สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

การศึกษาการสร้างโปรโตพลาสต์และการทำให้โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ในเห็ดหอม (*Lentinula edodes* (Berk.) Sing.

Formation and Regeneration of Protoplasts in *Lentinula edodes* (Berk.) Sing.

T034411

RCH
QK
617
W292S

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 34411
วัน, เดือน, ปี 1 พ.ย. 2542

ผู้วิจัย
รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2540 ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และจากการอนุเคราะห์ในการให้ใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือการวิจัยของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณประภัสสร โชคสวนทรัพย์ ที่ช่วยในการทำการทดลองและคุณพัชรินทร์ ขาวสวย ที่จัดช่วยพิมพ์ต้นฉบับ

พรรณี ฐิตาภิฐิต

30 มิถุนายน 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การแยกโปรโตพลาสต์ในการศึกษาครั้งนี้แยกจากเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยว โดยพบว่าเส้นใยเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25° ซ. ในอาหาร MA ที่ pH 5 สำหรับวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่ดีที่ทำโดยนำเส้นใยอายุ 5 วัน จำนวน 0.3 กรัม มาผสมกับโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ (sodium maleate buffer 0.05 โมล) จำนวน 3 มล. และย่อยผนังเซลล์ด้วย lysing enzyme ผสมกับ β-glucuronidase ในอัตราส่วน 2 : 2 มก. ต่อหนึ่ง มล. ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ (pH 5) โดยมี $MgSO_4$ (0.6 โมล) เป็น osmotic stabilizer ทั้งนี้พบว่าโปรโตพลาสต์เกิดขึ้นด้วยอัตราสูงสุด (6.2 x 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อหนึ่ง มล. ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์) หลังการบ่มด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชม. สำหรับการทำให้โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ทำโดยนำโปรโตพลาสต์ไปล้างด้วยโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ตามด้วย $MgSO_4$ 0.6 โมล อีก 1 ครั้ง ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารสำหรับสร้างผนังเซลล์ (ประกอบด้วย PDA ที่ละลายใน $MgSO_4$ 0.6 โมล) และเททับด้วยอาหารชนิดเดียวกันแต่มีความเข้มข้นของ PDA เพียง 0.7% และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25° ซ. เป็นเวลา 10 วัน เพื่อเก็บเกี่ยวโคโลนี (ซึ่งเจริญมาจากโปรโตพลาสต์ที่ได้สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่) โดยพบว่าอัตราการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ คือ 0.018%

ABSTRACT

The studies of protoplast isolation were performed by obtaining firstly the mycelia derived from a single spore. The mycelia were found growing best on MA, pH 5 at 25° C. The best way to obtain protoplasts from mycelia was performed by taking 5 day-old mycelium to mix with 3 ml. of protoplast buffer (0.05 mol. sodium maleate buffer) and digested their cell wall with 2 : 2 mg of lysing enzyme and β-glucuronidase per one ml of protoplast buffer (pH5) with $MgSO_4$ (0.6 mol.) as the osmotic stabilizer. The highest rate (6.2 x 10^5 protoplast/ml. of protoplast buffer) of protoplast isolation was obtained after 4 hours incubation at room temperature. Cell wall regeneration of protoplast was performed by rinsing the protoplasts twice with protoplast buffer followed by another rinse with 0.6 mol. $MgSO_4$ before transferring them into the regeneration medium (2.5% PDA in 0.6 mol. $MgSO_4$) overlayed with the same medium but with 0.7% reduction in PDA concentration. The regeneration culture was incubated at 25° C for 10 days for colony harvesting. The regeneration rate was found to be 0.018%.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ข
สารบัญเรื่อง	ค
สารบัญตาราง	ง
คำอธิบายคำย่อหรือคำศัพท์	ง
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	2
วัสดุและอุปกรณ์	2
ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง	2
ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์	4
สรุปและข้อเสนอแนะ	8
บรรณานุกรม	8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ผลของปัจจัยที่มีต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย

ตารางที่ 2 ผลของอายุของเส้นใยที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องและที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีโดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย lysing enzyme และ β-glucuronidase ในอัตราส่วน 2 : 2 มก. ต่อ หนึ่ง มล. ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ (pH 5 และมี $MgSO_4$ 0.6 โมล เป็น osmotic stabilizer)

ตารางที่ 3 ผลของระดับ pH ในสารละลายโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์ในเส้นใย (อายุ 5 วัน) ของเห็ดหอมเมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องและที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีโดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย lysing enzyme และ β-glucronidase ในอัตราส่วน 2 : 2 มก. ต่อ หนึ่ง มล.ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ (มี $MgSO_4$ เป็น osmotic stabilizer)

ตารางที่ 4 ผลของชนิดของ osmotic stabilizer ที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์ในเส้นใย (อายุ 5 วัน) ของเห็ดหอมเมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที โดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วย lysing enzyme และ β-glucuronidase ในอัตราส่วน 2:2 มก. ต่อหนึ่งมล. ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ (pH5)

ตารางที่ 5 ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ (มก.ต่อหนึ่งมล.ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์) ที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์ (เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที) ในโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ (ที่ pH 5 และมี $MgSO_4$ 0.6 โมล เป็น osmotic stabilizer)

คำอธิบายคำย่อหรือคำศัพท์

PDA = potato dextrose agar

MA = malt extract agar

WA = water agar

โปรโตพลาสต์ = protoplast = เซลล์ที่ผนังเซลล์ถูกย่อยออกไป

โปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ = protoplast buffer (ในงานวิจัยนี้ใช้ sodium maleate buffer 0.05 โมล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

เห็ดหอมเป็นเห็ดพื้นเมืองที่มีการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์มาเป็นเวลานานในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลี มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. ซึ่งต่อมา Pegler (1983) ได้เปลี่ยนชื่อสกุลใหม่จึงกลายเป็น *Lentinula edodes* (Berk) Pegler, มีชื่อสามัญว่า Chinese mushroom หรือ Japanese mushroom หรือ Black mushroom คนจีนและคนญี่ปุ่นเรียกเห็ดหอมว่า Haeng-ko และ Shii-ta-ke ตามลำดับ

เห็ดหอมจัดเป็นเห็ดที่มีความสำคัญมากที่สุดชนิดหนึ่ง เพราะมีรสชาดดีและมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ของมันเอง มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและยังเชื่อกันว่ามีสรรพคุณทางยา

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยมีการเพาะเห็ดหอมในเชิงพาณิชย์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2517 โดยมีการพัฒนาวิธีการเพาะมาตลอด แต่ปัจจุบันยังนับว่าประสบผลสำเร็จไม่เป็นที่พอใจนัก ทั้งนี้เพราะเห็ดหอมต้องการอุณหภูมิค่อนข้างต่ำสำหรับการออกดอก การปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมให้มีความสามารถที่จะขึ้นได้ดีในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยจึงนับว่ามีความจำเป็น การรวมโปรโตพลาสต์เพื่อการสร้างสายพันธุ์ใหม่ในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในจุลินทรีย์และพืชเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจจากนักพันธุศาสตร์ทั่วโลกเพราะเป็นวิธีที่สามารถสร้างลูกผสมเมื่อการผสมพันธุ์ระบบดั้งเดิม (conventional method, ซึ่งต้องอาศัยการผสมกันของเซลล์สืบพันธุ์ต่างเพศ) ทำไม่ได้ อย่างไรก็ตาม การรวมโปรโตพลาสต์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเห็ดยังไม่เป็นที่แพร่หลายเท่าที่ควร ทำให้เทคนิคต่างๆ ที่มีตีพิมพ์เผยแพร่ยังมีน้อย ที่ตีพิมพ์เผยแพร่เท่าที่ตรวจเอกสารพบส่วนใหญ่ได้จากประเทศญี่ปุ่น (เช่น Kawasumi *et. al.*, 1988) ประเทศเนเธอร์แลนด์ (เช่น Sonnenberg *et. al.*, 1988) และฮ่องกง (เช่น Chang et at., 1985) และเนื่องจากเทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ในเห็ดยังไม่ดีเท่าที่ควรการศึกษาในด้านนี้ยังต้องมีการศึกษาอีกมาก และวิธีการขั้นต้นของการรวมโปรโตพลาสต์ก็คือการได้มาซึ่งโปรโตพลาสต์ในอัตราที่สูง ดังนั้น ความสำคัญและที่มาของปัญหาในงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดต่อการแยกโปรโตพลาสต์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอม (ไม่ว่าจะหว่างสายพันธุ์ต่างๆ ของเห็ดหอม หรือระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดชนิดอื่นๆ) ในอนาคต

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1. เพื่อศึกษาถึงปัจจัยที่มีต่อการเจริญของเส้นใย (กระจุกใยรา, mycelium) ของเห็ดหอม (ที่ได้จากการงอกของสปอร์เดี่ยว)
2. เพื่อศึกษาถึงปัจจัยที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดหอม
3. เพื่อศึกษาอัตราการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ในโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

<u>วัสดุ</u>

ดอกเห็ดหอมสด (ออกดอกอยู่ในถุงขี้เลื่อย, ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญ-ญิก จังหวัดนครปฐม)

อาหารเลี้ยงเส้นใย : PDA , MA และ WA

เอนไซม์สำหรับย่อยผนังเซลล์ : lysing enzyme และ β-glucuronidase

สารเคมีชนิดต่างๆ : KCl, NH_4Cl, sorbital, mannitol, chloramphinicol

กระดาษกรอง (Whatman#1)

<u>อุปกรณ์</u>

ตู้เขี่ยเชื้อ

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

เครื่องปั่นเหวี่ยง

เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้

ตู้บ่มเชื้อที่ปรับอุณหภูมิได้

haemacytometer

กล้องจุลทรรศน์ที่ติดตั้งอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

sinterglass filter

Cork-borer (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม.)

ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว

นำดอกเห็ดหอมสดมาทำสปอร์พิมพ์ (spore-print) ด้วยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) เก็บสปอร์พิมพ์ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

นำสารละลายสปอร์ (spore suspension) ที่มีความเข้มข้นประมาณ 3 X 10^6 สปอร์ต่อหนึ่ง มล. ของน้ำกลั่น (ปลอดเชื้อ) จำนวน 0.2 มล. มาแผ่ (spread) ลงบนจานอาหาร MA ที่เติม chloramphinicol 50 มก.ต่อ มล. (เพื่อระงับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย) บ่มที่ 20-25° ซ. เป็นเวลา 10-12 ชม. ภายใต้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ชนิดของ osmotic stabilizer

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1 และ 4.2 แต่แปรผันชนิดของ osmotic stabilizer (mannitol, sorbital, $MgSO_4$, NH_4Cl และ KCl ที่มีความเข้มข้น 0.6 โมล) เพื่อหาว่าสารใดเป็น osmotic stabilizer ที่เหมาะสมสำหรับเห็ดหอม

4.4 ความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1 และ 4.2 แต่แปรผันความเข้มข้นของ lysing enzyme และ β-glucuronidase ตั้งแต่ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มก. ต่อ 1 มล. ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ ทำให้เกิดเป็น 16 สูตรการทดลอง (T1 - T16) ดังตารางต่อไปนี้

lysing enzyme / β-glucuronidase	0	1	2	3
0	T1	T2	T3	T4
1	T5	T6	T7	T8
2	T9	T10	T11	T12
3	T13	T14	T15	T16

5. การศึกษาหาอัตราการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์

นำโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้ไปล้างด้วยโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ตามด้วย $MgSO_4$ (0.6 โมล) อีก 1 ครั้ง ต่อไปนำโปรโตพลาสต์ที่ได้ ไปเลี้ยงในอาหารสำหรับสร้างผนังเซลล์ (ซึ่งประกอบด้วย PDA 2.5% ที่ละลายใน $MgSO_4$ 0.6 โมล) และเททับ (overlay) ด้วย PDA ที่มีความเข้มข้นเพียง 0.7% และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25° ซ. เป็นเวลา 10 วันเพื่อเก็บเกี่ยวโคโลนี นับจำนวนโคโลนี (โปรโตพลาสต์ที่ได้สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่) ด้วย haemacytometer

ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

1. ผลของปัจจัยที่มีต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย

ผลของการศึกษาถึงชนิดของอาหาร, อุณหภูมิของการบ่มและ pH ของอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย (ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว) (ตารางที่ 1) พบว่าอาหาร, อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใย คือ MA, 25° ซ. และ pH 5 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าเห็ดหอมจะเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เติบโตได้ดีต่อเมื่ออุณหภูมิค่อนข้างต่ำคือ 20-25 ° ซ. ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิในประเทศไทย ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมให้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิที่สูงขึ้น (เช่น ที่ 30-40° ซ.) จึงเป็นงานที่จำเป็นอย่างยิ่ง

ตารางที่ 1 ผลของปัจจัยที่มีต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย

ปัจจัยที่ศึกษา		เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
อาหารเลี้ยงเชื้อ (อายุเส้นใย = 18 วัน, pH ของอาหาร = 5, บ่มที่อุณหภูมิห้อง)	PDA	5.0
	MA	8.5
	WA	2.9
อุณหภูมิของการบ่ม (อายุของเส้นใย = 14 วัน ชนิดของอาหารคือ MA ที่มี pH5)	15	4.0
	20	6.4
	25	8.4
	30	5.6
	35	0
pH ของอาหาร (อายุของเส้นใย = 14 วัน, ชนิดของอาหารคือ MA, บ่มที่อุณหภูมิห้อง)	4.5	7.0
	5.0	8.7
	5.5	7.5
	6.0	6.0
	6.5	4.5

2. ผลของปัจจัยที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์ในเห็ดหอม

2.1 อายุของเส้นใย

จากการศึกษาผลของอายุของเส้นใย (ที่กระจายตัวดีในอาหาร PDB) ต่อการแยกโปรโตพลาสต์ (ตารางที่ 2) พบว่า เส้นใยอายุ 5 วันจะให้ผลของการแยกโปรโตพลาสต์ดีที่สุดโดยมีอัตราการเกิด = 4.1 X 10^5 โปรโตพลาสต์ต่อหนึ่งมิลลิลิตรของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ ซึ่งนับเป็นอัตราที่สูงพอที่จะใช้ในการการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมในอนาคต

ตารางที่ 2 ผลของอายุของเส้นใยที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องและที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีโดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย lysing enzyme และ β-glucuronidase ในอัตราส่วน 2 : 2 มก. ต่อหนึ่ง มล. ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ (pH 5 และมี $MgSO_4$ เป็น osmotic stabilizer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

34411

อายุของเส้นใย (วัน)	จำนวนโปรโตพลาสต์ ($X10^5$) ต่อหนึ่งมิลลิลิตรของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์
1	0.9
2	2.2
3	2.8
4	3.4
5	4.1
6	3.6
7	1.5

2.2 pH ของสารละลายโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์

จากการศึกษาถึงผลของระดับ pH ในสารละลายโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์สำหรับแยกโปรโตพลาสต์ (ตารางที่ 3) พบว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดก็เช่นเดียวกับ pH ในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยคือ pH 5

ตารางที่ 3 ผลของระดับ pH ในสารละลายโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์ในเส้นใย (อายุ 5 วัน) ของเห็ดหอมเมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย lysing enzyme และ β-glucuronidase ในอัตราส่วน 2 : 2 มก. ต่อหนึ่ง มล. ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ (มี $MgSO_4$ เป็น osmotic stabilizer)

pH	จำนวนโปรโตพลาสต์ ($X10^5$) ต่อหนึ่งมิลลิลิตรของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์
4.5	1.6
5.0	4.5
5.5	3.6
6.0	2.5

2.3 ชนิดของ osmotic stabilizer

จากผลของชนิดของ osmotic stabilizer ที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์ในตารางที่ 4 จะเห็นว่า osmotic stabilizer ที่เหมาะสมที่สุดคือ $MgSO_4$ (0.6 โมล) ซึ่งเป็นสารเคมีธรรมดาที่มีหาง่ายและราคาไม่แพง การศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ในเห็ดหอมจึงเป็นงานวิจัยที่ไม่สิ้นเปลืองงบประมาณมากและน่าจะทำให้ได้ผลสม่ำเสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 **ผลของชนิดของ osmotic stabilizer ที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์ในเส้นใย (อายุ 5 วัน) ของเห็ดหอมเมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย lysing ezyme และ β-glucuronidase ในอัตราส่วน 2 : 2 มก. ต่อหนึ่ง มล. ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์**

ชนิดของ osmotic stabilizer (0.6 โมล)	จำนวนโปรโตพลาสต์ ($X10^5$) ต่อหนึ่งมิลลิลิตรของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์
mannitol	4.6
sorbitol	3.9
$MgSO_4$	5.1
KCl	3.4
NH_4Cl	1.5

2.4 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ (lysing enzyme และ β-glucuronidase)

จากผลของชนิดและความเข้มข้นของ lysing enzyme และ β-glucuronidase (ตารางที่ 5) พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวจำนวนโปรโตพลาสต์แทบจะไม่เกิดขึ้นเลยแม้จะใช้เวลาบ่มเกิน 4 ชั่วโมงไปแล้ว ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน สามารถมีโปรโตพลาสต์เกิดขึ้นได้ โดยที่เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดต่างเท่ากับ 2 มก. (ต่อ หนึ่ง มล.ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์) จะให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 6.2×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อหนึ่งมิลลิลิตรของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์

ตารางที่ 5 **ผลของชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ (มก. ต่อหนึ่ง มล. ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์) ที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์ (เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที) ในโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ (ที่ pH 5 และมี $MgSO_4$ 0.6 โมล เป็น osmotic stabilizer)**

Lysing enzyme / β-glucuronidase	0	1	2	3
0	-	-	-	-
1	-	2.5	4.2	5.2
2	-	3.2	6.2	5.0
3	-	4.0	4.3	5.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาหาอัตราการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์

จากการศึกษาการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์จากวิธีการดังในข้อ 5 ของขั้นตอนการดำเนินการทดลอง (หน้า 4) พบว่าเปอรเซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ คือ 0.018 ซึ่งนับว่าเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตไปเป็นโคโลนีของสายพันธุ์เห็ดหอมต่อไป ซึ่งจะทำให้การศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอม (ไม่ว่าจะระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดหอมหรือเห็ดหอมกับเห็ดชนิดอื่นๆ) เป็นไปได้ไม่ยาก

สรุปและข้อเสนอแนะ

เส้นใยเห็ดหอมสามารถเจริญเติบโตได้ดีให้อาหาร MA ที่มี pH 5 และที่อุณหภูมิ 25° ซ. ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยสามารถทำได้โดยใช้เส้นใยที่มีอายุประมาณ 5 วัน บ่มในสารละลายโปร-โตพลาสต์บัฟเฟอร์ (sodium maleate buffers, 0.05 โมล) โดยมี lysing enzyme และ β-glucuronidase (2:2 มก. ต่อหนึ่งมล. ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ pH5) เป็นเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ และมี $MgSO_4$ (0.6 โมล) เป็น osmotic stabilizer อัตราสูงสุดของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้คือ 6.2×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อหนึ่งมล. ของโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์) และเปอร์เซ็นต์ที่สามารถทำให้โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่คือ 0.018 แม้ว่าอัตราการเกิดโปรโตพลาสต์และเปอร์เซ็นต์ที่ทำให้โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ในเห็ดหอมจากการศึกษาครั้งนี้จะมีค่าสูงพอประมาณ แต่การศึกษาถึงปัจจัยอื่นๆ นอกเหนือจากที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้ หรือการเพิ่มองศาแห่งความแปรผันให้มากขึ้นในแต่ละปัจจัยที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้จะเป็นงานทดลองที่ควรทำต่อไปเพื่อเพิ่มอัตราการแยกโปรโตพลาสต์ให้สูงมากยิ่งขึ้นซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมในอนาคต.

บรรณานุกรม

Chang, S.T., Li, G.S.F. and Peberdy, J.F. 1985. Isolation of protoplasts from edible fungi. MIRCEN Journal, 185-194.

Kawasumi, T., Baba, T. and Yanagi, S, O. 1988. Protoplast Fusion of Incompatible Mating Type Combinations of *Lentinus edodes* (Shiitake) Auxotrophs. Agric. Biol. Chem. 52(12), 3197-3199.

Pegler, D.N. 1983. The genus *Lentinula* (Tricholomataceae tribe Collybieae). Sydowia (36) : 227 - 239. In Przybylowicz, P. and Donoghue, J. *Shiitake* Growers Handbook (The Art and Science of Mushroom Cultivation), 217 pp. USA.

Sonnenberg, A.S., Wessels, T.G. and Griensven, L.J.V. 1988. An efficient protoplasting/regeneration system for *Agaricus bisporus* and *Agaricus bitorques*. Current Microbiology 17:285-292.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้