สหสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์กับความสามารถในการเกิดดอกของสายพันธุ์ลูกผสม ของเห็ดหอม (*Lentinula edodes*)

นางสาว วันดี ยินดียิ่งยืน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-059-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018219

CORRELATION OF ISOZYMES WITH FRUITING ABILITY OF HYBRIDS OF SHIITAKE (*Lentinula edodes*)

Miss Wandee Yindeeyoungyeon

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Programe of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
1991

ISBN 974-579-059-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สหสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์กับความสามารถในการเกิดดอกของสายพันธุ์ลูกผสมของเห็ดหอม (*Lentinula edodes*)
โดย	นางสาว วันดี ยินดียั่งยืน
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ สุทธพรรณ ตรีรัตน์
	รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ สุทธพรรณ ตรีรัตน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อังคณา ฉายประเสริฐ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วันดี ยินดียั่งยืน : ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์กับความสามารถในการเกิดดอกของสายพันธุ์ลูกผสมของเห็ดหอม (Lentinula edodes) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์สุทธพรรณ ตรีรัตน์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล, 126 หน้า. ISBN 974-579-059-1

การศึกษาเห็ดหอม (Lentinula edodes) สายพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสม โดยใช้คุณสมบัติความแตกต่างของปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย (hyphal interaction) ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างในเบื้องต้นของสายพันธุ์ดังกล่าวคือ แยกสายพันธุ์เห็ดหอมเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสายพันธุ์ MU2, MU4 และ MU11 กับกลุ่มสายพันธุ์ MU5, MU9 และ MU12

การเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเหลว PDYB เป็นระยะเวลา 10 - 50 วัน พบว่าทั้งเส้นใยสปอร์เดี่ยว (monokaryotic mycelia) และเส้นใย dikaryon มีลักษณะการเจริญคิดเป็นน้ำหนักแห้งแบบทวีคูณ (logarithmic growth) โดยที่เส้นใย dikaryon สายพันธุ์พ่อ แม่ (MU2, MU4, MU12) และลูกผสม 12 สายพันธุ์ มีการเจริญใกล้เคียงกัน แต่การเจริญของเส้นใยสปอร์เดี่ยวต่ำกว่าเส้นใย dikaryon 2 - 3 เท่า

เมื่อศึกษาเอนไซม์ภายในเซล พบว่าวิธีการสกัดแยกโปรตีนและเอนไซม์จากเส้นใยที่ให้ผลสมบูรณ์ที่สุดคือ การบดด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ตามด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) เส้นใยเห็ดหอมมีการผลิต laccase ทั้งชนิดภายนอกและภายในเซลควบคู่ไปกับการเจริญ จากการศึกษาเห็ดลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างพ่อ แม่ 2 คู่ คือ MU2 และ MU12 กับ MU4 และ MU12 พบว่าเส้นใยของกลุ่มที่เกิดดอกได้ดีส่วนใหญ่มีระดับแอคติวิตีของ laccase สูงหรือค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ยแล้วเส้นใยสปอร์เดี่ยวส่วนมากจะมีแอคติวิตีต่ำกว่าในเส้นใย dikaryon

รูปแบบการเจริญและการผลิต acid phosphatase ทั้งในเส้นใยสปอร์เดี่ยวและเส้นใย dikaryon เป็นแบบควบคู่กับการเจริญเช่นเดียวกัน โดยที่ระดับแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ซึ่งพบเฉพาะภายในเซลไม่แตกต่างกันมากนักในระหว่างเส้นใยสปอร์เดี่ยวและเส้นใย dikaryon

ผลการตรวจสอบรูปแบบการผลิตเอนไซม์ glutamate dehydrogenase และ acid phosphatase โดยวิธีอิเลคโตรฟอริซิส แสดงว่าเส้นใยเห็ดหอมที่ทดลองผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้อย่างละรูปแบบเดียว (monomorphic pattern) ในขณะที่รูปแบบไอโซไซม์ laccase ภายในเซลและ esterase เมื่อวิเคราะห์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการเจริญพบว่าแตกต่างกัน นอกจากนี้เส้นใยสปอร์เดี่ยวซึ่งได้จากสายพันธุ์พ่อหรือแม่เดียวกันมีรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันออกไป กลุ่มของลูกผสมเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ได้จากการผสมเส้นใยสปอร์เดี่ยวระหว่าง MU4 และ MU12 มีสัมพันธภาพของไอโซไซม์ laccase ภายในเซล และ esterase กับคุณสมบัติของการเกิดดอก โดยที่ลูกผสมซึ่งไม่เกิดดอกมีรูปแบบไอโซไซม์ต่างจากกลุ่มที่เกิดดอกอย่างชัดเจน ส่วนลูกผสมจากพ่อ แม่คู่อื่นให้ผลไม่ชัดเจน

ภาควิชา .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

WANDEE YINDEEYOUNGYEON : CORRELATION OF ISOZYMES WITH FRUITING ABILITY OF HYBRIDS OF SHIITAKE (Lentinula edodes). THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SUTHAPHUN TRIRATANA, M.Sc. AND ASSOC. PROF. DR. SANHA PANICHAJAKUL, Ph.D., 126 pp. ISBN 974-579-059-1

The parental and hybrid strains of shiitake (Lentinula edodes) were studied in certain aspects. The hyphal interaction experiment had revealed that the examined strains could be divided into two groups : MU2, MU4, MU11 and MU5, MU9, MU12.

The growth patterns of L. edodes, mono- and dikaryotic mycelia in PDYB liquid media during growth period of 10 - 50 days were logarithmic growth. The growth rates of dikaryotic mycelia were 2 - 3 times higher than those of monokaryotic mycelia.

Homogenization and sonication were used as effective techniques to release intracellular enzymes from L. edodes mycelia. Intra- and extracellular laccases were growth associative enzymes. The laccase activities in good fruiting hybrids derived from MU2 - MU12 and MU4 - MU12 were rather high when compared to the hybrids that could not fruit. Most of the monosporous isolates had lower average laccase activities than the dikaryotic mycelia.

Acid phosphatase was found to be growth associative enzyme. Specific activities of acid phosphatase in mono- and dikaryotic mycelia were not significantly different.

Isozyme patterns of glutamate dehydrogenase and acid phosphatase examined by polyacrylamide slab gel electrophoresis were monomorphic while laccase and esterase had polymorphic patterns. The intracellular laccase and esterase obtained from different age of cultures were changed. The intracellular laccase and esterase isozyme patterns of the hybrids from the parents MU4 and MU12 were found to be correlated with fruiting ability but another set of hybrids did not show consistent results.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ รศ. สุทธพรรณ ตรีรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำแนะนำ ให้กำลังใจ และอีกหลายสิ่งหลายอย่างกับผู้เขียน

กราบขอบพระคุณ รศ. ดร. สัณห์ พณิชยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการตรวจแก้ไข

กราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. สุเทน ธนียวัน ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และ รศ. ดร. อังคณา ฉายประเสริฐ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอบคุณ พี่อ๋อย พี่ยี ตุ้ย และลุงจวบ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญรูป.....ฐ

บทที่

1 บทนำ.....1

2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....12

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสายพันธุ์เห็ดหอม.....12

2.1.1 ครุภัณฑ์.....12

2.1.2 เคมีภัณฑ์.....13

2.1.3 สายพันธุ์เห็ดหอม (*L. edodes*).....14

2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเชื้อและสูตรวัสดุเพาะ.....20

2.2 วิธีการทดลอง.....21

2.2.1 การทดสอบความสามารถในการเกิดดอกในลูกผสม C369, C377, C516 และ C504.....22

2.2.2 การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย (Hyphal interaction) ของ dikaryotic mycelium.....22

2.2.3 วิธีการเลี้ยงและการศึกษารูปแบบการเจริญของเส้นใย *L. edodes* ในอาหารเหลว.....23

2.2.4 วิธีการเตรียมและสกัดสารละลายเอนไซม์จากตัวอย่างเพื่อใช้ในการวัดแอคติวิตีและวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์.....25

2.2.5 การวิเคราะห์โปรตีน.....25

2.2.6 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในสภาพสารละลาย.....25

บทที่ หน้า

2.2.7 การแยกไอโซไซม์ที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดหอมด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์อิเลคโตรฟอริซิส และการติดตามรูปแบบไอโซไซม์.....26

3 ผลการทดลอง.....29

3.1 ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดดอกในลูกผสมที่ไม่เกิดดอกในการทดสอบครั้งแรก 29

3.2 ผลการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย.....29

3.3 การศึกษารูปแบบการเจริญของเส้นใย *L. edodes* ในอาหารเหลว.....33

3.4 การสกัดโปรตีนจากเส้นใย *L. edodes*.....35

3.5 ผลการศึกษารูปแบบการเจริญของเส้นใย *L. edodes* กับการผลิตเอนไซม์ laccase และ acid phosphatase.....43

3.6 การผลิตเอนไซม์ laccase ใน *L. edodes*.....43

3.7 การผลิตเอนไซม์ acid phosphatase ใน *L. edodes*.....55

3.8 ผลการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase, acid phosphatase, laccase และ esterase.....55

3.8.1 Glutamate dehydrogenase.....55

3.8.2 Acid phosphatase.....55

3.8.3 Laccase.....59

3.8.4 Esterase.....70

4 วิจารณ์และสรุป.....81

4.1 ปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย.....81

4.2 แอคติวิตีของ laccase ใน *L. edodes*.....82

4.3 แอคติวิตีของ acid phosphatase ใน *L. edodes*.....86

4.4 รูปแบบไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase และ acid phosphatase.....86

4.5 รูปแบบไอโซไซม์ laccase ใน *L. edodes*.....86

4.6 รูปแบบไอโซไซม์ esterase ใน *L. edodes*.....87

สรุป 90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

เอกสารอ้างอิง.....92

ภาคผนวก.....100

1 การเตรียมสารละลาย.....101

2 Thomas homogenizer apparatus.....103

3 Sonicater (Heat system).....104

4 LKB Electrophoretic apparatus.....105

5 Protein content(mg/ml) in *L. edodes* mycelia after breaking with homogenizer and sonicater.....106

6 Intracellular laccase activity (units/mg prot.) in *L. edodes* mycelia after breaking with homogenizer and sonicater.....108

7 Acid phosphatase activity (units/mg prot.x 0.01) in *L. edodes* mycelia after breaking with homogenizer and sonicater.....110

8 Comparison of extracellular laccase activities (units/100 ml media x 1000).....112

9 Relative mobility (Rf) of laccase isozymes from *L. edodes* mycelia. Dikaryotic culture : (parents : MU2, MU12) ; hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377) and Monokaryotic culture : (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10). At 30 days of growth period 113

10 Relative mobility (Rf) of laccase isozymes from *L. edodes* mycelia. Dikaryotic culture : (parents : MU2, MU12) ; hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377) and Monokaryotic culture : (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10). At 50 days of growth period 114

11 Relative mobility (Rf) of laccase isozymes from *L. edodes* mycelia. Dikaryotic culture : (parents : MU4, MU12) ; hybrids (C508, C507, C513, C502, C516, C504) and Monokaryotic culture

ภาคผนวกที่ หน้า

: (FF10, FF9, FF7, FF2, FF5, N9, N10). At 30 days of growth period.....115

12 Relative mobility (Rf) of laccase isozymes from *L. edodes* mycelia. Dikaryotic culture : (parents : MU4, MU12) ; hybrids (C507, C516) and Monokaryotic culture : (FF10, FF9, N9, N10). At 50 days of growth period.....116

13 Relative mobility (Rf) of esterase isozymes from *L. edodes* mycelia. Dikaryotic culture : (parents : MU2, MU12) ; hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377) and Monokaryotic culture : (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10). At 30 days of growth period 117

14 Relative mobility (Rf) of esterase isozymes from *L. edodes* mycelia. Dikaryotic culture : (parents : MU2, MU12) ; hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377) and Monokaryotic culture : (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10). At 50 days of growth period 118

15 Relative mobility (Rf) of esterase isozymes from *L. edodes* mycelia. Dikaryotic culture : (parents : MU4, MU12) ; hybrids (C508, C507, C513, C502, C516, C504) and Monokaryotic culture : (FF10, FF9, FF7, FF2, FF5, N9, N10). At 30 days of growth period.....119

16 Relative mobility (Rf) of esterase isozymes from *L. edodes* mycelia. Dikaryotic culture : (parents : MU4, MU12) ; hybrids (C508, C507, C513, C502, C516, C504) and Monokaryotic culture (FF10, FF9, FF7, FF2, FF5, N9, N10). At 50 days of growth period.....120

17 Protein standard curve using protein-dye binding method

ภาคผนวกที่ หน้า

(Bradford, 1976), bovein serum albumin was use as standard protein.....121

18 PNP standard curve using *p*-Nitrophenol as standard.....122

19 Changes of $O.D._{590}$ /min in laccase enzyme assay according to various enzyme concentration.....123

20 Rate of oxidation of substrates by a whole fresh mushroom homogenate (Leatham and Stahmann, 1981).....124

21 Fluctuation of laccase activity in some replications of *L. edodes* strain MU4, cultivated in PDYB medium (static culture), at 25 ° C.....125

ประวัติผู้เขียน.....126

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 Some characteristics of dikaryotic *L. edodes* strains of the parents (MU12, MU2, MU4, MU5, MU9 and MU11).....14

2 Some characteristics of dikaryotic *L. edodes* strains of the hybrids (derived from MU2 MU12) : C364, C366, C359, C373, C369 and C377.....16

3 Some characteristics of dikaryotic *L. edodes* strains of the hybrids (derived from MU4 MU12) : C508, C507, C513, C502, C516 and C504.....18

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 Generalized life cycle of the Basidiomycotina.....3

2 Mating diagram of *L. edodes*.....5

3.1 Fruiting of *L. edodes* parental strains (MU12 (N), MU2 and MU4) on sawdust blocks.....15

3.2 Fruiting of *L. edodes* hybrids (C364, C366, C359, C373) on sawdust blocks.....17

3.3 Fruiting of *L. edodes* hybrids (C508, C507, C513, C502,) on sawdust blocks.....19

4 Outlines of the procedure used in the experiment.....21

5 Cultures of *L. edodes* mycelia in static liquid media (PDYB)..24

6 Fruiting trial of *L. edodes* hybrids : C369, C377, C516 and C504 (the second trial).....30

7 Hyphal interaction among 6 strains of *L. edodes* (MU2, MU4, MU5, MU9, MU11 and MU12) on PDY agar plate.....31

8 Typical pattern of growth curve demonstrating the accumulation of *L. edodes* mycelial dry weight during growth in static PDYB medium.....34

9 The light micrograph of *L. edodes* mycelia (x 200) after breaking with homogenizer and sonicater.....36

10.1 Protein (mg/ml) from *L. edodes* dikaryotic mycelia : parents (MU2, MU12) after breaking with homogenizer and sonicater.....37

10.2 Protein (mg/ml) from *L. edodes* dikaryotic mycelia : hybrids

รูปที่ หน้า

(C364, C366, C359, C373, C369 and C377) after breaking with homogenizer and sonicater.....38

10.3 Protein (mg/ml) from *L. edodes* monokaryotic mycelia (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10) after breaking with homogenizer and sonicater.....39

11.1 Protein (mg/ml) from *L. edodes* dikaryotic mycelia : parents (MU4, MU12) after breaking with homogenizer and sonicater.....40

11.2 Protein (mg/ml) from *L. edodes* dikaryotic mycelia : hybrids (C508, C507, C513, C516, C504) after breaking with homogenizer and sonicater.....41

11.3 Protein (mg/ml) from *L. edodes* monokaryotic mycelia : (FF10, FF9, FF7, FF5, N9, N10) after breaking with homogenizer and sonicater.....42

12.1 Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of intracellular laccase (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes* dikaryotic culture : parents (MU2, MU12, MU4) and hybrid (C359).....44

12.2 Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of intracellular laccase (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes* monokaryotic culture : (E6, N9, N10, FF10).....45

13.1 Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of extracellular laccase (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes* dikaryotic culture : parents (MU2, MU12, MU4) and hybrid (C359).....46

รูปที่ หน้า

13.2 Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of extracellular laccase (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes* monokaryotic culture : (E6, N9, N10, FF10).....47

14.1 Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of acid phosphatase (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes* dikaryotic culture : parents (MU2, MU12, MU4) and hybrid (C359).....48

14.2 Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of acid phosphatase (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes* monokaryotic culture : (E6, N9, N10, FF10) 49

15.1 Changes in intracellular laccases activity during the growth period of *L. edodes* mycelia : MU2, MU12, hybrids and their corresponding monokaryotic culture 51

15.2 Changes in intracellular laccases activity during the growth period of *L. edodes* mycelia : MU4, MU12, hybrids and their corresponding monokaryotic culture.....52

16.1 Changes in extracellular laccase activity during the growth period of *L. edodes* mycelia : MU2, MU12, hybrids and their corresponding monokaryotic culture.....53

16.2 Changes in extracellular laccase activity during the growth period of *L. edodes* mycelia : MU4, MU12, hybrids and their corresponding monokaryotic culture.....54

17.1 Changes in acid phosphatase activity during the growth period of *L. edodes* mycelia : MU2, MU12, hybrids and their corresponding monokaryotic culture.....56

รูปที่ หน้า

17.2 Changes in acid phosphatase activity during the growth period of *L. edodes* mycelia : MU4, MU12, hybrids and their corresponding monokaryotic culture.....57

18 Glutamate dehydrogenase isozyme pattern of *L. edodes*, MU2 and MU4.....58

19 Laccase isozyme pattern of *L. edodes*, MU4 and MU12.....60

20 Laccase isozyme pattern of *L. edodes*, hybrids : C373 and monokaryotic mycelia : E5, N10.....61

21.1 The pattern of intracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU2, MU12) ; hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377) and monokaryotic mycelia (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10) at 30 days of growth period.....63

21.2 The pattern of extracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU2, MU12) ; hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377) and monokaryotic mycelia (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10) at 30 days of growth period.....64

22.1 The pattern of intracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU4, MU12) ; hybrids (C508, C507, C513, C502, C516, C504) and monokaryotic mycelia (FF10, FF9, FF7, FF2, FF5, N9, N10) at 30 days of growth period.....65

22.2 The pattern of extracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU4, MU12) ; hybrids (C508, C507, C513, C502, C516, C504) and monokaryotic mycelia (FF10, FF9, FF7, FF2, FF5, N9, N10) at 30 days of growth period.....66

23.1 The pattern of intracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU2, MU12) ; hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377) and monokaryotic mycelia (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10)

รูปที่ หน้า

at 50 days of growth period.....68

23.2 The pattern of extracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU2, MU12) ; hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377) and monokaryotic mycelia (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10) at 50 days of growth period.....69

24.1 The pattern of intracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU4,MU12) ; hybrids (C508, C507, C513, C502, C516, C504) and monokaryotic mycelia (FF10, FF9, FF7, FF2, FF5, N9, N10) at 50 days of growth period.....71

24.2 The pattern of extracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU4,MU12) ; hybrids (C508, C507, C513, C502, C516, C504) and monokaryotic mycelia (FF10, FF9, FF7, FF2, FF5, N9, N10) at 50 days of growth period.....72

25 Esterase isozyme pattern of *L. edodes*, MU4 at 10, 20, 30, 40 and 50 days of growth periods.....73

26 Esterase isozyme pattern of *L. edodes*, hybrid : C373 and monokaryotic mycelia : E5, N10 at 30 days of growth period 74

27 The pattern of esterase isozymes of *L. edodes* parents (MU2, MU12) ; hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377) and monokaryotic mycelia (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10) at 30 days of growth period.....76

28 The pattern of esterase isozymes of *L. edodes* parents (MU2, MU12) ; hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377) and monokaryotic mycelia (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10) at 50 days of growth period.....77

รูปที่ หน้า

29 The pattern of esterase isozymes of *L. edodes* parents (MU4, MU12) ; hybrids (C508, C507, C513, C502, C516, C504) and monokaryotic mycelia (FF10, FF9, FF7, FF2, FF5, N9, N10) at 30 days of growth period.....79

30 The pattern of esterase isozymes of *L. edodes* parents (MU4, MU12) ; hybrids (C508, C507, C513, C502, C516, C504) and monokaryotic mycelia (FF10, FF9, FF7, FF2, FF5, N9, N10) at 50 days of growth period.....80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย