กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2544 และการอนุเคราะห์ให้ใช้อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตลอดจนคุณ ชนินันท์ พรสุริยา ผู้ช่วยนักวิจัยที่ได้ช่วยทำการทดลองและพิมพ์ต้นฉบับ

พรรณี ฐิตาภิชิต

พฤษภาคม 2545

RCH
QK
617
W2725

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 44507
วัน, เดือน, ปี- 6 มิ.ย. 2546

b 11243892
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

จากการศึกษาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดกินได้ในสกุล *Pleurotus* จำนวน 5 ชนิด (เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ) พบว่าปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยสำหรับเห็ดแต่ละชนิดตามลำดับมีดังต่อไปนี้ เส้นใยเห็ดที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ในเห็ดทุกชนิดเป็นเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวที่มีอายุ 4 วัน เมื่อเลี้ยงในอาหาร MEB (malt extract broth) พีเอช 6.0-7.0 ที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส โดยการนำไปบ่มด้วยไลซิ่งเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต (ทำหน้าที่เป็นโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์) ที่มีความเข้มข้น 0.9, 0.9, 1.2, 0.9 และ 0.9 โมลาร์ ตามลำดับ ทั้งนี้ได้ทำการเขย่าส่วนผสมที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยของเห็ดแต่ละชนิดที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้มีค่าเท่ากับ 8.78×10^6, 10.33×10^6, 10.55×10^6, 8.05×10^6 และ 2.58×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในด้านการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน พบว่าเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้มีลักษณะคล้ายกันมากโดยมีความแตกต่างในรายละเอียดด้านต่างๆ เพียงเล็กน้อย

ABSTRACT

It was found from the studies on protoplast isolations in the 5 edible species of the genus *Pleurotus* (*P. ostreatus, P. sajor-caju, , P. citrinopileatus, P. flabellatus* and *P.cystidiosus*) that the most suitable condition of each factor for the five species was as follows: the mycelia used for all species were derived from single spore isolation, and were 4 day-old in MEB (malt extract broth), pH 6.0-7.0 at 20-30°C. The concentrations of the lysing enzyme (as lytic enzyme) were 9, 8, 8, 9 and 10 mg/ml, respectively. For $MgSO_4$ (as protoplast buffer) the suitable concentrations were 0.9, 0.9, 1.2, 0.9 and 0.9 molars, respectively. The solutions containing the above most suitable condition of each factor for each species were incubated for 2 hours, at room temperature, and shaken at 100 rpm. The amounts of protoplast obtained for the five species were 8.78×10^6, 10.33×10^6, 10.55×10^6, 8.05×10^6 and 2.58×10^6 protoplast/ml, respectively. The taxonomical characteristics of the five species were similar with some little variations among them.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อ..... ข
ABSTRACT..... ข
สารบัญเรื่อง..... ค
สารบัญตาราง..... ง
สารบัญรูป..... จ
บทที่ 1. บทนำ..... 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย..... 2
บทที่ 2. การตรวจเอกสาร..... 3
2.1 การปรับปรุงพันธุ์เห็ด..... 3
2.2 องค์ประกอบของผนังเซลล์เห็ดรา..... 4
2.3 โปรโตพลาสต์..... 5
2.4 การแยกโปรโตพลาสต์..... 5
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโพรโตพลาสต์..... 5
2.5.1 อายุของเชื้อ..... 5
2.5.2 ชนิดของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์..... 7
2.5.3 ค่าพีเอช..... 7
2.5.4 ความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์..... 8
2.5.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์..... 8
บทที่ 3. วัตถุดิบและวิธีการวิจัย..... 9
บทที่ 4. ผลการวิจัย..... 13
บทที่ 5. สรุปผลการวิจัย..... 26
บรรณานุกรม..... 27
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี..... 29
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางสถิติ..... 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

4.1 ลักษณะของเห็ดจำนวน 5 ชนิด ในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญอยู่บนก้อนขี้เลื่อย.....13

4.2 รูปร่างของสปอร์ของเห็ดในสกุล *Pleurotus*.....14

4.3 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ด 5 ชนิด ในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WA, PDA และMEA ที่พีเอช 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 9 วัน.....17

4.4 ปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิด ในสกุล *Pleurotus* เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง.....21

4.5 ปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิด ในสกุล *Pleurotus* เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่มีชนิดต่างๆกันของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ (ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์) และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....22

4.6 ปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิด ในสกุล *Pleurotus* เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....24

4.7 ลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว.....25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เห็ดเป็นอาหารที่ประชาชนทั่วโลกรู้จักกันดี และนิยมนำมาบริโภคตั้งแต่โบราณกาลเนื่องจากอัตราการเพิ่มที่สูงของประชากรโลกประกอบกับความสนใจเกี่ยวกับการรับประทานอาหารเพื่อสุขภาพของคน จึงทำให้มีความต้องการอาหารที่มีโปรตีนสูงเพื่อทดแทนโปรตีนจากสัตว์เพิ่มมากขึ้น เห็ดจัดเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูงชนิดหนึ่งโดยมีโปรตีนประมาณร้อยละ 19-35 ของน้ำหนักแห้ง (Chang และ Buswell, 1996) นอกจากนี้เห็ดยังอุดมไปด้วยเกลือแร่และวิตามินโดยเฉพาะวิตามินบีรวม ไรโบฟลาวิน ไนอาซิน ไทอามิน กรดแพนโททีนิก รวมทั้งมีไขมันและแคลอรีต่ำ แต่มีเกลือแร่ เช่น โพแตสเซียม ฟอสฟอรัส แมงกานิส และแคลเซียมในปริมาณที่สูง (Jong และ Birmingham, 1994) นอกจากนี้เห็ดหลายชนิดยังมีสรรพคุณทางยาจึงทำให้เห็ดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเนื่องจากคุณค่าของเห็ดดังกล่าวจึงมีงานวิจัยต่างๆ เกี่ยวกับเห็ดออกมาเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์เห็ด

เห็ดในสกุล *Pleurotus* เช่น เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ เป็นเห็ดที่นิยมรับประทานและเพาะเลี้ยงเชิงการค้าเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการและมีสรรพคุณทางยา คือมีคุณสมบัติการเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic), เป็นสารต่อต้านไวรัส (antiviral), ต่อต้านมะเร็ง (anticarcinogenic), ต่อต้านการอักเสบ (antiinflammatory) และเป็นสารลดความดันในเลือด (hypocholesterolemic) (Gunde-Cimerman,1999) นอกจากนี้เห็ดในสกุลนี้ยังเพาะเลี้ยงได้ง่ายและให้ผลผลิตสูงตลอดปี ในปัจจุบันมีการศึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์โดยการนำเห็ดที่อยู่ในสกุลนี้มาผสมกัน (Matsumoto และคณะ, 1997) หรือนำเห็ดในสกุลนี้ไปผสมกับเห็ดในสกุลอื่นโดยใช้เทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์เพื่อให้ได้เห็ดลูกผสมที่ดีและให้ผลผลิตได้ตลอดปี การปรับปรุงพันธุ์เห็ดโดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์นั้นขั้นแรกต้องเตรียมโปรโตพลาสต์ซึ่งขั้นตอนนี้จำเป็นต้องศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ซึ่งได้แก่ อายุของเส้นใยที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์ ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (lysing enzyme) ตลอดจนชนิด ค่าพีเอช (pH) และความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ (osmotic stabilizer) ทั้งนี้เพื่อให้โปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีความสมบูรณ์และมีปริมาณมากพอที่จะนำไปทำการรวมโปรโตพลาสต์ในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาหาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์และการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของเห็ดในสกุล *Pleurotus* จำนวน 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ

1.2.2 เพื่อเป็นแนวทางในการเตรียมโปรโตพลาสต์สำหรับเห็ดชนิดอื่นๆ ในสกุล *Pleurotus*

1.2.3 เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดในสกุล *Pleurotus* โดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์

1.2.4 เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดในสกุลอื่นๆ ของเห็ดกินได้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ ถูกจัดอยู่ในสกุล (genus) เดียวกัน แต่ต่าง ชนิด (species) กัน ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (Alexopoulos และ Mims, 1979)

Kingdom Mycota
Division Amastigomycota
Subdivision Basidiomycotina
Class Basidiomycetes
Subclass Holobasidiomycetidae II
Order Agaricales
Family Tricholomataceae
Genus *Pleurotus*

Species	*ostreatus*	สำหรับ เห็ดนางรม
	sajor-caju	สำหรับ เห็ดนางฟ้า
	citrinopileatus	สำหรับ เห็ดรมสีทอง
	flabellatus	สำหรับ เห็ดนางนวล
	cystidiosus	สำหรับ เห็ดเป๋าฮื้อ

เห็ดในสกุล *Pleurotus* ทั้ง 5 ชนิดนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกันแต่จะแตกต่างกันในรายละเอียดเพียงเล็กน้อย เช่น ขนาดและสีในส่วนต่างๆ ของดอกเห็ด

2.1 การปรับปรุงพันธุ์เห็ด

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดทำได้ 3 วิธีใหญ่ๆ ดังต่อไปนี้

1. การคัดเลือก (selection) ดอกเห็ดที่มีลักษณะดีเพื่อนำไปขยายพันธุ์โดยใช้เนื้อเยื่อหรือสปอร์ของดอกเห็ดสด

2. การผสมพันธุ์โดยนำเส้นใยของเห็ด 2 ชนิดมาผสมกัน (conventional method) แต่มักเกิดปัญหาการเข้ากันไม่ได้ทางเพศ (sexual incompatibility) โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าทำการผสมพันธุ์ระหว่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อย เช่น ระหว่างชนิดในสกุลเดียวกัน (interspecific hybridization) (เช่น เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล ฯลฯ) หรือระหว่างเห็ดต่างสกุล (intergeneric hybridization) [เช่นเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) กับเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*)] ซึ่งมักพบว่าไม่มีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น

3. การรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) นับเป็นวิธีการสร้างฟิวแซนท์ (fusant)หรือลูกผสม (ที่อาจได้ผล) ในกรณีที่วิธีดั้งเดิมไม่อาจเกิดขึ้นได้ วิธีนี้ทำได้โดยการนำโปรโตพลาสต์ของเห็ด 2 ชนิดมารวมกัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงสายพันธุ์เพราะจะเป็นการสร้างลูกผสมที่มีลักษณะของสายพันธุ์พ่อและแม่มารวมกัน โดยที่ลูกผสมที่ได้อาจจะมีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นชุดหรือหลายชุดจากของพันธุ์พ่อแม่ [เห็ดมีโครโมโซมเป็น monoploid (n) ดังนั้นฟิวแซนท์หรือลูกผสมควรจะมีโครโมโซมเป็น diploid (2n) หรือ polyploid (>2n) ขึ้นกับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มารวมกัน] จะทำให้ได้ดอกเห็ดที่ใหญ่ขึ้นและแข็งแรง (Peberdy และคณะ, 1976) หรือได้ดอกเห็ดที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ เช่น การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ด *Laetiporus sulphureus* [ซึ่งสามารถผลิตสารที่ต่อต้านการเกิดโรคเลือดลิ่ม (thrombosis) แต่เพาะเลี้ยงได้ยากและไม่เป็นที่นิยมรับประทาน] กับเห็ด *Hypsizygus marmoreaus* (ซึ่งเป็นเห็ดที่เพาะเลี้ยงในเชิงการค้า) ได้ลูกผสมที่สามารถผลิตสารต่อต้านโรคเลือดลิ่มและเพาะเลี้ยงได้ง่าย (Okamura และคณะ, 2000) หรือการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดโคนหรือเห็ดปลวก (*Termitomyces* spp.) (ซึ่งเป็นเห็ดที่ต้องอาศัยปลวกช่วยในการขยายพันธุ์จึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้) กับเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) ทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะผสมระหว่างเห็ดโคนกับเห็ดฟางและสามารถเพาะเลี้ยงได้ (สุมาลี, 2541)

2.2 องค์ประกอบของผนังเซลล์เห็ดรา

ผนังเซลล์ของเห็ดรามีหลายชั้น (multilaminate) และประกอบด้วยสารเคมีที่สำคัญดังต่อไปนี้

ไคติน (chitin)

เซลลูโลส (cellulose)

โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide)

โปรตีน (protein)

ไลปิดชนิดต่างๆ (lipid)

ส่วนประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกันไปตามชนิดของเห็ดรา สภาวะแวดล้อม ชนิดของอาหาร พีเอช อุณหภูมิ โดยมีไคตินและเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์เห็ดราเกือบทุกชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 โปรโตพลาสต์ (Protoplast)

โปรโตพลาสต์คือเซลล์พืชหรือเซลล์จุลินทรีย์ที่ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) ดังนั้นโปรโตพลาสต์จึงถูกห่อหุ้มไว้ด้วยเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane หรือ plasma membrane) แต่โปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ (cell wall regeneration) และเจริญแบ่งเซลล์ต่อไปได้ โปรโตพลาสต์ของเห็ดรามีรูปร่างค่อนข้างกลมเพราะภายในเซลล์ของเห็ดรามีเวคคิวโอล (vacuole) โปรโตพลาสต์แตกได้ง่ายเมื่อค่าแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจึงจำเป็นต้องแยกและเก็บโปรโตพลาสต์ไว้ในสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ (osmotic stabilizer) ที่เหมาะสม

2.4 การแยกโปรโตพลาสต์ (Protoplast Isolation)

การแยกโปรโตพลาสต์เป็นขั้นตอนการเอาผนังเซลล์ออกจากเซลล์เดิมของสิ่งมีชีวิต จึงทำให้ได้เซลล์ที่เป็นโปรโตพลาสต์ การแยกโปรโตพลาสต์ทำได้ 2 วิธีคือ

1. วิธีกล (mechanical method) เป็นวิธีที่ไม่นิยมเพราะควบคุมได้ยากและอาจทำให้โพรโตพลาสต์ได้รับความเสียหาย วิธีนี้มักทำโดยการนำเซลล์ไปเขย่ากับลูกแก้วเพื่อทำลายผนังเซลล์หรือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic)

2. วิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic method) เป็นวิธีการใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (lytic enzyme) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ที่ใช้สำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันเนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ ตัวอย่างเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของเห็ดรา (รวมทั้งยีสต์) นั้นต้องเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคตินและเซลลูโลสเนื่องจากไคตินและเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ในเห็ดรา เช่น เอนไซม์จากหอยทาก (*Helix pomatia*) ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า เฮลิเคส (helicase), เอนไซม์ไซโมไลเอส (zymolyase), ซึ่งแยกได้จากแบคทีเรีย *Arthrobacter luteus* และเอนไซม์กลูคาเนส (glucanase) หรือโนโวไซม์ (Novozyme 234) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *Trichoderma hazianum* นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์จากแหล่ง (เชื้อจุลินทรีย์) อื่นๆ อีกมาก (ตารางที่ 2.1)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดรา

2.5.1 อายุของเส้นใยเห็ดรา

อายุของเส้นใยเห็ดราที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น โปรโตพลาสต์ของแบคทีเรีย *Streptomyces* และ *Micromonospora* จะได้จากการแยกเชื้อที่เจริญอยู่ในช่วงปลายของ log phase (Imada และคณะ, 1999) สำหรับเชื้อเห็ดราซึ่งมีการเจริญที่-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แหล่งเอนไซม์สลายผนังเซลล์ (Peberdy, 1985)

เอนไซม์	แหล่งที่มา (ชื่อเชื้อจุลินทรีย์)	บริษัทที่ผลิต
เฮลิเคส (Helicase)	*Helix pomatia*	Francaise, Clichy, France
กลูซูเลส (Glusulase)	*Helix pomatia*	Endo Laboratories, New York
เบต้า-กลูคูโรนิเดส (β-Glucuronidase)	*Helix pomatia*	Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.
โนโวไซม์ 234 (Novozyme234)	*Trichoderma* sp.	Novo Industry A/S, Enzyme Division, Bagsverd, Denmark
เซลลูเลส ซีพี (Cellulase CP)	*Penicillium Funiculosum*	John & E. Sturge Ltd. Selby, North Yorkshire, England
ไซม์โมไลเอส 5000 (Zymolyase 5000)	*Arthrobacter luteus*	Kirin Breweries Co. Ltd. Takasaki, Japan
ไซม์โมไลเอส 60,000 (Zymolyase 60,000)	*Arthrobacter luteus*	Kirin Breweries Co. Ltd. Takasaki, Japan
ดริเซเลส(Driselase)	*Irpex lacteus*	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan

ปลายของเส้นใย (hyphal tip) และจะเจริญออกไปเรื่อยๆ นั้น การแยกโปรโตพลาสต์มักนิยมเตรียมในอาหารเหลวและมักใช้เส้นใยที่มีอายุน้อยคืออยู่ในระยะต้นหรือระยะกลางของ log phase เพราะระยะเหล่านี้ผนังเซลล์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้ง่ายกว่าเส้นใยของเชื้อเห็ดราที่มีอายุมาก เช่น การแยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อราข้าวแดง (*Monascus* sp. KB6SR) จะใช้เส้นใยที่มีอายุ 16-20 ชั่วโมง [โดยสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้มากถึง 10^6-10^8 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร (ชุลี, 2536)] เห็ดนางฟ้าใช้เส้นใยที่มีอายุ 3 วัน [ซึ่งจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์ในปริมาณที่มากพอ (Eguchi และ Miyato,1995)] สำหรับเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวจะใช้เส้นใยที่มีอายุ 5 และ 3 วัน ตามลำดับ [ซึ่งจะให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากถึง 4.1×10^5 และ 6.5×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ประภัสสร, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองเพื่อหากราฟของการเจริญเติบโต (growth curve) ของเชื้อที่นำมาเตรียมโปรโตพลาสต์เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการหาช่วงการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ร่วมกับอายุของเชื้อ (เส้นใย) ซึ่งได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีผลทำให้องค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกันไป เช่น การเติมกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบลงไปในอาหารจะช่วยทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ได้ง่ายขึ้นหรือเติมสารจำพวก dithiothreitol, β-mercaptoethanol หรือ thioglycolate ก่อนนำเซลล์มาย่อยสลายผนังเซลล์ซึ่งทำให้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ได้ดีขึ้น (Gascon และคณะ, 1964)

2.5.2 ชนิดของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ (osmotic stabilizer)

โปรโตพลาสต์จะถูกทำลายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมซิส แต่โปรโตพลาสต์จะคงรูปอยู่ได้เมื่ออยู่ในสารละลายไอโซโทนิค (isotonic solution) ซึ่งโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสารละลายนี้จะมีรูปร่างกลมและเต่ง นอกจากนี้โปรโตพลาสต์ยังมีชีวิตอยู่ได้ในสารละลายไฮเปอร์โทนิค (hypertonic solution) โดยโปรโตพลาสต์ในสารละลายชนิดนี้จะเหี่ยวเล็กน้อยเนื่องจากมีการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ แต่เมื่อโปรโตพลาสต์อยู่ในสารละลายไฮโปโทนิค (hypotonic solution) โปรโตพลาสต์จะแตกเนื่องจากมีการรับน้ำเข้าไปมาก สารละลายที่ใช้สำหรับรักษาโปรโตพลาสต์ให้คงรูปและมีชีวิตอยู่ได้มีชื่อเรียกว่า สารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ (osmotic stabilizer) ซึ่งได้แก่ สารละลายของเกลืออนินทรีย์ [เช่น โพแตสเซียมคลอไรด์ (KCl), แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$), แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl), เป็นต้น] หรือสารละลายของน้ำตาลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ [เช่น กลูโคส (glucose), ซูโครส (sucrose), มอลโตส (maltose), ซอร์บิทอล (sorbitol) และแมนนิทอล (mannitol) เป็นต้น) เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะใช้สารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์แตกต่างกันไป เช่น การแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดแครง (เห็ดตีนตุ๊กแก, *Schizophyllum commune*) ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตร่วมกับโพแตสเซียมคลอไรด์เป็นสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่ให้ปริมาณโปรโตพลาสต์สูงกว่าเมื่อใช้ซอร์บิทอลหรือแมนนิทอล (De vries และ Wessles, 1972) นอกจากนี้แมกนีเซียมซัลเฟตยังเป็นสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่ดีที่สุดสำหรับเห็ดนางฟ้าและเห็ดฟาง(Chang และคณะ, 1985)

2.5.3 ค่าพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์

ค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์จะทำให้โปรโตพลาสต์คงสภาพอยู่ได้และค่าพีเอชที่เหมาะสมยังมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ค่าพีเอชที่สูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้โปรโตพลาสต์แตกเมื่อหลุดออกจากผนังเซลล์ โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเห็ดแต่จะอยู่ในช่วงประมาณ 4.5 - 6.5 เช่น ของเห็ดน้ำหมึกที่ชื่อ *Coprinus macrorhizus* คือ 5.5 (Yanagi และ Takebe, 1984) ของเห็ดนางฟ้าและเห็ด *Mycoleptodonoides aitchisonii* คือ 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ (Eguchi และ Miyato, 1995) และของเห็ดหอมคือ 5.0 (ประภัสสร, 2540) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4. ความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์

ความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น เห็ดนางฟ้าใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์ เห็ดฟางใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 0.4 โมลาร์ (Chang และคณะ, 1985) ส่วนเห็ดนางรม (*P. ostreatus*) ใช้แมนนิทอล 0.6 โมลาร์ (Magae และคณะ, 1985) เป็นต้น

2.5.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (lysing enzyme)

ความเข้มข้นของเอนไซม์จะมีผลต่อปริมาณการเกิดโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปพบว่าอัตราการเกิดโปรโตพลาสต์และปริมาณโปรโตพลาสต์ที่ได้มีค่ามากขึ้นเมื่อใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูงขึ้น (De vries และ Wessles,1972)แต่การใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูงหรือบ่มนานเกินไปจะทำให้ความมีชีวิต (viability) ของโปรโตพลาสต์ต่ำลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 ชนิดของเห็ด

เห็ดที่ใช้ในการวิจัยได้แก่

เห็ดนางรม (oyster mushroom), *Pleurotus ostreatus* จากกรมวิชาการเกษตร

เห็ดนางฟ้า (pheonix oyster mushroom), *Pleurotus sajor-caju* จากกรมวิชาการเกษตร

เห็ดนางรมสีทอง (golden oyster mushroom), *Pleurotus citrinopileatus* จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก

เห็ดนางนวล (pink oyster mushroom), *Pleurotus flabellatus* จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก

เห็ดเป๋าฮื้อ (abalone mushroom), *Pleurotus cystidiosus* จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก

3.1.2 สารเคมี ได้แก่

ทวีน 80 (tween 80) ของบริษัท Fluka

ไลซิ่ง เอนไซม์ (lysing enzyme) ของบริษัท Sigma

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Fluka

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของบริษัท Merk

แมนนิทอล (mannitol) ของบริษัท Merk

ซอร์บิทอล (sorbitol) ของบริษัท Merk

มอลต์สกัด (malt extract) ของบริษัท Merk

อาหาร PDA (potato dextrose agar) สำเร็จรูปของบริษัท Fluka

วุ้นผง (agar)

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettle Toledo รุ่น PG 5002

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettle Toledo รุ่น PG 803

เครื่องวัดพีเอช ของบริษัท Denver Instrument รุ่น 215

เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของบริษัท Sanyo รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดัน ของบริษัท Harvey รุ่น Hydroclave MC 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตู้เขี่ยเชื้อ ของบริษัท ISSCO Larminar flow รุ่น BVT 123

กล้องจุลทรรศน์ ของบริษัท Olympus รุ่น CHS

ไมโครปิเปตต์ ขนาด 200 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson

ไมโครปิเปตต์ ขนาด 5 มิลลิตร ของบริษัท Gilson

เครื่องแก้ว ของบริษัท Pyrex

อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ของบริษัท Boeco

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน

3.2.1.1 การวัดขนาดของเส้นใยเห็ด

นำเส้นใยของเห็ดที่เลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มาทำสไลด์ แล้วนำมาศึกษาลักษณะของเส้นใยและวัดขนาดของเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีไมโครมิเตอร์ (micrometer) ติดตั้งอยู่ด้วย ทำการวัดประมาณ 20 เส้นใยโดยการสุ่มแล้วหาค่าเฉลี่ย

3.2.1.2 การเพาะเห็ดเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยา

นำเส้นใยเห็ดจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่แก่ (โดยทั่วไปอายุไม่เกิน 9 วัน) จำนวนเล็กน้อยมาใส่ลงในขวดที่บรรจุเมล็ดข้าวฟ่างต้มสุกซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญเต็มขวดเมล็ดข้าวฟ่าง ต่อไปนำลงไปเพาะให้เกิดดอกในถุงขี้เลื่อย เมื่อดอกเห็ดเจริญเต็มที่ ทำการเก็บดอกเห็ดมาศึกษาสัณฐานวิทยาทั้งลักษณะภายนอก (macroscopic characteristics) และภายใน (microscopic characteristics) ตามวิธีของพรรณีและคณะ (2537) และวัดขนาดของส่วนประกอบต่างๆ ของดอก

3.2.2 การทำสปอร์พิมพ์ (spore-print)

นำดอกเห็ดทั้ง 5 ชนิด ที่เจริญเต็มที่มาตัดส่วนก้านออกแล้วนำมาคว่ำลงบนบีกเกอร์ที่ภายในบรรจุแผ่นกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ในที่ปลอดลม เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหรือตลอดคืน นำหมวกเห็ดออกแล้วปิดบีกเกอร์ด้วยกระดาษฟอยล์ที่ฆ่าเชื้อแล้วจะได้สปอร์พิมพ์ที่ปราศจากเชื้อบนกระดาษกรอง เก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

3.2.3 การแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation)

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยนำแผ่นสปอร์พิมพ์ 1 แผ่นใส่ลงในน้ำกลั่น 5 มิลลิตร ที่มีทวีน 80 ร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำสารแขวนลอยสปอร์เกลี่ยลงบนอาหาร WA (water agar) ที่มีความแข็งมากกว่าปกติ (วุ้นร้อยละ 1.8) และมีคลอแรมพีนิคอล (chloramphenicol) 50 มก./มล. เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงความแตกต่างของปัจจัยที่มีต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย ทั้งนี้เพื่อให้ได้เส้นใยปริมาณมากสำหรับนำไปศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ในขั้นต่อไป วิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

ตัดเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวด้วย cork borer ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มล. แล้วนำชิ้นเส้นใยที่ตัดได้มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ วัดการเจริญเติบโตโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีที่มีอายุ 9 วัน ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยดังต่อไปนี้

1. ศึกษาหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย ชนิดของอาหารที่ใช้ได้แก่ WA, PDA และ MEA (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง

2. ศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย อุณหภูมิที่ศึกษาได้แก่ 15, 20, 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส สำหรับอาหารที่ใช้คืออาหารที่เหมาะสมสำหรับเห็ดแต่ละชนิดที่เป็นผลจากการศึกษาในข้อ 1 (ซึ่งผลการทดลองพบว่า MEA เหมาะสมที่สุดสำหรับเห็ดทั้ง 5 ชนิด การทดลองต่อๆไปในงานวิจัยนี้จึงได้ใช้อาหาร MEA สำหรับเห็ดทั้ง 5 ชนิด)

3. ศึกษาหาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย ค่าพีเอชที่ศึกษาได้แก่ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 สำหรับชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่บ่มในเห็ดแต่ละชนิดจะขึ้นกับผลการทดลองในข้อ 1 และ 2

การทดลองนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD,Completely Randomized Design) โดยในแต่ละสิ่งทดลอง (treatment) จะทำการทดลอง 4 ซ้ำจากนั้นทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA,analysis of variance) ถ้าค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองมีความแตกต่างกันจะนำผลที่ได้ไปตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.2.5 การศึกษาหาสภาวะบางประการที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

เมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวในข้อ 3.2.4 แล้ว จะนำเส้นใยที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเห็ดแต่ละชนิดมาทำการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ทำการศึกษาสภาวะบางประการที่มีผลต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ ชนิดของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ และความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละสิ่งทดลอง จากนั้นทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยการวิเคราะห์ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แปรปรวน หากพบว่ามีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองจะนำผลที่ได้ไปตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

1. ความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

นำเส้นใยเห็ดมาเลี้ยงในอาหารเหลว MEB ที่มีลูกปัดแก้ว 20 ลูกบรรจุอยู่ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เก็บเส้นใยโดยปั่นแยกที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แล้วจึงล้างด้วยโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ ต่อไปนำเส้นใยปริมาณ 0.3 กรัมใส่ลงในสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์และเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้น

2. ชนิดของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์

นำเส้นใยเห็ดอายุ 4 วัน (เก็บเส้นใยตามวิธีในข้อ 1) ปริมาณ 0.3 กรัม ใส่ลงในสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ ที่มีออสโมติกสเตบิไลเซอร์ชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้ แมกนีเซียมซัลเฟต แมนนิทอล ซอร์บิทอล และโพแทสเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้น

3. ความเข้มข้นของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์

นำเส้นใยเห็ดอายุ 4 วัน (เก็บเส้นใยตามวิธีในข้อ 1) ปริมาณ 0.3 กรัม ใส่ลงในสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ ที่ประกอบด้วยโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟต (สารออส-โมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมที่สุด) เป็นออสโมติกสเตบิไลเซอร์ ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6, 0.9 และ 1.2 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นับจำนวนโปรโต-พลาสต์ที่เกิดขึ้น

3.2.6 การศึกษาอัตราการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ (regeneration rate) ของโปรโตพลาสต์

ดูดสารแขวนลอยโปรโตพลาสต์มาหยดลงบนอาหาร MEA ที่เติมวุ้น 3% จากนั้นเททับ (overlay) ด้วยอาหารชนิดเดิมแต่ลดความเข้มข้นของวุ้นเป็น 0.5% แล้วนำไปบ่ม นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ โดยสมการดังนี้

% ความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่เท่ากับ

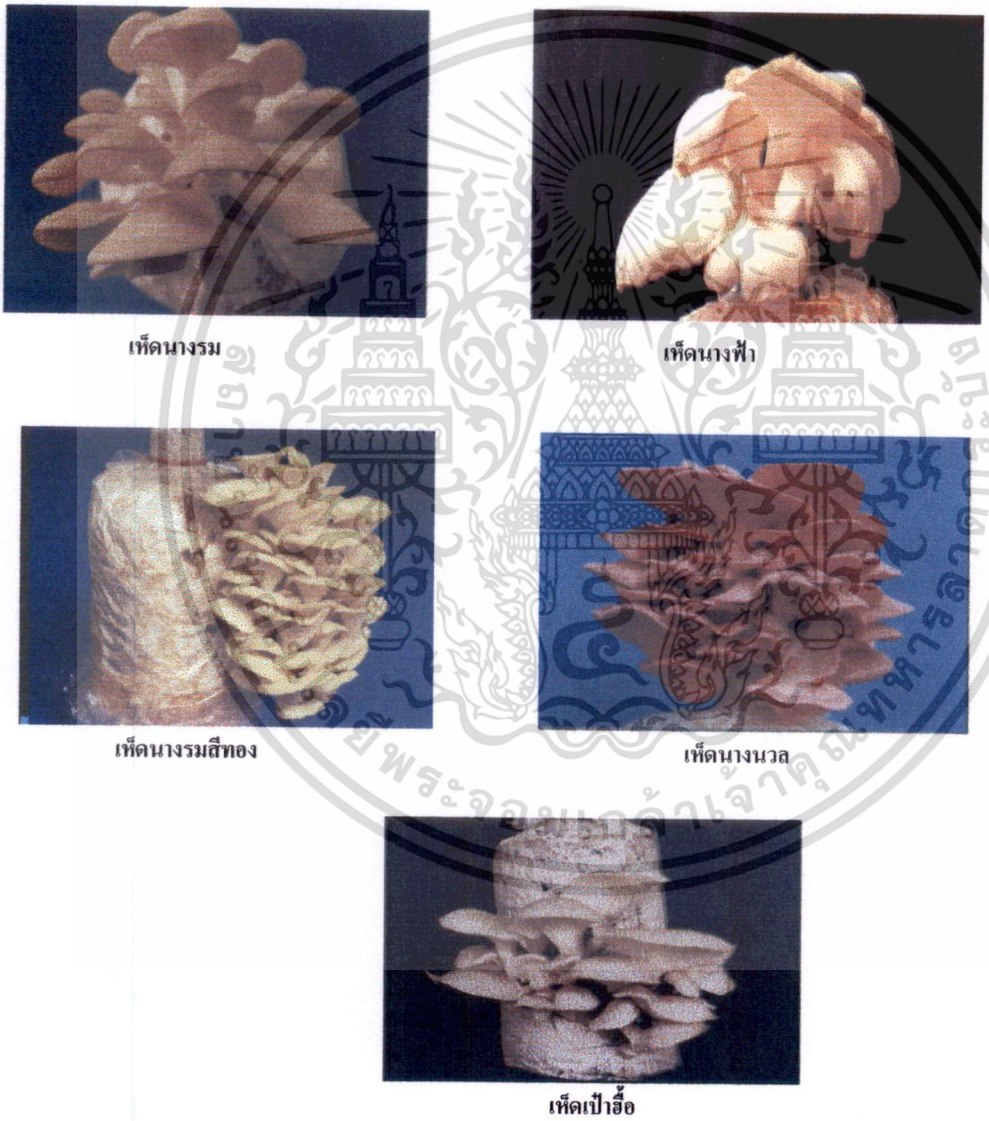
$$\frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เจริญเป็นเส้นใยบนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่นับได้ด้วยวิธี direct count}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด

4.1.1 ลักษณะของเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญอยู่บนก้อนขี้เลื่อย (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ลักษณะของเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญบนก้อนขี้เลื่อย

จากรูปที่ 4.1 จะเห็นว่าลักษณะโดยทั่วไป (ที่คล้ายกัน) ของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม-สีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ มีดังต่อไปนี้คือ ดอกเห็ดขึ้นเป็นกลุ่ม หมวกเห็ด (cap หรือ pileus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีรูปร่างคล้ายพัดหรือเปลือกหอย ยกเว้นเห็ดนางรมสีทองที่มีรูปร่างคล้ายปากแตร ผิวของดอกเห็ดมีลักษณะเรียบ ข้างใต้ดอกเห็ดมีครีบ (gills หรือ lamellae) ที่มีสีเดียวกับดอกเห็ดและเรียงตัวเป็นระเบียบติดกับก้านดอก (stalk หรือ stip) และขยายลงทางด้านล่างของก้านซึ่งเรียกว่าการเรียงตัวแบบ decurrent ก้านดอกมีขนาดสั้นและสีเดียวกับดอกเห็ด เนื้อเห็ด (texture) มีลักษณะสดและอ่อนนุ่ม สปอร์ (basidiospores) มีรูปร่างยาวรี สีใส และผิวเรียบ (รูปที่ 4.2)

รูปที่ 4.2 รูปร่างของสปอร์ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* (รูปวาดจากสปอร์ของเห็ดนางฟ้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์)

4.1.2 ลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ

จากการศึกษารายละเอียดของลักษณะภายนอกและภายในรวมทั้งการสังเกตลักษณะการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อของเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้ พบว่าเห็ดเหล่านี้มีความแตกต่างกันเล็กน้อยในด้านของสีและขนาดของส่วนต่างๆ ของดอกเห็ด สปอร์ และเส้นใย รวมทั้งพบว่ามีการสร้างสปอร์อเพศ (asexual spore) ที่มีชื่อว่า oidia (เอกพจน์เรียก oidium) ในอาหารเลี้ยงเชื้อในเห็ดเป๋าฮื้อ แต่ไม่พบในเห็ดอื่นๆ อีก 4 ชนิด (ตารางที่ 4.1)

4.2 การศึกษาหาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus*

จากการทดลองเพื่อหาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว ซึ่งได้แก่ ชนิดของอาหาร อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม และพีเอชของอาหาร ได้ผลการทดลองดังนี้

4.2.1 การศึกษาหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

ในการทดลองนี้ได้ทำการทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิดที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวบนอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ WA, PDA และ MEA ที่พีเอช 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน และทำการวัดการเจริญของเส้นใย โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและระดับความหนาแน่นของเส้นใย ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.3

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ขออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะที่แตกต่างกันของเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่ทำการศึกษาซึ่งได้แก่ เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ

ชนิดของเห็ด	หมวกเห็ด		ความยาวของก้านดอกเฉลี่ย (ซม.)	สีของสปอร์พิมพ์	ขนาดสปอร์เฉลี่ย (ไมครอน)	ขนาดเส้นใยเฉลี่ย (ซม.)	การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (oidia) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
	ขนาดเฉลี่ย (ซม.)	สี					
นางรม	4.93 x 5.68	สีขาวปนน้ำตาล	6.00 ± 0.56	สีครีม	3.90 x 7.92	2.43± 0.69	ไม่พบ
นางฟ้า	9.40 x 15.83	สีเทาปนน้ำตาลอ่อน	3.25 ± 0.48	สีครีม	3.78 x 8.65	1.67 ± 0.52	ไม่พบ
นางรมสีทอง	3.34 x 3.72	สีเหลืองอ่อนหรือเหลืองทอง	2.65 ± 0.34	สีเทา	2.36 x 7.64	2.38 ± 0.47	ไม่พบ
นางนวล	3.75 x 4.91	สีชมพู	1.24 ± 0.49	สีชมพู	2.67 x 6.28	1.62 ± 0.51	ไม่พบ
เป๋าฮื้อ	5.16 x 8.03	สีน้ำตาลปนเทา	2.87 ± 0.31	สีน้ำตาลอ่อน	4.19 x 12.08	2.85 ± 0.79	พบ

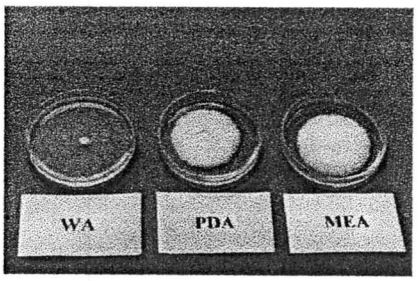
ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิด ในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อใช้อาหาร WA, PDA และ MEA ที่พีเอช 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน

ชนิดของเห็ด	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารชนิดต่างๆ (ซม.)			ระดับความหนาแน่นของเส้นใย		
	WA	PDA	MEA	WA	PDA	MEA
นางรม	5.15a	5.45a	5.97a	+	++	+++
นางฟ้า	7.30a	7.50a	7.50a	+	++	+++
นางรมสีทอง	6.13a	5.98a	5.50a	+	++	+++
นางนวล	3.58a	3.45a	4.33a	+	++	+++
เป๋าฮื้อ	1.84c	2.54b	2.73a	+	++	+++

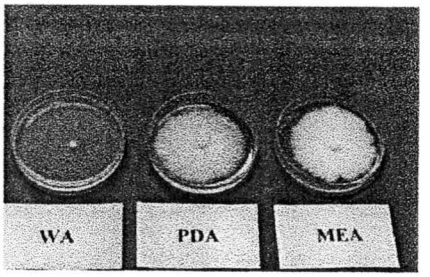
หมายเหตุ + หมายถึง เส้นใยมีความหนาแน่นน้อย
++ หมายถึง เส้นใยมีความหนาแน่นปานกลาง
+++ หมายถึง เส้นใยมีความหนาแน่นมาก

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.2 รูปที่ 4.3 และภาคผนวก ข) จะเห็นว่าความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเห็ด 4 ใน 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง และเห็ดนางนวลบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จากการศึกษาระดับความหนาแน่นของเส้นใย จะเห็นว่าเส้นใยเห็ดทุกชนิดเจริญได้หนาแน่นที่สุดบนอาหาร MEA สำหรับเห็ดเป๋าฮื้อพบว่าการเจริญเติบโตของเส้นใยในอาหาร 3 ชนิดนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 โดยบนอาหาร MEA มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีมากที่สุด และจากการศึกษาระดับความหนาแน่นของเส้นใย ก็พบว่าบนอาหาร MEA เส้นใยมีการเจริญหนาแน่นที่สุดเช่นเดียวกับเห็ดอื่นๆ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอาหาร MEA เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองพบว่าเห็ดเป๋าฮื้อเจริญได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับเห็ดอื่นๆ

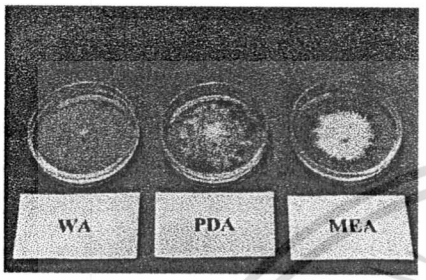
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



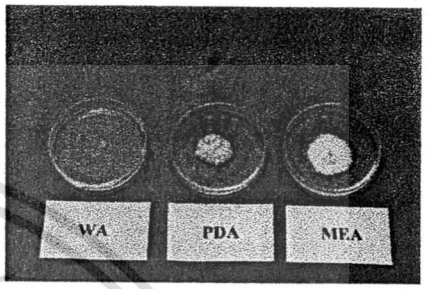
เห็ดนางรม



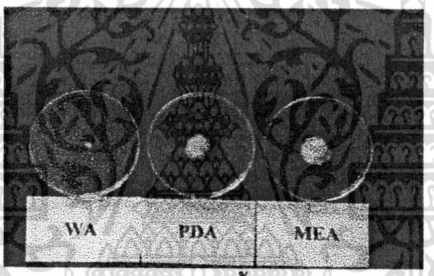
เห็ดนางฟ้า



เห็ดนางรมสีทอง



เห็ดนางนวล



เห็ดเป๋าฮื้อ

รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวบนอาหารเลี่ยงเชื้อ WA, PDA และ MEA ที่พีเอช 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 9 วัน

4.2.2 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิดที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวบนอาหาร MEA พีเอช 5.0 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน ทำการวัดการเจริญของเส้นใยโดยวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี และได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.3 และภาคผนวก ข) พบว่าโคโลนีของเส้นใยเห็ดนางรมมีเส้นผ่าศูนย์กลางสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 °ซ และแตกต่างจากที่อุณหภูมิอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
44507

ตารางที่ 4.4 ผลการศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่พีเอชต่างๆ กัน และบ่มที่อุณหภูมิ 30 หรือ 25 °ซ เป็นเวลา 9 วัน

ชนิดของเห็ด	อุณหภูมิที่ใช้บ่ม (°ซ)	เส้นผ่าศูนย์โคโลนีที่พีเอชต่างๆ (ซม.)					
		4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
นางรม	30	5.00b	5.80ab	5.98a	6.18a	6.58a	6.45a
นางฟ้า	30	5.20b	6.48a	6.63a	7.10a	6.70a	6.65a
นางรมสีทอง	25	3.15e	4.57d	5.15c	5.43bc	5.53b	5.98a
นางนวล	25	3.30c	3.50c	3.58ab	4.23ab	4.38a	4.88a
เป๋าฮื้อ	25	2.80c	2.95c	3.25bc	3.55ab	3.73ab	3.93a

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.4 และภาคผนวก ข) พบว่าพีเอชของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล*Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว โดยการวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดชนิดต่างๆ มีดังต่อไปนี้

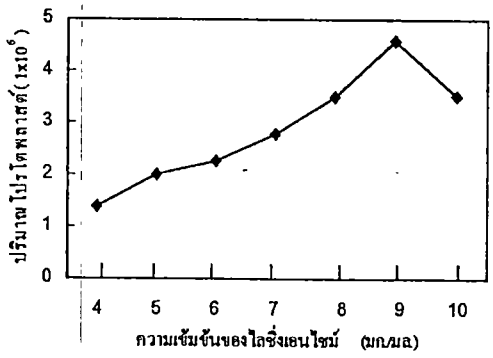
เห็ดนางรมมีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีสูงสุดที่พีเอช 6.5 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับที่พีเอช 5.0, 5.5, 6.0 และ 7.0 เห็ดนางฟ้ามีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีสูงสุดที่พีเอช 6.0 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับที่พีเอช 5.0, 5.5, 6.5 และ 7.0 เห็ดนางรมสีทองมีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีสูงสุดที่พีเอช 7.0 ซึ่งมีความแตกต่างจากที่พีเอชอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เห็ดนางนวลมีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีสูงสุดที่พีเอช 7.0 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับที่พีเอช 5.5, 6.0 และ 6.5 และเห็ดเป๋าฮื้อมีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีสูงสุดที่พีเอช 7.0 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับที่พีเอช 6.0 และ 6.5

ดังนั้นสรุปได้ว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ คือ 5.0-7.0, 5.0-7.0, 7.0, 5.5-7.0 และ 6.0-7.0 ตามลำดับ

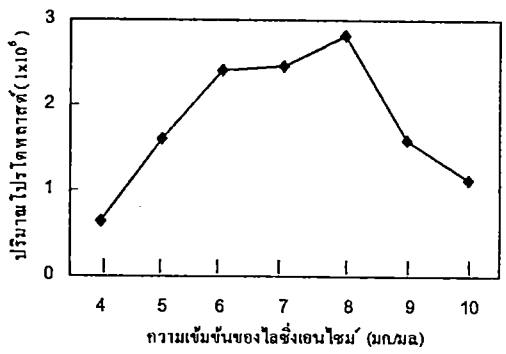
4.3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์

การทดลองนี้ได้ทำการทดลองภายหลังจากได้ศึกษาหาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดแต่ละชนิดแล้ว (การทดลองที่ 4.2) การวิจัยทำโดยนำเส้นใยเห็ดมาเลี้ยงในอาหาร MEB ที่พีเอช 6.5, 6.0, 7.0, 7.0 และ 7.0 สำหรับเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล

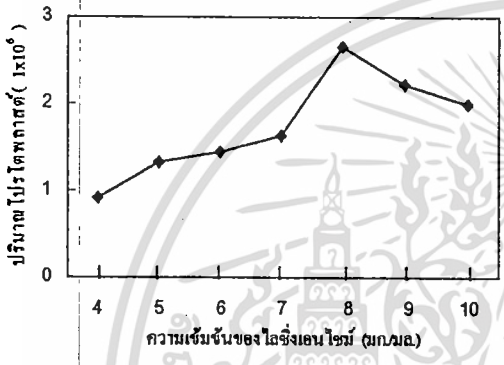
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



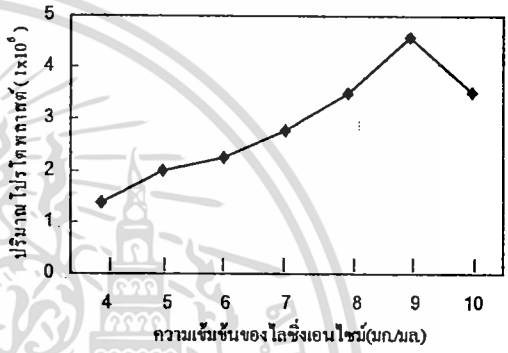
เห็ดนางรม



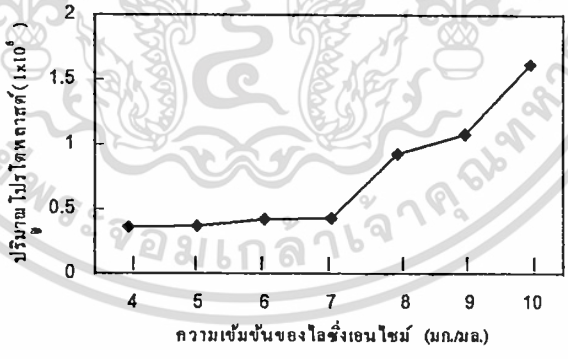
เห็ดนางฟ้า



เห็ดนางรมฮีทอง



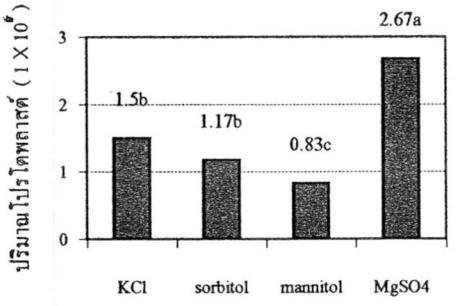
เห็ดนางนวล



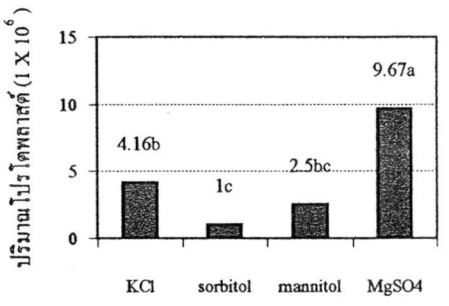
เห็ดเป๋าฮื้อ

รูปที่ 4.4 ปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

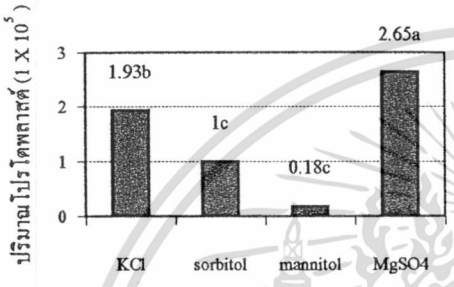
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



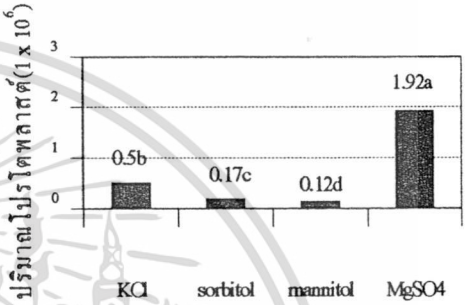
เห็ดนางรม



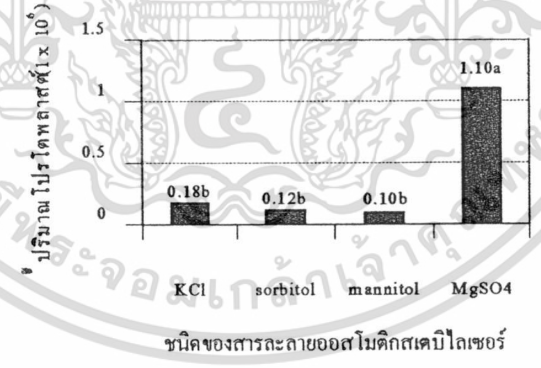
เห็ดนางฟ้า



เห็ดนางรมสีทอง



เห็ดนางนวล



เห็ดเป๋าฮื้อ

รูปที่ 4.5 ปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่มีชนิดต่างๆ กันของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ (ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์) และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 การศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

จากการทดลองเพื่อศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว โดยนำเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงในอาหาร MEB เป็นเวลา 4 วัน มาบ่มด้วยสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ (ความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ ตามลำดับ) ที่มี $MgSO_4$ ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.6

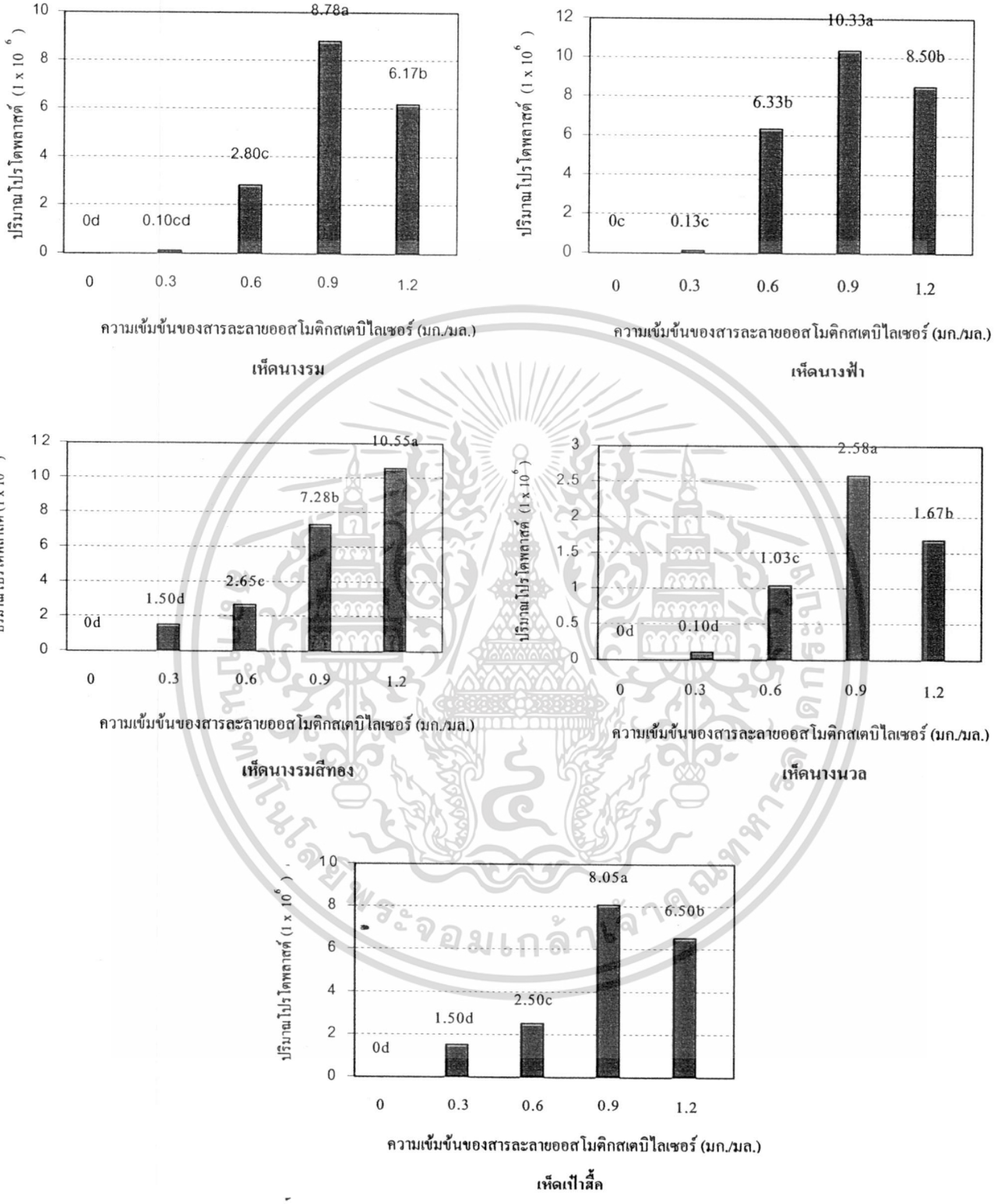
จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.6) เมื่อนำผลการทดลองของเห็ดทั้ง 5 ชนิดมาวิเคราะห์ทางสถิติ (ตารางภาคผนวก ข) โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดและตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT พบว่าความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่แตกต่างกัน มีผลทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ คือ 0.9, 0.9, 1.2, 0.9 และ 0.9 โมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งจะได้ปริมาณโปรโตพลาสต์เท่ากับ 8.78×10^6, 10.33×10^6, 10.55×10^6, 8.05×10^6, $2..58 \times 10^6$ และ 1.67×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมล. ตามลำดับ

จากการศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว พบว่าโปรโตพลาสต์ของเห็ดทั้ง 5 ชนิด ที่ได้มีลักษณะเหมือนกันคือส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม ขนาดเล็กบ้างใหญ่บ้าง โดยขนาดโปรโตพลาสต์โดยเฉลี่ยเท่ากับ 3.54 ± 0.54 ไมครอน (รูปที่ 4.7)

4.4 การศึกษาการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์

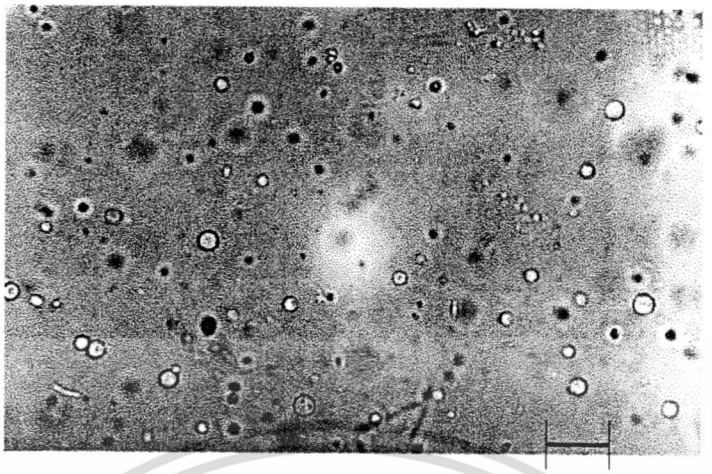
จากการศึกษาความสามารถในการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวโดยนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไปเลี้ยงบนอาหารสำหรับให้โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ สามารถคำนวณความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของเห็ดทั้ง 5 ชนิดได้ดังแสดงในตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่างๆกันของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว (ภาพถ่ายจากโปรโตพลาสต์ที่ได้จากเส้นใยเห็ดนางรม)

ตารางที่ 4.5 แสดงความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ของเห็ด 5 ชนิดในสกุล ***Pleurotus***

ชนิดของเห็ด	ความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์	คิดเป็นร้อยละ
เห็ดนางรม	2/110 = 0.018	1.80
เห็ดนางฟ้า	6/210 = 0.028	2.80
เห็ดนางรมสีทอง	6/300 = 0.020	2.00
เห็ดนางนวล	5/228 = 0.022	2.20
เห็ดเป๋าฮื้อ	3/300 = 0.010	1.00

จากตารางที่ 4.5 จะเห็นว่าความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อเท่ากับร้อยละ 1.80, 2.80, 2.00, 2.20 และ 1.00 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว พบว่าเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA โดยเห็ดนางฟ้าเจริญได้ดีที่สุด ตามด้วยเห็ดนางรม เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อเจริญได้น้อยที่สุด สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้อยู่ในช่วง 20-30°ซ โดยที่ ที่อุณหภูมิ 37°ซ เห็ดทั้ง 5 ชนิดจะไม่สามารถเจริญ และที่อุณหภูมิ 15°ซ จะมีเพียงเห็ดนางนวลเท่านั้นที่เจริญได้ดีส่วนเห็ดอีก 4 ชนิดมีการอัตราการเจริญต่ำ สำหรับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญจะอยู่ในช่วง 5.0-7.0

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ พบว่าไลซิ่งเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรมและเห็ดนางนวลมีความเข้มข้นเท่ากันคือ 9 มก./มล. และของเห็ดนางฟ้าจะเท่ากับของเห็ดนางรมสีทองคือที่ความเข้มข้น 8 มก./มล. และเมื่อใช้ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์สูงกว่านี้จะทำให้ปริมาณของโปรโตพลาสต์ที่ได้ลดลง ส่วนเห็ดเป๋าฮื้อนั้นพบว่าแม้จะใช้ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ 10 มก./มล. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดก็ยังไม่ลดลง ดังนั้นถ้าต้องการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดเป๋าฮื้อให้ได้ปริมาณมากควรใช้ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ไม่ต่ำกว่า 10 มก./มล. สำหรับชนิดของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมของเห็ดทั้ง 5 ชนิด คือ แมกนีเซียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ โดยที่จะมีเพียงเห็ดนางรมสีทองเท่านั้นที่ต้องใช้ความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่สูงกว่าเห็ดชนิดอื่นๆ คือต้องใช้ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ และจากการศึกษาการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ พบว่าความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางฟ้ามีค่าสูงสุด ตามลำดับด้วยเห็ดนางนวล เห็ดนางรมสีทอง และเห็ดนางรม ส่วนเห็ดเป๋าฮื้อมีความถี่ของอัตราการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ต่ำสุด

จากการศึกษาเอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของเห็ดทั้ง 5 ชนิด พบว่าเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้มีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายคลึงกันมาก แต่มีความแตกต่างในรายละเอียดต่างๆเพียงเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ชุลี ชัยศรีสุข. 2536. "การเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของราข้าวแดง (*Monascus* sp. KB6SR) เพื่อใช้เป็นแหล่งโครโมโซมที่คงสภาพ." **ว.วิทยาศาสตร์ ม.ก.** 11(3) : 122-129.

ประภัสสร โชคสวนทรัพย์. 2540. "การผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรรณี ฐิตาภิชิต, งามนิจ นนทโส และสำอาง หอมชื่น. 2537. "การสำรวจและการจำแนกเห็ดจำพวก agarics ในอุทยานแห่งชาติเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์." **ว.วิทยาศาสตร์ ม.ก.** 12(2) : 79-92.

สุมาลี พิชญางกูร. 2541. **เห็ดโคนและลูกผสมฟิวแสนท์.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

Alexopoulos, C. J. and Mims, C. W. 1979. **Introductory Mycology.** John Wiley & Sons. Inc., New York.

Chang, T. S., Li, G. S. F. and Peberdy, F. J. 1985. "Isolation of Protoplasts from Edible Fungi." **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology** 1 : 185-193.

Chang, S. T. and Buswell, J. A. 1996. "Mushroom Nutriceuticals." **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 12 : 473-476.

De varies, O. M. H. and Wessels, J. G. H. 1972. "Release of Protoplasts from *Schizophyllum commune* by Lytic Enzyme Preparation from *Trichoderma viridae*". **J. Gen. Microbiol.** 73:13-22.

Eguchi, F. and Miyato, H. 1995. "Production of New Species of Edible Mushrooms by Protoplast Fusion Method III. Protoplast Fusion and Analysis of the Fusant between *Pleurotus sajor-caju* and *Mycoleptodonoides aitchisonii*." **Mokuzai Gakkaishi** 41(3) : 342-348.

Gascon, S., Ochoa, A. G., and Villaneuva, J. R. 1964. "Production of Yeast and Mold Protoplasts by Treatment with the Strepzyme of *Micromonospora*." **J. Microbiol.** 11 : 573-580.

Gunde-Cimerman, N. 1999. "Medicinal Value of the Genus *Pleurotus* (Fr.) P.Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes)." **International Journal of Medicinal Mushrooms** 1 : 69-80.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Imada, C., Okanishi, M. and Okami, Y. 1999. "Intergenus Protoplast Fusion between *Streptomyces* and *Micromonospora* with Reference to the Distribution of Parental Characteristics in the Fusants." **Journal of Bioscience and Bioengineering** 88(2) : 143-147.

Jong, S. C. and Bermingham, J. M. 1994. "Nutrition Value of the Shittake Mushroom." **Mushroom News** 43 : 30-37.

Magae, Y., Kakimoto, Y., Kashiwagi, Y. and Sasaki, T. 1985. "Fruiting Body Formation from Regenerated Mycelium of *Pleurotus ostreatus* Protoplasts." **Appl.Environ. Microbiol.** 49 (2) : 441-442.

Matsumoto, M., Eguchi, F. and Higaki, M. 1997. "Polyethylene Glycol Centrifugal Fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* ." **Mokuzai Gakkaishi** 43(2) : 215-219.

Okamura, T., Takeno, T., Dohi, M., Yasumasa, I., Hayashi., T., Toyoda, M., Noda, H., Fukuda, S., Horie, N. and Ohsugi, M. 2000. "Development of Mushrooms for Thrombosis Prevention by Protoplast Fusion." **Journal of Bioscience and Bioengineering** 85(5) : 474-478.

Peberdy, J. F., Rox, A. H., Rogers, H. J., and Cocking, E. C. 1976. **Microbial and Plant Protoplasts** Academic Press, London .

Peberdy, J. F. and Ferenczy, L. 1985. **Fungal Protoplast Applications in Biochemistry and Genetics** Basel, New York.

Yanagi, O. S. and Takebe, I. 1984. "An Efficient Method for the Isolation of Mycelial Protoplasts from *Coprinus macrorhizus* and other Basidiomycetes." **Appl. Microbiol Biotechnol.** 19: 58-60.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ water agar (WA)

ส่วนประกอบได้แก่

ผงวุ้น	20 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ปรับค่าพีเอชให้ได้ 5.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)

ใช้อาหาร PDA สำเร็จรูป เตรียมโดยชั่ง PDA 39 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มล. นำไปต้มให้อาหารละลายเข้ากับน้ำจนมีลักษณะใส ปรับค่าพีเอชให้ได้ 5.0 จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar (MEA)

ส่วนประกอบได้แก่

มอลท์สกัด	20 กรัม
กูลโคส	20 กรัม
ผงวุ้น	20 กรัม
เปปโทน	1 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ปรับค่าพีเอชให้ได้ 5.0 บรรจุลงขวดอาหารนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. สารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

4.1 โซเดียมมาลีทบัฟเฟอร์ (โปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์) 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0

เตรียมสารละลาย:

A : สารละลายโซเดียมมาลีท 0.2 โมลาร์ (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ผสมกับกรดมาลิอิก 19.6 กรัม ในน้ำ 1,000 มล.)

B : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มล.)

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 50 มล. เข้ากับสารละลาย B ปริมาตร 9 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 200 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

เตรียมโดย ชั่ง lysing enzyme มาละลายในโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ โดยใช้ $MgSO_4$ 0.6 โมลาร์ เป็น osmotic stabilizer ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองมิลลิพอร์ (millipore filter ของบริษัท Swinnex) และกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

5. การเตรียม osmotic stabilizer

5.1. $MgSO_4$ 0.6 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง $MgSO_4.7H_2O$ 147.84 กรัม ละลายในโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ปริมาตร 1,000 มล.

5.2. KCl 0.6 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง KCl 44.74 กรัม ละลายในโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ปริมาตร 1,000 มล.

5.3. mannitol 0.6 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง mannitol 109.3 กรัม ละลายในโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ปริมาตร 1,000 มล.

5.4. sorbitol 0.6 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง sorbitol 109.3 กรัม ละลายในโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ปริมาตร 1,000 มล.

5.5. sucrose 0.6 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง sucrose 198 กรัม ละลายในโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ปริมาตร 1,000 มล.

6. อาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์

แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

6.1 อาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ ประกอบด้วย

มอลท์สกัด	20 กรัม
กูลโคส	20 กรัม
ผงวุ้น	30 กรัม
เปปโทน	1 กรัม
ซูโครส 0.6 โมลาร์	1 ลิตร

6.2 อาหารที่ใช้เททับผิวหน้า

มอลท์สกัด	20 กรัม
กูลโคส	20 กรัม
ผงวุ้น	5 กรัม
เปปโทน	1 กรัม
ซูโครส 0.6 โมลาร์	1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของตารางที่ 4.2

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	2	1.39	0.69	1.38
Error	9	4.51	0.50	
total	11	5.90		

C.V. = 12.79%

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	2	0.12	0.06	1.20
Error	9	0.52	0.05	
total	11	0.64		

C.V. = 3.02%

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรมสีทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	2	0.86	0.43	2.69
Error	9	1.45	0.16	
total	11	2.31		

C.V. = 6.81%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางนวลที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	2	1.80	0.90	3.46
Error	9	2.38	0.26	
total	11	4.18		

C.V. = 13.49%

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดเป๋าฮื้อที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	2	1.34	0.67	67**
Error	9	0.12	0.01	
Total	11	1.46		

C.V. = 4.22%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	MEA	PDA	WA
ระดับ .05	_____		
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย		_____	
			_____

ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติของตารางที่ 4.3

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	4	176.11	43.78	4378**
Error	15	0.2	0.01	
Total	19	175.31		

C.V. = 12.79%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

อุณหภูมิ	30	25	20	15	37
ระดับ 0.05	———				
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย		———			
			———		
				———	
					———

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	4	237.98	59.50	1983.17**
Error	15	0.40	0.03	
Total	19	238.38		

C.V. = 2.56%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

อุณหภูมิ	30	25	20	15	37
ระดับ 0.05	———————				
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย		———————			
			———		
				———	

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมสีทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	4	90.23	22.56	752**
Error	15	0.52	0.03	
Total	19	90.75		

C.V. = 4.69%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

อุณหภูมิ	25	30	20	15	37
ระดับ 0.05	———				
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย		———			
			———		
				———	
					———

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติของตารางที่ 4.4

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	5	6.42	1.28	3.88*
Error	18	5.99	0.33	
total	23	12.41		

C.V. = 9.57%

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

พีเอช	6.5	7.0	6.0	5.5	5.0	4.5
ระดับ 0.05						
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย						

พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	5	8.48	1.70	18.89**
Error	18	1.64	0.09	
Total	23	10.12		

C.V. = 4.64%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

พีเอช	6.5	7.0	6.0	5.5	5.0	4.5
ระดับ 0.05						
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมสีทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	5	20.10	4.02	80.4**
Error	18	0.81	0.05	
Total	23	20.91		

C.V. = 4.50%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

พีเอช	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0	4.5
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย	———	———	———	———	———	———

พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางนวลที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	5	7.49	1.50	8.82**
Error	18	3.05	0.17	
Total	23	10.54		

C.V. = 10.36%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

พีเอช	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0	4.5
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย	———	———	———	———	———	———

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดเป๋าฮื้อที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	5	3.93	0.79	7.18**
Error	18	2.04	0.11	
Total	23	5.97		

C.V. = 9.84%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

พีเอช	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0	4.5
ระดับ 0.05						
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย						

ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติของรูป 4.4

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	6	2033.00	338.80	170.27**
Error	14	27.87	1.99	
Total	20	2060.87		

C.V. = 4.83%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์	9	10	8	7	6	5	4
ระดับ 0.05							
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย							

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	6	1121.41	186.90	296.67**
Error	14	8.82	0.63	
Total	20	1130.23		

C.V. = 4.40%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์	8	7	6	5	9	10	4
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย	———	———	———	———	———	———	———

ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมสีทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	6	628.53	104.76	168.97**
Error	14	8.69	0.62	
Total	20	637.22		

C.V. = 4.51%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์	8	9	10	7	6	5	4
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย	———	———	———	———	———	———	———

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางนวลที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	6	2202.13	367.02	780.89**
Error	14	6.63	0.47	
total	20	2208.76		

C.V. = 3.89%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์	9	8	10	7	6	5	4
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย	———	———	———	———	———	———	———

ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดเป๋าฮื้อที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	6	421.14	70.19	305.17**
Error	14	3.27	0.23	
Total	20	424041		

C.V. = 6.47%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์	10	9	8	7	6	5	4
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย	———	———	———	———	———	———	———

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.5 การวิเคราะห์ทางสถิติของรูปที่ 4.5

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

ชนิดของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรม ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	3	5.73	1.91	63.67**
Error	8	0.24	0.03	
Total	11	5.97		

C.V. = 11.25%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์	$MgSO_4$	KCl	sorbitol	mannitol
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย	———	———	———	———

ชนิดของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางฟ้า ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	3	128.84	42.95	252.65**
Error	8	1.33	0.17	
Total	11	130.17		

C.V. = 9.52%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์	$MgSO_4$	KCl	mannitol	sorbitol
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย	———	———	———	———

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรม-สีทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	3	1464.84	488.28	456.34**
Error	8	8.58	1.07	
Total	11	1473.42		

C.V. = 8.50%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์	$MgSO_4$	KCl	mannitol	sorbitol
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย	———	———	———	

ชนิดของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางนวลที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	3	642.75	214.25	3570.83**
Error	8	0.50	0.06	
Total	11	643.25		

C.V. = 0.9%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์	$MgSO_4$	KCl	sorbitol	mannitol
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย	———	———	———	———

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	4	8335.4	2083.85	2451.59**
Error	10	8.50	0.85	
total	14	8343.9		

C.V. = 4.25%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์	0.9	1.2	0.6	0.3	0
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย					

ความเข้มข้นของสารออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมสีทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

Source of variation	d.f.	SS	MS	F-cal
Treatment	4	57638.26	14409.57	14127.03**
Error	10	10.17	1.02	
total	14	57648.43		

C.V. = 1.90%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของสารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์	1.2	0.9	0.6	0.3	0
ระดับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้