A42 x A43	A42	A43
A43 x A3*	A43	A3
A42 x A43mut	A42	A43mut
A3* x A43mut	A3	A43mut
B1 x B42	B42	B1
B42 x B43	B42	B43
B43 x B1 [#]	B43	B1
B42 x B43mut	B42	B43mut
B1 [#] x B43mut	B43mut	B1

*A3 allele of *C. cinerea* 218 was dominated by A43 allele of Okayama7

[#]B1 allele of *C. cinerea* 218 was dominated by B43 and B43mut alleles of Okayama7 and Uv-6031, respectively.

จากการวิเคราะห์ข้อมูลในตารางพบว่ายีน A และ B mating type ควบคุมการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส แต่ทิศทางการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสอาจขึ้นอยู่กับชนิดของแอลลีลยีน mating type ของ

แต่ละสายพันธุ์ ในการศึกษาตำแหน่งของนิวเคลียสระหว่างการผสมพันธุ์ของทั้งสองโมโนคาริออน โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยเทคนิค DAPI พบว่าในวันที่ 2 ของการผสม พบตำแหน่งนิวเคลียสอยู่ระหว่าง

กิ่งกลาง และค่อนข้างทางด้านปลายของเส้นใย เมื่อตรวจสอบตำแหน่งของนิวเคลียสในการผสมของวันที่ 4 ขณะที่เส้นใยโมโนคาริออนทั้งสองเชื่อมกันไม่พบความชัดเจนในการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสระหว่างปลายเส้นใยที่เชื่อมกัน และยังไม่ชัดเจนว่าโมโนคาริออนของกลุ่มใดเป็นตัวให้หรือเป็นตัวรับนิวเคลียส จากการย้อมนิวเคลียสด้วย DAPI อย่างไรก็ดีพบว่าในการเชื่อมกันของเส้นใยระหว่างการผสมของโมโนคาริออนทั้งสอง มีการเชื่อมกันของเส้นใยทั้งที่ปลายของเส้นใยและที่ทางด้านข้างของเส้นใย (Figure 4B) ในการศึกษาครั้งนี้ยังศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของแคลมป์เซลล์ต่อการเกิดดอกเห็ดของกลุ่มสมระหว่างไฮโมคาริออน AmutBmut กับกลุ่มสมใดคาริออนคู่ต่างๆ เนื่องจากไฮโมคาริออน AmutBmut เป็นเห็ด *C. cinerea* ที่สามารถเจริญและพัฒนาจากเส้นใยไปเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ โดยไม่ต้องการการผสมจากโมโนคาริออนสายพันธุ์อื่น และสามารถสร้างแคลมป์เซลล์ได้เอง แต่อย่างไรก็ดีไฮโมคาริออน AmutBmut สามารถผสมกับโมโนคาริออนสายพันธุ์อื่นได้ โดยโมโนคาริออนกลุ่มสมต้องมี mating type ต่างจากแอลลีล *A43mut* และ *B43mut* (Swamy, 1984; Srivilai, 2006) ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแคลมป์เซลล์ต่อการเกิดขึ้นของดอกเห็ดโดยใช้กลุ่มสม 3 กลุ่มสม ได้แก่ PS001-1 x PS002-1, PS001-1 x AmutBmut และ PS002-1 x AmutBmut พบจำนวนการสร้างแคลมป์เซลล์ทั้งแบบไม่สมบูรณ์ และแบบสมบูรณ์ในแต่ละกลุ่มสม มีค่าเฉลี่ยจำนวนแคลมป์เซลล์แบบสมบูรณ์ใกล้เคียงกัน ยกเว้นในค่าเฉลี่ยจำนวนแคลมป์เซลล์ที่ไม่สมบูรณ์พบจำนวนมากในกลุ่มใดคาริออน PS001-1 x AmutBmut ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า PS001-1 เป็นสายพันธุ์โคไอโซเจนนิค ที่เกิดจากการผสมย้อนกลับโดยไฮโมคาริออน AmutBmut ทำให้ PS001-1 เป็น

สายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมคล้ายกับไฮโมคาริออน AmutBmut และจากการทดสอบสมรรถภาพของสายพันธุ์โคไอโซเจนนิค 2 สายพันธุ์ ระหว่าง PS001-1 และ PS002-1 พบว่าสายพันธุ์โคไอโซเจนนิค PS001-1 มีศักยภาพในการเป็นคู่ผสมได้ดีในการใช้ทดสอบหาชนิดยีน (Srivilai, 2006; ประยุตต์ และพินดา, 2552; อนัญพร และคณะ, 2554) และจากผลการศึกษาจำนวนแคลมป์เซลล์ที่สมบูรณ์ พบน้อยมากในเกือบทุกคู่ใดคาริออน รวมทั้งไฮโมคาริออน AmutBmut ขณะที่การสร้างดอกเห็ดในระยะไพรมอร์เตียกลับพบมีจำนวนมากในทุกคู่ใดคาริออน รวมทั้งไฮโมคาริออน AmutBmut ด้วย แต่ในทางตรงกันข้ามกลับพบจำนวนดอกเห็ดที่สมบูรณ์น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนไพรมอร์เตียที่พบในแต่ละกลุ่มสมในงานเพาะเชื้อของสายพันธุ์ไฮโมคาริออน AmutBmut พบมีไพรมอร์เตียพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดเพียง 14 % และน้อยกว่ากลุ่มสมใดคาริออนคู่อื่น แสดงว่าจำนวนแคลมป์เซลล์ที่เกิดจากการกระตุ้นของโปรตีน HD1 และ HD2 และการกระตุ้นระหว่างฟีโรโมน และฟีโรโมนรีเซพเตอร์ ของแต่ละโมโนคาริออน อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของโปรตีนทั้งสองคู่ และนำมาซึ่งการสร้างดอกเห็ด ในกลุ่มสมของกลุ่มใดคาริออนมากกว่าในไฮโมคาริออน AmutBmut นอกจากนี้การเกิดขึ้นของดอกเห็ดอาจเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์พันธุ์ของแต่ละสายพันธุ์ได้ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ปี พ.ศ. 2550 ขอขอบคุณ Professor Dr. Ursula Kües, Institute for Forest Botany, Georg-August-University, Göttingen ประเทศเยอรมันนี ที่กรุณามอบเชื้อรา *C. cinerea* ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี และ

ขอขอบคุณนางสาวเบญจภรณ์ จิตต์น้อม ที่ได้ช่วย
ทำงานวิจัยบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

ประยูร ศรีวิไล และพินิดา เล้าชาญวุฒิ. 2552.

การเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมระหว่าง
รุ่นพ่อแม่และรุ่นลูกที่เกิดจากการผสมพันธุ์ซ้ำ
แบบย้อนกลับของเห็ดชั้นสูง *Coprinopsis*
cinerea. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 28: 88–97.

อัญพร พรหมเมตา ไพโรจน์ ประมวล และ
ประยูร ศรีวิไล. 2554. ลักษณะทางชีววิทยา
และเบื้องหลังพันธุกรรมของเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา
Cambodian *Phellinus igniarius* เปรียบเทียบกับ
เห็ดเบสิดิโอไมซีตชนิดอื่น. วารสาร
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย
มหาสารคาม. (ฉบับพิเศษ): 100–115.

Asante-Owusu, R.N., Banham, A.H., Böhnert,
H.U., Mellor, E.J.C. and Casselton, L.A.
1996. Heterodimerization between two
classes of homeodomain proteins in the
mushroom *Coprinus cinereus* brings together
potential DNA-binding and activation domains.
Gene 172: 25–31.

Badalyan, S.M., Polak, E., Aebi, M. and Kües,
U. 2004. Role of peg formation in clamp cell
fusion of homobasidiomycete fungi. *J Basic*
Microbiol 44: 167–177.

Bharathan, G., Janssen, B.J., Kellog, A. and
Sinha, N. 1997. Did homeodomain protein
duplicate before the origin of agiosperms,
fungi and metazoan. *Proc Natl Acad Sci*
USA 94: 13749–13753.

Casselton, L.A. 1998. A large pheromone and
receptor gene complex determines multiple

B mating type specificities in *Coprinus*
cinereus. *Genetics* 148: 1081–1090.

Casselton, L.A. and Economou, A. 1985.
Dikaryon formation. In: Moor, D. Casselton,
L.A. Wood D.A. Frankland, J.C. (eds),
Developmental Biology of Higher Fungi.
Cambridge University Press, p. 213–299.

Casselton, L.A. and Olesnicky, N.S. 1998.
Molecular genetics of mating recognition in
basidiomycete fungi. *Mol Biol Rev* 62: 55–
70.

Elliott C.G. 1994. *Reproduction in Fungi: Genetical*
and Physiological Aspects. Chapman Hall.

Giesy, R.M. and Day, P. 1965. The septal
pores of *Coprinus lagopus* in relation to
nuclear migration. *Am J Bot* 52: 287–293.

Halsall, J.R., Milner, M.J. and Casselton L.A.
2000. Three subfamilies of pheromone and
receptor genes generate multiple *B* mating
specificities in the mushroom *Coprinus*
cinereus. *Genetics* 154: 1115–1123.

Hamada, S. and Fujita, S. 1983. DAPI staining
improved for quantitative cytofluorometry.
Histochem Cell Biol 70: 219–266.

Harder, C.B. and Annen, D.K. 2009. Unilateral
nuclear migration in basidiomycetes:
pheromone interaction, genomic conflicts
and mating system reversion. *Fungal Biol*
Rev 23: 48–58.

Hurst, L.D. and Hamilton, W.D. 1992. Cytoplasmic
fusion and the nature of sexes. *Proc R Soc*
Lond Series B-Biol Sci 247: 189–194.

James, T.Y., Srivilai, P., Kües, U. and Vilgalys,
R. 2006. Evolution of the bipolar mating
system of the mushroom *Coprinellus*

- disseminatus* from its tetrapolar ancestors involves loss of mating-type-specific pheromone receptor function. *Genetics* 3: 1877–1891.
- Kamada, T. 2002. Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *Bioessays* 24: 449–459.
- Kertesz-Chaloupková, K., Walser, P.J., Granado, J.D., Aebi, M. and Kües U. 1998. Blue light overrides repression of asexual sporulation by mating type genes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Fungal Genet Biol* 23: 95–109.
- Koltin, Y., and Flexer, A.S. 1969. Alteration of nuclear distribution in *B* mutant strains of *Schizophyllum commune*. *J Cell Sci* 4: 739–747.
- Kües, U. 2000. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol Mol Biol Rev* 4: 316–353.
- Kües, U., Walser, P.J., Klaus, M.J. and Aebi, M. 2002. Influence of activated *A* and *B* mating type pathways on developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol Gen Genom* 268: 262–271.
- Kües, U. 1994. Two classes of homeodomain protein specify the multiple *A* mating of the mushroom *Coprinus cinereus*. *Plant cell* 6: 1467–1475.
- Kües, U. and Casselton, L.A. 1992. Homeo domains and regulation of sexual development in basidiomycetes. *Trends Genet* 8: 154–155.
- Kües, U., Göttgens, B., Stratmann, R., Richardson, W.V.J., O'Shea S.F. and Casselton, L.A. 1994. A chimeric homeo domain protein causes selfcompatibility and constitutive sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *EMBO J* 13: 4054–4059.
- Larraya, L.M., Perez G., Iribarren, I., Blanco, J.A., Alfonso, M., Pisabarro, A.G. and Ramirez, L. 2001 Relationship between monokaryotic growth rate and mating type in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 67: 3385–3390.
- O'Shea, S.F., Chaure, P.T.J., Halsall, R., Olesnick, N.S., Leibbrant, A., Connerton, I.F. and Casselton L.A. 1998. A large pheromone and receptor gene complex determines multiple *B* mating specificities in *Coprinus cinereus*. *Genetics* 148: 1081–1090.
- Pardo, E.H., O'Shea, S.F. and Casselton, L.A. 1996. Multiple versions of the *A* mating type locus of *Coprinus cinereus* are generated by three paralogous pairs of multiallelic homeobox genes. *Genetics* 144: 87–94.
- Redhead, S.A., Vilgalys, R., Moncalvo, J.M., Johnson, J and Hopple, J.S. 2001. *Coprinus* Pers. and the disposition of *Coprinus* species sensu lato. *Taxon* 50: 203–241.
- Schubert, D., Raudaskoski, M., Knabe, N. and Kothe, E. 2006. Ras GTPase-activating protein Gap1 of the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* regulates hyphal

- growth orientation and sexual development. *Eukaryot Cell* 5: 683–695.
- Spit, A., Hyland, R.H., Mellor, E.C.J. and Casselton, L.A. 1998. A role for hetero dimerization in nuclear localisation of a homeodomain protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6228–6233.
- Srivilai, P. 2006. Molecular analysis genes acting in Basidiomycetes. (*Ph.D thesis*) Faculty of Forest Botany. University of Goettingen, Germany.
- Srivilai, P., Loutchanwoot, P. and Sukha, J. 2009. Blue light signaling inactivates the mating type genes-mediated repression of asexual spore production in the higher basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Pak J Biol Sci* 12: 110–118.
- Srivilai, P. and Loutchanwoot, P. 2009. *Coprinopsis cinerea* as a model fungus to evaluate genes underlying sexual development in basidiomycetes. *Pak J Biol Sci* 12: 821–835.
- Swamy, S., Uno, I. and Ishikawa, T. 1984. Morphogenetic effects of mutations at the A and B incompatibility factors of *Coprinus cinereus*. *J Gen Microbiol* 130: 3219–3224.
- Suzanne, F. 1998. A large pheromone and receptor gene complex determines multiple B mating type specificities in *Coprinus cinereus*. *Genetics* 148: 1081–1090.