

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์และการรวมโปรโตพลาสต์
ในเห็ดกินได้บางชนิดของสกุล *Pleurotus*

STUDIES ON FACTORS FOR PROTOPLAST ISOLATION AND
PROTOPLAST FUSION IN SOME EDIBLE SPECIES OF THE
MUSHROOM, GENUS *Pleurotus*



ชนินันท์ พรสุริยา

CHANINUN PORNSURIYA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

๑๗.

๒๕๔๑

๒๕๔๗

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. ๒๕๔๗

ISBN 974-324-987-7

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน... 50954

วัน, เดือน, ปี 26 พ.ค. 2547

b.....
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

๕๑๓๘ ๑๐๖๑

**STUDIES ON FACTORS FOR PROTOPLAST ISOLATION AND
PROTOPLAST FUSION IN SOME EDIBLE SPECIES OF THE
MUSHROOM, GENUS *Pleurotus***



CHANINUN PORNSURIYA

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2004

ISBN 974-324-987-7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2004

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์และ
การรวมโปรโตพลาสต์ในเห็ดกินได้บางชนิดของสกุล
Pleurotus

นักศึกษา

นางสาวชนินันท์ พรสุริยา

รหัสประจำตัว

42065203

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

พ.ศ.

2547

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. พรรณี จิตาภิชิต

บทคัดย่อ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเห็ดในสกุล *Pleurotus* จำนวน 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ มีลักษณะคล้ายกันมากโดยมีความแตกต่างในรายละเอียดด้านต่างๆ เพียงเล็กน้อย และจากการศึกษาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดทั้ง 5 ชนิด พบว่าสภาวะของปัจจัยบางประการที่เหมาะสมสำหรับเห็ดแต่ละชนิดตามลำดับมีดังต่อไปนี้ เส้นใยเห็ดที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ในเห็ดทุกชนิดเป็นเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวหมอลต์สก็ด พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ยกเว้นเห็ดนางฟ้าที่เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 วัน ตามด้วยการบ่มด้วยไลซิงเอนไซม์ (จากบริษัท Sigma ซึ่งมีความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ) โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต (ที่ความเข้มข้น 0.9, 0.9, 1.2, 0.9 และ 0.9 โมลาร์ สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ) ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 เป็นออสโมติกสตาบิไลเซอร์ที่เหมาะสมที่สุด ทั้งนี้ได้ทำการบ่มโดยการเขย่าส่วนผสมที่เหมาะสมของเห็ดแต่ละชนิดที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ในเห็ดแต่ละชนิดมีปริมาณเท่ากับ 8.78×10^6 , 8.52×10^6 , 10.55×10^6 , 8.05×10^6 และ 2.58×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ

สำหรับการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล โดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วยโพลิเอทรีนไกลคอล (PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 6,000) ความเข้มข้นร้อยละ 40 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที พบว่าได้ถูกผสมโดยสังเกตจากการมีแคลมปีคอนเนคชั่นทั้งหมด 5 สายพันธุ์ โดย 3 สายพันธุ์ คือ Fu1, Fu2 และ Fu3 เป็นลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง และอีก 2 สายพันธุ์ คือ Fu4 และ Fu5 เป็นลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล เห็ดลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์มี

ขนาดของเส้นใยและสปอร์ใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อแม่ และเมื่อตรวจสอบรูปแบบไอโซไซม์เอสเทอร์ส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส พบว่าลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 แสดงลักษณะความเป็นลูกผสมเมื่อทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์เอสเทอร์สและมาเลทดีไฮโดรจีเนส ส่วนลูกผสม Fu4 และ Fu5 แสดงลักษณะความเป็นลูกผสมเมื่อทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์เอสเทอร์ส เมื่อนำลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ไปเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย พบว่าเห็ดลูกผสม Fu2 และ Fu3 ไม่เกิดดอก ส่วนเห็ดลูกผสม Fu1, Fu4 และ Fu5 สามารถเพาะให้เกิดดอกได้ โดยเห็ดลูกผสม Fu1 และ Fu5 มีดอกเห็ดที่มีรูปร่างลักษณะทั้งภายนอกและภายในเป็นลักษณะผสมระหว่างเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ ส่วนเห็ดลูกผสม Fu4 มีรูปร่างลักษณะภายนอกเหมือนเห็ดนางรมแต่มีสีของสปอร์พิมพ์เป็นสีผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล



Thesis Title	Studies on Factors for Protoplast Isolation and Protoplast Fusion in Some Edible Species of the Mushroom, Genus <i>Pleurotus</i>
Student	Miss Chaninun Pornsuriya
Student ID.	42065203
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2004
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Pannee Dhitaphichit

ABSTRACT

Morphological studies of five species of the genus *Pleurotus*, namely *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. citrinopileatus*, *P. djamor* and *P. cystidiosus*, were found in having similar characteristics but with some variations among them. On the aspects of protoplast isolations the results were that the suitable conditions of the factors for the five species, respectively, were as follows : the mycelia used for each species were derived from single spore isolations, and were 4 day-old in malt extract broth medium, pH 7.0 incubated at 25°C (*P. sajor-caju* incubated at 30°C). The mycelia of the 5 species were then treated with Lysing Enzyme (Sigma, at the concentrations of 9, 8, 8, 9 and 10 mg/ml, respectively) and with MgSO₄ (at the concentrations of 0.9, 0.9, 1.2, 0.9 and 0.9 molar, respectively) in 0.05 M Na-maleate buffer pH 5.0 as the most suitable osmotic stabilizer. The solutions containing the above most suitable condition of each factor for each species were incubated by shaking at 100 rpm, at room temperature, for 2 hours. The amounts of protoplast obtained in the five species were 8.78×10^6 , 8.52×10^6 , 10.55×10^6 , 8.05×10^6 and 2.58×10^6 protoplasts/ml, respectively.

Protoplast fusions between *P. ostreatus* vs *P. citrinopileatus*, *P. ostreatus* vs *P. djamor* and *P. citrinopileatus* vs *P. djamor* were done by using 40% polyethylene glycol (PEG; MW 6,000) and incubated at room temperature for 20 minutes. Five fusants because of having clamp connections were isolated, among these three of them (Fu1, Fu2 and Fu3) were fusants of *P. ostreatus* vs *P. citrinopileatus*, while the other two, Fu4 and Fu5 were fusants of *P. ostreatus* vs *P. djamor*. All fusants had bigger mycelia and spores than those of their parents. When isozyme patterns of esterase, maleate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase were studied, it was

found that Fu1, Fu2 and Fu3 showed hybridization when esterase and maleate dehydrogenase were used, while Fu4 and Fu5 did so when only esterase was used. For fruitbodies production in sawdust plastic bags, Fu2 and Fu3 did not fruit. The characteristics of the fruitbodies of Fu1 and Fu5 were mixture (both macro- and microcharacteristics) of their parental strains while Fu4 looked morphologically similar to *P. ostreatus* but the color of its spore-print was in between those of *P. ostreatus* and *P. djamor*.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ดี ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาในทุกด้าน รวมทั้งการเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ที่ถูกต้องจาก รศ. ดร. พรรณี จิตาภิชาติ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยรู้สึกทราบบ้างในความกรุณาของท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์อัญชลี เชิงกุล รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ และ ผศ. อารีฤทธิ์บุรณ์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง รวมทั้งให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาทุกคนที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณทุกๆ ท่าน ที่ไม่ได้เอ่ยนาม ที่มีส่วนช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ของผู้เขียนที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ชนินันท์ พรสุริยา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญภาพ.....	XII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ.....	4
2.1.1 การจัดจำแนก.....	4
2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	5
2.1.3 วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์.....	5
2.2 การปรับปรุงพันธุ์เห็ด.....	7
2.2.1 วิธีการคัดเลือกพันธุ์.....	7
2.2.2 วิธีการผสมพันธุ์.....	7
2.2.3 วิธีการทำให้เกิดสายพันธุ์กลาย.....	7
2.2.4 วิธีการรวมโครโมโซม.....	8
2.3 โพรโตพลาสต์.....	8
2.3.1 คำจำกัดความของโพรโตพลาสต์.....	8
2.3.2 คุณสมบัติของโพรโตพลาสต์.....	9
2.3.3 ประโยชน์ของโพรโตพลาสต์.....	9
2.4 ขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์.....	10

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 การแยกโพรโตพลาสต์	10
2.5.1 วิธีการแยกโพรโตพลาสต์	10
2.5.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโพรโตพลาสต์	10
2.5.3 การแยกโพรโตพลาสต์จากเห็ดรา	12
2.5.4 ปฏิกิริยาที่มีผลต่อการแยกโพรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ ย่อยสลายผนังเซลล์	13
2.6 การรวมโพรโตพลาสต์	16
2.6.1 รูปแบบการรวมโพรโตพลาสต์	16
2.6.2 ความสัมพันธ์ระหว่างการรวมโพรโตพลาสต์กับ parasexual cycle	18
2.6.3 วิธีการรวมโพรโตพลาสต์	19
2.7 การสร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ของโพรโตพลาสต์	21
2.8 การคัดเลือกลูกผสมและการพิสูจน์ความเป็นลูกผสม	22
2.8.1 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นสายพันธุ์กลาย	22
2.8.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	24
2.8.3 การตรวจสอบการสร้างเคลมปีคอนเนคชัน	24
2.9 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์	24
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรวมโพรโตพลาสต์	25
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการดำเนินงานวิจัย	28
3.1 ชนิดของเห็ดที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	28
3.2 อุปกรณ์ในการดำเนินงาน	28
3.3 สารเคมี	29
3.3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	29
3.3.2 สารเคมีสำหรับแยกโพรโตพลาสต์	30
3.3.3 สารเคมีสำหรับรวมโพรโตพลาสต์	30
3.3.4 สารเคมีสำหรับการศึกษาไอโซไซม์	30
3.4 วิธีการวิจัย	31
3.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.1.1 การเตรียมเส้นใยเห็ด.....	31
3.4.1.2 การวัดขนาดของเส้นใยเห็ด.....	31
3.4.1.3 การเพาะเห็ดเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	31
3.4.1.4 การทำสปอร์พิมพ์.....	32
3.4.2 การเตรียมเส้นใยเห็ดที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว.....	32
3.4.3 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว.....	32
3.4.3.1 การศึกษาหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	33
3.4.3.2 การศึกษาหาพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	33
3.4.3.3 การศึกษาหาอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ.....	33
3.4.4 การศึกษาหาสภาวะบางประการที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ จากเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว.....	33
3.4.4.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์.....	33
3.4.4.2 ชนิดของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์.....	34
3.4.4.3 ความเข้มข้นของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์.....	34
3.4.5 การศึกษาลักษณะและการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์.....	34
3.4.6 การรวมโปรโตพลาสต์.....	35
3.4.7 การคัดเลือกลูกผสม.....	36
3.4.8 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่.....	36
3.4.8.1 การเจริญของเส้นใยและขนาดของเส้นใย.....	36
3.4.8.2 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเส้นใยเห็ดลูกผสม.....	36
3.4.8.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสม.....	37
3.4.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	37
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	38
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	38
4.2 ผลการแยกสปอร์เดี่ยว.....	38

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 ผลการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว.....	46
4.3.1 ผลการศึกษาหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	46
4.3.2 ผลการศึกษาหาพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	46
4.3.3 ผลการศึกษาหาอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเชื้อ	48
4.4 การศึกษาหาสภาวะของปัจจัยบางประการที่เหมาะสมสำหรับการแยก โพรโตพลาสต์จากเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว	50
4.4.1 ความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์.....	50
4.4.2 ชนิดของออสโมติกสเทบิลไลเซอร์.....	51
4.4.3 ความเข้มข้นของออสโมติกสเทบิลไลเซอร์.....	52
4.5 การศึกษาลักษณะและการสร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ของโพรโตพลาสต์.....	54
4.6 การรวมโพรโตพลาสต์.....	57
4.7 การคัดเลือกลูกผสม	57
4.8 การศึกษาลักษณะของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่.....	59
4.8.1 การศึกษายานาของเส้นใย.....	59
4.8.2 การศึกษารูปแบบไฮโซไซม์.....	60
4.8.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสม.....	60
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	72
บรรณานุกรม.....	76
ภาคผนวก ก วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีที่ใช้ในการแยกและรวมโพรโตพลาสต์.....	83
ภาคผนวก ข วิธีเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษารูปแบบไฮโซไซม์.....	86
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	89
ภาคผนวก ง การศึกษาความเสถียรของเห็ดลูกผสม	115
ประวัติผู้เขียน	122

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อเห็ดรากลุ่มต่างๆ	12
2.2 ตัวอย่างสภาวะของปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ด.....	15
2.3 ชื่อเห็ดที่มีรายงานการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของคู่เชื้อชนิดเดียวกัน แต่ต่างสายพันธุ์กัน	17
2.4 ชื่อเห็ดที่มีรายงานการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของคู่เชื้อในสกุลเดียวกัน แต่ต่างชนิดกัน.....	17
2.5 ชื่อเห็ดที่มีรายงานการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของคู่เชื้อต่างสกุลกัน	17
4.1 ลักษณะที่แตกต่างกันของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ	44
4.2 แถบของเอนไซม์เอสเทอร์ส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ที่มีอยู่ในเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง	62
4.3 แถบของเอนไซม์เอสเทอร์ส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ที่มีอยู่ในเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางนวล.....	64
4.4 การเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ เมื่อเลี้ยงบนอาหารมอลต์สกัดอาการ์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	66
4.5 รายละเอียดของลักษณะทางวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่.....	67
4.6 รายละเอียดของลักษณะทางวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่.....	69
ข.1 อัตราส่วนที่ใช้ในการเตรียมเจล	87
ค.1 ผลการศึกษาหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล <i>Pleurotus</i> ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ดบน อาหารวอเตอร์อาการ์ อาหารพีดีเอ อาหารมอลต์สกัดอาการ์ พีเอช 6.0 และบ่มที่อุณหภูมิ ห้อง เป็นเวลา 9 วัน	92
ค.2 ผลการศึกษาหาพีเอชของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล <i>Pleurotus</i> ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ดบน อาหารมอลต์สกัดอาการ์ ที่พีเอชต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน	96

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ค.3 ผลการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล <i>Pleurotus</i> ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารมอลต์สกัดอาการ์ ที่พีเอช 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 9 วัน	99
ค.4 ผลของความเข้มข้นของสารละลายไคซิงเอนไซม์ (4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มก./มล.) ที่มีต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด (อายุ 4 วัน) 5 ชนิดในสกุล <i>Pleurotus</i> เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์ ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0.....	103
ค.5 ผลของชนิดของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ (โพแทสเซียมคลอไรด์ โซรบิทอล แมนนิทอล และแมกนีเซียมซัลเฟต ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) ที่มีต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล <i>Pleurotus</i> เมื่อบ่มและเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ไคซิงเอนไซม์ ที่มีความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ	106
ค.6 ผลของความเข้มข้นของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ที่เหมาะสม (แมกนีเซียมซัลเฟตในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) ที่มีต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล <i>Pleurotus</i> เมื่อบ่มและเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ไคซิงเอนไซม์ ที่มีความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ	110
ค.7 ผลการวัดขนาดของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่.....	111
ค.8 ผลการวัดขนาดของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ .	112
ค.9 ผลการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่	113
ค.10 ผลการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่	114

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 วงจรชีวิตของเห็ดใน Class Basidiomycetes	6
2.2 การสร้างแคลมปีคอนเนคชันของเห็ดใน Class Basidiomycetes.....	7
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดนางรม	39
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดนางฟ้า	40
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดนางรมทอง	41
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดนางนวล.....	42
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดเป๋าฮื้อ	43
4.6 สปอร์พิมพ์ของเห็ดทั้ง 5 ชนิดในสกุล <i>Pleurotus</i>	45
4.7 การสร้างสปอร์แบบไม้อาศัยเพศในอาหารเลี้ยงเชื้อของเห็ดเป๋าฮื้อ	45
4.8 ผลการศึกษาหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิด ในสกุล <i>Pleurotus</i> ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงบนอาหารวอเตอร์อาร์การ์ อาหารพีดีเอ และอาหารมอลต์สก็ดอาร์การ์ พีเอช 6.0 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน.....	47
4.9 ผลการศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิด ในสกุล <i>Pleurotus</i> ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงบนอาหารมอลต์สก็ดอาร์การ์ ที่พีเอชต่างๆ กัน และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน.....	48
4.10 ผลการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิด ในสกุล <i>Pleurotus</i> ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงบนอาหารมอลต์สก็ดอาร์การ์ พีเอช 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กัน เป็นเวลา 9 วัน.....	49
4.11 ปริมาณโพโรโดพลาสติก (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิด เมื่อบ่มใน สารละลายไลซิงเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มก./มล. โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์ (ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) เป็นออสโมติกสเตรบิลไอเซอร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง.....	51
4.12 ปริมาณโพโรโดพลาสติก (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิด เมื่อบ่มในสารละลาย ไลซิงเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ โดยมีออสโมติกสเตรบิลไอเซอร์ (ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์) ชนิดต่างๆ และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

4.13 ปริมาณโพโรโดพลาสต์ (ต่อมถ.) ของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิด เมื่อบ่มในสารละลาย ไลซิงเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....	54
4.14 ลักษณะโพโรโดพลาสต์ที่แยกได้ (กำลังขยาย 400 เท่า) โดยการบ่มเส้นใยเห็ดด้วย สารละลายไลซิงเอนไซม์ (ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเห็ดแต่ละชนิด) ซึ่งมีแมกนีเซียมซัลเฟต (ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเห็ดแต่ละชนิด) ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์) พีเอช 5.0 เป็นออสโมติกสเตรปีไลเซอร์	56
4.15 โพโรโดพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่และเจริญเป็นเส้นใยบนอาหารสำหรับการ สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพโรโดพลาสต์.....	58
4.16 รูปแบบของลูกผสมที่อาจเกิดขึ้นได้จากการรวมโพโรโดพลาสต์	59
4.17 รูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่และแม่	61
4.18 รูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่และแม่	63
4.19 ลักษณะโคโลนีของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ โดยเลี้ยงบนอาหาร มอลต์สเก็คตาการ์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	65
4.20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu1.....	68
4.21 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu4.....	70
4.22 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu5.....	71
ง.1 ลักษณะโคโลนีของเห็ดลูกผสม Fu1 ที่เลี้ยงบนอาหารมอลต์สเก็ค พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 7 วัน	116
ง.2 ลักษณะโคโลนีของเห็ดลูกผสม Fu2 ที่เลี้ยงบนอาหารมอลต์สเก็ค พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 7 วัน	116
ง.3 ลักษณะโคโลนีของเห็ดลูกผสม Fu3 ที่เลี้ยงบนอาหารมอลต์สเก็ค พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 7 วัน	117
ง.4 ลักษณะโคโลนีของเห็ดลูกผสม Fu4 ที่เลี้ยงบนอาหารมอลต์สเก็ค พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 7 วัน	117
ง.5 ลักษณะโคโลนีของเห็ดลูกผสม Fu5 ที่เลี้ยงบนอาหารมอลต์สเก็ค พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 7 วัน	118

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ง.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสม Fu1 หลังจากทำการถ่ายเชื้อแล้วนำมาเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย	119
ง.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสม Fu4 หลังจากทำการถ่ายเชื้อแล้วนำมาเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย	120
ง.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสม Fu5 หลังจากทำการถ่ายเชื้อแล้วนำมาเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย	121



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

เห็ดในสกุล *Pleurotus* หลายชนิดเป็นเห็ดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น เห็ดนางรม (*P. ostreatus*) เห็ดเป๋าฮื้อ (*P. cystidiosus*) เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) และเห็ดนางรมหลวง (*P. eryngii*) เป็นต้น โดยในประเทศไทยมีการเพาะเห็ดสกุลนี้เพื่อการค้าเป็นอันดับสองรองจากเห็ดฟาง ทั้งนี้เนื่องจากเห็ดในสกุลนี้เป็นเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้ง่ายเพราะสามารถย่อยสลายลิกนินและเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบของเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม เช่น กระจาด ขี้เลื่อย กากเมล็ดกาแฟ ฟางข้าว ช้างข้าวโพด เปลือกเมล็ดฝ้าย และขานอ้อย เป็นต้น (Rajaratnam and Bano. 1991) นอกจากนี้เห็ดในสกุลนี้ยังออกดอกได้ตลอดปีและมีคุณค่าทางอาหารสูง โดยมีโปรตีนประมาณร้อยละ 10-30 ของน้ำหนักแห้ง และยังอุดมไปด้วยวิตามินต่างๆ เช่น โทอามิน ไบโอฟลาวิน ไนอะซิน ไบโอติน และกรดแอสคอร์บิก รวมทั้งมีไขมันและแคลอรีต่ำแต่มีเกลือแร่ เช่น ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมในปริมาณที่สูง และยังมีสรรพคุณทางยา โดยสามารถผลิตสารซึ่งมีสรรพคุณทางยา ได้แก่ สารปฏิชีวนะ สารต่อต้านไวรัส มะเร็ง และการอักเสบ รวมทั้งสารลดความดันในเลือด (Gunde-Cimerman. 1999; Kues and Liu. 2000) จากคุณสมบัติข้างต้นทำให้เห็ดในสกุลนี้เป็นที่สนใจในการนำมาปรับปรุงสายพันธุ์

การรวมโพรโตพลาสต์เป็นเทคนิคอย่างหนึ่งที่นำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดเพื่อให้ได้เห็ดที่มีคุณสมบัติตามความต้องการ และเป็นการสร้างลูกผสม (fusant) สายพันธุ์ใหม่ที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นชุดจากเดิมที่เป็นโมโนพลอยด์ (monoploid) ให้เป็นดิพลอยด์ (diploid) หรือโพลีพลอยด์ (polyploid) ซึ่งอาจทำให้ได้ดอกเห็ดที่ใหญ่และแข็งแรงขึ้น (Peberdy *et al.* 1976) การรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดสามารถทำได้ทั้งระหว่างเห็ดต่างสายพันธุ์ (intraspecific protoplast fusion) เห็ดต่างชนิด (interspecific protoplast fusion) และเห็ดต่างสกุล (intergeneric protoplast fusion) แต่การรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดต่างสกุลนั้นจะเกิดขึ้นได้ยากกว่าการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์ เนื่องจากความสำเร็จในการรวมโพรโตพลาสต์น่าจะเกิดขึ้นได้ยากกว่าตามความใกล้ชิดมากน้อยทางพันธุกรรมของคู่เชื้อ (Anne and Peberdy, 1976)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงเทคนิคในการเตรียมโพรโตพลาสต์เพื่อให้ได้โพรโตพลาสต์จำนวนมาก ตลอดจนนำเทคนิคการรวมโพรโตพลาสต์มาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus* โดยทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล ซึ่งเห็ดนางนวลและเห็ดนางรมทองเป็นเห็ดที่มีสีสวยงาม โดยมีสีเหลืองทองและสีชมพู ตามลำดับ แต่เห็ดทั้งสองชนิดนี้ไม่เป็นที่นิยมเพาะเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การดำเนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ยาก การนำเห็ดสองชนิดนี้มาผสมพันธุ์กับเห็ดนางรมซึ่งเป็นเห็ดที่มีสีขาวนวล เพาะเลี้ยงได้ง่ายและให้ผลผลิตสูง โดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์อาจทำให้ได้ลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะรวมระหว่างเห็ดทั้งสองชนิดคือ ได้ดอกเห็ดที่มีลักษณะดอกใหญ่ เพาะเลี้ยงได้ง่าย ให้ผลผลิตสูง และมีสีสวยงาม เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเลือกรับประทานเห็ดในสกุล *Pleurotus*

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus*
- 1.2.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดกินได้จำนวน 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus*
- 1.2.3 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดกินได้จำนวน 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus*
- 1.2.4 ศึกษาวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล และคัดเลือกลูกผสม
- 1.2.5 พิสูจน์ความเป็นลูกผสมโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบไอโซไซม์

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งลักษณะภายนอกและภายใน (macroscopic and microscopic characteristics) หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว และหาสภาวะของปัจจัยบางประการที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* 5 ชนิด คือ เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ทำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล ตลอดจนทำการคัดเลือกลูกผสมที่ได้หลังจากการรวมโปรโตพลาสต์ รวมทั้งศึกษาลักษณะลูกผสมโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบไอโซไซม์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทำให้ทราบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus*
- 1.4.2 ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว
- 1.4.3 ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.4 สามารถสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* โดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์

1.4.5 สามารถนำวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ไปประยุกต์ใช้กับเห็ดชนิดอื่นๆ เพื่อสร้างลูกผสมสายพันธุ์ใหม่



บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ

2.1.1 การจัดจำแนก

เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ เป็นเห็ดที่อยู่ในสกุล (genus) เดียวกันแต่ต่างชนิด (species) กัน ซึ่งสามารถจัดจำแนก (classification) ได้ดังนี้ (Alexopoulos and Mim. 1979)

Kingdom : Myceteae (Fungi)

Division : Amastigomycota

Subdivision : Basidiomycotina

Class : Basidiomycetes

Subclass : Holobasidiomycetidae II

Order : Agaricales

Family : Tricholomataceae

Genus : *Pleurotus*

ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อสามัญของเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้มีดังต่อไปนี้ (Stamets. 2000)

เห็ดนางรม (the oyster mushroom) : *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer

เห็ดนางฟ้า (the phoenix mushroom) : *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer

เห็ดนางรมทอง (the golden oyster mushroom) : *Pleurotus citrinopileatus* Singer

เห็ดนางนวล (the pink oyster mushroom) : *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedjin

เห็ดเป๋าฮื้อ (the abalone mushroom) : *Pleurotus cystidiosus* Miller

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการจัดจำแนกเห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวล ในชื่ออื่นอีก ดังต่อไปนี้

P. pulmonarius (Fr.) Quel = *P. sajor-caju* (Fr.) Singer = เห็ดนางฟ้า (Stamets. 1993)

P. cornucopiae var. *citrinopileatus* (Sing.) Ohira = *P. citrinopileatus* Singer = เห็ดนางรมทอง (Hilber. 1982 ; Ohira. 1990)

P. flabellatus (Berk.& Br.) Saccardo = *P. djamor* (Fr.) Boedjin = *P. salmoneo-stramineus* Vasil. = เห็ดนางนวล (Corner. 1981; Stamets. 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

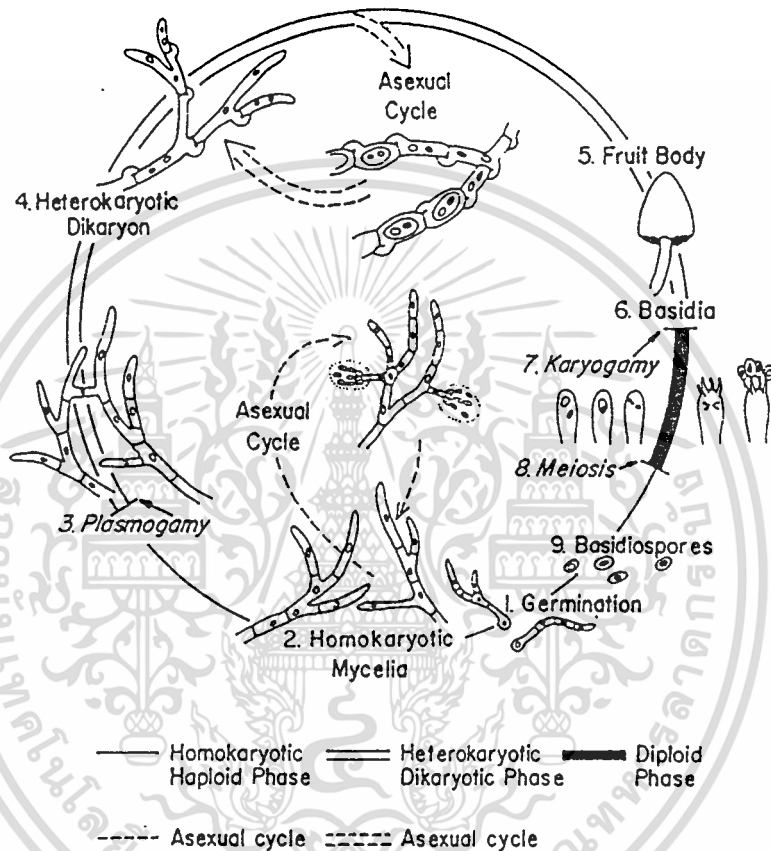
เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมวล และเห็ดเป่าซื่อ เป็นเห็ดในสกุล *Pleurotus* ซึ่งเห็ดในสกุลนี้จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันคือ ดอกเห็ดเกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม รูปทรงของดอกคล้ายพัด (flabellate) หรือเปลือกหอย (dimidiate) ดอกเจริญขึ้นติดกับวัสดุโดยมีก้านดอก (stalk, stipe) อวบสั้นอยู่บริเวณตรงกลางหรือด้านข้างของหมวกดอก (cap, pileus) ผิวด้านบนของหมวกดอกอาจพบเม็ดสี (pigment) ครีบดอก (gill, lamellae) เจริญลำแนวตาลงมาบนก้าน (decurrent) เนื้อเยื่อของดอกเห็ด (context) มีความสดและอ่อนนุ่ม เส้นใยมีสีใส (hyaline) และมีผนังกัน (septate) แบบ dolipore แบ่งเส้นใยเป็นช่องๆ และมีแคลมป์คอนเนกชัน (clamp connection) ดอกเห็ดมีการสร้างสปอร์ที่บริเวณด้านข้างของครีบได้หมวกดอก โดยสปอร์จะมีรูปร่างยาวรีและมีสีใส สปอร์พิมพ์ (spore-print) มีสีขาว สีครีม สีชมพู หรือสีเทา (Pegler, 1983) ส่วนสีของดอกเห็ดมีทั้ง สีขาว สีน้ำเงิน สีเทา สีน้ำตาล สีทอง และสีชมพู (Stamets, 1993)

2.1.3 วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์

2.1.3.1 วงจรชีวิต

เห็ดในสกุล *Pleurotus* มีวงจรชีวิตเป็นแบบเฮเทอโรธาลลิก (heterothallic life cycle) โดยมีวงจรชีวิตชนิดแฮพโลไบออนติก (haplobiontic) ชนิดแฮพลอยด์ (haploid) (Alexopoulos and Mims, 1979) ดังนั้นเซลล์ทั่วไปจึงมีสถานะของโครโมโซมเป็นโมโนพลอยด์ (monoploid) (ภาพที่ 2.1) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ เมื่อดอกเห็ดเจริญเต็มที่ จะมีการสร้างสปอร์เรียกว่าเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) สปอร์เหล่านี้มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (โมโนพลอยด์) เมื่อสปอร์ตกในที่ที่เหมาะสมจะงอก (germinate) เส้นใยออกมา เส้นใยนี้จะมีผนังขวาง (septum) กัน โดยแต่ละเซลล์มีหนึ่งนิวเคลียส (monokaryon) และเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสเหมือนกัน (homokaryotic mycelium) เรียกเส้นใยในระยหานี้ว่าเส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) เส้นใยในระยหานี้จะมีการเจริญโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) เมื่อเส้นใยนี้ไปสัมผัส (anastomosis) กับเส้นใยปฐมภูมิที่มีเมทิงไทป์ (mating type) ต่างชนิดกัน ผนังของเส้นใยจะหลอมเชื่อมกัน จากนั้นไซโทพลาซึมจะไหลมารวมกัน (เกิด plasmogamy) เส้นใยที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะมี 2 นิวเคลียสในหนึ่งเซลล์ (dikaryon, $n+n$) และเป็นนิวเคลียสที่ต่างกัน (heterokaryon) เรียกเส้นใยในระยหานี้ว่าเส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) เส้นใยในระยหานี้จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วและมีการสร้างแคลมป์คอนเนกชัน (ภาพที่ 2.2) ต่อมาเส้นใยทุติยภูมิจะขยายปริมาณมากขึ้น และรวมตัวกันแน่นเป็นกลุ่มก้อน เรียกเส้นใยในระยหานี้ว่าเส้นใยตติยภูมิ (tertiary mycelium) ซึ่งเซลล์ของเส้นใยยังคงสภาพเป็นไดคารีโออน เส้นใยในระยหานี้จะค่อยๆ พัฒนาไปเป็นดอกเห็ด (fruiting body) เมื่อดอกเห็ดพัฒนาไปถึงระยะหนึ่ง จะมีการสร้างเบสิดิอัส (basidia) ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปกระบอง และนิวเคลียสทั้งสองที่อยู่ภายในจะรวมตัว (เกิด karyogamy) ได้นิวเคลียสที่เป็นดิพลอยด์ ($2n$) จากนั้นจะมีการแบ่งแบบไมโทซิส

(meiosis) ทำให้โครโมโซมลดลงเป็นแฮพลอยด์ (n) แต่ละเบสิดีจะสร้างสเตอริกมา (sterigma) 4 อัน ต่อมานิวเคลียสแต่ละอันจะเคลื่อนที่ไปอยู่ปลายสเตอริกมาพร้อมกับพองออกเป็นรูปร่างที่ค่อนข้างกลม แล้วมีการพัฒนาไปเป็นเบสิดีโอสปอร์ จำนวน 4 อัน เมื่อดอกเห็ดเจริญเต็มที่ จะมีการปลดปล่อยสปอร์ และถ้าสภาวะแวดล้อมเหมาะสมสปอร์จะงอกเป็นเส้นใย แล้ววงจรชีวิตก็จะเริ่มใหม่อีกครั้งหนึ่ง



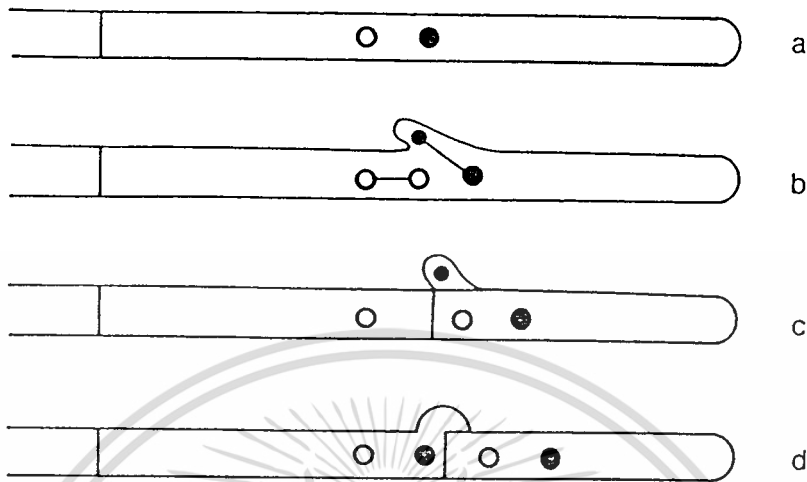
ภาพที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของเห็ดใน Class Basidiomycetes

ที่มา : Raper (1978)

2.1.3.2 การสืบพันธุ์

เห็ดในสกุล *Pleurotus* ซึ่งมีวงจรชีวิตแบบเฮเทอโรทาลิกนั้นเป็นเห็ดที่ไม่สามารถผสมตัวเองได้ภายในทลัส (thallus) เดียวกัน ดังนั้นการสืบพันธุ์แบบใช้เพศจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อนิวเคลียสจากต่างทลัส ซึ่งมีเมแททังไทป์ต่างกันมาผสมกันเท่านั้น โดยระบบการผสมพันธุ์ (mating system, breeding system) จะเป็นเททราโพลาร์ (tetrapolar) คือ มีแฟคเตอร์ (factor) หรือยีน (gene) 2 ชุด ได้แก่ แฟคเตอร์ A และ B ซึ่งใน 1 แฟคเตอร์ประกอบด้วย 2 อัลลีล (แฟคเตอร์ A ประกอบด้วยอัลลีล A_1 และ A_2 ส่วนแฟคเตอร์ B ประกอบด้วยอัลลีล B_1 และ B_2) ซึ่งแฟคเตอร์ทั้ง 2 นี้อยู่ต่างโครโมโซมกัน ดังนั้นเมื่อมีการแยกตัวออกจากกันในขณะมีการแบ่งเซลล์ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติให้มาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบไมโอซิสจึงทำให้สามารถสร้างเบสิดิโอสปอร์ที่ต่างกันได้ 4 ชนิด (ภายในเห็ดหนึ่งดอก) คือ A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 และ A_2B_2



ภาพที่ 2.2 แสดงการสร้างแคลมป์คอนเนกชันของเห็ดใน Class Basidiomycetes
ที่มา : Gow and Gadd (1995)

2.2 การปรับปรุงพันธุ์เห็ด

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดสามารถทำได้โดยวิธีการต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.2.1 วิธีการคัดเลือกพันธุ์ (selection method)

ทำได้โดยการนำสปอร์ของเห็ดมาผสมกันในห้องปฏิบัติการแล้วคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะดีไปขยายพันธุ์ต่อไป หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดสายพันธุ์ดีที่คัดเลือกไว้ แล้วนำไปขยายพันธุ์ต่อไป

2.2.2 วิธีการผสมพันธุ์ (hybridization หรือ crossing method)

เป็นวิธีการผสมพันธุ์ที่มีชีวิตแบบดั้งเดิม (conventional method) ซึ่งทำโดยการผสมข้ามระหว่างเห็ดสองสายพันธุ์ที่สามารถเข้าคู่กันได้ วิธีนี้เป็นวิธีที่ประสบความสำเร็จมากในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดกินได้หลายชนิด แต่มีข้อจำกัดบางประการคือเส้นใยเห็ดจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้อาจไม่สามารถผสมกันได้ (incompatible) โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเป็นสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมห่างกัน (Chang, 1982)

2.2.3 วิธีการทำให้เกิดสายพันธุ์กลาย (mutation method)

การทำให้เกิดสายพันธุ์กลายเป็นการทำให้ขึ้นเกิดการเปลี่ยนแปลง เป็นผลให้เกิดลักษณะพันธุกรรมใหม่ๆ ที่แตกต่างไปจากลักษณะปกติดั้งเดิม การเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะรูปร่างทั่วไปหรือเกี่ยวกับลักษณะทางสรีรวิทยาหรือชีวเคมีหรือลักษณะทางพฤติกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(วิสุทธิ ใบไม้. 2533) ซึ่งในธรรมชาติความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์อยู่ระหว่าง 10^{-5} ถึง 10^{-10} เซลล์/รุ่น แต่ด้วยการทำให้อัตราการเกิดสายพันธุ์กลายสูงขึ้นสามารถเห็นยีนได้โดยใช้รังสีเอกซ์ (x-rays) รังสีแกมมา (gamma-rays) แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet light, uv) หรือการใช้สารเคมี เช่น กรดไนตริก (nitrous acid, NA) ไฮดรอกซีลามีน (hydroxylamine, NH_2OH) ไดเมทิลซัลโฟเนต (dimethylsulphonate) เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethylmethanesulphonate, EMS) ไดเอทิลซัลโฟเนต (diethylsulphonate) เมทิลมีเทนซัลโฟเนต (methylmethanesulphonate, MMS) เอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกวานิดีน (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG) และอะคริดีนมัสตาร์ด (acridinemustard) สารเคมีเหล่านี้มักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคู่เบสที่จุดใดจุดหนึ่งในโมเลกุลดีเอ็นเอในรูปแบบต่างๆ กัน แล้วแต่สมบัติทางเคมีของสารชนิดนั้นๆ (วิสุทธิ ใบไม้. 2533) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีหรือสารเคมีจะทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติต่างๆ กัน แต่โดยส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติดีกว่าเดิมจะมีเพียงประมาณร้อยละ 1 ที่มีคุณสมบัติดีกว่าสายพันธุ์เดิม (กานันต์ สุภณวงษ์. 2534) ซึ่งเมื่อตรวจพบก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้

2.2.4 วิธีการรวมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion method)

การรวมโพรโตพลาสต์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถสร้างลูกผสมที่มีลักษณะรวมกันของสายพันธุ์พ่อแม่ (parental strain) โดยไม่ถูกจำกัดด้วยเมทิงไทป์หรือยีนที่เข้ากันไม่ได้ของคู่เชื้อที่นำมาผสมพันธุ์กัน และมีความถี่ของการรวมกันค่อนข้างสูง (Chang. 1982) จึงได้มีการนำเอาวิธีการรวมโพรโตพลาสต์ไปพัฒนาใช้ในระดับอุตสาหกรรม

2.3 โพรโตพลาสต์

2.3.1 คำจำกัดความของโพรโตพลาสต์

โพรโตพลาสต์เป็นคำที่ใช้มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1953 โดย Weibull ใช้เรียกโครงสร้างของแบคทีเรียที่เหลือหลังจากผนังเซลล์ (cell wall) ถูกทำลายหรือถูกแยกเอาผนังเซลล์ออกไปเหลือเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane หรือ plasma membrane) ห่อหุ้มไซโตพลาซึม (cytoplasm) อยู่เท่านั้น ปัจจุบันมีความหมายรวมถึงเซลล์พืชหรือจุลินทรีย์ที่ไม่มีผนังเซลล์

โครงสร้างที่ได้จากการแยกเอาผนังเซลล์ออก แบ่งได้ 2 ประเภทคือ

2.3.1.1 สเฟียโรพลาสต์ (sphaeroplast) คือ เซลล์ที่ยังคงมีผนังเซลล์เหลือติดอยู่บางส่วน

2.3.1.2 โพรโตพลาสต์ คือ เซลล์ที่ไม่มีส่วนของผนังเซลล์หลงเหลืออยู่เลย

การแยกความแตกต่างระหว่างโครงสร้างทั้งสองประเภทโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาทำได้ยาก ดังนั้นในการเรียกโครงสร้างที่ไม่มีผนังเซลล์จึงมีผู้ใช้ทั้งคำว่าสเฟียโรพลาสต์และโพรโตพลาสต์ในความหมายที่เหมือนกัน (Villanueva and Garcia Acha. 1971)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 คุณสมบัติของโพรโตพลาสต์พอสรูปได้ดังนี้

2.4.2.1 มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ปกติ แต่ไม่มีผนังเซลล์

2.4.2.2 มีอัตราการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid, RNA) และโปรตีนเท่ากับในเซลล์ปกติ แต่การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) เท่ากับครึ่งหนึ่งของเซลล์ปกติ

2.4.2.3 โพรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้ (cell wall regeneration)

2.4.2.4 โพรโตพลาสต์สามารถกลับเป็นเซลล์ปกติ ที่มีการเจริญและแบ่งเซลล์ต่อไปได้

2.3.3 ประโยชน์ของโพรโตพลาสต์

2.3.3.1 นำไปใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์ผนังเซลล์และโครงสร้างของผนังเซลล์

2.3.3.2 นำไปใช้ในการเตรียมสารสกัดจากเซลล์ (cell free extract) เช่น เอนไซม์ ดีเอ็นเอ และออร์แกเนล (organelles) ต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น นิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย ไรโบโซม เป็นต้น

2.3.3.3 นำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี รวมทั้งกระบวนการสังเคราะห์สารต่างๆ ภายในเซลล์

2.3.3.4 นำไปใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ เช่น การปรับปรุงพันธุ์ของแบคทีเรีย เห็ดรา สาหร่าย และพืช ด้วยเทคนิคการรวมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion) และโพรโตพลาสต์ทรานสฟอร์เมชัน (protoplast transformation) ซึ่งเทคนิคการรวมโพรโตพลาสต์เป็นการเหนี่ยวนำหรือส่งเสริมให้เกิดเจเนติกรีคอมบิเนชัน (genetic recombination) ในจุลินทรีย์ทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอตด้วยความถี่สูง นอกจากนั้นเทคนิคนี้ยังได้มีการพัฒนาอย่างดียิ่งสำหรับเซลล์พืชและสัตว์ การส่งเสริมให้เกิดเจเนติกรีคอมบิเนชันนั้นทำได้โดยนำโพรโตพลาสต์ของเซลล์เหล่านั้นมาเหนี่ยวนำให้เกิดการหลอมรวมกัน เป็นผลให้สารพันธุกรรมทั้งหมดภายในโพรโตพลาสต์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่เข้ามาอยู่ในโพรโตพลาสต์เดียวกัน ทำให้ยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจจากสายพันธุ์ต่างๆ เข้าไปอยู่ร่วมกันในโพรโตพลาสต์เดี่ยว ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่เจริญและเพิ่มจำนวนตามปกติได้ วิธีนี้เหมาะสำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์ (recombinant) ของจุลินทรีย์ที่ไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศหรือมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่ไม่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากการรวมตัวของโพรโตพลาสต์เกิดขึ้นได้โดยไม่อาศัยเมทิงไทป์ของคู่เชื้อที่นำมาผสมพันธุ์กัน และใช้ในการรวมจีโนม (genome) ของคู่เชื้อที่มีลักษณะพันธุกรรมที่ต่างกันมากได้ และการรวมกันนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนชุดของโครโมโซม (ploidy) จึงทำให้เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม ซึ่งมักมีจำนวนโครโมโซมหลายชุด (polyploid) หรือเป็นแบบแอนนูพลอยด์ (aneuploid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์

การรวมโพรโตพลาสต์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

2.4.1 การแยกโพรโตพลาสต์ (protoplast isolation หรือ protoplast preparation) เป็นขั้นตอนของการเปลี่ยนเซลล์เป็นโพรโตพลาสต์

2.4.2 การหลอมรวมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion) เป็นขั้นตอนที่เหนี่ยวนำให้โพรโตพลาสต์ตั้งแต่สองโพรโตพลาสต์เข้ามารวมกันเป็นโพรโตพลาสต์เดี่ยว

2.4.3 การเปลี่ยนโพรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ (protoplast regeneration) เนื่องจากโพรโตพลาสต์เป็นโครงสร้างที่เพิ่มจำนวนไม่ได้ จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนโพรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ปกติ โดยการทำให้โพรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ เมื่อโพรโตพลาสต์เปลี่ยนกลับเป็นเซลล์ปกติจึงสามารถเจริญเพิ่มจำนวนและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

2.5 การแยกโพรโตพลาสต์

2.5.1 วิธีการแยกโพรโตพลาสต์

การแยกโพรโตพลาสต์สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

2.5.1.1 วิธีกล (mechanical method) หรือวิธีที่ไม่ใช้เอนไซม์ (non-enzymatic method) วิธีนี้เป็นวิธีแรกที่ใช้ในการแยกโพรโตพลาสต์ เช่น การนำเซลล์ไปเขย่ากับลูกแก้วหรือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic vibration) เพื่อทำลายผนังเซลล์ และการใช้สารเคมีที่มีผลต่อขบวนการเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ เช่น ไดดีออกซีกลูโคส (2-deoxyglucose) และ แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate) (Foury and Goffeau, 1973) การแยกโพรโตพลาสต์ด้วยวิธีกลนี้ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากควบคุมได้ยากทำให้โพรโตพลาสต์ที่แยกออกมาถูกทำลายส่งผลให้ได้ปริมาณโพรโตพลาสต์น้อย และโพรโตพลาสต์ที่ได้มักไม่สมบูรณ์ทำให้มีอัตราการอยู่รอดต่ำ (Peberdy, 1979)

2.5.1.2 วิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic method) วิธีนี้เป็นวิธีการใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (lytic enzyme) ย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมเนื่องจากสะดวกและทำให้ได้โพรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์เป็นปริมาณมาก

2.5.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโพรโตพลาสต์

การใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเส้นใยเห็ดราต้องคำนึงถึงองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเส้นใยเห็ดรานั้นๆ ซึ่งองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เส้นใยของเส้นใยเห็ดรา ได้แก่ สารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เช่น ไคติน เซลลูโลส กุลแคน แมนแนน ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 60-80 ของส่วนประกอบของผนังเซลล์ โดยชนิดและปริมาณองค์ประกอบแต่ละเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเห็ดรา (ตารางที่ 2.1) ดังนั้นการใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเห็ดราจึงต้องผสมเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในสัดส่วนและปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อเห็ดราและยีสต์มีหลายชนิดดังนี้

2.5.2.1 เอนไซม์จากหอยทาก (snail enzyme) เป็นเอนไซม์จากน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (gastric juice) ของหอยทาก *Helix pomatia* เมื่อวิเคราะห์พบว่ามียีนประกอบเป็น endo- β (1-3) glucanase และ endo- β (1-6) glucanase ซึ่งสามารถย่อยสลายกลูแคน เอนไซม์ชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์เกือบทุกชนิด ชื่อทางการค้าของเอนไซม์ชนิดนี้มีหลายชื่อ ได้แก่ Helicase, Glusulase, Sulfatase และ Cytohelicase เป็นต้น

2.5.2.2 เอนไซม์จากแบคทีเรีย ซึ่งเป็นเอนไซม์จาก *Anthrobactor luteus* มีองค์ประกอบเป็น β (1-3) glucanase และ protease

2.5.2.3 เอนไซม์จากเชื้อรา ซึ่งเป็นเอนไซม์จากเชื้อ *Trichoderma harzianum* ประกอบด้วย เอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ α (1-3) glucan glucanohydrolase, β (1-3) glucan glucanohydrolase, cellulase, xylanase และ neutral protease เอนไซม์ชนิดนี้มีชื่อทางการค้าหลายชื่อ ได้แก่ *Trichoderma* Enzyme, Mutanase, Lysing Enzyme และ Novozyme 234 เป็นต้น

2.5.2.4 เอนไซม์ผสม เช่น เอนไซม์ผสมระหว่าง chitinase, zymolase และ hemicellulase หรือผสมระหว่าง chitinase, zymolase และ Novozyme 234 หรือผสมระหว่าง chitinase, zymolase หรือผสมระหว่าง chitinase กับเอนไซม์จากหอยทาก เป็นต้น

Kitamoto *et al.* (1988) ได้สกัดเอนไซม์ β (1-3) glucanase และ chitinase จากเชื้อรา *T. harzianum* แล้วนำมาเป็นเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเห็ดราใน Class Basidiomycetes, Ascomycetes, Deuteromycetes และ Zygomycetes พบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จะมีประสิทธิภาพในการแยกโพรโตพลาสต์ได้ดีที่สุดเมื่อใช้เวลาในการบ่ม 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Kim *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาหาเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ด *Lentinus lepideus* โดยนำเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงบนอาหารฟีดเอ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน มาย่อยเอาผนังเซลล์ออกด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ Novozyme 234, Cellulase และเอนไซม์ผสมระหว่าง Novozyme 234 กับ Cellulase, Novozyme 234 กับ β -Glucuronidase และ Novozyme 234 กับ Cellulase และ β -Glucuronidase พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ Novozyme 234 เพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้น 10 มก./มล. ให้ปริมาณโพรโตพลาสต์สูงสุดถึง 20×10^6 โพรโตพลาสต์/มล.

ตารางที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อเห็ดครากลุ่มต่างๆ

Taxonomy groups	Fibrous polymers	Gel-like polymers
Basidiomycetes	Chitin β -(1-3), β -(1-6)-Glucan	Xylomannoproteins α -(1-3)-glucan
Ascomycetes	Chitin β -(1-3), β -(1-6)-Glucan	Galactomannoproteins α -(1-3)-glucan
Zygomycetes	Chitin Chitosan	Polyglucuronic acid Glucuronomannoproteines Polyphosphate
Chytridiomycetes	Chitin Glucan	Glucan
Hyphochytridiomycetes	Chitin Glucan	Glucan
Oomycetes	β -(1-3), β -(1-6)-Glucan Cellulose	Glucan

ที่มา: Gow and Gadd (1995)

2.5.3 การแยกโพรโตพลาสต์จากเห็ดรา

การแยกโพรโตพลาสต์จากเห็ดราอาจทำได้จากส่วนต่างๆ ดังนี้

2.5.3.1 เส้นใย เส้นใยที่ใช้ควรมีอายุน้อยซึ่งผนังเซลล์ยังบางอยู่เพื่อให้เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายผนังเซลล์สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ได้โพรโตพลาสต์จำนวนมาก ซึ่งในช่วงแรกของการบ่มด้วยเอนไซม์โพรโตพลาสต์ส่วนใหญ่จะถูกปลดปล่อยออกมาจากส่วนปลายของเส้นใย (hyphal tip) เป็นโพรโตพลาสต์ที่มีขนาดเล็กและไม่มีแวคิวโอล (vacuoles) ส่วนโพรโตพลาสต์ที่ปลดปล่อยได้ในภายหลังจะเป็นโพรโตพลาสต์ที่ปลดปล่อยมาจากส่วนโคนของเส้นใย โพรโตพลาสต์ในระยะนี้จะแวคิวโอลและมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ หากยังเพิ่มระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ ดังนั้นโพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากส่วนของเส้นใยจะมีขนาดไม่เท่ากัน

Peberdy (1976) ได้ศึกษาโครงสร้างภายใน (ultra-structure) ของโพรโตพลาสต์ของเชื้อรา *Apergillus nidulans* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากการย่อยสลายเส้นใยในช่วงชั่วโมงแรกจะมีขนาดเล็ก โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.1-5.5 ไมโครเมตร ซึ่งเกิดจากบริเวณส่วนปลายของเส้นใย โพรโตพลาสต์เหล่านี้มีแวคิวโอลขนาดเล็ก มีนิวเคลียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไรโบโซม ไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) ในปริมาณที่สูง และหลังจากบ่มด้วยเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์นานกว่า 3 ชั่วโมง พบว่าโปรโตพลาสต์มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 13.7 ไมโครเมตร มีเวกคิวโอลขนาดใหญ่และมีความหนาแน่นของไรโบโซมต่ำ

2.5.3.2 สปอร์ เนื่องจากผนังเซลล์ของสปอร์มีความหนามากกว่าของเส้นใยทำให้สามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ ดังนั้นในการแยกโปรโตพลาสต์จากสปอร์จึงต้องใช้เวลาในการบ่มด้วยเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์นานจึงจะได้ปริมาณโปรโตพลาสต์มากพอ (Peberdy, 1976) ดังนั้นสปอร์ที่ใช้ควรเป็นสปอร์ที่ยังไม่แก่เต็มที่ (immature spore) ซึ่งจะมีผนังบางทำให้ถูกย่อยสลายได้ง่าย หรือสปอร์ที่กำลังงอก (germinating spore) เพราะสปอร์ได้สร้างส่วนของจิร์มทิว (germ tube) ซึ่งมีผนังเซลล์ที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ได้ง่าย (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2536)

2.5.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

2.5.4.1 อายุของเชื้อ

การแยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใยมักใช้เส้นใยที่มีอายุน้อย โดยการเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลวและบ่มบนเครื่องเขย่า แล้วนำเส้นใยซึ่งอยู่ในช่วง early-exponential phase หรือ mid-exponential phase ซึ่งเป็นเส้นใยระยะที่มีความไวต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์มากกว่าเส้นใยของเชื้อราที่มีอายุมากมาทำการแยกโปรโตพลาสต์

2.5.4.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้องค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกันไป ดังนั้นการเติมสารบางอย่างลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถไปยับยั้งขบวนการสร้างผนังเซลล์ทำให้ได้ผนังเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งทำให้ผนังเซลล์ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ได้ง่ายขึ้น ได้แก่ การเติมกรดอะมิโนบางชนิด เช่น DL-threonine และ glycine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2536)

Yamada *et al.* (1983) ได้ทำการศึกษาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรม *P. ostreatus* โดยทำการเลี้ยงเชื้อเห็ดในอาหารเหลว 3 ชนิด พบว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ โดยอาหารออยเนียนซอสซอส (onion-soysauce medium) จะทำให้ได้ปริมาณโปรโตพลาสต์สูงกว่าอาหารฟีดือ (potato dextrose medium) และอาหารกลูโคสยีสต์เปปโตน (glucose yeast peptone medium)

2.5.4.3 สารรีดิวส์

การใช้สารรีดิวส์บางชนิดเพื่อทำพรีทรีทเมนต์ (pretreatment) เซลล์ก่อนแยก เป็นการใส่สารประกอบบางอย่างกับเซลล์ก่อนนำไปเตรียมโปรโตพลาสต์ ซึ่งอาจ

ทำให้การเตรียมโปรโตพลาสต์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น การใช้สารประกอบ thiol (β -mercaptoethanol, dithithreitol หรือ thioglycolate) ซึ่งสามารถทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ในโปรตีนที่ผนังเซลล์ทำให้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ทำงานได้ง่ายขึ้น (Gascon *et al.* 1964; Davies and Elvin. 1964; Andeson and Millbank. 1966)

2.5.4.4 บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์อาจมีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ ดังนั้นในการแยกโปรโตพลาสต์ควรเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่มีคุณสมบัติไม่เป็นตัวขัดขวางการย่อยของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อเห็ดราจะใช้ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) มาเลทบัฟเฟอร์ (maleate buffer) และ ซัคซิเนทบัฟเฟอร์ (succinate buffer) ส่วนพีเอชที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์อยู่ในช่วง 4.0 ถึง 8.0 (Fox. 1991)

2.5.4.5 สารออสโมติกสเตรบิลไอเซอร์

สารออสโมติกสเตรบิลไอเซอร์เป็นสารรักษาสภาพแรงดันออสโมซิสของโปรโตพลาสต์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์เป็นโครงสร้างที่ถูกทำลายได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมซิส จึงจำเป็นต้องเก็บโปรโตพลาสต์ไว้ในสารละลายที่รักษาสภาพแรงดันออสโมซิส สารละลายที่รักษาแรงดันออสโมซิสที่ใช้เก็บรักษาโปรโตพลาสต์มักใช้สารละลายที่เป็นไอโซโทนิก (isotonic solution) หรือสารละลายไฮเปอร์โทนิก (hypertonic solution) ซึ่งโปรโตพลาสต์จะมีรูปร่างกลมและเต่งในสารละลายที่เป็นไอโซโทนิก และจะเหี่ยวเล็กน้อยในสารละลายที่เป็นไฮเปอร์โทนิกเนื่องจากการเสียน้ำออกจากเซลล์ แต่ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่เปลี่ยนแปลง สารที่นำมาใช้เป็นออสโมติกสเตรบิลไอเซอร์ต้องไม่เป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ ไม่ลดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ และควรช่วยส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ สารที่นิยมนำมาใช้ออสโมติกสเตรบิลไอเซอร์ได้แก่ สารละลายเกลืออนินทรีย์ เช่น โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) เป็นต้น และสารละลายของน้ำตาล และสารละลายของน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น กลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) ซอร์บิทอล (sorbitol) แมนนิทอล (mannitol) เป็นต้น

Kim *et al.* (2000) ได้ศึกษาออสโมติกสเตรบิลไอเซอร์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ด *L. lepidus* โดยนำเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงในอาหารฟิดีโอ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน มาบ่มด้วยเอนไซม์ Novozym 234 ปริมาตร 10 มก./มล. โดยใช้สารชนิดต่างๆ คือ ซูโครส ซอร์บิทอล แมนนิทอล โซเดียมคลอไรด์ โพแทสเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ เป็นออสโมติกสเตรบิลไอเซอร์ แล้วนับจำนวนโปรโตพลาสต์ทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 10 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้ซูโครส 0.6 โมลาร์ และบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมงได้ปริมาณโปรโตพลาสต์สูงสุด

2.5.4.6 ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการแยกโพรโตพลาสต์

ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการแยกโพรโตพลาสต์คือสภาวะขณะบ่มเอนไทม์ ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ระยะเวลา ความเร็วรอบในการเขย่า โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยทั่วไป จะอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส และพีเอชช่วง 4.0-8.0 ซึ่งเหมาะสมสำหรับการทำงานของ เอนไทม์ และความมีชีวิตของเซลล์ ระยะเวลาในการบ่มเอนไทม์ โพรโตพลาสต์จะเกิดมากใน ช่วง 2-3 ชั่วโมงแรกของการบ่มด้วยเอนไทม์ย่อยสลายผนังเซลล์ แต่ถ้าทิ้งไว้นานเกินไปจะทำให้ โพรโตพลาสต์แตกได้ ความเร็วรอบในการเขย่า ซึ่งมีผลต่อความอยู่รอดของโพรโตพลาสต์ โดยปกติจะใช้ความเร็วรอบในการเขย่า ประมาณ 80-100 รอบต่อนาที

ตารางที่ 2.2 แสดงตัวอย่างสภาวะของปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ด

ชนิดของเห็ด	สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	เอนไทม์ย่อยสลายผนังเซลล์	ออสโมติกสเทบิลไลเซอร์	ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการแยกโพรโตพลาสต์
เห็ดใน class basidiomycetes (23 ชนิด)	Yeast-extracted Liquid medium, 25°C	<i>Trichoderma</i> lytic enzyme or Helicase	0.5 M MgSO ₄	0.05 M Na-maleate buffer, pH 5.8, 24°C, 5 h
<i>Tricholoma matsutake</i>	Glucose, yeast extract, and Bacto-Soytone, 23°C, 15-25d	Cellulase R-10 + Zymolyase 5000 + β-glucuronidase	0.6 M MgSO ₄	0.05 M malic acid-NaOH buffer, pH 5.6, 25°C, 3 h
<i>Coprinus cinereus</i>	CY-1 medium, 28°C, 7-10 d	Cellulase “Onozuka” R-10	0.5 M MgSO ₄	0.05 M Na-maleate buffer, pH 5.8, 28°C, 24 h
<i>Coprinus pellucidus</i>	preculture-YGP medium, 28°C, 4 d-homogenate 18 h, shaking	Chitinase + Cellulase “Onozuka” R-10 + Zymolyase 5000 + β-glucuronidase	0.5 M MgSO ₄	0.05 M malic acid-NaOH buffer, pH 5.8, 30°C, 3 h, shaking
<i>Lentimus edodes</i>	MYG liquid Medium, 25°C, 3-4 d	Cellulase “Onozuka” RS + chitinase	0.6 M mannitol	0.05 M succinate buffer, pH 4.6

ที่มา : เรียบเรียงมาจาก Hashiba (1992)

ชูลี ชัยศรีสุข (2536) ได้เตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของราข้าวแดง (*Monascus* sp. KB6SR) โดยนำเส้นใยของเชื้อรา (ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MY บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200-220 รอบต่อนาที ในที่มืดนาน 16-20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส) ปริมาณ 0.2-0.25 กรัม มาบ่มในสารละลายของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ chitinase, lyticase และ cellulase ในอัตราส่วน 3 : 2.5 : 5 มก./มล. ซึ่งมีโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต 0.8 โมลาร์ ในโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ (sodium citrate buffer) 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.5 โดยการเขย่าในที่มืดด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5-2 ชั่วโมง ได้โปรโตพลาสต์ 10^6 - 10^8 โปรโตพลาสต์/มล. ซึ่งโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้เป็นโปรโตพลาสต์ที่มีคุณภาพดีเพราะไม่มีแวกคิวโอลหรือมีแวกคิวโอลขนาดเล็ก

2.6 การรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion)

การรวมโปรโตพลาสต์เป็นขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์ตั้งแต่ 2 โปรโตพลาสต์ขึ้นไปมาหลอมรวมกัน เพื่อนำสารพันธุกรรมจากแต่ละโปรโตพลาสต์เข้ามาอยู่ด้วยกันทำให้ยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจจากสายพันธุ์ต่างๆ เข้าไปอยู่รวมกันในโปรโตพลาสต์เดียวกัน

ลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์เรียกว่า รีคอมบิแนนท์ ลูกผสมจากการทำฟิวชัน (fusion hybrid) ผลผลิตจากการทำฟิวชัน (fusion product) หรือฟิวแซนต์ (fusant)

2.6.1 รูปแบบการรวมโปรโตพลาสต์

การรวมโปรโตพลาสต์จากเชื้อต่างกลุ่มกันอาจแบ่งได้เป็น 3 แบบ โดยยึดหลักการจัดหมวดหมู่ตามอนุกรมวิธานดังนี้ คือ

2.6.1.1 Intraspecific protoplast fusion เป็นการรวมโปรโตพลาสต์ของคู่เชื้อที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ (strain variety) (ตารางที่ 2.3) ความถี่ในการหลอมรวมกันจะสูงเนื่องจากเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์พ่อและแม่ (parental strain) ที่ผสมกันมีความแตกต่างในทางพันธุกรรมน้อย ทำให้เซลล์ลูกผสมที่เกิดขึ้นจากการรวมรูปแบบนี้มีความคงตัวสูง (Peberdy *et al.* 1976)

2.6.1.2 Interspecific protoplast fusion เป็นการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างคู่เชื้อต่างชนิดกันแต่อยู่ในสกุลเดียวกัน (ตารางที่ 2.4) ความถี่ในการรวมโปรโตพลาสต์จะต่ำกว่าแบบแรก เนื่องจากมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของคู่เชื้อที่นำมาผสมกันมากขึ้น ทำให้ลูกผสมที่ได้ไม่ค่อยมีความคงตัว โดยนิวเคลียสอาจไม่รวมกันง่ายๆ

2.6.1.3 Intergeneric protoplast fusion เป็นการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างคู่เชื้อต่างสกุลกัน (ตารางที่ 2.5) ซึ่งพบว่าประสบความสำเร็จน้อย เนื่องจากจีโนมของเชื้อต่างสกุลกันมีความแตกต่างกันมากทำให้การรวมกันของนิวเคลียสเกิดขึ้นยาก นิวเคลียสของลูกผสมที่ได้จะเกิดการแยกตัวไปเหมือนกับสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีอยู่เดิมเมื่อเลี้ยงไปสักระยะหนึ่ง (Peberdy. 1976)

ตารางที่ 2.3 แสดงชื่อเห็ดที่มีรายงานการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของคู่เชื้อชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กัน

ชนิดของเห็ด	เอกสารอ้างอิง
<i>Volvariella volvacea</i>	วีรวัฒน์ กนกนุเคราะห์ (2534)
<i>Coprinus macrorrhizus</i>	Kiguchi and Yanagi (1985)
<i>Lentinus edodes</i>	Kawasumi <i>et al.</i> (1987)
<i>P. salmoneo-stramineus</i>	Toyomasu and Mori (1987a)
<i>P. salmoneo-stramineus</i>	Iijima <i>et al.</i> (1991)
<i>C. cinereus</i>	Zhao and Chang (1995)
<i>Schizophyllum commune</i>	Zhao and Chang (1995)

ตารางที่ 2.4 แสดงชื่อเห็ดที่มีรายงานการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของคู่เชื้อในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกัน

ชนิดของเห็ด	เอกสารอ้างอิง
<i>P. ostreatus</i> × <i>P. salmoneo-stramineus</i>	Toyomasu <i>et al.</i> (1986)
<i>P. ostreatus</i> × <i>P. columbinus</i>	Toyomasu and Mori (1987b)
<i>P. pulmonarius</i> × <i>P. sajor-caju</i>	Toyomasu and Mori (1987b)
<i>P. pulmonarius</i> × <i>P. cornucopiae</i>	Takehara <i>et al.</i> (1993)
<i>P. ostreatus</i> × <i>P. pulmonarius</i>	Takehara <i>et al.</i> (1993)
<i>P. ostreatus</i> × <i>P. sajor-caju</i>	Matsumoto <i>et al.</i> (1997)
<i>V. volvacea</i> × <i>V. displasia</i>	Wang (1992)
<i>P. sajor-caju</i> × <i>P. cystidiosus</i>	Liang and Zhao (1999)

ตารางที่ 2.5 แสดงชื่อเห็ดที่มีรายงานการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของคู่เชื้อต่างสกุลกัน

ชนิดของเห็ด	เอกสารอ้างอิง
<i>Termitomyces sp.</i> × <i>V. volvacea</i>	สุมาลี พิษญากร (2541)
<i>L. edodes</i> × <i>P. ostreatus</i>	จรัสรัช มั่นถาวร (2544)
<i>P. ostreatus</i> × <i>Agrocybe cylindracea</i>	Eguchi <i>et al.</i> (1993)
<i>P. ostreatus</i> × <i>S. commune</i>	Zhao and Chang (1996)

Eguchi *et al.* (1993) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อต่างสกุลกันของ *P. ostreatus* กับ *Agrocybe cylindracea* พบว่าลูกผสมที่ได้มีแคลมปีคอนเนคชั่น และเมื่อทดสอบความเสถียรของลูกผสมโดยทำการถ่ายเชื้อเห็ดลูกผสมทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 20 เดือน พบว่าอัตราการเจริญ การเส้นใยและรูปแบบไฮโซไมซ์ยังคงแสดงความเป็นลูกผสมเหมือนเดิม

Zhao and Chang (1996) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดที่อยู่ต่างสกุลกันคือเห็ดนางรม *P. ostreatus* กับเห็ดแครงหรือเห็ดตีนตุ๊กแก *S. commune* โดยใช้สารละลายโพลีเอทิลีนไกลคอล พบว่าลูกผสมที่ได้ส่วนใหญ่มีนิวเคลียสของเส้นใยเป็นโมโนคารีออนและเป็นหมัน (sterile)

นอกจากรูปแบบการรวมโพรโตพลาสต์ที่กล่าวมาแล้วข้างต้นบางรายงานมีการรวมโพรโตพลาสต์ของเชื้อที่อยู่ต่างสับคลาส (subclass) กัน

Eguchi and Higaki (1995) ได้สร้างสายพันธุ์เห็ดกินได้ชนิดใหม่โดยใช้เทคนิคการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดซึ่งอยู่ต่างสับคลาสกันคือเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer) ซึ่งอยู่ในสับคลาส holobasidiomycetidae II กับเห็ด *Mycoleptodonoides aitchisonii* (Berk.) Maas G. ซึ่งเป็น tooth fungus ชนิดหนึ่งที่อยู่ในสับคลาส holobasidiomycetidae I โดยนำโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดทั้งสองชนิดที่มีนิวเคลียสเดี่ยวและเป็นสายพันธุ์กลายชนิดที่ต้องการสารอาหารบางอย่างในการเจริญเติบโต (mononuclear auxotrophic mutants) มาทำการรวมโพรโตพลาสต์โดยวิธีการใช้กระแสไฟฟ้าและวิธีการใช้สารโพลีเอทิลีนไกลคอล พบว่าลูกผสมที่ได้มีแคลมปีคอนเนคชั่น และใน 1 เซลล์เส้นใยประกอบด้วย 2 นิวเคลียส เมื่อนำเส้นใยของเห็ดลูกผสมมาเลี้ยงร่วมกับเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ พบว่าไม่เกิดการผสมพันธุ์กันกับเส้นใยของเห็ดทั้ง 2 สายพันธุ์ และเมื่อพิสูจน์ความเป็นลูกผสมด้วยวิธีไฮโซไมซ์ พบว่าเชื้อเห็ดลูกผสมมีแถบเหมือนทั้งสายพันธุ์พ่อและแม่

Okamura *et al.* (2000) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของเห็ดกินได้ในประเทศญี่ปุ่นเพื่อให้ได้เห็ดที่นำมาประกอบอาหารในครัวเรือนมีสารป้องกันการเกิดโรคทรมโบซิส (thrombosis) โดยนำโพรโตพลาสต์ของเห็ดหิ้งสีเหลือง (*sulphur shelf*) *Laetiporus sulphureus* (อยู่ในสับคลาส holobasidiomycetidae I) ซึ่งมีสารยับยั้งทรมบิน (anti-thrombin substance) แต่ไม่เป็นที่นิยมรับประทานเนื่องจากเป็นเห็ดป่าที่มีเนื้อแข็งเหมือนไม้ มาทำการรวมกับโพรโตพลาสต์ของเห็ดชิเมจิ *Hypsizygus marmoreus* (อยู่ในสับคลาส holobasidiomycetidae II) ซึ่งเป็นเห็ดที่มีขายทั่วไปตามท้องตลาดในประเทศญี่ปุ่นและเป็นเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้ง่าย โดยใช้กระแสไฟฟ้าในการรวมโพรโตพลาสต์ ทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเห็ดชิเมจิแต่มีสารยับยั้งทรมบินเหมือนเห็ดหิ้งสีเหลืองและสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย

2.6.2 ความสัมพันธ์ระหว่างการรวมโพรโตพลาสต์กับ parasexual cycle

parasexual cycle ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ plasmogamy, karyogamy และ haploidization ซึ่งเกิดโดยไม่จำเพาะเจาะจงเวลาหรือตำแหน่งที่เกิดในวงจรชีวิต parasexual cycle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบครั้งแรกในปี 1952 โดย Pontecorvo และ Roper ใน *Apergillus nidulans* นับตั้งแต่นั้นมา ปรากฏการณ์ parasexual ก็ถูกพบใน Deuteromycetes หรือ Fungi Imperfecti หลายๆ ชนิดรวมทั้งใน Basidiomycetes และใน Ascomycetes แต่ parasexual cycle มีความสำคัญต่อเชื้อราพวก Deuteromycetes มากกว่าพวกอื่นๆ เนื่องจากพวกมันไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแต่ parasexual cycle ทำให้เกิดเจนเนติกรีคอมบิเนชัน โดยไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศทำให้เชื้อราเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อปรับตัวให้เหมาะสมกับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ นอกจากนี้นักชีววิทยาบางท่านยังจัดการรวมโปรโตพลาสต์เป็น parasexual cycle ด้วย โดยเมื่อมีการรวมโปรโตพลาสต์นั้นไซโตพลาซึมของแต่ละโปรโตพลาสต์จะมารวมอยู่ในเซลล์เดียวกันแล้วเกิดการรวมตัวของนิวเคลียส และขณะที่โปรโตพลาสต์ของลูกผสมเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ปกติจะเกิดกระบวนการ haploidization (หลังจากมีหรือไม่มี mitotic crossing over) โดยการแบ่งแบบไมโทซิส (mitosis) ทำให้เกิดโคโลนีที่เป็นเฮเทอโรคารีออนที่มีความเสถียรหรือไม่เสถียร โดยอาจเกิดการลดลงของโครโมโซมกลายเป็นแอนนูพลอยด์หรือแฮพลอยด์ (Gadau and Lingg. 1992)

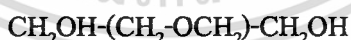
Toyomasu and Mori (1987b) ได้ทำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดที่อยู่ในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิด ซึ่งได้แก่ *P. ostreatus* กับ *P. columbinus* และ *P. columbinus* กับ *P. sajor-caju* พบว่าลูกผสมที่ได้ ออกดอกง่ายและมีความคงทนของสายพันธุ์อยู่ได้ช่วงระยะเวลาหนึ่งแล้วเกิด parasexuality ทำให้สายพันธุ์ลูกผสมกลายกลับไปหาสายพันธุ์เดิม ลูกผสมบางสายพันธุ์ไม่ออกดอกและบางสายพันธุ์ออกดอกแคระแกร็น

2.6.3 วิธีการรวมโปรโตพลาสต์

การรวมโปรโตพลาสต์ทำได้ 2 วิธี คือ การใช้สารเคมี และการใช้กระแสไฟฟ้า

2.6.3.1 การใช้สารเคมี (chemical method)

สารเคมีที่นิยมใช้ในการรวมโปรโตพลาสต์ คือ สารโพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ซึ่งมีสูตรโมเลกุลดังนี้



โดยจะใช้ร่วมกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) การนำโพลีเอทิลีนไกลคอลมาช่วยเหี่ยวน้ำให้เกิดการรวมกันของโปรโตพลาสต์นั้นเริ่มโดย Kao and Michayluk (1974) พบว่าโพลีเอทิลีนไกลคอลเป็นสารพอลิเมอร์ที่ทำให้เกิดการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ (fusing agent) เนื่องจากมีพันธะอีเธอร์ (ether bond) ทำให้มีประจุไฟฟ้าเป็นลบเล็กน้อย จึงทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับประจุบวกของน้ำ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และสารอื่นๆ ที่อยู่บนผิวของโปรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นผลให้เกิดการเกาะตัวกันของโปรโตพลาสต์ ส่วนแคลเซียมไอออนทำหน้าที่เชื่อมระหว่างกลุ่มของโปรตีนที่ผิวของโปรโตพลาสต์ (Anne and Peberdy. 1976) สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการใช้โพลีเอทิลีนไกลคอลให้ได้ผลสูงสุด คือ น้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้น และเวลาที่ใช้ในการบ่ม

โดยน้ำหนักโมเลกุลของโพลีเอทธิลีนไกลคอลที่เหมาะสมสำหรับการเหนี่ยวนำให้โพรโตพลาสต์ของเชื้อเห็ดรารวมกันอย่างมีประสิทธิภาพ คือ น้ำหนักโมเลกุล 4,000-6,000 โดยส่วนใหญ่มักใช้ความเข้มข้นร้อยละ 25-30 และพบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นต่ำกว่าร้อยละ 20 โพรโตพลาสต์ของเชื้อรามักแตก เนื่องจากสารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอลจะมีสภาพเป็นสารละลายไฮโปโทนิกและเมื่อความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 30 สารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอลจะมีสภาพเป็นสารละลายไฮเปอร์โทนิกซึ่งมีผลทำให้โพรโตพลาสต์เหี่ยวและความถี่ของการรวมโพรโตพลาสต์ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอลที่มีความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อโพรโตพลาสต์ (Peberdy, 1985)

การรวมโพรโตพลาสต์โดยวิธีใช้สารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอลเป็นการรวมเซลล์แบบสุ่ม ไม่สามารถที่จะควบคุมให้การรวมของโพรโตพลาสต์เป็นแบบหนึ่งต่อหนึ่งเซลล์หรือหนึ่งต่อสองเซลล์ได้ ไม่เหมือนกับวิธีการรวมเซลล์ด้วยเครื่องมือทางอิเล็กทรอนิกส์ แต่เป็นวิธีการรวมเซลล์ที่สะดวกไม่ต้องใช้เทคนิคสูงแต่ต้องมีความรู้ความชำนาญพื้นฐานและหลักในการคัดเปรียบเทียบ (screening) ถูกผสมที่เกิดขึ้น (สุมาลี พิชญางกูร, 2541)

Matumoto *et al.* (1997) ได้ทำการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์บอนที่เป็นสายพันธุ์กลายชนิดที่ต้องการสารบางชนิดในการเจริญเติบโต (auxotrophic mutant) ของเห็ดนางรม *P. ostreatus* และเห็ดนางฟ้า *P. sajor-caju* แล้วนำโพรโตพลาสต์ของเห็ดทั้ง 2 ชนิดนี้มารวมกันโดยใช้โพลีเอทธิลีนแบบปกติ (ไม่มีการปั่นเหวี่ยง) เปรียบเทียบกับการใช้โพลีเอทธิลีนร่วมกับการปั่นเหวี่ยง (PEG centrifugal fusion method) พบว่าอัตราการรวมโพรโตพลาสต์โดยใช้วิธีหลังสูงกว่าการใช้วิธีแรกถึงร้อยละ 10

สารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการรวมโพรโตพลาสต์คือ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) Nagata (1978) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ของพืชโดยใช้โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA, น้ำหนักโมเลกุล 500) ความเข้มข้นร้อยละ 15 ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ ที่ผสมอยู่กับแมนนิทอล 0.3 โมลาร์ พบว่า PVA/Ca^{2+} ทำให้เกิดการรวมกันของโพรโตพลาสต์ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ PEG/Ca^{2+}

2.6.3.2 การใช้กระแสไฟฟ้า (electrofusion method)

การรวมโพรโตพลาสต์โดยใช้กระแสไฟฟ้ามาเหนี่ยวนำให้โพรโตพลาสต์เกิดการรวมกันเรียกว่าอิเล็กโตรฟิวชัน (electrofusion) เริ่มโดย Zimmermann and Vienlen (1982) ได้ประดิษฐ์เครื่องมือที่เรียกว่า Zimmermann cell fusion system ซึ่งอาศัยหลักการของไดอิเล็กโตรโฟรีซิส (dielectrophoresis) โดยใช้สนามไฟฟ้ากระแสสลับ (non-monogeneous AC electric field) ทำให้โพรโตพลาสต์ที่อยู่ใกล้กันเข้ามาติดกันและต่อกันเป็นสายคล้ายสายไข่มุก (pearl chaining) เมื่อเชื่อมโพรโตพลาสต์แต่ละอันแล้ว จึงใช้ไฟฟ้ากระแสตรง (DC voltage) ที่เหมาะสมผ่านเข้าไปเป็น

จังหวัดๆ ซึ่งจะมีผลทำให้เชื้อหุ้มเซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลที่อยู่ทั้งสองด้านของเชื้อหุ้มเซลล์ช่วยทำให้เกิดช่องที่เชื้อหุ้มเซลล์ ทำให้โปรโตพลาสต์หลอมรวมกัน

Zhao and Chang (1995) ได้ทำการทดลองรวมโปรโตพลาสต์ภายในเชื้อชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันของเห็ดโคนน้อย *C. cinereus* และเห็ดตีนตุ๊กแก *S. commune* โดยใช้สารละลายโพลีเอทรีลินไกลคอลเปรียบเทียบกับการใช้กระแสไฟฟ้า พบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเห็ดแต่ละชนิดวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ทั้ง 2 วิธี มีความถี่ในการรวมโปรโตพลาสต์เท่ากับร้อยละ 16.7-50.0 และ ร้อยละ 6.9-8.4 ตามลำดับ

2.7 การสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์เป็นโครงสร้างที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้แต่สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ (cell wall regeneration) และกลับกลายเป็นเซลล์ปกติซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้ ดังนั้นถ้าต้องการนำโปรโตพลาสต์ที่รวมกันแล้ว (fused protoplast) ไปศึกษาและนำไปใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ ซึ่งทำได้โดยนำมาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมและบ่มในสภาวะที่เหมาะสม ประสิทธิภาพในการสร้างผนังเซลล์ใหม่และการเจริญต่อเป็นโคโลนีของโปรโตพลาสต์จะแสดงในรูปของค่าความถี่ของโปรโตพลาสต์ที่กลับคืนสู่สภาพเซลล์ปกติ (regeneration frequency หรือ reversion frequency) ซึ่งหาได้จากสูตรดังนี้

ความถี่ของการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์เท่ากับ

จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ปกติ

จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ ได้แก่ เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ การเทอาหารวุ้นทับ (overlay) ความเข้มข้นของวุ้น (agar concentration) สารออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ และส่วนประกอบของอาหารก็มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ใหม่ (Peberdy and Fox. 1993)

ไพเราะ ปันพานิช (2536) กล่าวว่าปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ คือ Autoinhibition โดยพบว่าโปรโตพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์ได้เร็วที่สุดจะยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่อยู่ใกล้เคียง แต่ถ้าลดความเข้มข้นของอาหารวุ้นลงบางส่วน (โดยให้น้ำหนักของอาหารวุ้นลดลงร้อยละ 15-20 ของน้ำหนักเริ่มต้น) จะช่วยลด Autoinhibition และเพิ่มอัตราเร็วของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ได้

Abe (1982) ได้นำเส้นใยเห็ด *Tricholoma matsutake* 2 สายพันธุ์ มาบ่มด้วยเอนไซม์ย่อย

สลายผนังเซลล์ซึ่งมีส่วนผสมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซโมไลเอส และเบต้า-กลูโคซิเดส ในอัตรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วน 1 : 1 : 3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยแช่ตลอดเวลาเพื่อเร่งให้โปรโตพลาสต์หลุดออกจากเส้นใยง่ายขึ้น แล้วนำโปรโตพลาสต์ที่ได้มารวมกันโดยใช้ $\text{PEG}/\text{Ca}^{2+}$ พบว่าเซลล์ที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์มีขนาดใหญ่กว่าเดิม และเมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง พบว่าโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ได้สมบูรณ์ในเวลา 3-4 วัน

Mukherjee and Sengupta (1986) ได้แยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟาง *V. volvacea* โดยใช้เอนไซม์ Novozym 234 และโซเดียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ (พีเอช 6.0) เป็นออสโมติกสเทบิลไลเซอร์ แล้วนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไปเลี้ยงในอาหารเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ พบว่าโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ได้ต่ำเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว แต่จะสร้างผนังเซลล์ได้มากกว่าร้อยละ 50 เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีวุ้นร้อยละ 2 และเททับด้วยอาหารชนิดเดียวกันที่มีวุ้นร้อยละ 0.5

Kim *et al.* (2000) ได้ศึกษาชนิดของออสโมติกสเทบิลไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเห็ด *L. lepideus* โดยนำโปรโตพลาสต์ไปเลี้ยงบนอาหาร MCM ที่มีออสโมติกสเทบิลไลเซอร์ชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบได้แก่ ซูโครส แมนนิทอล ซอร์บิทอล และเมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ พบว่าซูโครสเป็นออสโมติกสเทบิลไลเซอร์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ โดยมีความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่เท่ากับร้อยละ 3.28 ± 0.60

2.8 การคัดเลือกลูกผสมและการพิสูจน์ความเป็นลูกผสม

เมื่อต้องการนำเชื้อสองชนิดมาทำการรวมโปรโตพลาสต์ ซึ่งทำโดยการนำโปรโตพลาสต์ของเชื้อทั้งสองชนิดจำนวนมากมายอยู่ในหลอดทดลองเดียวกัน จึงไม่สามารถที่จะกำหนดว่าการรวมโปรโตพลาสต์ต้องเกิดขึ้นระหว่างโปรโตพลาสต์ของเชื้อต่างชนิดกันเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจมีการรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ของเชื้อต่างชนิดกันหรือเชื้อชนิดเดียวกัน ตลอดจนอาจมีการรวมกันของโปรโตพลาสต์มากกว่า 2 เซลล์เข้าด้วยกัน ดังนั้นจึงต้องมีวิธีที่เหมาะสมสำหรับแยกโปรโตพลาสต์ที่รวมกันแล้วว่าเป็นประเภทใด คือเป็นประเภทลูกผสมหรือประเภทที่เกิดจากเชื้อชนิดเดียวกัน

การคัดเลือกลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดสองชนิดสามารถทำได้ 3 วิธีใหญ่ๆ คือ

2.8.1 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นสายพันธุ์กลาย

การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นสายพันธุ์กลายเพื่อนำมารวมโปรโตพลาสต์นั้นอาจแบ่งลักษณะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่จะใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ได้ 3 ลักษณะ ดังนี้ต่อไปนี้

2.8.1.1 ลักษณะสายพันธุ์กลายที่ต้องการอาหารเฉพาะ (auxotrophic mutants)

โดยทั่วไปเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสายพันธุ์ปกติ (wild type) สามารถเจริญได้ในอาหารจำกัด (minimal medium) เรียกสายพันธุ์ปกตินี้ว่าโปรโตโทรบ (prototroph) แต่ถ้าสายพันธุ์ใดที่สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์สารบางชนิด เช่น กรดอะมิโน หรือวิตามินบางชนิด สำหรับการเจริญเติบโต เนื่องจากการขาดเอนไซม์หนึ่งหรือหลายชนิดในกระบวนการสังเคราะห์สารนั้นๆ เมื่อเติมสารอาหารหรือกรดอะมิโนที่ขาดนั้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารจำกัด จุลินทรีย์สายพันธุ์กลายนั้นจึงจะสามารถเติบโตได้ปกติ เรียกสายพันธุ์กลายเหล่านี้ว่าออกโซโทรบ (auxotroph) ดังนั้นก่อนการรวมโปรโตพลาสต์จึงควรคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นออกโซโทรบต่างชนิดกัน ซึ่งถ้าไม่สามารถคัดเลือกจากเชื้อที่กลายพันธุ์โดยธรรมชาติที่มีอยู่แล้วก็อาจทำการเหนี่ยวนำ ซึ่งวิธีที่จะทำได้สายพันธุ์กลายที่ต้องการอาหารเฉพาะ อาจทำได้โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตหรือสารเคมี ซึ่งสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายที่นิยมใช้กับเชื้อเห็ดราและยีสต์ คือ เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) และ เอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (NTG) (ชวนพิศ ดีเอกนามกุล. 2536) เนื่องจากทั้งแสงอัลตราไวโอเลต เอทิลมีเทนซัลโฟเนต และ เอ็น-เมทิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน ทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการแทนที่ของคู่เบส (base pair substitution) โดยจะไปเติมกลุ่มเมทิล (methyl) ที่เบสกวีนีน (Guanine) เป็น O⁶-Methylguanine ซึ่งทำให้สามารถจับคู่กับไทมีนได้

เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นออกโซโทรบต่างชนิดกันมาทำการรวมโปรโตพลาสต์ จะได้ลูกผสมที่เป็นสายพันธุ์โปรโตโทรบที่สามารถคัดเลือกได้เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารจำกัดและอาหารสมบูรณ์ (complete medium)

2.8.1.2 ลักษณะการต้านทานยาหรือสารประกอบบางชนิด (drug resistance or compound marker)

วิธีการนี้เป็นวิธีการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นออกโซโทรบชนิดที่ขาดความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหรือสารประกอบบางชนิด เช่น สารฆ่าเชื้อรา (fungicide) โดยเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ที่จะนำมารวมโปรโตพลาสต์นั้นต้องขาดความสามารถต้านทานต่อยาต่างชนิดกัน เมื่อนำเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่เหล่านี้มาทำการรวมโปรโตพลาสต์สามารถคัดเลือกลูกผสมได้โดยการเลี้ยงเชื้อลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารจำกัดซึ่งเดิมขาดชนิดนั้นๆ ลงไป แล้วนำความสามารถในการต้านทานต่อยาของเชื้อลูกผสมไปเปรียบเทียบกับความสามารถในการต้านทานต่อยาชนิดเดียวกันของเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่

2.8.1.3 การใช้เทคนิคที่เรียกว่า dead donor technique ซึ่งทำได้โดยการให้โปรโตพลาสต์หนึ่งในคู่ผสมตายหรือไม่ทำงาน (inactivated) โดยใช้สารบางอย่าง เช่น ความร้อน (heat treatment) สารปฏิชีวนะ การฉายรังสีอัลตราไวโอเลตหรือการใช้สารเคมี เช่น ไอโอโดอะซิตาไมด์ (iodoacetamide) หรือไดเอทิลไพโรคาร์บอเนต (diethylpyrocarbonate) (Zhao and Chang. 1995) ดังนั้นการคัดเลือกลูกผสมจะสัมพันธ์กับมีชีวิตของอีกสายพันธุ์หนึ่ง

2.8.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เป็นการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อที่ผ่านขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งเป็นวิธีการขั้นต้นที่ง่ายสำหรับการคัดเลือกลูกผสม โดยอาจแบ่งเป็น 2 วิธีการย่อยดังต่อไปนี้

2.8.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก (macroscopic characteristics) ซึ่งได้แก่ รูปร่าง ลักษณะ และขนาดของโคโลนี ขนาด รูปร่าง และสีของดอกเห็ด และสีของสปอร์พิมพ์ เป็นต้น

2.8.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใน (microscopic characteristics) ซึ่งได้แก่ ขนาดเซลล์ของเส้นใย จำนวนนิวเคลียสภายในเซลล์ รูปร่าง สี ขนาดและลักษณะผิวของสปอร์ เป็นต้น

2.8.3 การตรวจสอบการสร้างแกลมปีคอนเนกชัน

การคัดเลือกลูกผสมด้วยวิธีการตรวจสอบการสร้างแกลมปีคอนเนกชันต้องใช้เส้นใยสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นโมโนคารีออนมาทำการรวมโพรโตพลาสต์ โดยที่ถ้าเป็นลูกผสมจริงจะมีเส้นใยเป็นแบบเฮเทอโรคารีออน ซึ่งสามารถสร้างแกลมปีคอนเนกชันได้

2.9 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ไอโซไซม์ (isozyme) หรือไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) คือเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่มีขั้นตอนแบบมากกว่าหนึ่งขั้น ทำให้มีรูปแบบโมเลกุลที่แตกต่างกันหลายรูปแบบ (เนื่องจากการเรียงตัวของ subunit ที่ต่างกัน) แต่ต่างก็ควบคุมปฏิกิริยาชีวเคมีชนิดเดียวกัน มีความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate) ตัวเดียวกันและเร่งปฏิกิริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน และยังมีคุณสมบัติคงตัวไม่ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม ทำให้มีการนำไอโซไซม์มาใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต (ชวนพิศอรุณรังสิกุล, 2538) และใช้ในการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ได้ด้วย (Yokono *et al.* 2000; Zhang *et al.* 1995)

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ทำได้โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งเป็นวิธีทางชีวเคมีที่แยกสารออกจากกันในสนามไฟฟ้า โดยอาศัยความแตกต่างของชนิดและปริมาณประจุหรือรวมทั้งขนาดและรูปร่างของสารที่ต้องการแยก การตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้าดังกล่าวทำได้โดยนำสารละลายที่มีสับสเตรทกับโคเอนไซม์ (co-enzyme) ไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่สนใจแล้วจะเกิดตะกอนปรากฏขึ้นเป็นแถบซึ่งแสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ทำการศึกษา

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรวมโพรโตพลาสต์

อัจฉรา พัทพพานนท์ และ สัตยชัย ดันตยาภรณ์ (2538) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดฟางโดยวิธีการรวมโพรโตพลาสต์ พบว่าเมื่อนำเส้นใยเห็ดฟางและเห็ดนางฟ้าอายุ 18 ชม. มาบ่มด้วยเอนไซม์ไคติเนสและใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์ (พีเอช 5.8) เป็นออสโมติกสเตบิลไลเซอร์ โดยใช้เวลาในการบ่มไม่เกิน 3 ชั่วโมง โพรโตพลาสต์ของเห็ดทั้งสองชนิดที่แยกได้อยู่ในสภาพที่ดี ไม่แตกหรือเหี่ยว และเมื่อนำโพรโตพลาสต์มาทดสอบการสร้างผนังเซลล์ใหม่บนอาหาร Yeast Glucose Peptone พบว่าโพรโตพลาสต์ของเห็ดฟางและเห็ดนางฟ้าสามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ ร้อยละ 0.04 และ 0.22 ตามลำดับ เมื่อขยายเส้นใยจากโคไคโนที่เกิดจากโพรโตพลาสต์ของเห็ดฟางแล้วนำไปเพาะด้วยฟางหมัก พบว่าสามารถพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้โดยมีลักษณะรูปร่างและผลผลิตไม่ต่างจากเดิม ส่วนโพรโตพลาสต์ของเห็ดนางฟ้าเมื่อขยายเส้นใยไปเพาะแล้วไม่สร้างดอก ส่วนผลการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดฟางกับเห็ดนางฟ้า พบว่าได้ลูกผสมที่เป็นเส้นใยเจริญบนอาหารฟิสิกส์ได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเกิดดอกเห็ดเมื่อเพาะในอาหารจีเลี่ย แต่รูปร่างและลักษณะดอกเห็ดจะแตกต่างจากเห็ดฟางและเห็ดนางฟ้า

ประภัสสร โชคสวนทรัพย์ (2540) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโพรโตพลาสต์และทำการผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) กับเห็ดขอนขาว (*L. squarrosulus* (Mont.) Pegler) โดยวิธีการรวมโพรโตพลาสต์ ผลการทดลองด้านการแยกโพรโตพลาสต์พบว่าเมื่อนำเส้นใยเห็ดหอมอายุ 5 วัน และเห็ดขอนขาวอายุ 3 วัน มาย่อยด้วยไลซิ่งเอนไซม์ผสมกับเบต้ากลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase) ในอัตราส่วน 2 : 2 และ 4 : 2 มก./คอมล. โดยการเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชม. ได้จำนวนโพรโตพลาสต์เท่ากับ 6.2×10^5 และ 8.8×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. สำหรับผลการรวมโพรโตพลาสต์ได้ลูกผสม 3 สายพันธุ์ที่มีขนาดและน้ำหนัก รวมทั้งปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของเส้นใยมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ไปเพาะเลี้ยงจนเกิดดอกในถุงจีเลี่ย พบว่าดอกเห็ดของลูกผสม 2 สายพันธุ์ มีรูปร่างลักษณะทั้งภายนอกและภายในเป็นลักษณะผสมระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ รูปร่างลักษณะทั้งภายนอกและภายในคล้ายคลึงกับเห็ดหอม

จรัสรัช มั่นถาวร (2544) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกโพรโตพลาสต์ได้จากเส้นใยอายุ 3 วัน โดยการบ่มด้วยสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่ประกอบด้วยไลซิ่งเอนไซม์ 4 มก./มล. โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต 0.9 โมลาร์ ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 เป็นออสโมติกสเตบิลไลเซอร์ พบว่าได้จำนวนโพรโตพลาสต์เท่ากับ 4.87×10^7 โพรโตพลาสต์/มล. และเมื่อทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดหอมพบว่ามีเชื้อลูกผสม 5 สายพันธุ์ จากเชื้อทั้งหมด 475 สายพันธุ์ ที่แสดงความเป็นลูกผสมโดยสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราในสเตรปโตมัยซินและไอโอดีน และเมื่อทำการวัดขนาดของเส้นใยและปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดพบว่าลูก

ผสมทั้ง 5 สายพันธุ์มีขนาดของเส้นใยและปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Wang *et al.* (1991) ได้ทดลองแยกเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดแชมปิญอง แล้วนำเส้นใยที่ได้ไปแยกโพรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ Lywallzyme ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 พบว่าได้ปริมาณโพรโตพลาสต์สูงสุดเท่ากับ 4.8×10^7 โพรโตพลาสต์/มล. แล้วนำโพรโตพลาสต์ที่ได้ไปศึกษาการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ พบว่าความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่เท่ากับร้อยละ 3-5 และเมื่อนำโพรโตพลาสต์ของเห็ด 2 สายพันธุ์มารวมกันโดยใช้โพลีเอทธิลีนไกลคอล (น้ำหนักโมเลกุล 4,000) ซึ่งผสมอยู่กับแคลเซียมคลอไรด์และซูโครส 0.6 โมลาร์ (พีเอช 8.5) แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเพื่อกระตุ้นให้โพรโตพลาสต์เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่บนอาหาร compost extract media (CEM) แล้วทำการคัดเลือกลูกผสมโดยใช้การวิเคราะห์ไอโซไซม์ พบว่าลูกผสมที่ได้มีบางลักษณะของพ่อแม่รวมอยู่ด้วย

Wang (1992) ได้ทดลองใช้โพลีเอทธิลีนไกลคอลในการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดฟาง *V. volvacea* กับเห็ด *V. displasia* พบว่ามีความถี่ของการรวมโพรโตพลาสต์เท่ากับร้อยละ 95 และมีความถี่ของการเปลี่ยนจากโพรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ปกติเท่ากับร้อยละ 4 และเมื่อทำการคัดเลือกลูกผสมโดยใช้สีของดอกเห็ด ปริมาณของโปรตีนและกรดอะมิโนของลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ พบว่าลูกผสมที่ได้มีปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังคัดเลือกลูกผสมโดยการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ พบว่าลูกผสมที่ได้มีลักษณะบางอย่างแตกต่างไปจากสายพันธุ์พ่อแม่

Takehara *et al.* (1993) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ด *P. ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer กับเห็ด *P. pulmonarius* (Fr.) Quel และระหว่างเห็ด *P. pulmonarius* (Fr.) Quel กับเห็ด *P. cornucopiae* (Paul.) Rolla. Var. *citrinopileatus* (Sing.) Ohira. โดยใช้โพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดที่มีนิวเคลียสเดี่ยวสายพันธุ์กลายที่ต้องการสารบางชนิดในการเจริญเติบโต พบว่าลูกผสมที่ได้จากทั้ง 2 คู่ผสมพันธุ์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับเห็ด *P. pulmonarius*

Imada *et al.* (1999) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อ *Micromonospora* 2 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซินแต่สามารถใช้น้ำตาลแรฟฟิโนสในการเจริญเติบโตได้ กับเชื้อ *Streptomyces griseus* 1 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซินแต่ไม่สามารถนำน้ำตาลแรฟฟิโนสไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ โดยใช้สารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอลในการรวม ได้โคโลนีของเชื้อลูกผสมที่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซินและสามารถนำน้ำตาลแรฟฟิโนสไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ โดยความถี่ของการเกิดลูกผสมเท่ากับ 2×10^6 โพรโตพลาสต์/มล. และมีลูกผสม 2 ตัวอย่างจากลูกผสมทั้งหมด 31 ตัวอย่างสามารถสร้างสารซึ่งอาจเป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่แตกต่างจากยาปฏิชีวนะสเตรปโทมัยซินที่ได้จากเชื้อ *S. griseus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hanson and Howell (2002) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยการใช้เทคนิคการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อรา *T. virens* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ซึ่งทำให้เกิดโรครากเน่าโคนเน่า กับเชื้อรา *T. koningii* ซึ่งมีคุณสมบัติในการเก็บรักษาไว้ได้นานแต่มีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* โดยใช้สารโพลีเอทรีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุล 4,000 พบว่ามีลูกผสม 1 ตัวอย่างจากลูกผสมทั้งหมด 5 ตัวอย่างที่ยังคงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* เมื่อเก็บไว้นานมากกว่า 1 ปี



บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ชนิดของเห็ดที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ได้แก่

3.1.1 เห็ดนางรม (oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*)

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

3.1.3 เห็ดนางรมทอง (golden oyster mushroom, *Pleurotus citrinopileatus*)

3.1.4 เห็ดนางนวล (pink oyster mushroom, *Pleurotus djamor*)

3.1.5 เห็ดเป่าฮื้อ (abolone mushroom, *Pleurotus cystidiosus*)

หัวเชื้อเห็ด (spawn) ของเห็ดนางรมและเห็ดนางฟ้าได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรุณฤๅก จังหวัดนครปฐม

3.2 อุปกรณ์ในการดำเนินงาน

3.2.1 กล้องจุลทรรศน์ light microscope (Optihot ; objectives : 4, 10, 40 และ 100X ; eyepieces : model UFX-DX) จากบริษัท Olympus Optical Co.Ltd., Japan

3.2.2 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ จากบริษัท Pyrex, U.S.A.

3.2.3 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้แรงดันไอน้ำ (autoclave, Tomy : model autoclave SS-325) จากบริษัท Tomy Seiko Co.Ltd., Japan

3.2.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, Cyber Scan : model pH2000) จากบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore

3.2.5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (mettler-toledo : model PG 5002) จากบริษัท Scientific Promotion Co,Ltd., ประเทศไทย

3.2.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (mettler-toledo : model AG 2047) จากบริษัท Scientific Promotion Co,Ltd., ประเทศไทย

3.2.7 เครื่องเขย่า (orbital shaker, edison : model 4230) จากบริษัท Gemmy Industrial Co., Taiwan

3.2.8 เครื่องหมุนเหวี่ยง (refrigerated centrifuge, Sanyo : model Falcon 6/300) จากบริษัท Sanyo, Japan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.9 ชุดกรองแบคทีเรีย (millipore filter) และแผ่นเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากบริษัท Millipore Corporation, U.S.A.

3.2.10 ซินเตอร์กลาส ฟิลเตอร์ (sinter glass filter, DURAN) จากบริษัท Schott, Germany

3.2.11 ตู้เป่าเชื้อ (laminar air flow, ISSCO : model HS 123) จากบริษัท Dwyer Instruments, INC. U.S.A.

3.2.12 ตู้บ่มเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated incubator, SHEL LAB : model 2020) จากบริษัท Sheldon Manufacturing, INC. U.S.A.

3.2.13 ตู้อบชนิดลมร้อน (hot-air oven, SHEL LAB : model 1375FX) จากบริษัท Sheldon Manufacturing, INC. U.S.A.

3.2.14 ตู้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) จากบริษัท Gemmy Industrial Co., Taiwan

3.2.15 ไมโครปิเปต (micropipette) จากบริษัทกิบไทย ประเทศไทย

3.2.16 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) จากบริษัท Boeco, Germany

3.2.17 ลูกปัดแก้ว (glass bead) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.50 ซม.

3.2.18 เครื่องนับเซลล์ (cell counter) จากบริษัท Gemmy Industrial Co.

3.2.19 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จากบริษัท Memmert, Germany

3.2.20 ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากบริษัท ชันโย ยูนิเวอร์แซลอิเล็กทริก จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย

3.2.21 โกร่งบดยา

3.2.22 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแนวดิ่ง จากบริษัท Bio-rad laboratory, U.S.A

3.2.23 กล้องถ่ายภาพดิจิทัล (digital camera, digital Mavica MVC-FD73) จากบริษัท โซนี่, ประเทศไทย

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.1 กลูโคส (glucose) จากบริษัท Fluka, Switzerland

3.3.1.2 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) จากบริษัท Merck, Germany

3.3.1.3 เปปโตน (peptone) จากบริษัท Fluka, Switzerland

3.3.1.4 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) จากบริษัท Merck, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.5 มอลต์สกัด (malt extract) จากบริษัท Fluka, Switzerland

3.3.1.6 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) จากบริษัท Merck, Germany

3.3.1.7 วุ้นผง (agar) จากบริษัท Difco, U.S.A.

3.3.1.8 อาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (potato dextrose agar, PDA) จากบริษัท Difco, U.S.A.

3.3.2 สารเคมีสำหรับแยกโปรโตพลาสต์

3.3.2.1 ซอร์บิทอล (sorbitol) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.2.2 ซูโครส (sucrose) จากบริษัท Fluka, Switzerland

3.3.2.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากบริษัท Merck, Germany

3.3.2.4 มาลิกอิกแอนไฮไดรด์ (maleic anhydride) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.2.5 แมนนิทอล (mannitol) จากบริษัท Fluka, Switzerland

3.3.2.6 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) จากบริษัท Merck, Germany

3.3.2.7 ไลซิงเอนไซม์ (Lysing Enzyme :L-1412) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.3 สารเคมีสำหรับรวมโปรโตพลาสต์

3.3.3.1 โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol-6000) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.3.2 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) จากบริษัท Merck, Germany

3.3.4 สารเคมีสำหรับการศึกษาไอโซไซม์

3.3.4.1 อะซิโตน (acetone) จากบริษัท Sharlau Chemie S.A., Spain

3.3.4.2 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) จากบริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

3.3.4.3 อะคริลามิด (acrylamide) จากบริษัท Amersham International, England

3.3.4.4 บิส-อะคริลามิด (bis-acrylamide) จากบริษัท Amersham International, England

3.3.4.5 กรดซิตริก (citric acid) จากบริษัท Baker analyzed, U.S.A.

3.3.4.6 เทตระเมทิลีนไดอามีน (tetramethylenediamine) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.4.7 บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) จากบริษัท Fluka, Switzerland

3.3.4.8 กลีเซอรอล (glycerol) จากบริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

3.3.4.9 บิวทานอล (butanol) จากบริษัท Merck, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4.10 ทริส-เบส (Tris-base) จากบริษัท Promega Corporation, U.S.A

3.3.4.11 ไกลซีน (glycine) จากบริษัท Promega Corporation, U.S.A

3.3.4.12 ฟาสต์บลูอาร์อาร์ซอลท์ (fast blue RR salt) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.4.13 อัลฟาแนปทิลอะซิเตท (α -naphthyl acetate) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.4.14 กรดมาลิก (malic acid) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.4.15 แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride) จากบริษัท Fluka, Switzerland

3.3.4.16 ฟีนาไซด์เมโทซัลเฟต (phenazine methosulphate) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.4.17 ไนโตรบลูเททราโซเลียม (nitro blue tetrazolium, NBT) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.4.18 เมทิลไทอาโซลิลเททราโซเลียม (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)

3.3.4.19 นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP)

3.4 วิธีการวิจัย

3.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.4.1.1 การเตรียมเส้นใยเห็ด

นำหัวเชื้อเส้นใยเห็ดแต่ละชนิด (รวม 5 ชนิด คือ เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมขาว และเห็ดเป๋าฮื้อ) มาเลี้ยงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารฟิดีเอ (PDA, Potato Dextrose Agar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน นำเส้นใยเห็ดที่ได้มาทำการทดลองในข้อต่อไป

3.4.1.2 การวัดขนาดของเส้นใยเห็ด

นำเส้นใยเห็ดแต่ละชนิดที่เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อฟิดีเอมาทำสไลด์ แล้วนำมาศึกษาลักษณะของเส้นใยและวัดขนาดของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีไมโครมิเตอร์ (micrometer) ติดตั้งอยู่ด้วย โดยทำการสุ่มวัดเส้นใยประมาณ 100 เส้นแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.4.1.3 การเพาะเห็ดเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเส้นใยเห็ดแต่ละชนิดที่มีอายุประมาณ 7 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อฟิดีเอ มาจำนวนเล็กน้อยใส่ลงในขวดที่บรรจุเมล็ดข้าวฟ่างต้มสุกซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเส้นใยเห็ดเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง นำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ขึ้นไปใส่ในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูป เมื่อเส้นใยเห็ดเจริญเต็มก้อนขี้เลื่อยจะทำการเปิดดอก นำดอกเห็ดที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเต็มที่แล้วมาทำการศึกษาลักษณะภายนอกและภายใน โดยศึกษาลักษณะภายนอกจะทำการศึกษา สีของสปอร์พิมพ์และลักษณะของดอกเห็ด (ซึ่งจะศึกษาลักษณะของส่วนต่างๆ ของดอก ได้แก่ ก้านดอก การยึดติดของครีบกับก้านดอก หมวกดอก และเนื้อเห็ด) ส่วนลักษณะภายในจะศึกษารูปร่างและขนาดของสปอร์ ลักษณะของเส้นใยและไฮมีเนียม (Walting, 1973)

3.4.1.4 การทำสปอร์พิมพ์

นำดอกเห็ดทั้ง 5 ชนิด ที่เจริญเต็มที่มาตัดส่วนก้านออกแล้วนำมาคว่ำลงบนปีกเกอร์ซึ่งภายในมีแผ่นกระดาษกรองตัดเป็นแผ่นกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ในที่ปลอดลม เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง นำหมวกเห็ดดอกออกแล้วปิดปีกเกอร์ด้วยกระดาษฟอยล์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จะได้สปอร์พิมพ์ที่ปราศจากเชื้อบนกระดาษกรอง เก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

3.4.2 การเตรียมเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

นำแผ่นสปอร์พิมพ์ 1 แผ่นใส่ลงในน้ำกลั่น 5 มล. ที่มีทวิน 80 (tween 80) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นของสปอร์ประมาณ 1×10^3 สปอร์/มล. ใส่น้ำตาลแขวนลอยสปอร์ประมาณ 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารวอเตอร์อาการ์ (WA, water agar) ที่มีคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) 50 มก./มล. เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 วัน นำมาตอกลงกล้องจุลทรรศน์ ตัดชิ้นวุ้นซึ่งมีสปอร์ที่กำลังงอกเจริญ (germ tube) มาเลี้ยงในหลอดอาหารผิวเอียงพีดีเอ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร เชื้อเส้นใยที่เจริญอยู่มาตอกลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อให้แน่ใจว่าเส้นใยที่ได้นั้นเป็นเส้นใยโมโนคาร์ร็อนที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว ซึ่งจะต้องไม่พบแคลมป์คอนเนคชัน จากนั้นจึงนำหลอดที่มีเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

3.4.3 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

การศึกษหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาถึงความแตกต่างของปัจจัยที่มีต่อการเจริญของเส้นใย ทั้งนี้เพื่อให้ได้เส้นใยปริมาณมากสำหรับนำไปศึกษาในขั้นต่อไป ซึ่งวิธีการทดลองมีดังต่อไปนี้

ตัดเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวด้วย cork borer ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. แล้วนำชิ้นเส้นใยที่ตัดได้มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ วัดการเจริญเติบโตโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีที่มีอายุ 9 วัน โดยทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยดังต่อไปนี้

3.4.3.1 ศึกษาหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย ซึ่งชนิดของอาหารที่ใช้ได้แก่ วอเตอร์อาร์ก้า ฟิดีเอ และมอลต์สกัดอาร์ก้า (MEA, malt extract agar) (ภาคผนวก ก) ที่มีพีเอช 6.0 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง

3.4.3.2 ศึกษาหาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย ค่าพีเอชที่ศึกษาได้แก่ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 สำหรับอาหารที่ใช้คืออาหารที่เหมาะสมสำหรับเห็ดแต่ละชนิดที่เป็นผลจากการศึกษาในข้อ 3.4.3.1 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง

3.4.3.3 ศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย อุณหภูมิที่ศึกษาได้แก่ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส สำหรับชนิดและพีเอชของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเห็ดแต่ละชนิดจะขึ้นกับผลการทดลองในข้อ 3.4.3.1 และ 3.4.3.2

3.4.4 การศึกษาหาสภาวะบางประการที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

เมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวในข้อ 3.4.3 แล้ว จะนำเส้นใยที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเห็ดแต่ละชนิดมาทำการศึกษหาปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ทำการศึกษาหาสภาวะที่มีผลต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ ชนิดและความเข้มข้นของออสโมติกสเตรสโมลิเชอร์

3.4.4.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

นำเส้นใยเห็ดแต่ละชนิดมาเลี้ยงในอาหารเหลวมอลต์สกัด พีเอช 7.0 ปริมาตร 30 มล. (ในขวดรูปชมพู่ขนาด 150 มล.) เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงแยกเส้นใยเห็ดมาเลี้ยงในอาหารเหลวมอลต์สกัด พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 มล. (ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.) ที่มีถูกปิดแก้ว 20 ลูกบรจุอยู่ นำไปแช่ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับเห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมขาว และเห็ดเป๋าฮื้อ ส่วนเห็ดนางฟ้านำไปแช่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อไปทำการเก็บเส้นใยโดยปั่นแยกที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ล้างเส้นใยที่ได้ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แล้วจึงล้างด้วยโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ก) 1 ครั้ง จากนั้นนำเส้นใยปริมาณ 0.3 กรัมใส่ลงในสารละลายไลซิงเอนไซม์ (Lysing Enzyme, เป็นชื่อทางการค้าของเอนไซม์ ซึ่งสกัดมาจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum*) 3 มล. โดยใช้เมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์ (ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) เป็นออสโมติกสเตรสโมลิเชอร์ (ภาคผนวก ก) เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ ซึ่งไลซิงเอนไซม์เป็นเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) โปรติเอส (protease) และ เซลลูเลส (cellulase) โดยแปรผันความเข้มข้นเป็น 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มก./มล. และแช่ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.4.4.2 ชนิดของออสโมติกสเทปีไลเซอร์

นำเส้นใยเห็ดอายุ 4 วัน (เลี้ยงและเก็บเส้นใยตามวิธีในข้อ 3.4.4.1) ปริมาณ 0.3 กรัม ใส่ลงในสารละลายไคซิงเอนไซม์โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.4.4.1 (ได้แก่ 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ตามลำดับ) ที่มีออสโมติกสเทปีไลเซอร์ชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้ โปแทสเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต และซอร์บิทอล ที่ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ (ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) ปริมาตร 3 มล. นำไปแช่ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับจำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.4.4.3 ความเข้มข้นของออสโมติกสเทปีไลเซอร์

นำเส้นใยเห็ดอายุ 4 วัน (เลี้ยงและเก็บเส้นใยตามวิธีในข้อ 3.4.4.1) ปริมาณ 0.3 กรัม ใส่ลงในสารละลายไคซิงเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเห็ดแต่ละชนิดซึ่งได้จากการทดลองที่ 3.4.4.1 (ได้แก่ 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ตามลำดับ) และชนิดของสารออสโมติกสเทปีไลเซอร์ที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 3.4.4.2 (คือ แมกนีเซียมซัลเฟต) และแปรผันความเข้มข้นของออสโมติกสเทปีไลเซอร์ให้เป็น 0, 0.3, 0.6, 0.9 และ 1.2 โมลาร์/ปริมาตร 3 มล. นำไปแช่ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นับจำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.4.5 การศึกษาลักษณะและอัตราการสร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ของโพรโตพลาสต์

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ดแต่ละชนิดแล้วจะทำการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ดแต่ละชนิดโดยใช้สภาวะดังกล่าวคือเลี้ยงเส้นใยเห็ดสายพันธุ์โมโนคารีออนของเห็ดแต่ละชนิด ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเหลวโมลท์สก็ด พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 มล. และมีลูกปิดแก้วบรรจุอยู่ 20 ลูก นำไปบ่มโดยการแช่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับเห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ส่วนเห็ดนางฟ้าใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน นำเส้นใยเห็ดที่ได้มาทำการแยกโพรโตพลาสต์โดยการบ่มด้วยสารละลายไคซิงเอนไซม์ (ที่ความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ) โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต (ความเข้มข้น 0.9, 0.9, 1.2, 0.9 และ 0.9 โมลาร์ ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) เป็นออสโมติกสเทปีไลเซอร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการแยกโพรโตพลาสต์ออกจากเส้นใยโดยการกรองผ่าน sinter glass filter แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยออสโมติกสเทปีไลเซอร์ 2 ครั้ง แล้วนำไปกระจายในออสโมติกสเทปีไลเซอร์ สังเกตลักษณะโพรโตพลาสต์ที่แยกได้ วัดขนาดของโพรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีไมโครมิเตอร์ติดตั้งอยู่ด้วย โดยทำการสุ่มวัดประมาณ 100 โพรโตพลาสต์แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย และทำการถ่ายภาพโพรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การศึกษาหาอัตราการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ ทำโดยเจือจางโพรโตพลาสต์ให้มีความเข้มข้น 1×10^4 โพรโตพลาสต์/มล. ใช้ไมโครปิเปตดูดสารแขวนลอยโพรโตพลาสต์ปริมาตร 0.1 มล. ไปเลี้ยงในอาหารที่ใช้สำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ซึ่งมีความเข้มข้นของวุ้นร้อยละ 3 แล้วเททับด้วยอาหารชนิดเดิมที่มีความเข้มข้นของวุ้นร้อยละ 0.5 (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส (เห็ดนางฟ้าบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ซึ่งจะรายงานเป็นร้อยละ ตามสมการดังนี้

$$\text{ความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่} = \frac{\text{จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ปกติ} \times 100}{\text{จำนวนโพรโตพลาสต์ทั้งหมด}}$$

3.4.6 การรวมโพรโตพลาสต์

การทดลองนี้จะทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทองเห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และระหว่างเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล ซึ่งทำได้โดยนำเส้นใยของเห็ดทั้ง 3 ชนิดมาแยกโพรโตพลาสต์โดยใช้สภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.4.4 เมื่อได้โพรโตพลาสต์แล้วจึงนำมากรองเอากากเส้นใยออกจากโพรโตพลาสต์ด้วย sinter glass filter แล้วนำไปปั่นแยกให้โพรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของไลซิงเอนไซม์ทิ้งอย่างช้าๆ แล้วล้างโพรโตพลาสต์ด้วยออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ 2 ครั้ง หลังจากนั้นทำการกระจายโพรโตพลาสต์ในออสโมติกสเตรปีไลเซอร์โดยให้มีความเข้มข้นโพรโตพลาสต์ประมาณ 1×10^6 โพรโตพลาสต์/มล. นำสารแขวนลอยโพรโตพลาสต์ของเห็ดที่ต้องการรวมโพรโตพลาสต์ชนิดละ 1 มล. มาใส่รวมกันในหลอดแก้วแล้วนำไปปั่นแยกให้โพรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วดูดสารละลาย PEG/ Ca^{2+} (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีโพรโตพลาสต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที โดยเขย่าหลอดเบาๆ ทุก 5 นาที จากนั้นเติมออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ลงไป 9 มล. แล้วนำไปปั่นแยกที่ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างโพรโตพลาสต์ด้วยออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ 2 ครั้ง เจือจางให้ได้โพรโตพลาสต์ 1×10^4 โพรโตพลาสต์/มล. แล้วจึงดูดสารแขวนลอยโพรโตพลาสต์ที่ผ่านการรวมกันแล้วจำนวน 0.1 มล. ไปเลี้ยงในอาหารที่ใช้สำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ซึ่งมีความเข้มข้นของวุ้นร้อยละ 3 ต่อไปทำการเททับด้วยอาหารชนิดเดิมที่มีความเข้มข้นของวุ้นร้อยละ 0.5 (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ทุกๆ วัน เมื่อพบการเกิดโคโลนีจะทำการเก็บโคโลนีที่เจริญอยู่เดี่ยวๆ มาเลี้ยงบนอาหารผิวแข็งมอลต์สเก็คดอาร์ โดยเลี้ยง 1 โคโลนีต่อ 1 หลอดทดลอง

3.4.7 การคัดเลือกลูกผสม

ในการทดลองนี้ทำการคัดเลือกลูกผสมโดยสังเกตจากการเกิดแคลมคอนเนคชั่นซึ่งทำได้โดย นำเส้นใยของเห็ดจากโคโลนีที่เก็บได้ภายหลังการรวมโพรโตพลาสต์ในข้อ 3.4.6 มาทำสไลด์ แล้วตรวจสอบการเกิดแคลมคอนเนคชั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกโคโลนีที่เกิดแคลมคอนเนคชั่นเพื่อนำไปทดสอบในข้อต่อไป

3.4.8 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสมเปรียบเทียบกับของพ่อแม่

3.4.8.1 การเจริญของเส้นใยและขนาดของเส้นใย

นำโคโลนีที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.7 มาเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม (จากการทดลองข้อ 3.4.3) เป็นเวลา 9 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและขนาดเส้นใยด้วยไมโครมิเตอร์เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ โดยทำการวัดแบบสุ่มทั้งหมด 100 ขั้ว แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.4.8.2 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเส้นใยเห็ดลูกผสม

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเส้นใยเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก *Pasteur et al.* (1988) และ ขนิษฐา พรเจริญโรจน์ (2543) โดยนำเส้นใยเห็ดแต่ละชนิดที่เลี้ยงในอาหารเหลวหมอลต์สก็ด พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน มากรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วล้างเส้นใยเห็ดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนำมาบดในโกร่งให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ตักเส้นใยที่บดแล้วใส่หลอดไมโครฟิวซ์ (microfuge tube) แล้วเติมบัฟเฟอร์ (extraction buffer) สำหรับใช้ในการสกัด (ภาคผนวก ข) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนใสมากลับไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งทำโดยนำส่วนใส 15 ไมโครลิตร มาผสมกับ sample buffer (Tris-HCl พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ กลีเซอรอลร้อยละ 10 และบรอมฟินอลบลูร้อยละ 0.025) 5 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปใส่ในช่องของเจลที่อยู่ในชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส ช่องละ 1 ตัวอย่าง ต่อไปเปิดเครื่อง power supply ปรับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 200 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส ปิดเครื่อง power supply เมื่อแถบสีบรอมฟินอลบลูห่างจากขอบล่างของแผ่นเจลประมาณ 1 ซม. (ใช้เวลาประมาณ 45 นาที) ขึ้นต่อไปนำแผ่นเจลมาข้อมด้วยสารละลายยับยั้งสเตรทของเอนไซม์ เอสเทอร์ส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส บันทึกการแสดงผลของไอโซไซม์แต่ละชนิดเป็นภาพถ่ายและหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) (วิธีการเตรียมเจลและสารละลายยับยั้งสเตรทอยู่ในภาคผนวก ข)

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ } (R_f) = \frac{\text{ระยะทางที่แถบของเอนไซม์เคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่สีมาตรฐานเคลื่อนที่}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.8.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสม

นำเชื้อลูกผสมที่ได้มาเลี้ยงในอาหารมอลต์สัปดาห์ที่ 7.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อลูกผสมมาทำการขยายปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่าง เมื่อเส้นใยเห็ดเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่างจึงนำเมล็ดข้าวฟ่างใส่ลงในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูปสำหรับเพาะเห็ด เมื่อเส้นใยเจริญเต็มก้อนขี้เลื่อยแล้วจึงทำการเปิดดอกโดยการรดน้ำและให้ได้รับแสงแดดรำไร นำดอกเห็ดที่เกิดมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งลักษณะภายนอกและภายในอย่างละเอียด ตามวิธีการในข้อ 3.4.1.3

3.4.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองในข้อ 3.4.3 และ 3.4.4 ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มทดลอง (CRD, Completely Randomized Design) โดยในแต่ละสิ่งทดลอง (treatment) จะทำการทดลอง 4 ซ้ำ ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA, analysis of variance) ถ้าค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองมีความแตกต่างกันจะนำผลที่ได้ไปตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4

ผลการทดลอง

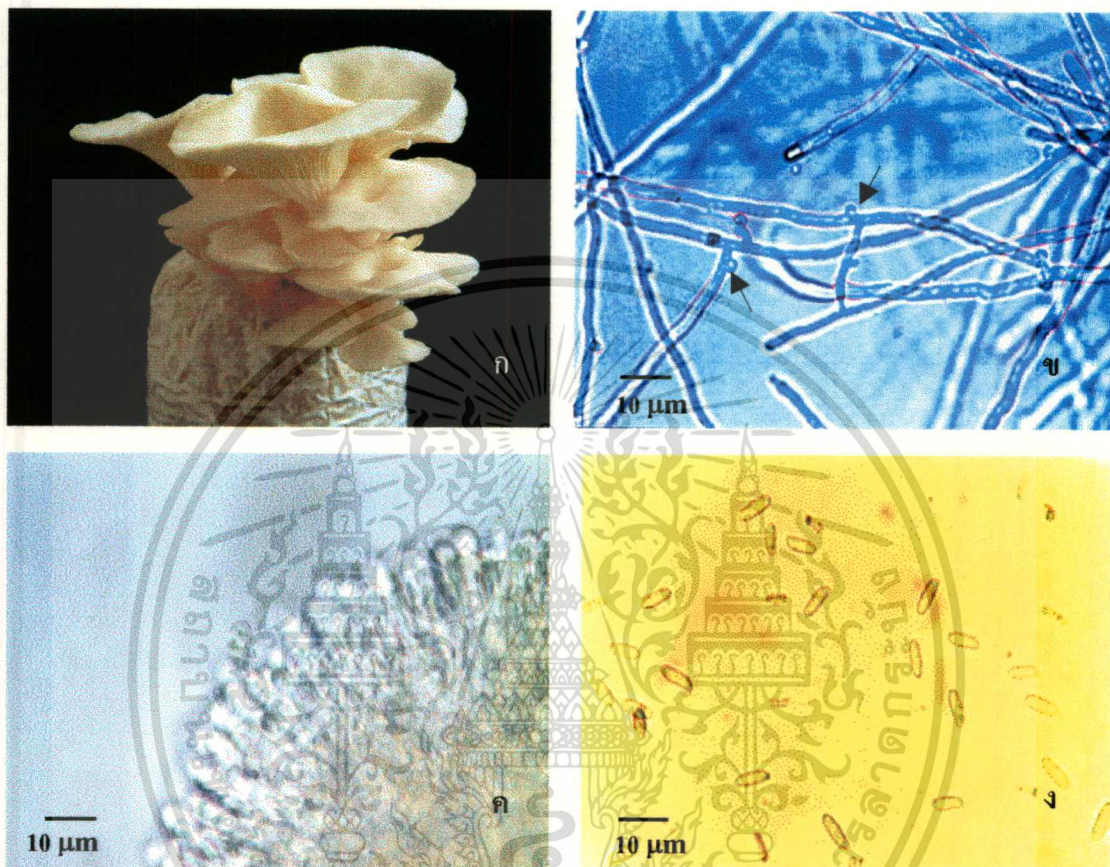
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการนำเชื้อเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ มาเพาะเลี้ยงแล้วศึกษารายละเอียดของลักษณะภายนอกและภายในรวมทั้งการสังเกตลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้มีลักษณะของเส้นใยและสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปที่คล้ายคลึงกัน (ภาพที่ 4.1-4.5) คือ เส้นใยเห็ดมีสีใส (hyaline) มีผนังกัน (septum) และมีแคลมป์คอนเนกชัน และเมื่อนำเส้นใยมาขยายปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่างแล้วนำไปเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย พบว่าดอกเห็ดขึ้นเป็นกลุ่ม โดยหมวกเห็ด (cap หรือ pileus) จะมีรูปร่างคล้ายพัด เปลือกหอย หรือปากแตร ผิวของดอกเห็ดมีลักษณะเรียบ ก้านดอกมีขนาดสั้นและสีเดียวกับดอกเห็ดหรือจางกว่าเล็กน้อย เนื้อเห็ด (texture) มีลักษณะสดและอ่อนนุ่ม ได้ดอกเห็ดมีครีบ (gills หรือ lamellae) สีเดียวกับดอกเห็ดหรือจางกว่าเล็กน้อย ซึ่งเรียงตัวติดกับก้านดอก (stalk หรือ stipe) แบบดีเคอเรนท์ (decurrent) โดยครีบจะเรียงตัวเป็นระเบียบและขยายลงทางด้านล่างของก้านชัดเจน ส่วนของครีบประกอบด้วยซิสทีเดีย (cystidia) แบบกระบอกแทรกอยู่ระหว่างเบสิดิยา (basidia) ซึ่งเป็นแบบโฮโลเบสิดิยา (holobasidia) ที่มีสเตอริกมา (sterigma) 4 อัน และที่ส่วนปลายของสเตอริกมาแต่ละอันมีสปอร์ยึดติดอยู่ สปอร์เหล่านี้เรียกว่าเบสิดิโอสปอร์ (basidiospores) ซึ่งมีรูปร่างยาวรี สีใส ผิวเรียบ และที่ปลายด้านหนึ่งของสปอร์ซึ่งเป็นด้านที่ยึดติดอยู่กับสเตอริกมาจะมีติ่งยื่นออกมาเรียกว่า hilar appendix

สำหรับลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างเห็ด 5 ชนิดนี้ พบว่าเห็ดเหล่านี้มีความแตกต่างกันเล็กน้อยในด้านของสีและขนาดของส่วนต่างๆ ของดอกเห็ด สปอร์ และเส้นใย รวมทั้งพบว่าการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) ที่มีชื่อเรียกว่า คอนิเดีย (conidia, เอกพจน์เรียก conidium) บนแต่ละโครงสร้างที่เรียกว่า คอร์เมียม (coremium, พหูพจน์เรียกว่า coremia) ในอาหารเลี้ยงเชื้อของเห็ดเป่าฮื้อ แต่ไม่พบในเห็ดอื่นๆ อีก 4 ชนิด (ตารางที่ 4.1)

4.2 ผลการแยกสปอร์เดี่ยว

จากการทำแผ่นสปอร์พิมพ์ของเห็ดทั้ง 5 ชนิด แล้วนำแผ่นสปอร์พิมพ์ที่ได้มาทำการแยกสปอร์เดี่ยว จากนั้นจึงได้คัดเลือกเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวซึ่งจะไม่มีแคลมป์คอนเนกชัน ทำให้ได้เส้นใยที่เป็นสายพันธุ์โมโนคาริโออน ทั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกเส้นใยที่เป็นสายพันธุ์โมโนคาริโออนของเห็ดแต่ละชนิด ชนิดละประมาณ 20 สายพันธุ์ แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่เจริญดีที่สุดบนอาหารพิดีเอ (พีเอช 6.0 ที่อุณหภูมิห้อง) เพื่อเป็นสายพันธุ์โมโนคาริโออนสำหรับการทดลองในขั้นตอน 4.3-4.5



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดนางรม

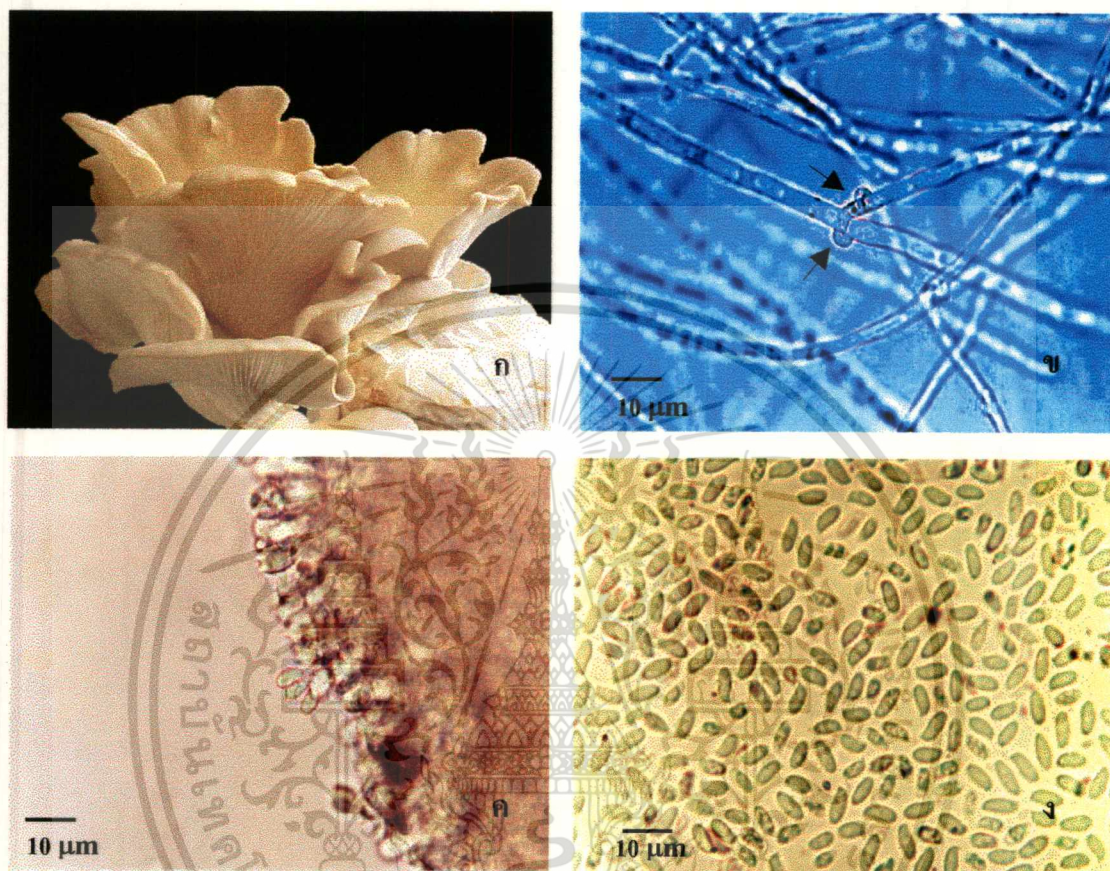
ก. ดอกเห็ดที่เจริญบนก้อนจี้เลื่อย

ข. เส้นใยเห็ดชนิดไคลาเรียม (มีแคลมป์คอนเนกชัน)

ค. ไฮมีเนียม

ง. เบสิดิโอสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



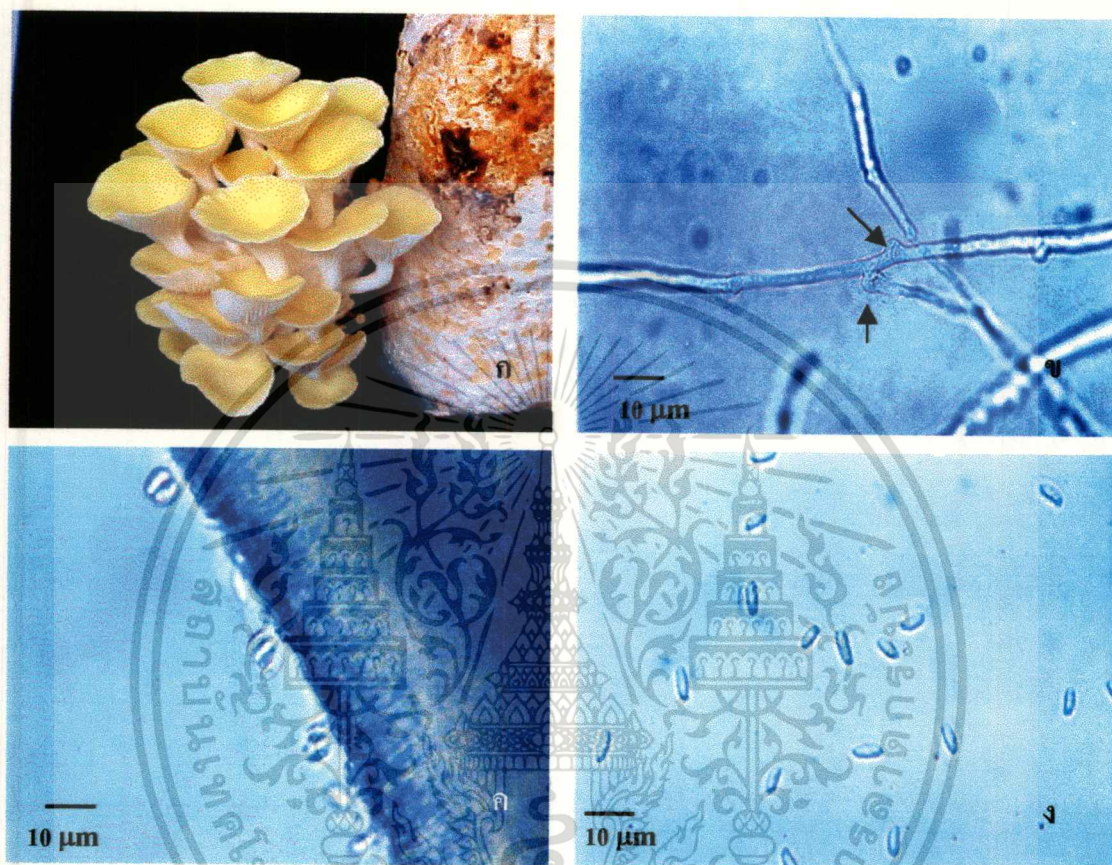
ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดนางฟ้า

ก. ดอกเห็ดที่เจริญบนก้อนขี้เลื่อย

ข. เส้นใยเห็ดชนิดไคคาร์รียอน (มีแคลมป์คอนเนคชัน)

ค. ไฮมีเนียม

ง. เบสิดิโอสปอร์



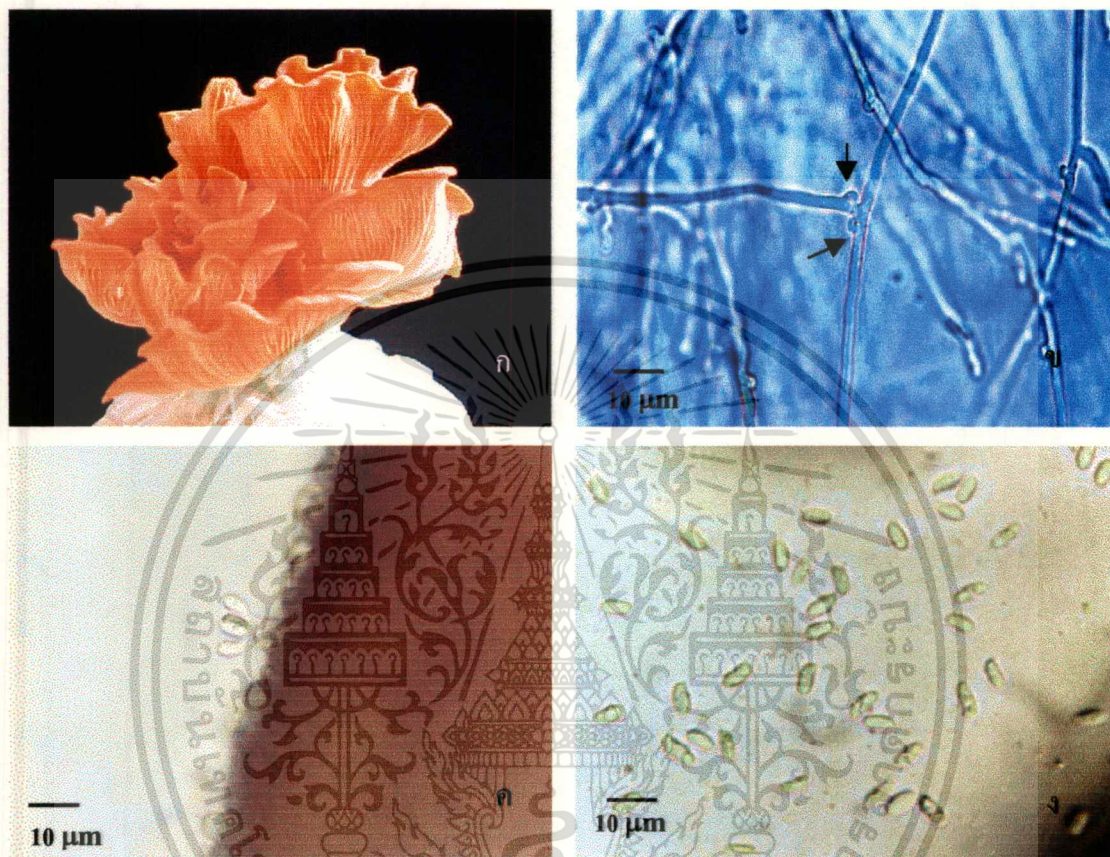
ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดนางรมทอง

ก. ดอกเห็ดที่เจริญบนก้อนขี้เลื่อย

ข. เส้นใยเห็ดชนิดไดคารีออน (มีแคลมป์คอนเนกชัน)

ค. ไฮมีเนียม

ง. เบสิดิโอสปอร์



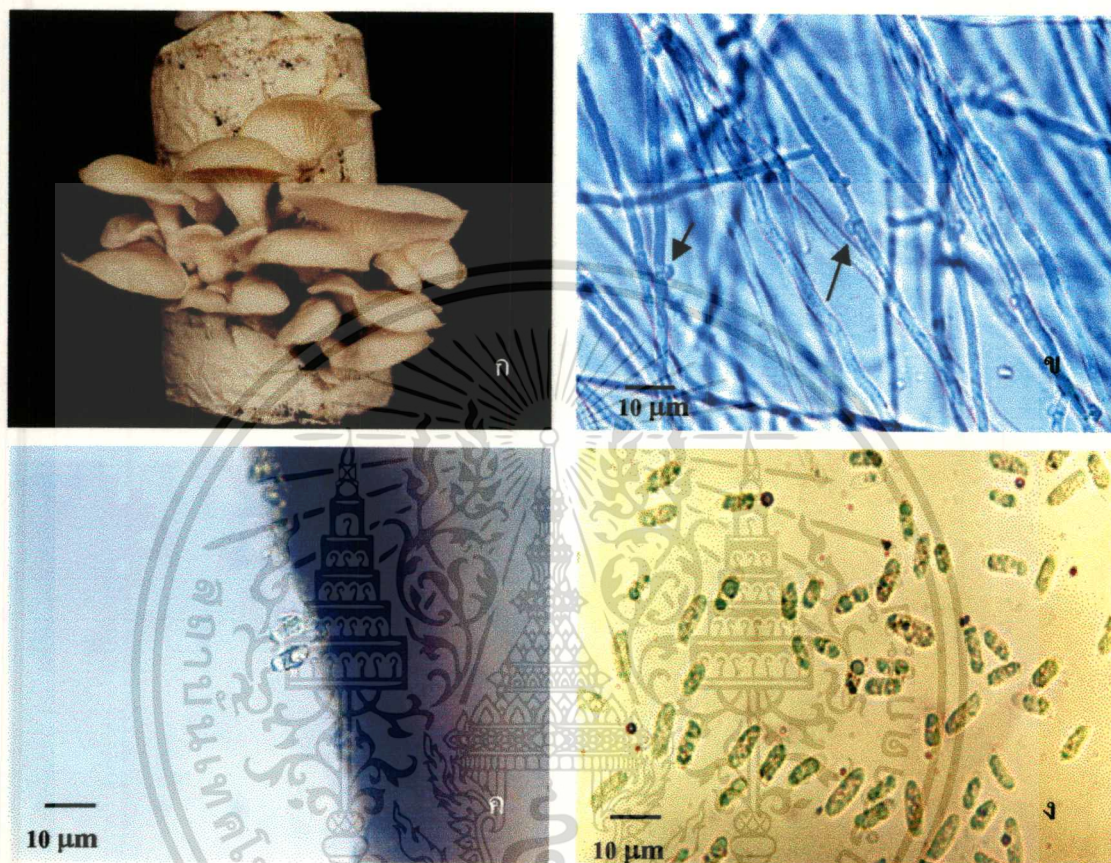
ภาพที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดนางนวล

ก. ดอกเห็ดที่เจริญบนก้อนขี้เลื่อย

ข. เส้นใยเห็ดชนิดไดคารีออน (มีเคลมปีคอนเนคชั่น)

ค. ไฮมีเนียม

ง. เบสิดิโอสปอร์



ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดเป่าฮื้อ

ก. ดอกเห็ดที่เจริญบนก้อนขี้เลื่อย

ข. เส้นใยเห็ดชนิดไคคาร์รอน (มีแคลมป์คอนเนกชัน)

ค. ไฮมีเนียม

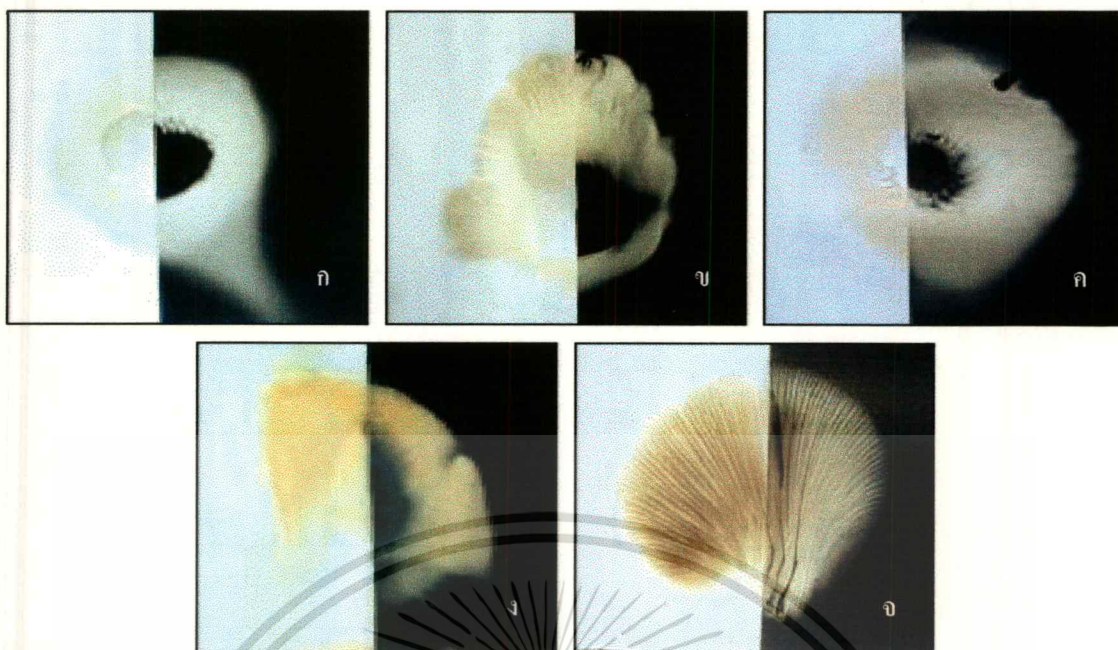
ง. เบสิดิโอสปอร์

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะที่แตกต่างกันของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ

ชนิดของเห็ด	หมวดเห็ด		ความยาว ของก้านดอก เฉลี่ย (เซนติเมตร)	สีของ สปอร์พิมพ์ ¹	ขนาดของ สปอร์เฉลี่ย (ไมโครเมตร)	ขนาดของเส้น ใยเฉลี่ย (ไมโครเมตร)	การสร้างสปอร์ แบบไม่อาศัยเพศ ในอาหารเลี้ยง เชื้อ (สร้าง conidia บน coremium) ²
	ขนาดเฉลี่ย (เซนติเมตร)	สี					
นางรม	4.93 x 5.68	สีขาวปนน้ำตาล	3.24 ± 0.56	สีขาวครีม	3.70 x 10.53	2.43 ± 0.69	ไม่พบ
นางฟ้า	9.40 x 15.83	สีเทาปนน้ำตาลอ่อน	3.25 ± 0.48	สีครีม	3.93 x 9.93	2.67 ± 0.52	ไม่พบ
นางรมทอง	3.34 x 3.72	สีเหลืองอ่อนหรือเหลืองทอง	2.65 ± 0.34	สีเทาอมชมพู	3.32 x 7.42	2.38 ± 0.47	ไม่พบ
นางนวล	3.75 x 4.91	สีชมพู	1.24 ± 0.49	สีชมพูอมส้ม	4.00 x 7.58	2.24 ± 0.51	ไม่พบ
เป่าฮื้อ	5.16 x 8.03	สีน้ำตาลปนเทา	2.87 ± 0.31	สีครีมปนน้ำตาลอ่อน	6.40 x 15.20	2.85 ± 0.79	พบ

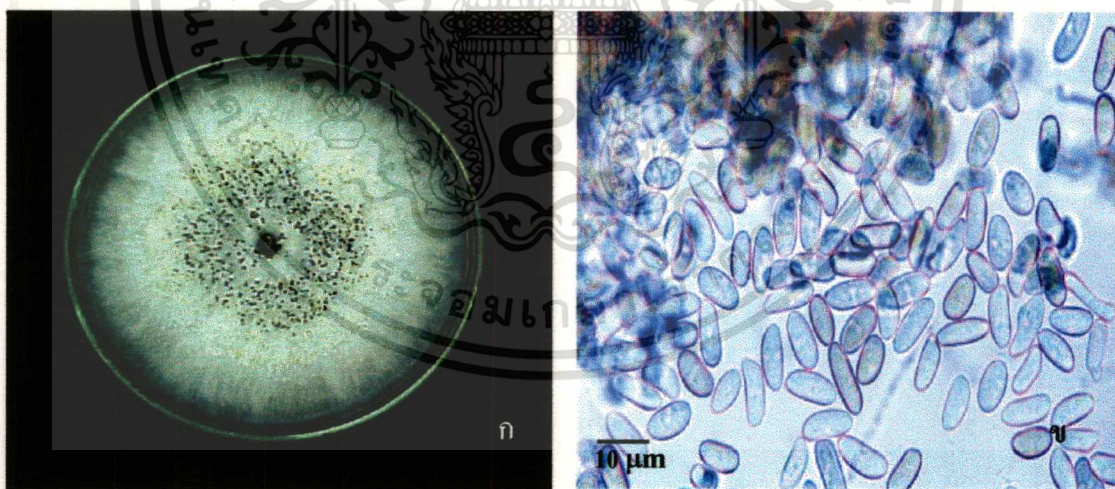
หมายเหตุ : 1 ภาพที่ 4.6

2 ภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.6 แสดงสปอร์พิมพ์ของเห็ดทั้ง 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus*

- ก. สปอร์พิมพ์ของเห็ดนางรม
- ข. สปอร์พิมพ์ของเห็ดนางฟ้า
- ค. สปอร์พิมพ์ของเห็ดนางรมทอง
- ง. สปอร์พิมพ์ของเห็ดนางนวล
- จ. สปอร์พิมพ์ของเห็ดเป๋าฮื้อ



ภาพที่ 4.7 แสดงการสร้างสปอร์แบบไม้อาศัยเพศในอาหารเลี้ยงเชื้อของเห็ดเป๋าฮื้อ

- ก. เส้นใยเห็ดเป๋าฮื้อเมื่อเจริญบนอาหารมอลต์สกัด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน (จุดดำๆ คือ คอนิเดียม)
- ข. ลักษณะคอนิเดียม (บนคอนิเดียม) ของเห็ดเป๋าฮื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดีย

จากการทดลองเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ที่เจริญมาจากสปอร์เดีย โดยได้ทำการศึกษาหาชนิดของอาหาร พิเศษของอาหาร และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ได้ผลการทดลองดังนี้

4.3.1 การศึกษาหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ที่เจริญมาจากสปอร์เดีย

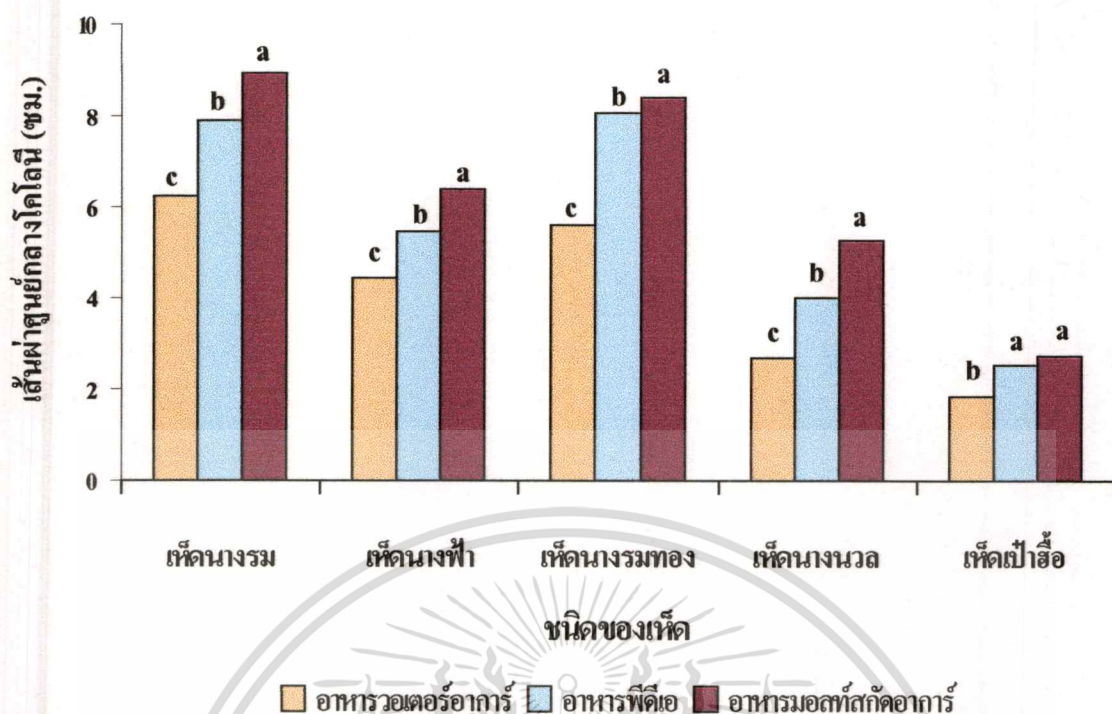
การทดลองนี้ได้ทำการทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเห็ดทั้ง 5 ชนิดที่เจริญมาจากสปอร์เดียบนอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ อาหารวอเตอร์อาร์ก้า อาหารฟิดีโอ และอาหารมอลท์สก็ด และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 9 วัน แล้วทำการวัดการเจริญของเส้นใย โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี ซึ่งพบว่าความยาวเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดนางรมบนอาหารทั้ง 3 ชนิดเท่ากับ 6.25, 7.92 และ 8.94 ซม. ตามลำดับ เห็ดนางฟ้าเท่ากับ 4.44, 5.48 และ 6.40 ซม. ตามลำดับ เห็ดนางรมทองเท่ากับ 5.59, 8.03 และ 8.40 ตามลำดับ เห็ดนางนวลเท่ากับ 2.70, 4.02 และ 5.29 ซม. ตามลำดับ และเห็ดเป่าฮื้อเท่ากับ 1.84, 2.54 และ 2.73 ซม. ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ภาคผนวก ค) พบว่ามีอาหารบางชนิดที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีโดยใช้วิธี DMRT (duncan's multiple range test) พบว่าเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวล เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารมอลท์สก็ดอาร์ก้า รองลงมาได้แก่ อาหารฟิดีโอ และอาหารวอเตอร์อาร์ก้า ตามลำดับ สำหรับเห็ดเป่าฮื้อพบว่าการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดบนอาหารวอเตอร์อาร์ก้ามีค่าต่ำสุด ส่วนบนอาหารฟิดีโอ และอาหารมอลท์สก็ดอาร์ก้าไม่มีความแตกต่างกัน แต่พบว่าบนอาหารมอลท์สก็ดอาร์ก้าเส้นใยเห็ดมีความหนาแน่นมากกว่าบนอาหารชนิดอื่น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอาหารมอลท์สก็ดอาร์ก้าเป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองพบว่าเห็ดเป่าฮื้อเจริญได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับเห็ดอื่นๆ (ภาพที่ 4.8 และตารางภาคผนวก ค)

4.3.2 การศึกษาหาพิเษที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ที่เจริญมาจากสปอร์เดีย

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ที่เจริญมาจากสปอร์เดียบนอาหารมอลท์สก็ดอาร์ก้าที่พิเษต่างๆ กันคือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 9 วัน จากนั้นทำการวัดผลการเจริญของเส้นใย โดยการวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี พบว่าพิเษของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิด โดยการวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดชนิดต่างๆ มีดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำเอกสารนี้ไปใช้ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



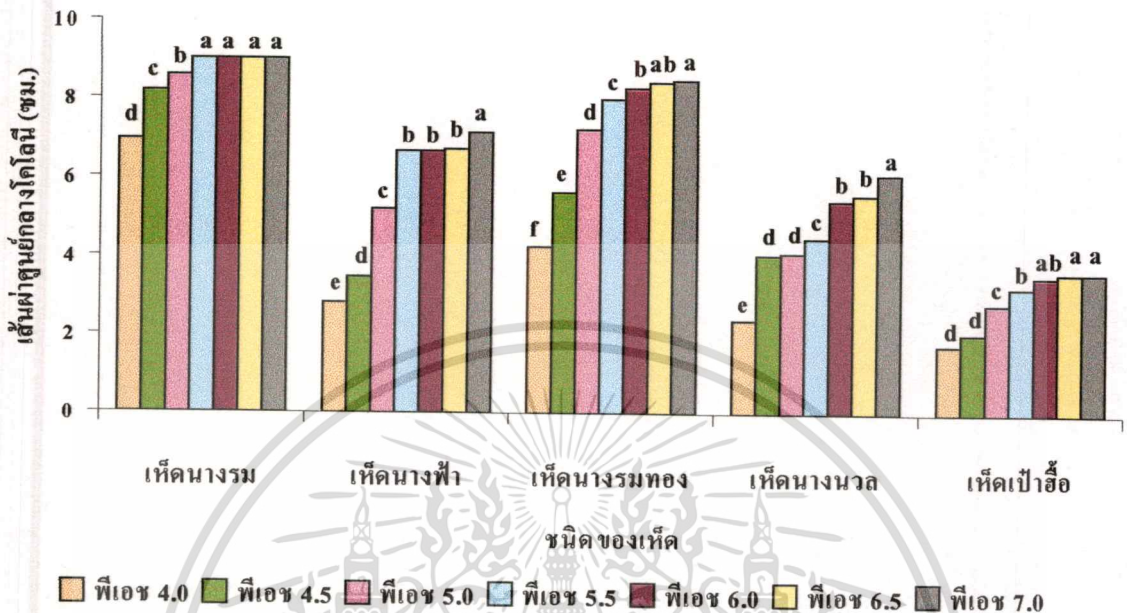
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในเห็ดชนิดเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็น $p < 0.05$

ภาพที่ 4.8 แสดงผลของการศึกษาหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงบนอาหารวอเตอร์อาร์การ์ อาหารฟีดเอ และอาหารมอลต์สก็ดอาร์การ์ พีเอช 6.0 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน

ความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีโดยเฉลี่ยของเห็ดนางรมที่พีเอชต่างๆ เท่ากับ 6.93, 8.21, 8.57, 9.00, 9.00, 9.00 และ 9.00 ซม. ตามลำดับ เห็ดนางฟ้าเท่ากับ 2.83, 3.46, 5.18, 6.66, 6.68, 6.73 และ 7.13 ซม. ตามลำดับ เห็ดนางรมทองเท่ากับ 4.23, 5.64, 7.23, 7.98, 8.29, 8.45 และ 8.50 ซม. ตามลำดับ เห็ดนางนวลเท่ากับ 2.38, 4.05, 4.09, 4.47, 5.42, 5.58 และ 6.10 ซม. ตามลำดับ และเห็ดเป่าฮื้อเท่ากับ 1.78, 2.07, 2.81, 3.24, 3.53, 3.60 และ 3.62 ซม. ตามลำดับ (ภาพที่ 4.9) ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ภาคผนวก ค) พบว่ามีค่าพีเอชบางค่าที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีโดยวิธี DMRT พบว่าที่พีเอช 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 เห็ดนางรมจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากัน ที่พีเอช 7.0 เห็ดนางฟ้าและเห็ดนางนวลมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีสูงกว่าที่พีเอชอื่นๆ ที่พีเอช 6.5 และ 7.0 เห็ดนางรมทองมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่พีเอช 7.0 เห็ดเป่าฮื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีไม่แตกต่างทางสถิติกับที่พีเอช 6.0 และ 6.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นสรุปได้ว่าฟีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ คือ 5.5-7.0, 7.0, 6.5-7.0, 7.0 และ 6.0-7.0 ตามลำดับ



หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในเห็ดชนิดเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ .05

ภาพที่ 4.9 แสดงผลของการศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงบนอาหารมอลต์สกัดดอกอาร์ที่พีเอชต่างๆ กัน และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน

4.3.3 การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

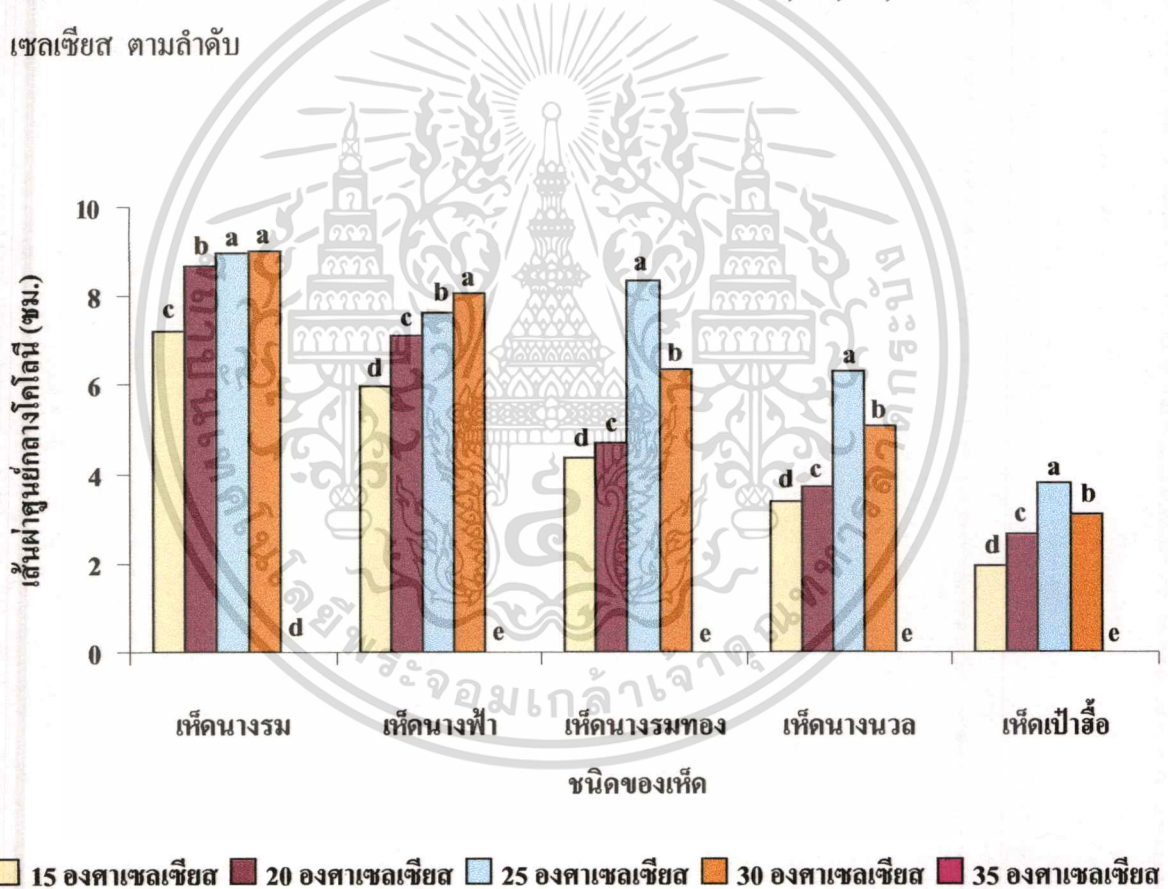
จากการทดลองเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวบนอาหารมอลต์สกัดดอกอาร์ พีเอช 7.0 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน จากนั้นจึงทำการวัดการเจริญของเส้นใยโดยวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.10 ซึ่งจะเห็นว่าที่อุณหภูมิต่างๆ เห็ดนางรมมีการเจริญเท่ากับ 7.20, 8.68, 8.98, 9.00 และ 0 ซม. ตามลำดับ เห็ดนางฟ้ามีการเจริญเท่ากับ 5.98, 7.09, 7.61, 8.08 และ 0 ซม. ตามลำดับ เห็ดนางรมทองมีการเจริญเท่ากับ 4.37, 4.69, 8.32, 6.33 และ 0 ซม. ตามลำดับ เห็ดนางนวลมีการเจริญเท่ากับ 3.37, 3.69, 6.32, 5.08 และ 0 ซม. ตามลำดับ และเห็ดเป่าฮื้อมีการเจริญเท่ากับ 1.93, 2.64, 3.81, 3.09 และ 0 ซม. ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ภาคผนวก ค) พบว่ามีบางอุณหภูมิที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลต่อการเจริญของเส้นใยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีโดยวิธี DMRT พบว่าเห็ดนางรมมีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีโดยเฉลี่ยสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมินี้เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีโดยเฉลี่ยของเห็ดนางรมไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เห็ดนางฟ้ามีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีโดยเฉลี่ยสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมินี้เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีโดยเฉลี่ยของเห็ดนางฟ้ามีความแตกต่างทางสถิติกับที่อุณหภูมิอื่นๆ ส่วนเห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวลและเห็ดเป่าฮื้อมีเส้นผ่าศูนย์กลางสูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมินี้เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีโดยเฉลี่ยของเห็ดทั้ง 3 ชนิดนี้มีความแตกต่างทางสถิติกับที่อุณหภูมิอื่นๆ

ดังนั้นจะเห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ คือ 25-30, 30, 25, 25 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ



หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในเห็ดชนิดเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

ภาพที่ 4.10 แสดงผลการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อใช้อาหารมอดที่สกัดจากอาร์พีเอส 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กัน เป็นเวลา 9 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาหาสภาวะบางประการที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

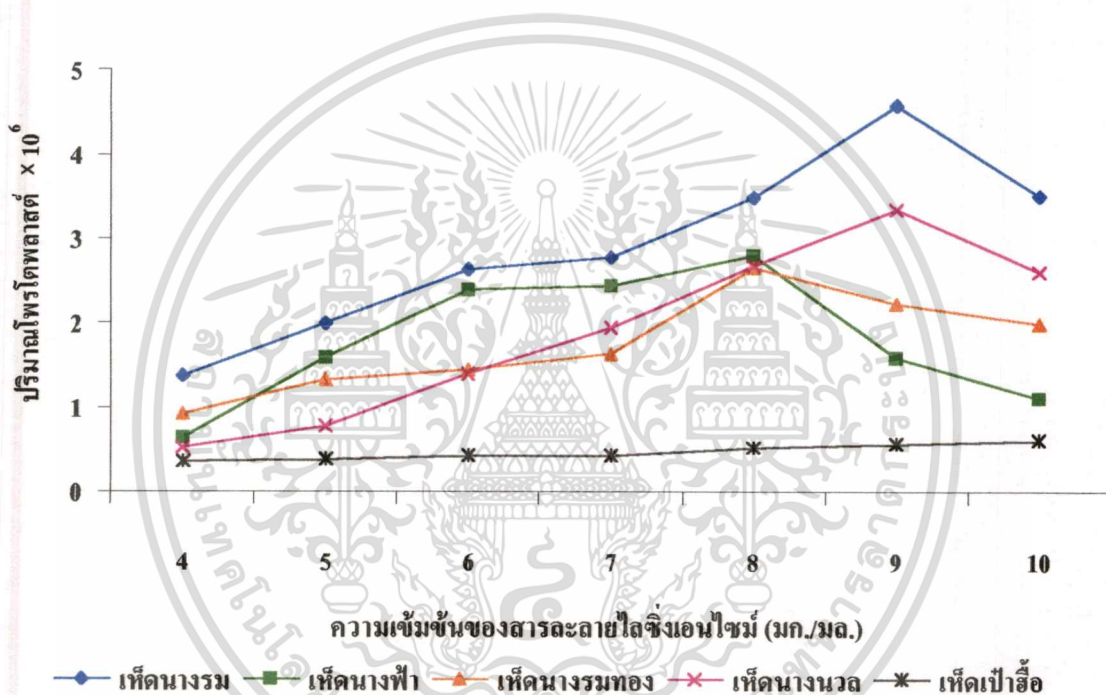
จากการนำเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์ร็อนซึ่งเจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ มาเลี้ยงในอาหารเหลวหมอลท์สการ์ด ที่พีเอช 7.0 และมีลูกบิดแก้ว 20 ลูกบรรจุอยู่ ตามด้วยการนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับเห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ส่วนเห็ดนางฟ้านำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นจึงได้นำเส้นใยเห็ดมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของไลซิงเอนไซม์ ชนิดและความเข้มข้นของออสโมติกสเทบีไลเซอร์ ได้ผลดังรายละเอียดต่อไปนี้

4.4.1 ความเข้มข้นของไลซิงเอนไซม์

จากการศึกษาหาความเข้มข้นของไลซิงเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์ร็อนของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ โดยการบ่มด้วยสารละลายไลซิงเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มก./มล. และใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์ (ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) เป็นออสโมติกสเทบีไลเซอร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเห็ดนางรมได้ปริมาณโปรโตพลาสต์เท่ากับ 1.38×10^6 , 2.00×10^6 , 2.65×10^6 , 2.78×10^6 , 3.50×10^6 , 4.59×10^6 และ 3.52×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ เห็ดนางฟ้าได้ปริมาณโปรโตพลาสต์เท่ากับ 0.64×10^6 , 1.60×10^6 , 2.41×10^6 , 2.46×10^6 , 2.82×10^6 , 1.59×10^6 และ 1.12×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ เห็ดนางรมทองได้ปริมาณโปรโตพลาสต์เท่ากับ 0.92×10^6 , 1.33×10^6 , 1.45×10^6 , 1.64×10^6 , 2.66×10^6 , 2.23×10^6 และ 2.00×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ เห็ดนางนวลได้ปริมาณโปรโตพลาสต์เท่ากับ 0.52×10^6 , 0.78×10^6 , 1.40×10^6 , 1.96×10^6 , 2.68×10^6 , 3.36×10^6 และ 2.61×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ และเห็ดเป่าฮื้อได้ปริมาณโปรโตพลาสต์เท่ากับ 0.36×10^6 , 0.37×10^6 , 0.42×10^6 , 0.43×10^6 , 0.53×10^6 , 0.58×10^6 และ 0.62×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ (ภาพที่ 4.11) ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ภาคผนวก ค) พบว่าในเห็ดแต่ละชนิดนั้นมีความเข้มข้นของไลซิงเอนไซม์บางระดับที่ให้ปริมาณโปรโตพลาสต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรโตพลาสต์ที่ได้โดยใช้วิธี DMRT พบว่าเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวลมีปริมาณโปรโตพลาสต์โดยเฉลี่ยสูงสุดที่ความเข้มข้นของไลซิงเอนไซม์ 9, 8, 8 และ 9 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งที่ความเข้มข้นเหล่านี้ปริมาณโปรโตพลาสต์โดยเฉลี่ยของเห็ดทั้ง 4 ชนิดนี้มีความแตกต่างทางสถิติกับปริมาณโปรโตพลาสต์โดยเฉลี่ยที่แยกได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของไลซิงเอนไซม์ที่ระดับอื่นๆ

และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไคซิงเอนไซม์ให้สูงขึ้นพบว่าปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จะลดลง ส่วนเห็ดเป่าฮื้อมีปริมาณโปรโตพลาสต์โดยเฉลี่ยที่ความเข้มข้นของไคซิงเอนไซม์ 10 มก./มล. สูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปริมาณโปรโตพลาสต์โดยเฉลี่ยที่แยกได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของไคซิงเอนไซม์ 9 มก./มล.

ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายไคซิงเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวล คือ 9, 8, 8 และ 9 มก./มล. สำหรับเห็ดเป่าฮื้อยังไม่ทราบความเข้มข้นของไคซิงเอนไซม์ที่เหมาะสม แต่จะใช้ไคซิงเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 10 มก./มล. ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 4.11 แสดงผลของความเข้มข้นของสารละลายไคซิงเอนไซม์ (4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มก./มล.) ที่มีต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด (อายุ 4 วัน) 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์ (ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) เป็นออสโมติกสเทบีไลเซอร์

4.4.2 ชนิดของออสโมติกสเทบีไลเซอร์

จากการศึกษาหาชนิดของออสโมติกสเทบีไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์บอนของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ โดยการนำเส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้มาบ่มด้วยสารละลายไคซิงเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิดตามลำดับ (จากผลการทดลองในข้อ 4.4.1)

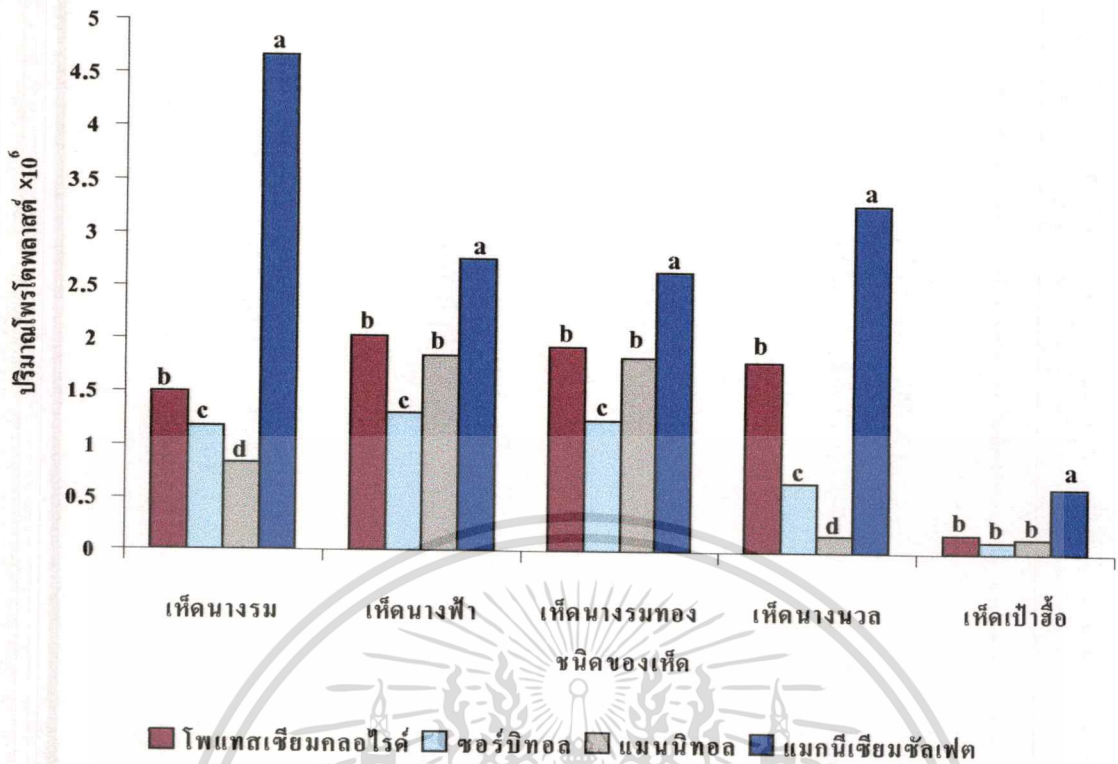
เอกสารนี้เป็นเอกสารผลงานสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้พิมพ์เผยแพร่แล้ว กรุณา
ไม่ทำการตีพิมพ์ซ้ำขึ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งมีสารชนิดต่างๆ กันได้แก่ โพแทสเซียมคลอไรด์ โซรบีทอล แมนนิทอล และแมกนีเซียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ (ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) เป็นออสโมติกสเดบิไลเซอร์ ตามด้วยการนำไปแช่ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้ออสโมติกชนิดต่างๆ เห็ดนางรมได้ปริมาณโพโตพลาสต์เท่ากับ 1.50×10^6 , 1.17×10^6 , 0.83×10^6 และ 4.67×10^6 โพโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ เห็ดนางฟ้าได้ปริมาณโพโตพลาสต์เท่ากับ 2.04×10^6 , 1.31×10^6 , 1.85×10^6 และ 2.76×10^6 โพโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ เห็ดนางรมทองได้ปริมาณโพโตพลาสต์เท่ากับ 1.93×10^6 , 1.24×10^6 , 1.83×10^6 และ 2.65×10^6 โพโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ เห็ดนางนวลได้ปริมาณโพโตพลาสต์เท่ากับ 1.80×10^6 , 0.67×10^6 , 0.17×10^6 และ 3.27×10^6 โพโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ และเห็ดเป่าส้อมได้ปริมาณโพโตพลาสต์เท่ากับ 0.18×10^6 , 0.12×10^6 , 0.15×10^6 และ 0.63×10^6 โพโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ (ภาพที่ 4.12) ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ภาคผนวก ค) พบว่าในเห็ดแต่ละชนิดนั้นมียออสโมติกสเดบิไลเซอร์บางชนิดที่มีผลทำให้ได้ปริมาณโพโตพลาสต์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณโพโตพลาสต์ที่แยกได้โดยใช้วิธี DMRT พบว่าเมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเป็นออสโมติกสเดบิไลเซอร์ เห็ดทั้ง 5 ชนิดมีปริมาณโพโตพลาสต์สูงสุดและแตกต่างทางสถิติกับปริมาณโพโตพลาสต์ที่แยกได้เมื่อใช้สารชนิดอื่นๆ เป็นสารออสโมติกสเดบิไลเซอร์

ดังนั้นแมกนีเซียมซัลเฟตจึงเป็นออสโมติกสเดบิไลเซอร์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ในการแยกโพโตพลาสต์ของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าส้อม

4.4.3 ความเข้มข้นของออสโมติกสเดบิไลเซอร์

จากการศึกษาหาความเข้มข้นของออสโมติกสเดบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพโตพลาสต์จากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์บอนของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าส้อม โดยนำเส้นใยเห็ดเหล่านี้มาบ่มด้วยสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ (ความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ) ที่มีแมกนีเซียมซัลเฟต (ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6, 0.9 และ 1.2 โมลาร์ ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) เป็นออสโมติกสเดบิไลเซอร์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้ (จากผลการทดลองในข้อ 4.4.2) ตามด้วยการนำไปแช่ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของออสโมติกสเดบิไลเซอร์เท่ากับ 0, 0.3, 0.6, 0.9 และ 1.2 โมลาร์ เห็ดนางรมมีปริมาณโพโตพลาสต์เท่ากับ 0 , 0.10×10^6 , 4.68×10^6 , 8.78×10^6 และ 6.17×10^6 โพโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ เห็ดนางฟ้ามีโพโตพลาสต์เท่ากับ 0 , 1.33×10^6 , 2.63×10^6 , 8.52×10^6 และ 6.32×10^6 โพโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ เห็ดนางรมทองมีโพโตพลาสต์เท่ากับ 0 , 1.50×10^6 , 2.65×10^6 ,



หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในเห็ดชนิดเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็น $p < 0.05$

ภาพที่ 4.12 แสดงผลของชนิดของออสโมติกสเทบิไลเซอร์ (โพแทสเซียมคลอไรด์ ซอร์บิทอล แมนนิทอล และแมกนีเซียมซัลเฟต ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) ที่มีต่อปริมาณโพรโพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* เมื่อบ่มและเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ไลซิงเอนไซม์ ที่มีความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ

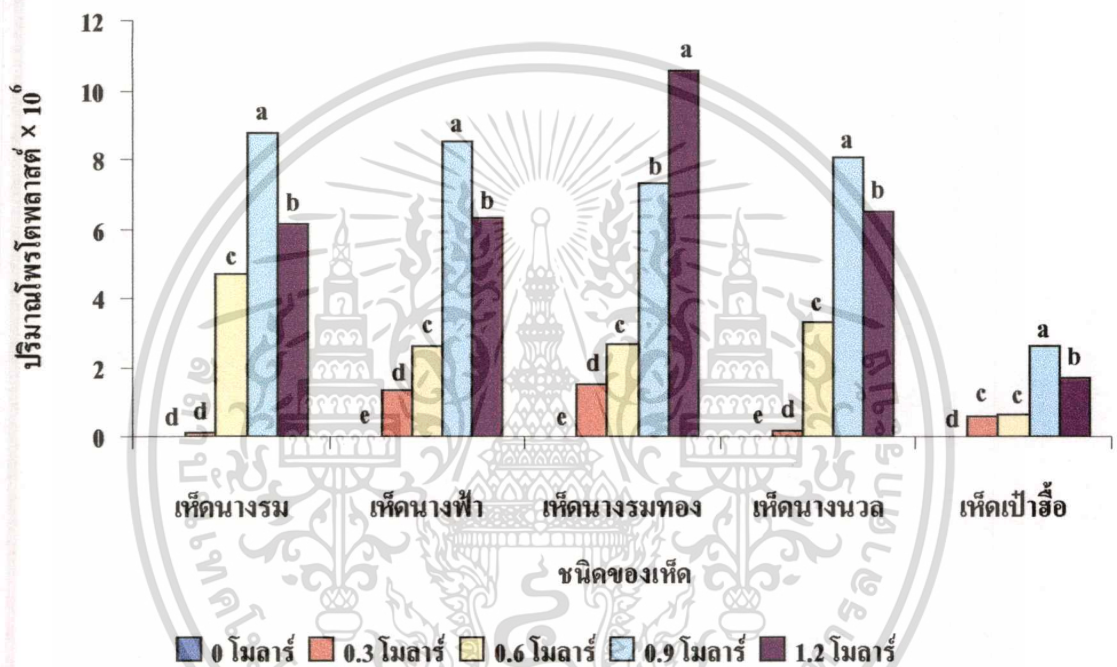
7.28×10^6 และ 10.55×10^6 โพรโพลาสต์/มล. ตามลำดับ เห็ดนางนวลมีโพรโพลาสต์เท่ากับ $0, 0.30 \times 10^6, 3.28 \times 10^6, 8.05 \times 10^6$ และ 6.50×10^6 โพรโพลาสต์/มล. ตามลำดับ เห็ดเป๋าฮื้อมีโพรโพลาสต์เท่ากับ $0, 0.58 \times 10^6, 0.66 \times 10^6, 2.58 \times 10^6$ และ 1.67×10^6 โพรโพลาสต์/มล. ตามลำดับ (ภาพที่ 4.13) ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ภาคผนวก ค) พบว่าในเห็ดแต่ละชนิดจะมีความเข้มข้นของออสโมติกสเทบิไลเซอร์บางความเข้มข้นที่มีผลทำให้ได้ปริมาณโพรโพลาสต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณโพรโพลาสต์ที่แยกได้โดยใช้วิธี DMRT พบว่าเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อจะมีปริมาณโพรโพลาสต์สูงที่สุดเมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.9 โมลาร์เป็นออสโมติกสเทบิไลเซอร์ และที่ความเข้มข้นนี้ปริมาณโพรโพลาสต์ที่ได้จะแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางสถิติจากที่ความเข้มข้นอื่นๆ สำหรับเห็ดนางรมทองจะได้ปริมาณโปรโตพลาสต์สูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ เมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ เป็นออสโมติกสเทบิไลเซอร์ และที่ความเข้มข้นนี้ปริมาณโปรโตพลาสต์ที่ได้จะแตกต่างทางสถิติจากที่ความเข้มข้นอื่นๆ เช่นกัน

ดังนั้นความเข้มข้นของออสโมติกสเทบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ คือ 0.9, 0.9, 1.2, 0.9 และ 0.9 โมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณโปรโตพลาสต์เท่ากับ 8.78×10^6 , 8.52×10^6 , 10.55×10^6 , 8.05×10^6 , และ 2.58×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ



หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในเห็ดชนิดเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็น $p < 0.05$

ภาพที่ 4.13 แสดงผลของความเข้มข้นของสารออสโมติกสเทบิไลเซอร์ที่เหมาะสม (แมกนีเซียมซัลเฟต ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) ที่มีต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* เมื่อบ่มและแยกด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ไลซิงเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ

4.5 การศึกษาลักษณะและการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์

จากการใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดแต่ละชนิดเพื่อทำการแยกโปรโตพลาสต์ โดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดสายพันธุ์โมโนคาร์บอนของเห็ดทั้ง 5 ชนิด ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเหลวหมอลต์สกัด พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 มล. และมีลูกปิดแก้วบรรจุอยู่ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถูก นำไปบ่มโดยการแช่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับเห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวน และเห็ดเป่าฮื้อ ส่วนเห็ดนางฟ้าใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน นำเส้นใยเห็ดที่ได้มาทำการแยกโพรโตพลาสต์โดยการบ่มด้วยสารละลายไคซิงเอนไซม์ (ที่ความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ) ซึ่งมีแมกนีเซียมซัลเฟต (ความเข้มข้น 0.9, 0.9, 1.2, 0.9 และ 0.9 โมลาร์ ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) เป็นออสโมติกสเทบิไลเซอร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าโพรโตพลาสต์ที่แยกได้มีรูปร่างกลม ขนาดเล็กบ้าง ใหญ่บ้าง (ภาพที่ 4.14) ซึ่งเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวน และเห็ดเป่าฮื้อ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 4.56, 4.40, 4.26, 4.86 และ 4.29 ไมโครเมตร ตามลำดับ

ผลการศึกษาหาอัตราการสร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวน และเห็ดเป่าฮื้อ ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว โดยนำโพรโตพลาสต์ที่แยกได้ไปเลี้ยงบนอาหารสำหรับให้โพรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ สามารถคำนวณความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ของเห็ดทั้ง 5 ชนิดได้จากสูตรที่กล่าวไว้ในวิธีการทดลองข้อ 3.4.5 ซึ่งได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

$$\begin{aligned}\text{ความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ของเห็ดนางรม} &= 2/110 \times 100 \\ &= 1.82\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{ความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ของเห็ดนางฟ้า} &= 6/210 \times 100 \\ &= 2.86\end{aligned}$$

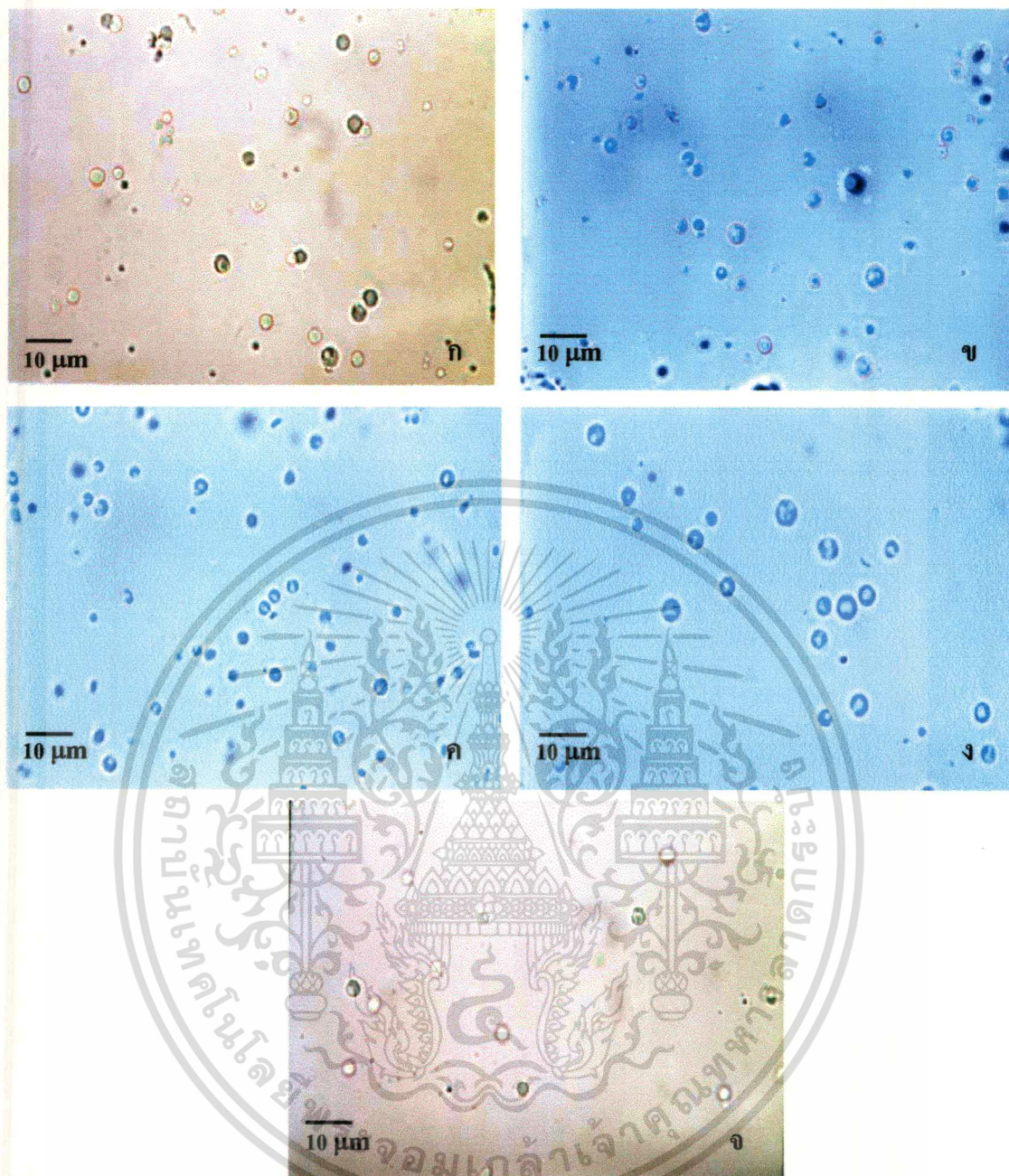
$$\begin{aligned}\text{ความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ของเห็ดนางรมทอง} &= 6/300 \times 100 \\ &= 2.00\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{ความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ของเห็ดนางนวน} &= 5/228 \times 100 \\ &= 2.19\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{ความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ของเห็ดเป่าฮื้อ} &= 3/300 \times 100 \\ &= 1.00\end{aligned}$$

ดังนั้นความถี่ของการสร้างผนังเซลล์ชั้นใหม่ของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวน และเห็ดเป่าฮื้อเท่ากับร้อยละ 1.82, 2.86, 2.00, 2.19 และ 1.00 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.14 แสดงลักษณะของโพรโพลิลาสต์ที่แยกได้ (กำลังขยาย 400 เท่า) โดยการบ่มเส้นใยให้หดด้วยสารละลายไลซิงเจนไรม์ (ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับให้แต่ละชนิด) ซึ่งมีแมกนีเซียมซัลเฟต (ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับให้แต่ละชนิดใน โซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์) พีเอช 5.0 เป็นออสโมติกสเตรบิลไลเซอร์

- ก. โพรโพลิลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดนางรม
- ข. โพรโพลิลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดนางฟ้า
- ค. โพรโพลิลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดนางรมทอง
- ง. โพรโพลิลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดนางนวล
- จ. โพรโพลิลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดเป่าฮื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

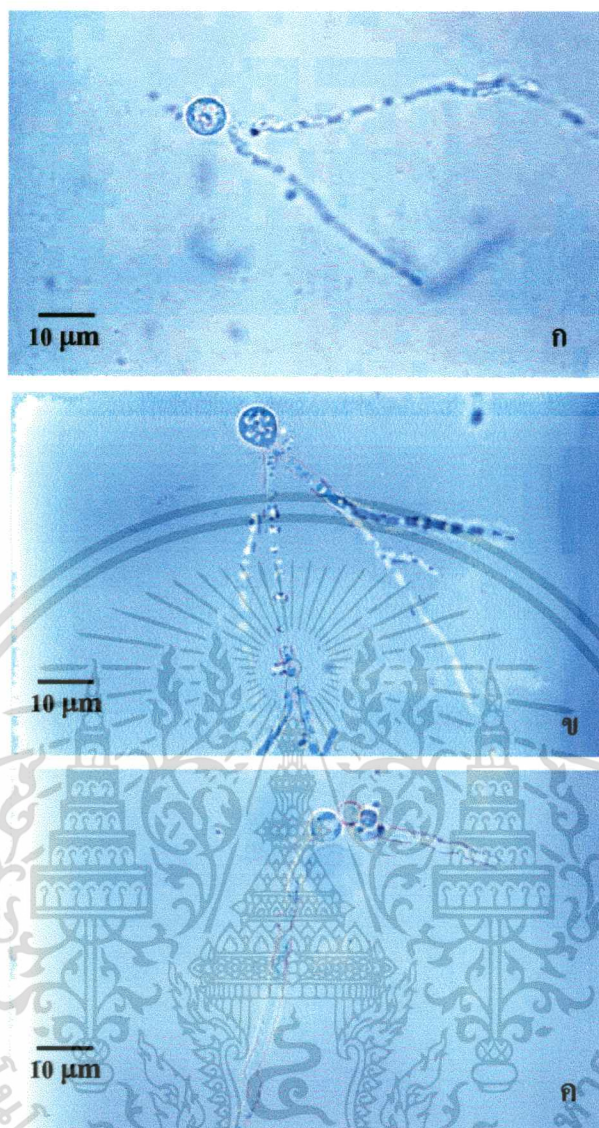
4.6 การรวมโปรโตพลาสต์

จากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล โดยใช้สารละลายโพลิเอทรีนไกลคอล แล้วนำโปรโตพลาสต์ที่ผ่านขั้นตอนการรวมโปรโตพลาสต์แล้วมาเลี้ยงบนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ พบว่าโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่และเจริญเป็นเส้นใยในวันที่ 2-5 ของการเลี้ยง (ภาพที่ 4.15) และประมาณวันที่ 7-12 จะพบโคโลนีเล็กๆ บนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ใหม่ โดยสามารถเก็บโคโลนีเดียวที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล ได้ทั้งหมด 487, 412 และ 391 โคโลนี ตามลำดับ

4.7 การคัดเลือกลูกผสม

เนื่องจากการทดลองนี้โปรโตพลาสต์ที่นำมาใช้ในขั้นตอนการรวมโปรโตพลาสต์เป็นโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์บอนซึ่งเจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ด ดังนั้นถ้าเกิดการรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ของเห็ดชนิดเดียวกันแล้ว เมื่อโปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่และเจริญเป็นเส้นใย เส้นใยนี้จะไม่สร้างแคลมป์คอนเนกชัน ในทางกลับกันถ้าเกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ของเห็ดต่างชนิดกัน เมื่อโปรโตพลาสต์ถูกผสมนี้สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่และเจริญเป็นเส้นใย เส้นใยนี้อาจจะสร้างหรือไม่สร้างแคลมป์คอนเนกชันก็ได้ โดยถ้าเส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนกชันอาจเกิดเนื่องจากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์บอนของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ที่นำมาผสมพันธุกันมีสภาพที่ไพบีที่ไม่สามารถผสมกันได้ (Ujima *et al.* 1991) หรือเมื่อมีการผสมกันแล้วนิวเคลียสไดนิวเคลียสหนึ่งอาจสลายตัวไปทำให้เส้นใยมีสภาพเป็นแฮพลอยด์ (Gadai and Lingg, 1992) ซึ่งทำให้ไม่เกิดการสร้างแคลมป์คอนเนกชัน และในการรวมกันของโปรโตพลาสต์เมื่อใช้สารละลายโพลิเอทรีนไกลคอลเป็นตัวหนึ่ยวามันอาจทำให้เกิดการรวมกันของโปรโตพลาสต์มากกว่า 2 โปรโตพลาสต์ (ภาพที่ 4.16) ซึ่งในการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทองสามารถเก็บโคโลนีเดียวได้ 487 โคโลนี พบว่ามี 3 โคโลนี ที่มีการสร้างแคลมป์คอนเนกชัน เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวลสามารถเก็บโคโลนีเดียวได้ 412 โคโลนี พบว่ามี 2 โคโลนี ที่มีการสร้างแคลมป์คอนเนกชัน และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวลสามารถเก็บโคโลนีเดียวได้ 391 โคโลนี แต่ไม่พบโคโลนีที่สร้างแคลมป์คอนเนกชัน ดังนั้นในการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล ได้ลูกผสมโดยวิธีการตรวจแคลมป์คอนเนกชัน ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ โดย 3 สายพันธุ์ ซึ่งกำหนดชื่อเป็น Fu1, Fu2 และ Fu3 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง ซึ่งสามารถคำนวณค่าความถี่ของการเกิดลูกผสมได้เท่ากับร้อยละ 0.62 และอีก 2 สายพันธุ์ ซึ่งกำหนดชื่อเป็น Fu4 และ Fu5 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล ซึ่งสามารถคำนวณค่าความถี่ของการเกิดลูกผสมได้เท่ากับร้อยละ 0.49 ส่วนการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวลไม่พบลูกผสม

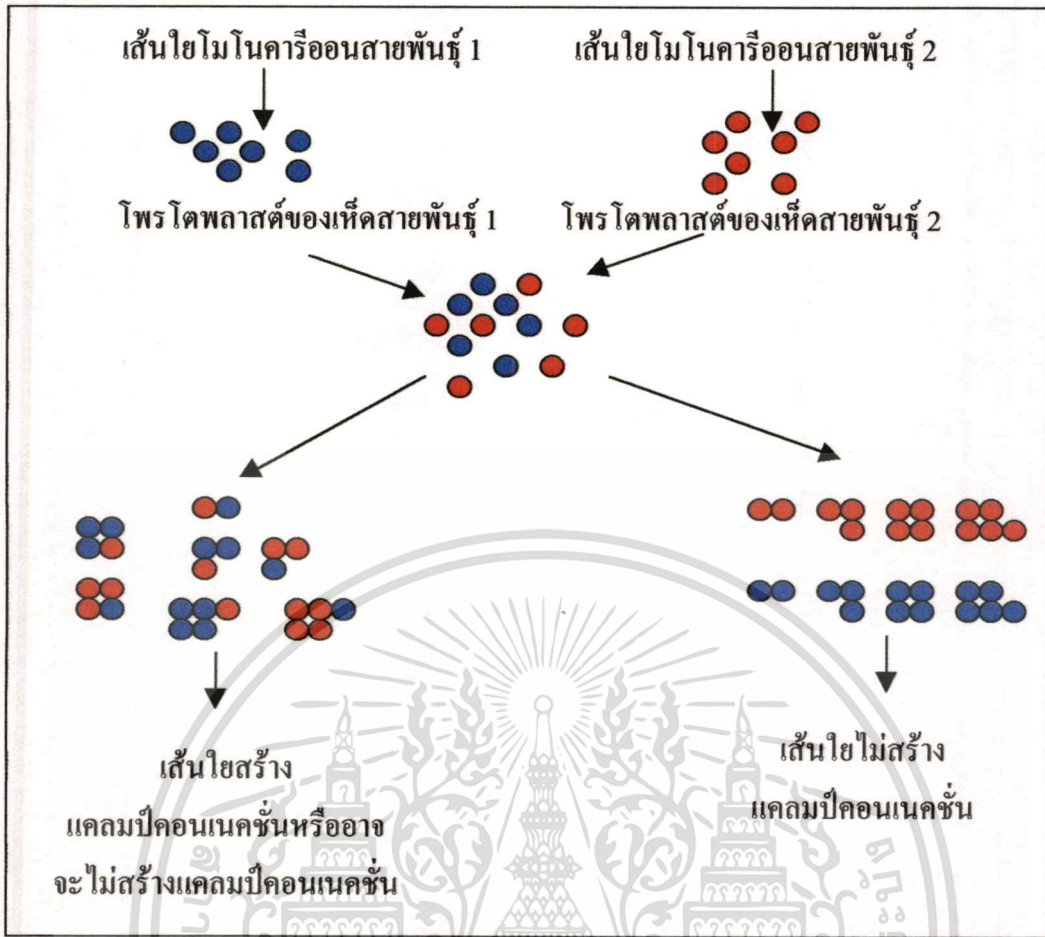
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 แสดงโปรโตพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่และเจริญเป็นต้นไฮบนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์

- ก. การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ที่อาจเกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางรม หรือเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางรมทอง
- ข. การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ที่อาจเกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมวล เห็ดนางรมกับเห็ดนางรม หรือเห็ดนางรมวลกับเห็ดนางรมวล
- ค. การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์ที่อาจเกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางรมวล เห็ดนางรมทองกับเห็ดนางรมทอง หรือเห็ดนางรมวลกับเห็ดนางรมวล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.16 แสดงรูปแบบของลูกผสมที่อาจเกิดขึ้นได้จากการรวมโพรโตพลาสต์

4.8 การศึกษาลักษณะของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่

4.8.1 การศึกษาขนาดของเส้นใย

จากการศึกษาขนาดของเส้นใยเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ โดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดลูกผสมบนอาหารมอลต์สกัดอาการ์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน แล้วทำการวัดขนาดของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง ซึ่งได้แก่ เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 3.0, 3.68 และ 2.84 ไมโครเมตร ตามลำดับ ขณะที่เห็ดนางรมและเห็ดนางรมทองซึ่งเป็นเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่และแม่มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 2.43 และ 2.38 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นใยโดยวิธี DMRT (ภาคผนวก ค) พบว่าเส้นใยของเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 กับสายพันธุ์พ่อแม่และแม่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับเห็ดลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมวล ซึ่งได้แก่ Fu4 และ Fu5 มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 2.76 และ 3.00 ไมโครเมตร ตามลำดับ ขณะที่เห็ดนางรมและเห็ดนางรมวลซึ่งเป็นเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่และแม่มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 2.43 และ 2.24 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นใยโดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธี DMRT (ภาคผนวก ค) พบว่าเส้นใยของเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 กับสายพันธุ์พ่อและแม่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4.8.2 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

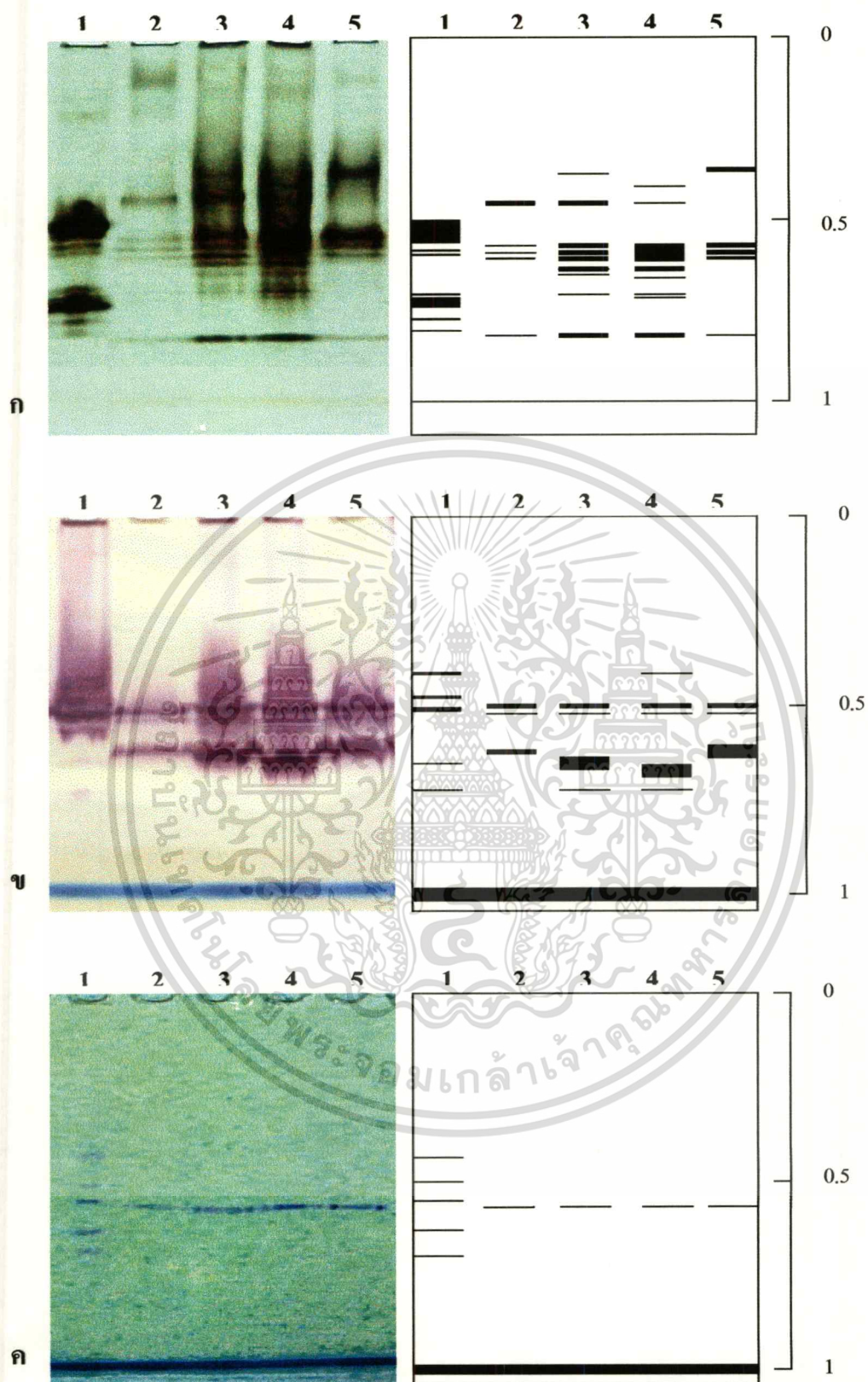
4.8.2.1 จากการศึกษาารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 ซึ่งเป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง พบว่าเห็ดสายพันธุ์ลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 มีความเป็นลูกผสม โดยในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์เอสเทอร์และมาเลทดีไฮโดรจีเนสของลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ ปรากฏแถบไอโซไซม์ 3 แบบ คือ แถบที่ไม่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง แถบที่เหมือนเห็ดนางรมหรือเห็ดนางรมทอง และแถบที่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง ส่วนแอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนสนั้นปรากฏแถบเพียงแบบเดียวคือแถบที่เหมือนกับเห็ดนางรม (ภาพที่ 4.17 และตารางที่ 4.2) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการศึกษารูปแบบไอโซไซม์เอสเทอร์และมาเลทดีไฮโดรจีเนสสามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเห็ดสายพันธุ์ลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 ได้ แต่เอสเทอร์จะให้ผลที่น่าเชื่อถือมากกว่า

4.8.2.2 จากการศึกษาารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 ซึ่งเป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมขาว พบว่าเห็ดสายพันธุ์ลูกผสม Fu4 และ Fu5 มีความเป็นลูกผสม โดยในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์เอสเทอร์ของลูกผสมทั้ง 2 สายพันธุ์ ปรากฏแถบไอโซไซม์ 3 แบบ คือ แถบที่ไม่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมขาว แถบที่เหมือนเห็ดนางรมหรือเห็ดนางรมขาว และแถบที่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมขาว ส่วนมาเลทดีไฮโดรจีเนสและแอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนส นั้นปรากฏแถบเพียงแบบเดียวคือแถบที่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมขาว และแถบที่เหมือนกับเห็ดนางรม ตามลำดับ (ภาพที่ 4.18 และตารางที่ 4.3) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการศึกษารูปแบบไอโซไซม์เอสเทอร์สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ Fu4 และ Fu5 ได้

4.8.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสม

ผลการศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อและแม่ พบว่าลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง ซึ่งได้แก่ เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 มีการเจริญของโคโลนีที่แตกต่างกัน โดยเห็ดลูกผสม Fu1 จะมีการเจริญดีกว่าเห็ดสายพันธุ์พ่อและแม่และมีลักษณะของเส้นใยคล้ายกับเห็ดนางรม ส่วนเห็ดลูกผสม Fu2 มีการเจริญช้ามากและมีลักษณะของเส้นใยคล้ายกับเห็ดนางรมทอง และเห็ดลูกผสม Fu3 มีการเจริญของโคโลนีใกล้เคียงกับเห็ดสายพันธุ์พ่อและแม่และมีลักษณะของเส้นใยคล้ายกับทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง สำหรับลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมขาว ซึ่งได้แก่ เห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 พบว่าเห็ดลูกผสมทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีการเจริญของโคโลนีดีกว่าเห็ดสายพันธุ์พ่อและแม่และมีลักษณะของเส้นใยคล้ายกับเห็ดนางรม (ภาพที่ 4.19 และตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.17 แสดงรูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่

1. เห็ดนางรมทอง 2. เห็ดลูกผสม Fu1 3. เห็ดลูกผสม Fu2 4. เห็ดลูกผสม Fu3
5. เห็ดนางรม ก. เอสเทอร์เรส ข. มาเลทดีไฮโดรจีเนส ค. แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงแถบของเอนไซม์เอสเทอร์ มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ที่มีอยู่ในเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง

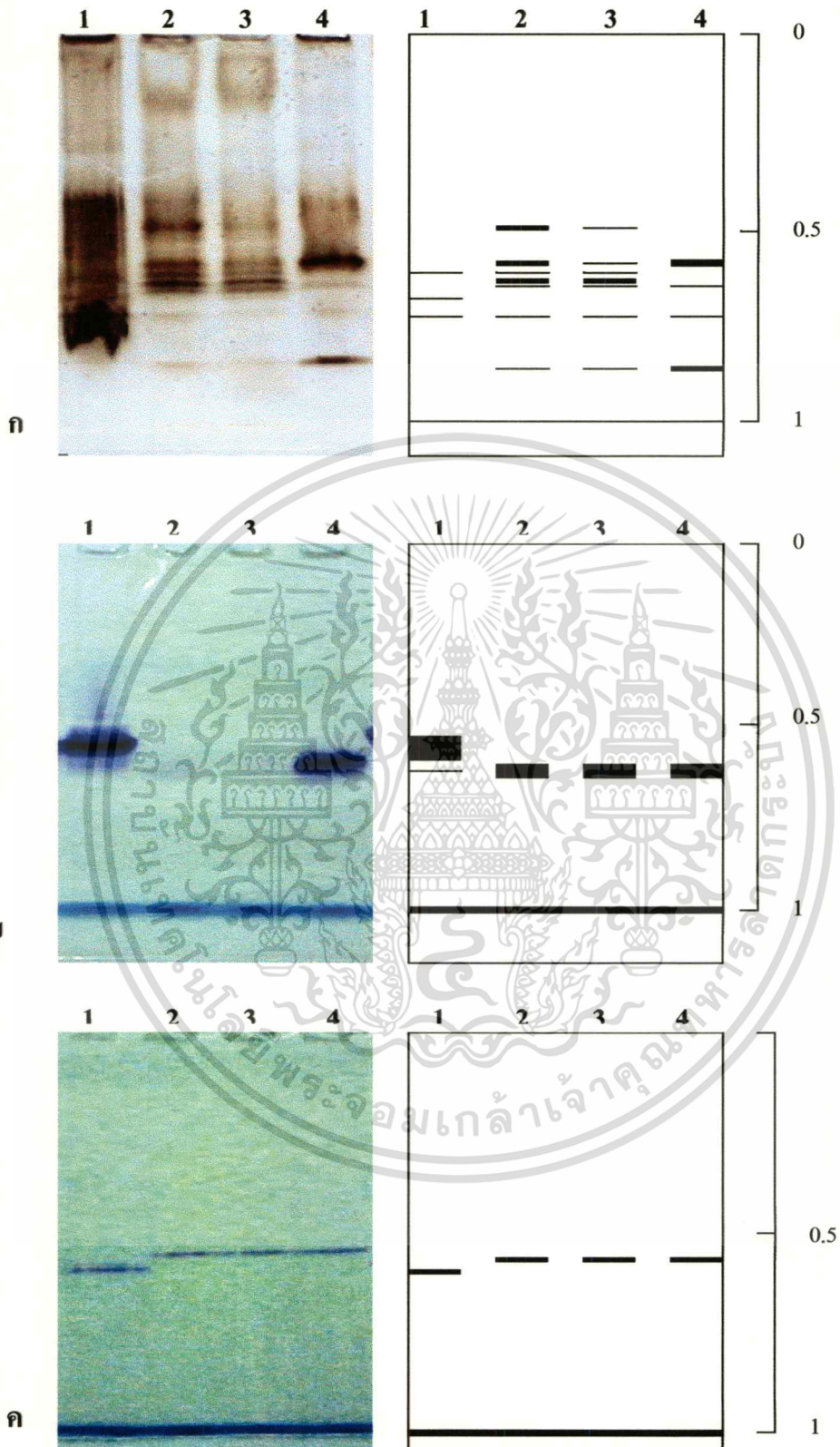
ชนิดของเอนไซม์	ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R _f)				
	เห็ดนางรมทอง	ลูกผสม Fu1	ลูกผสม Fu2	ลูกผสม Fu3	เห็ดนางรม
เอสเทอร์	-	-	0.37*	-	0.37
	-	-	-	0.40*	-
	-	0.45*	0.45*	0.45*	-
	0.52	-	-	-	-
	-	0.56*	0.56*	0.56*	0.56
	0.58	0.58**	0.58**	0.58**	0.58
	0.59	-	-	-	-
	-	0.61*	0.61*	0.61*	0.61
	-	-	0.63*	0.63*	-
	-	-	0.64*	-	-
	-	-	-	0.66*	-
	0.70	-	0.70*	0.70*	-
	-	-	-	0.71*	-
	0.72	-	-	-	-
	0.80	-	-	-	-
	-	0.82*	0.82*	0.82*	0.82
มาเลทดีไฮโดรจีเนส	0.41	-	-	0.41*	-
	0.47	-	-	-	-
	-	0.50*	0.50*	0.50*	0.50
	0.51	-	-	-	-
	-	0.52*	0.52*	0.52*	0.52
	-	0.62*	-	-	0.62
	0.66	-	0.66*	-	-
	-	-	-	0.67*	-
แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส	0.72	-	0.72*	0.72*	-
	0.43	-	-	-	-
	0.50	-	-	-	-
	0.55	-	-	-	-
	-	0.56*	0.56*	0.56*	0.56
	0.62	-	-	-	-
	0.69	-	-	-	-

* แสดง แถบที่ไม่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง

* แสดง แถบที่เหมือนเห็ดนางรม

* แสดง แถบที่เหมือนเห็ดนางรมทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 แสดงรูปแบบไอโซไซม์ของเห็บดุกผสมเปรียบเทียบกับเห็บสายพันธุ์พ่อและแม่

1. เห็บนางนวล 2. เห็บดุกผสม Fu4 3. เห็บดุกผสม Fu5 4. เห็บนางรม

ก. เอสเทอเรส ข. มาเลทดีไฮโดรจีเนส ค. แอสทอกลูตัสดีไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงแถบของเอนไซม์เอสเทอร์ส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ที่มีอยู่ในเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางนวล

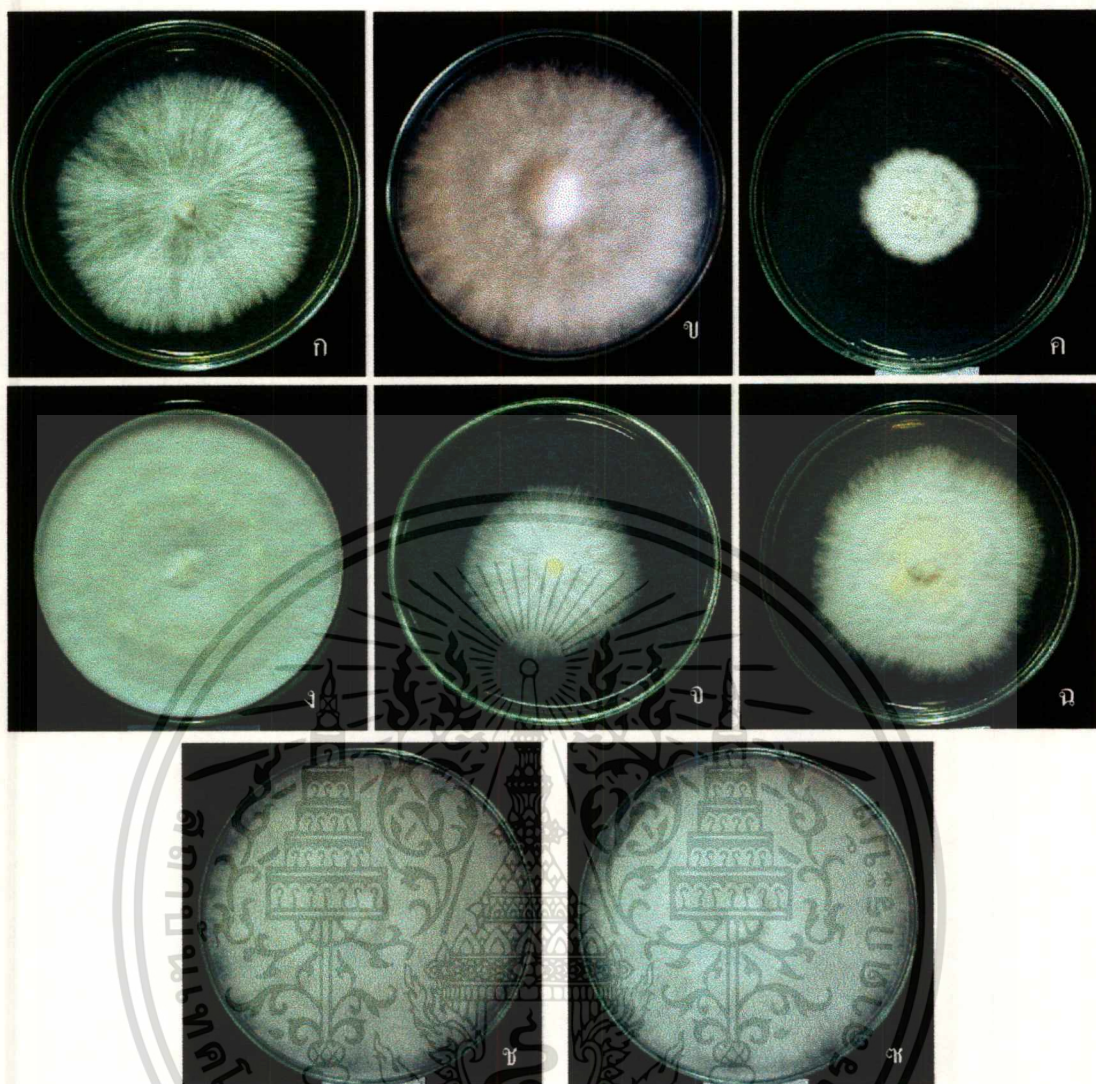
ชนิดของเอนไซม์	ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R _f)			
	เห็ดนางนวล	ลูกผสม Fu4	ลูกผสม Fu5	เห็ดนางรม
เอสเทอร์ส	-	0.49*	0.49*	-
	-	0.59*	0.59*	0.59
	0.61	0.61*	0.61*	-
	-	0.63*	0.63*	-
	-	0.65*	0.65*	0.65
	0.68	-	-	-
	0.72	0.72**	0.72**	0.72
	-	0.87*	0.87*	0.87
มาเลทดีไฮโดรจีเนส	0.62	0.62**	0.62**	0.62
	0.56	-	-	-
แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส	-	0.56*	0.56*	0.56
	0.60	-	-	-

* แสดง แถบที่ไม่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง

* แสดง แถบที่เหมือนเห็ดนางรม

* แสดง แถบที่เหมือนเห็ดนางนวล

เมื่อนำเห็ดลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ ไปเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย พบว่ามีเฉพาะลูกผสม 3 สายพันธุ์ที่สามารถเพาะให้เกิดดอกได้ คือลูกผสม Fu1, Fu4 และ Fu5 (ภาพที่ 4.20-4.22 และตารางที่ 4.5-4.6) โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังต่อไปนี้ เห็ดลูกผสม Fu1 (ภาพที่ 4.20) ขณะที่ยังไม่โตเต็มที่รูปร่างของดอกเห็ดคล้ายปากแตรและดอกเห็ดมีสีเหลืองคล้ายกับเห็ดนางรมทอง (ภาพที่ 4.3) เห็ดลูกผสม Fu4 (ภาพที่ 4.21) มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกับเห็ดนางรมมาก (ภาพที่ 4.1) แต่มีสีของสปอร์พิมพ์และขนาดของสปอร์เป็นลักษณะผสมระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางนวล ส่วนเห็ดลูกผสม Fu5 (ภาพที่ 4.22) มีรูปร่างของดอกเห็ดคล้ายเห็ดนางนวลผสมกับเห็ดนางรม (ภาพที่ 4.1 และ 4.4) แต่มีสีของดอกคล้ายเห็ดนางรม (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.19 แสดงลักษณะโคโดนีของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ โดยเลี้ยงบนอาหารมอลต์สกัดอาการ์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน
 ก. เห็ดนางรมทอง ข. เห็ดนางรม ค. เห็ดนางนวล ง. เห็ดลูกผสม Fu1
 จ. เห็ดลูกผสม Fu2 ฉ. เห็ดลูกผสม Fu3 ช. เห็ดลูกผสม Fu4 ซ. เห็ดลูกผสม Fu5

ตารางที่ 4.4 แสดงการเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ เมื่อเลี้ยงบนอาหารมอลต์สกัดอาการ์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

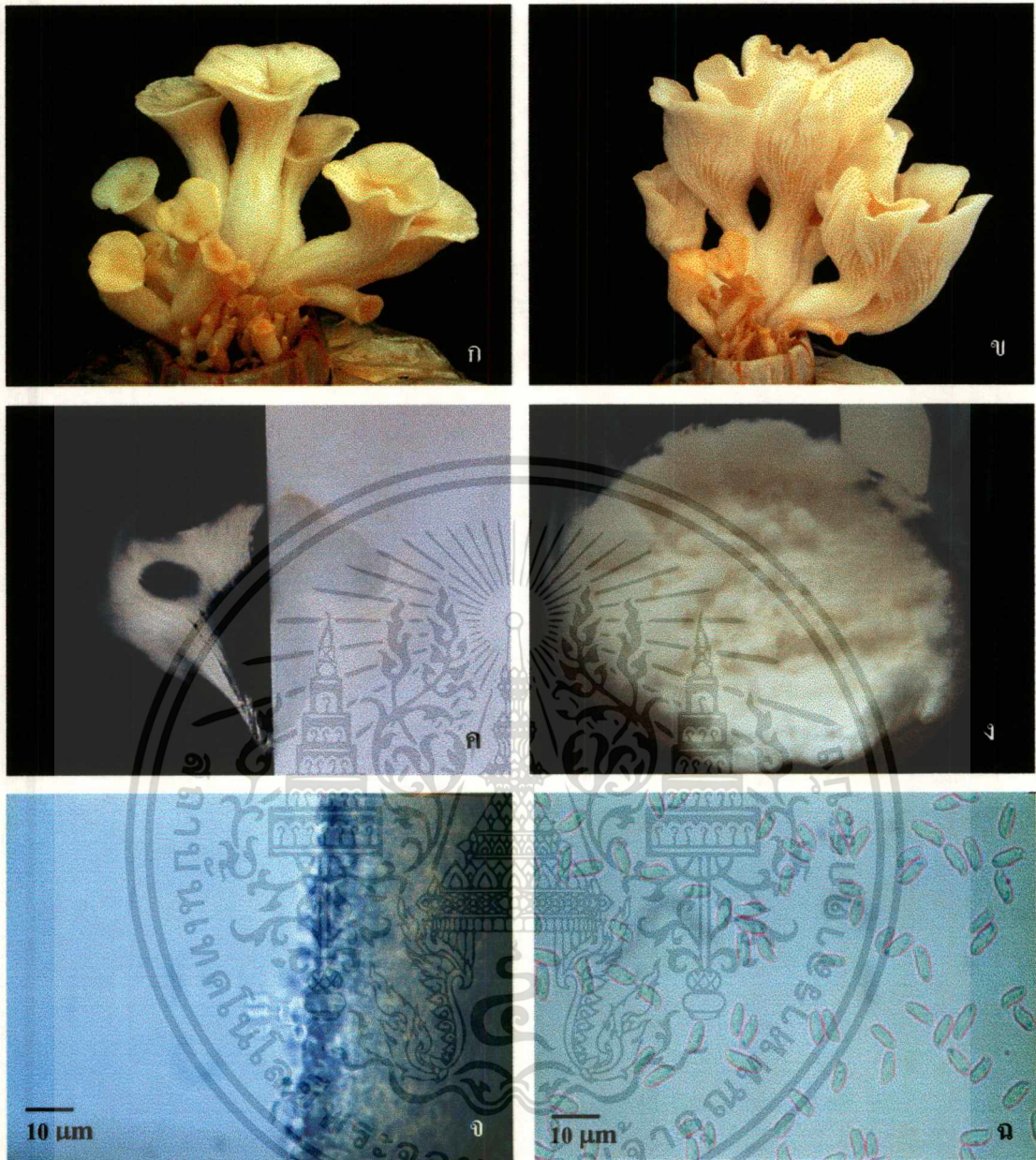
กลุ่มผสมพันธุ์	ชนิดของเห็ด	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี
เห็ดนางรม x เห็ดนางรมทอง	เห็ดนางรม	8.83b
	เห็ดนางรมทอง	7.32c
	เห็ดลูกผสม Fu1	>9.00a
	เห็ดลูกผสม Fu2	5.00e
	เห็ดลูกผสม Fu3	7.07d
เห็ดนางรม x เห็ดนางนวล	เห็ดนางรม	8.83b
	เห็ดนางนวล	3.24c
	เห็ดลูกผสม Fu4	9.00a
	เห็ดลูกผสม Fu5	9.00a

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งของกลุ่มผสมพันธุ์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

ตารางที่ 4.5 แสดงรายละเอียดของลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ชนิดของเห็ด				
	เห็ดนางรม	เห็ดนางรมทอง	เห็ดลูกผสม Fu1	เห็ดลูกผสม Fu2	เห็ดลูกผสม Fu3
สีของหมวกดอก	สีขาวครีม	สีเหลือง	ขณะยังไม่โตเต็มที่สีเหลือง เมื่อโตเต็มที่สีขาวอมเหลือง	ไม่เกิดดอก	ไม่เกิดดอก
ขนาดดอกเฉลี่ย (ซม.)	4.93 x 5.68	3.34 x 3.72	3.23 x 4.38		
สีของก้านดอก	สีขาวครีม	สีขาวอมเหลือง	สีขาวอมเหลือง		
ความยาวของก้านดอกเฉลี่ย (ซม.)	3.24 ± 0.56	2.65 ± 0.34	2.15 ± 0.43		
เนื้อของเห็ด	เหนียวนุ่ม	เหนียวเล็กน้อย	เหนียวเล็กน้อย		
ขนาดของเส้นใยเฉลี่ย (ซม.)	2.43 ± 0.69	2.38 ± 0.47	3.0 ± 0.52		
ขนาดของสปอร์เฉลี่ย (ไมครอน)	4.00 x 8.42	3.32 x 7.42	4.09 x 11.48		
สีของสปอร์พิมพ์	สีขาวครีม	สีเทาอมชมพู	สีขาวครีม		

๕



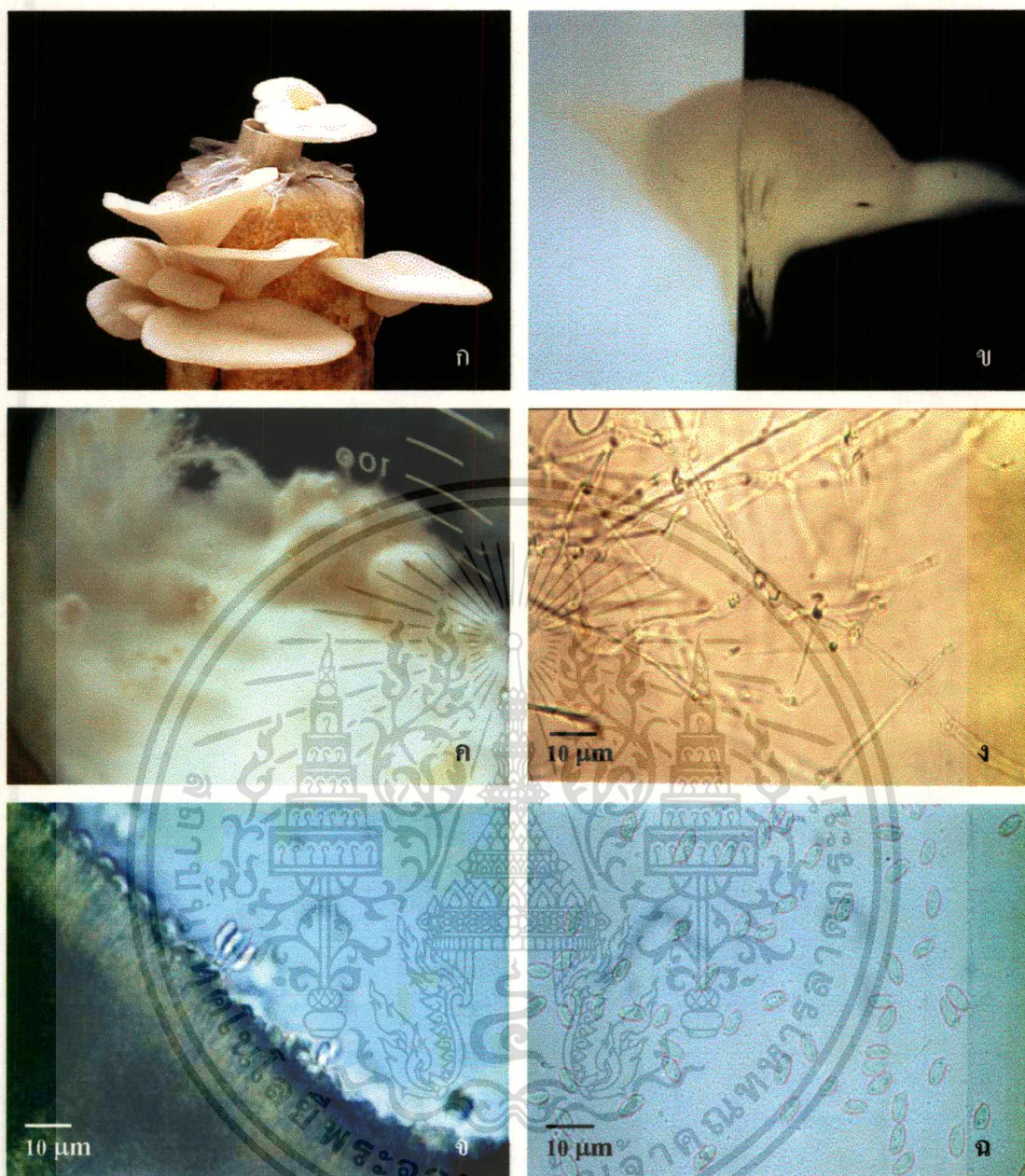
ภาพที่ 4.20 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu1

ก. ดอกเห็ดที่ยังไม่เจริญเต็มที่ ข. ดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่ ค. สปอร์พิมพ์
ง. คู่ดอกบนอาหารเหลวหมอลดที่สกัด จ. ไฮมีเนียม จ. เบสิดิโอสปอร์

ตารางที่ 4.6 แสดงรายละเอียดของลักษณะทางกายภาพของเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อและแม่

ลักษณะทางต้นฐานวิทยา	ชนิดของเห็ด			
	เห็ดนางรม	เห็ดนางรมสด	เห็ดลูกผสม Fu4	เห็ดลูกผสม Fu5
สีของหมวกดอก	สีขาวครีม	สีชมพู	สีขาวครีม	สีขาวครีม
ขนาดดอกเฉลี่ย (ซม.)	4.93 x 5.68	3.75 x 4.91	5.46 x 5.90	8.26 x 9.44
สีของก้านดอก	สีขาวครีม	สีชมพูหรือสีชมพูอมส้ม	สีขาวครีม	สีขาวครีม
ความยาวของก้านดอกเฉลี่ย (ซม.)	3.24 ± 0.56	1.24 ± 0.49	3.27 ± 0.41	4.02 ± 0.48
เนื้อของเห็ด	เนื้อหนานุ่ม	เนื้อบางนุ่ม	เนื้อหนานุ่ม	เนื้อหนานุ่ม
ขนาดของเส้นใยเฉลี่ย (ซม.)	2.43 ± 0.69	2.24 ± 0.51	2.76 ± 0.62	3.00 ± 0.58
ขนาดของสปอร์เฉลี่ย (ไมครอน)	4.00 x 8.42	4.00 x 7.58	4.17 x 8.60	3.51 x 8.03
สีของสปอร์พิมพ์	สีขาวครีม	สีชมพูอมส้ม	สีเทาอมชมพู	สีครีมอมเทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

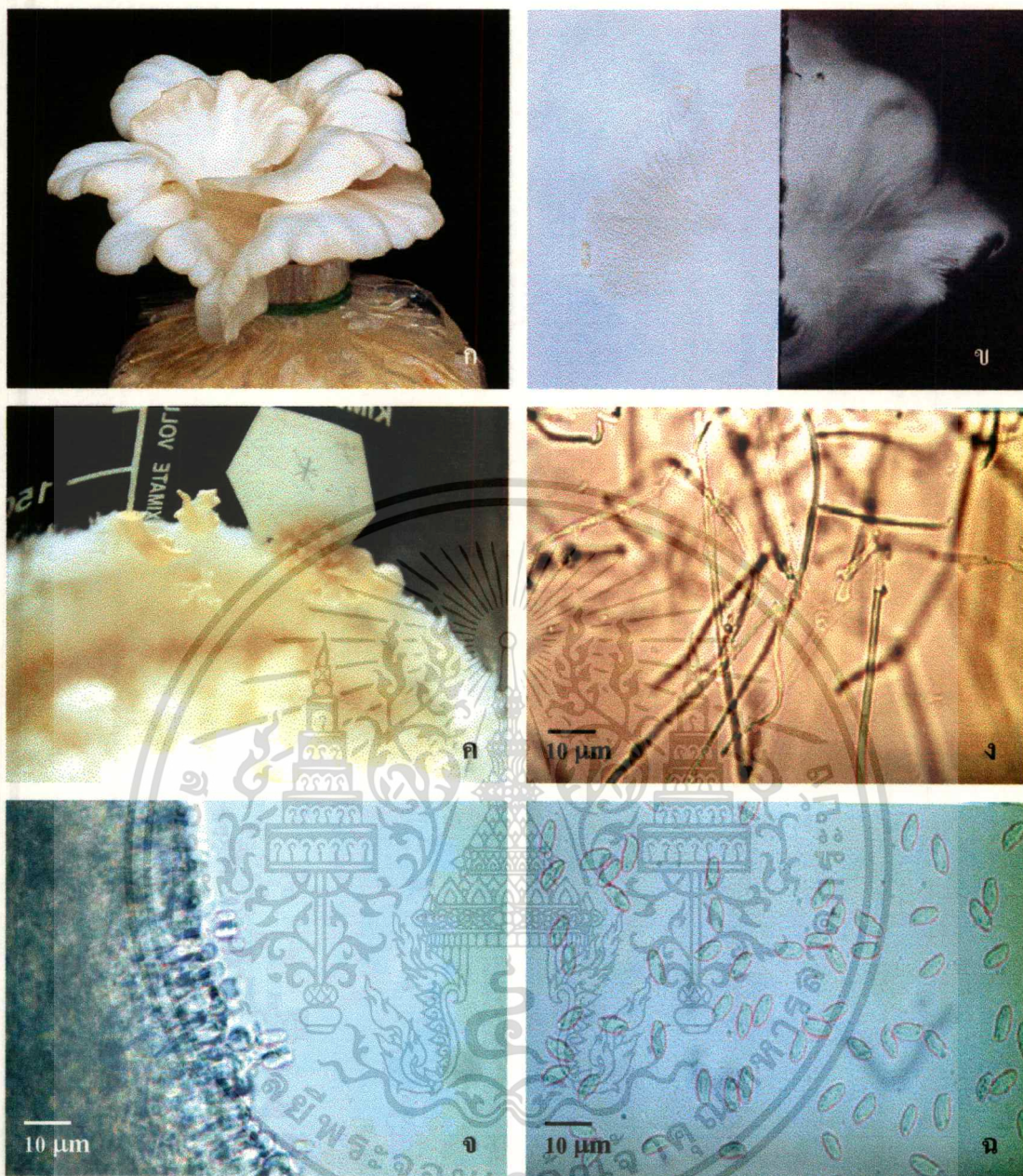


ภาพที่ 4.21 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu4

ก. ดอกเห็ด ข. สปอร์พิมพ์ ค. กลุ่มดอกบนอาหารเหลวออกัสกัต ง. เส้นใย

จ. ไฮมีเนียม ฉ. เบสิดิโอสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.22 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu5

ก. ดอกเห็ด ข. สปอร์พิมพ์ ค. ตุ่มดอกบนอาหารเหลวแอลทส์กัด ง. เส้นใย

จ. ไฮมีเนียม ฉ. เบสิดิโอสปอร์

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และเห็ดเป่าฮื้อ ซึ่งเป็นเห็ดในสกุล *Pleurotus* พบว่าเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกับการศึกษาของ วสันต์ เพชรรัตน์ (2530); เกษม สร้อยทอง (2537); Pacioni (1981); Pegler (1983); Chang and Quimio (1989) และ Stamets (1993) กล่าวคือเห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปคล้ายคลึงกันมากแต่มีความแตกต่างกันในรายละเอียดของส่วนต่างๆ ของเห็ดเพียงเล็กน้อยในด้านของสีและขนาดของส่วนต่างๆ ของดอกเห็ด สปอร์ และเส้นใย รวมทั้งพบว่ามีโครงสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศในเห็ดเป่าฮื้อแต่ไม่พบในเห็ดอื่นๆ อีก 4 ชนิด

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว พบว่าเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดทั้ง 5 ชนิด เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารมอลต์สกัดดอกอาร์ ซึ่งในงานวิจัยของ Wang and Anderson (1972); Eger *et al.* (1976); Chang *et al.* (1985) และ Petersen and Ridley (1996) ก็ใช้อาหารมอลต์สกัดดอกอาร์ในการเลี้ยงเชื้อเส้นใยเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เช่นกัน นอกจากนี้ Stamets (1993) ยังกล่าวว่าอาหารมอลต์สกัดดอกอาร์เป็นอาหารชนิดหนึ่งที่เหมาะสมในการเลี้ยงเส้นใยเห็ดชนิดต่างๆ สำหรับการศึกษาหาประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเส้นใยเห็ดที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดทั้ง 5 ชนิด เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อมอลต์สกัดดอกอาร์ที่มีพีเอช 5.5-7.0, 7.0, 6.5-7.0, 7.0 และ 6.0-7.0 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่ใกล้เคียงกับที่ Stamets (1993) ได้แนะนำไว้ว่าการเลี้ยงเชื้อพวก saprophytes เช่น เห็ดในสกุล *Pleurotus* ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.5-6.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติของเห็ดในสกุลนี้ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิด ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว คือ 25-30, 30, 25, 25 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Stamets (1993) ได้รายงานไว้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดนี้ คือ อุณหภูมิในช่วง 24-30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าเห็ด 5 ชนิดนี้มีบางชนิดที่สามารถเจริญได้แต่การเจริญต่ำมากจนไม่สามารถวัดผลและบางชนิดไม่สามารถเจริญได้เลย

จากการศึกษาหาสภาวะบางประการที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดที่เจริญมาจากสปอร์เดียวนั้น ในงานวิจัยนี้ใช้เส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิด ที่มีอายุ 4 วัน (ตามรายงานของ Yoo and Cha (1993)) มาทำการศึกษาค้นหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ชนิดและความเข้มข้นของสารที่ใช้เป็นออสโมติกสเทบิลไลเซอร์ โดยในการศึกษาหาความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์นั้นได้ใช้เอนไซม์ผสมที่สกัดมาจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของบริษัท Sigma ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์โคดีเนส โปรติเอส และเซลลูเลส เอนไซม์ผสมนี้มีชื่อทางการค้าว่า ไคซิงเอนไซม์ ทั้งนี้เนื่องจากรายงานที่เกี่ยวกับการแยกโพรโตพลาสต์แถบทุกลบับใช้เอนไซม์ผสมในการแยกโพรโตพลาสต์ เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดที่ผสมอยู่จะช่วยย่อยองค์ประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์ ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายผนังเซลล์สูงขึ้น ส่งผลให้ได้ปริมาณโพรโตพลาสต์สูงขึ้นด้วย ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของสารละลายไคซิงเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวล คือ 9, 8, 8 และ 9 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งทำให้ได้ปริมาณโพรโตพลาสต์สูงสุด 4.59×10^6 , 2.82×10^6 , 2.66×10^6 และ 3.36×10^6 โพรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ(โดยใช้เวลาในการบ่ม 2 ชั่วโมง) สำหรับเห็ดเป๋าฮื้อยังไม่ทราบความเข้มข้นของไคซิงเอนไซม์ที่เหมาะสม เนื่องจากเมื่อใช้ความเข้มข้นของไคซิงเอนไซม์สูงถึง 10 มก./มล. ปริมาณโพรโตพลาสต์ที่ได้มีเพียง 0.62×10^6 โพรโตพลาสต์/มล. และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปริมาณโพรโตพลาสต์ที่แยกได้เมื่อใช้ไคซิงเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 9 มก./มล. ซึ่งอาจเนื่องมาจากผนังเซลล์ของเส้นใยเห็ดเป๋าฮื้อมีความหนาแน่นกว่าเห็ดชนิดอื่นๆ อีก 4 ชนิด ดังนั้นหากต้องการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ดเป๋าฮื้อให้ได้ปริมาณมากควรเพิ่มความเข้มข้นของไคซิงเอนไซม์ให้สูงขึ้นหรือผสมเอนไซม์ชนิดอื่นลงไป เช่นเดียวกับการทดลองของ Boonchan (1991) ที่ทำการศึกษหาชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ดเป๋าฮื้อแล้วพบว่าเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ดเป๋าฮื้อคือ เอนไซม์ผสมซึ่งประกอบด้วย โนโวไซม์ 234 (เป็นเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วยเอนไซม์โคดีเนส เซลลูเลส และโปรติเอส) โคดีเนส คริสเลส (Driselase) และ เซลลูเลส (ในอัตราส่วน 2 : 1.5 : 2 : 2) โดยให้ปริมาณโพรโตพลาสต์สูงถึง 3.8×10^6 โพรโตพลาสต์/มล. ส่วนการศึกษหาชนิดและความเข้มข้นของสารที่ใช้เป็นออสโมติกสเทบิลไลเซอร์สำหรับเห็ดทั้ง 5 ชนิด พบว่าแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นสารที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้เป็นออสโมติกสเทบิลไลเซอร์ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางนวล และเห็ดเป๋าฮื้อ คือ 0.9 โมลาร์ ซึ่งให้ปริมาณโพรโตพลาสต์สูงที่สุดเท่ากับ 8.78×10^6 , 8.52×10^6 , 8.05×10^6 และ 2.58×10^6 โพรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ สำหรับเห็ดนางรมทอง พบว่าเมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ จะให้ปริมาณโพรโตพลาสต์สูงกว่าที่ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6 และ 0.9 โมลาร์ โดยให้ปริมาณโพรโตพลาสต์เท่ากับ 10.55×10^6 โพรโตพลาสต์/มล. ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ จรัสรัช (2544); Chang *et al.* (1985) และ Boonchan (1991) ที่ได้ทำการศึกษหาชนิดของสารที่ใช้เป็นออสโมติกสเทบิลไลเซอร์ในเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า และเห็ดเป๋าฮื้อ ตามลำดับ ต่างก็พบว่าแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นสารที่เหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นออสโมติกสเทบิลไลเซอร์ และ Santiago (1983) ยังกล่าวว่าแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นเกลืออนินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญหรือการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างที่โพรโตพลาสต์อยู่ในออสโมติกสเทบิลไลเซอร์ได้ด้วย ดังนั้นจึงมีผู้เลือกใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเป็นออสโมติกสเทบิลไลเซอร์ในการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ดอีกหลายๆ ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ทางศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงเห็ดเมืองหนาวได้จัดทำขึ้นเพื่อให้บริการแก่เกษตรกรและผู้สนใจในการนำข้อมูลไปใช้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยความเข้มข้นที่ใช้จะอยู่ในช่วง 0.5-1.2 โมลาร์ ขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ดนั้นๆ Peberdy and Fox (1993)

จากการศึกษาลักษณะของโพรโตพลาสต์ที่แยกได้ในเห็ดแต่ละชนิดเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าโพรโตพลาสต์ที่แยกจากเส้นใยของเห็ดทั้ง 5 ชนิด มีรูปร่างกลม ขนาดเล็กบ้างใหญ่บ้าง โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 4.56, 4.40, 4.26, 4.86 และ 4.29 ไมโครเมตร ตามลำดับ

จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล ได้ลูกผสมทั้งหมด 5 สายพันธุ์ โดย 3 สายพันธุ์ ซึ่งกำหนดชื่อเป็น Fu1, Fu2 และ Fu3 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง และอีก 2 สายพันธุ์ ซึ่งกำหนดชื่อเป็น Fu4 และ Fu5 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล ส่วนการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวลไม่พบลูกผสม แม้ว่าการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ด 2 ชนิดไม่ควรถูกจำกัดโดยเมททิงไทป์ก็ตาม แต่ในกรณีนี้อาจเนื่องมาจากว่าเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวลมีความใกล้เคียงกันมากทางพันธุกรรม ซึ่งจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดสกุล *Pleurotus* ด้วยเทคนิค PCR/RFLP โดยจิราพร นิลฉวี (2546) และการจัดจำแนกเห็ดในสกุล *Pleurotus* โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ซึ่งศึกษาโดย Magae *et al.* (1990) ได้จัดเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวลอยู่ในกลุ่มเดียวกันและแยกออกจากเห็ดชนิดอื่นๆ ในสกุลนี้ ดังนั้นเมื่อเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวลมีความใกล้เคียงกันมากทางพันธุกรรมจนแทบจะจัดเป็นเห็ดชนิดเดียวกันนั้น ในการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ด 2 ชนิดนี้โดยใช้โพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดเพียงชนิดละ 1 สายพันธุ์ จะไม่ประสบความสำเร็จถ้าเส้นใยคู่ที่นำมาผสมกันนั้นมีเมททิงไทป์เหมือนกันหรือเข้ากันไม่ได้ทางเพศ กล่าวคือคู่ผสมพันธุ์ต้องมีเมททิงไทป์เป็น A_1B_1 กับ A_2B_2 หรือ A_1B_2 กับ A_2B_1 เท่านั้นที่จะรวมกันได้

จากการศึกษาลักษณะของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่ โดยการวัดขนาดเส้นใย ศึกษารูปแบบไอโซไซม์และศึกษาสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดนั้น พบว่าเส้นใยของเห็ดลูกผสมมีขนาดใหญ่กว่าเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับที่ วีรวัฒน์ กนกนุเคราะห์ (2534); ประภัสสร โชคสวนทรัพย์ (2540); จรัสรัช มั่นถาวร (2544) และ Abe *et al.* (1982) ได้รายงานไว้ว่าลูกผสมที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์จะมีขนาดเซลล์ของเส้นใยใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งอธิบายได้ว่าลูกผสมมีจำนวนชุดของโครโมโซม (ระดับ ploidy) มากกว่าของพ่อแม่และแม่ เช่น ลูกผสมอาจเป็น $2n$, $3n$... ในขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่และแม่เป็นโมนาพลอยด์ (n) และเมื่อทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ เอสเทอเรส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ของเส้นใยเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเส้นใยของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่และแม่ พบรูปแบบไอโซไซม์ของลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 ปรากฏแถบที่แสดงความเป็นลูกผสมในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ เอสเทอเรส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส ส่วนลูกผสม Fu4 และ Fu5 ปรากฏรูปแบบไอโซไซม์ที่แสดงความเป็นลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลสมในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ เอสเทอร์สเฟิงชนิดเดียว แถบไอโซไซม์ที่แสดงความเป็น
 ลูกผสมของเห็ดลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ นั้นสามารถจำแนกได้ 3 ชนิด คือ แถบที่ไม่เหมือนพ่อและ
 แม่ แถบที่เหมือนพ่อหรือแม่ และแถบที่เหมือนทั้งพ่อและแม่ ซึ่งแสดงว่าลูกผสมที่ได้เกิดจากการ
 รวมกันของพ่อและแม่ และยังพบว่าเห็ดลูกผสมที่เกิดจากทั้ง 2 คู่ผสมพันธุ์ปรากฏรูปแบบไอโซไซม์
 ส่วนใหญ่เหมือนเห็ดนางรม ทั้งนี้เนื่องจากลูกผสมมีแนวโน้มได้รับพันธุกรรมที่ถ่ายทอดมา
 จากโครโมโซมของเห็ดนางรมมากกว่าเห็ดนางรมทองหรือเห็ดนางรมนวล อนึ่งจากรูปแบบไอโซไซม์
 ของเอนไซม์บางชนิด (เอสเทอร์สและมาเลติไฮโดรจีเนส) ที่พบว่าเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง
 และเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมนวลมีแถบไอโซไซม์ที่ตรงกัน แสดงให้เห็นว่าเห็ดเหล่านี้มีความสัมพันธ์
 กันทางพันธุกรรม (มี homology) ทั้งนี้เพราะเป็นเห็ดที่อยู่ในสกุลเดียวกัน และเมื่อนำเส้นใยเห็ด
 ลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ มาเพาะให้เกิดดอกแล้วนำดอกเห็ดมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบ
 ว่าเห็ดลูกผสม Fu2 และ Fu3 ไม่เกิดดอก เนื่องจากเส้นใยเจริญช้าและอ่อนแอมาก ทำให้เกิดการ
 ปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่นได้ง่าย ส่วนเห็ดลูกผสม Fu1, Fu4 และ Fu5 สามารถเกิดดอกได้และพบว่า
 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏมีลักษณะผสมระหว่างเห็ดสายพันธุ์พ่อและแม่

บรรณานุกรม

- เกษม สร้อยทอง. 2537. **เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. อุบลราชธานี : โรงพิมพ์ศิริธรรม ออฟเซ็ท.
- กำเนิด สุภณวงษ์. 2534. **จุลชีวอุตสาหกรรม**. กรุงเทพมหานคร : โอ. เอส. พรินต์ติ้งเฮาส์.
- จรัสรัช มั่นถาวร. 2544. “การสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) โดยการรวมโปรโตพลาสต์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จิราพร นิลฉวี. 2546. “การศึกษาพื้นฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus* โดยเทคนิค PCR/RFLP.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชวนพิศ ดีเอ็กนามกุล. 2536. “การทำให้เกิดการกลายในเชื้อรา.” หน้า 5.24. ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรกันท์. **หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ “เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม”**. เล่มที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม : โรงพิมพ์สารานุกรมสุขุมลฐานอาเซียน.
- ชวนพิศ อรุณรังสิกุล. 2538. “เทคนิคการตรวจสอบและจำแนกพันธุ์โดยใช้ Isozyme Pattern.” หน้า 16-30. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ การตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme Pattern และ RAPD. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและการเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.
- ชลธิ์ ชัยศรีสุข. 2536. “การเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของราข้าวแดง (*Monascus* sp.KB6SR) เพื่อใช้เป็นแหล่งโครโมโซมที่คงสภาพ.” ว. วิทยาศาสตร์ ม.ก. 11(3) : 122-129.
- ประภัสสร โชคสวนทรัพย์. 2540. “การผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ไพเราะ ปิ่นพานิชการ. 2536. “การหลอมรวมโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces*.” หน้า 8.2. ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรกันท์. **หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ “เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม”**. เล่มที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม : โรงพิมพ์สารานุกรมสุขุมลฐานอาเซียน.

- วสันต์ เพชรรัตน์. 2530. การผลิตเห็ด. สงขลา : ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะ
ทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วิสุทธิ ไบไม้. 2533. พันธุศาสตร์. กรุงเทพมหานคร : เจ้าพระยาระบบการพิมพ์.
- วีรวัฒน์ กนกนุเคราะห์. 2534. “การปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) โดยการ
รวมโปรโตพลาสต์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิต
วิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สาวิตรี ลิมทอง. 2536. โปรโตพลาสต์ฟิวชั่นของจุลินทรีย์. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาจุล-
ชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุมาลี พิชญากร. 2541. เห็ดโคนและลูกผสมฟิวแอสแตนท์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์
การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.
- อัญร่า พัทพานนท์ และสัจชัย ตันตยาภรณ์. 2538. “การปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยวิธีรวม
โปรโตพลาสต์.” รายงานผลงานวิจัยกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- Abe, M., Umetsu, H., Nakai, T. and Sasage, D. 1982. “Regeneration and Fusion of Mycelial
Protoplasts of *Tricholoma matsutake*.” *Agric. Biol. Chem.* 46 : 1955-1957.
- Alexopoulos, C. J. and Mins, C. W. 1979. **Introductory Mycology**. 3rd ed. New York. :
John Wiley & Sons.
- Anderson, F. B. and Millbank, J. W. 1966. “Protoplast Formation and Yeast Cell Wall
Structure.” *Biochem. J.* 93 : 682-687.
- Anne, J. and Peberdy, J. F. 1976. “Induce Fusion of Fungal Protoplast Following
Treatment with Polyethylene Glycol.” *J. of Gen. Microbial.* 92 : 413-417.
- Atlas, R. M. 1993. **Handbook of Microbiological Media**. Florida : CRC Press, Inc.
- Boonchan, S. 1991. “Studies on Formation, Regeneration and Fruiting Body Formation of
Pleurotus cystidiosus Protoplasts.” Master of Science (Environmental Biology), Mahidol
University.
- Chang, S. T. 1982. “Sexuality and Strain Improvement in Edible Mushroom.” **Mushroom
Newsletter for the Tropics**. 6(1) : 2-6.
- Chang, S. T., Li, G. S. F. and Peberdy, J. F. 1985. “Isolation of Protoplasts from Edible Fungi.”
Mircen Journal. 1 : 185-194.
- Chang, S. T. and Quimio, T. H. 1989. **Tropical Mushroom : Biological Nature and
Cultivation Method**. 3rd ed. Hong Kong : Polydesign Printing.

- Corner, E. J. H. 1981. "The Agaric Genera *Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species." **Beihefte Zur Nova Hedwigia**. 69 : 1-169.
- Devies, R. and Elvin, P. A. 1964. "The Effect of β -mercaptoethanol on Release of Invertase and Formation of Protoplasts of *Saccharomyces fragilis*." **Biochem. J.** 93 (3) : 8.
- Eger, G., Eden, G. and Wissig, E. 1976. "*Pleurotus ostreatus*-Breeding Potential of a New Cultivated Mushroom." **Theoretical and Applied Genetics**. 47 : 155-163.
- Eguchi, F., Fukuzumi, T. and Higaki, M. 1993. "Production of New Species of Edible Mushroom by Protoplasts Fusion Method. II. Analysis of the Mycelia and Basidiospores of a Fusant between *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe cylindracea*." **Mokuzai Gakkaishi**. 39(7) : 825-830.
- Eguchi, F. and Higaki, M. 1995. "Production of New Species of Edible Mushrooms by Protoplasts Fusion Method III. Protoplasts Fusion and Analysis of the Fusant between *Pleurotus sajor-caju* and *Mycocleptodonoides aitchisonii*." **Mokuzai Gakkaishi**. 41(3) : 342-348.
- Foury, F. and Goffeau, A. 1973. "Combination of 2-deoxyglucose and Snail Gut Enzyme Treatments for Preparing Sphaeroplasts of *Shizosaccharomyces pombe*." **J. of Gen. Microbiol.** 75 : 227-229.
- Fox, H. M. 1991. "Genetic Studies on the Edible Mushrooms *Lentinula edodes* and *Pleurotus* Species." Ph. D. Thesis of University of Nottingham.
- Gadau, M. E. and Lingg, A. J. 1992. "Protoplast Fusion in Fungi." 101-128. In Arora, D. K., Elander, R. P. and Mukerji, K. G. **Handbook of Applied Mycology Volume 4 : Fungal Biotechnology**. New York : Marcel Dekker. INC.
- Gascon, S., Ochoa, A. G. and Villaneuva, J. R. 1964. "Production of Yeast and Mold Protoplast by Treatment with the *Streptzyme* of *Micromonospora*." **As. Can. J. Microbiol.** 11 : 573-580.
- Gow, N. A. R. and Gadd, G. M. 1995. **The Growing Fungus**. 1st ed. London : Chapman & Hall.
- Gunde-Cimerman, N. 1999. "Medicinal Value of the Genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s. l., Basidiomycetes)." **International Journal of Medicinal Mushroom**. 1 : 69-80.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Hanson, L. E. and Howell, C. R. 2002. "Biocontrol Efficiency and Other Characteristics of Protoplast Fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*." **Mycol. Res.** 106(3) : 321-328.
- Hashiba, T. 1992. "Isolation of Fungal Protoplasts." 129-149. In Arora, D. K., Elander, R. P. and Mukerji, K. G. **Handbook of Applied Mycology Volume 4 : Fungal Biotechnology**. New York : Marcel Dekker, INC.
- Hilber, O. 1982. "Die Gattung *Pleurotus*." **Bibliotheca Mycologica**. 87 : 1-448.
- Imada, C., Okanishi, M. and Okami, Y. 1999. "Intergenous 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.
- Kao, K. N. and Michayluk, M. R. 1974. "A Method for High-Frequency Intergeneric Fusion of Plant Protoplasts." **Planta**. 115 : 355-367.
- Kawasumi, T., Kiuchi, N., Futasygi, Y., Ohba, K. and Yanagi, S. O. 1987. "High Yield Preparation of *Lentinus edodes* ("Shiitake") Protoplasts with Regeneration Capacity and Mating Type Stability." **Agric. Biol. Chem.** 63 : 1645-1656.
- Kiguchi, T. and Yanagi, S. O. 1985. "Intraspecific Heterokaryon and Fruit Body Formation in *Coprinus macrorrhizus* by Protoplast Fusion of Auxotrophic Mutants." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 22 : 121-127.
- Kim, B. K., Kang, J. H., Jin, M., Kim, H. W., Shim, M. J. and Choi, E. C. 2000. "Mycelial Protoplast Isolation and Regeneration of *Lentinus lepideus*." **Life Sciences**. 66(14) : 1359-1367.
- Kitamoto, Y., Mori, N., Yamamoto, M., Ohiwa, T. and Ichikawa, Y. 1988. "A Simple Method for Protoplast Formation and Improvement of Protoplast Regeneration from Various Fungi Using an Enzyme from *Trichoderma harzianum*." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 28 : 445-450.
- Kues, U. and Liu, Y. 2000. "Fruiting Body Production in Basidiomycetes." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 54 : 141-152.
- Liang, Z. R. and Zhao, L. Q. 1999. "A Study of Polarized Protoplast Fusion between *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus cystidiosus*." **Mycosystema**. 18(4) : 440-444.

- Magae, Y. *et al.* 1990. "Enzyme of Strain of *Pleurotus* species (Basidiomycetes) Compared by Electrophoresis." **J. Gen. Appl. Microbiol.** 36 : 69-80.
- Mukherjee, M. and Sengupta, S. 1986. "Mutagenesis of Protoplasts and Regeneration of Mycelium in the Mushroom *Volvariella volvacea*." **Applied and Environmental Microbiology.** 52(6) : 1412-1414.
- Mutsumoto, M., Eguchi, F. and Higaki, M. 1997. "Polyethylene Glycol Centrifugal Fusion Between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*." **Mokuzai Gakkaishi.** 43(2) : 215-219.
- Nagata, T. 1978. "A Novel Cell-fusion Method of Protoplasts by Polyvinyl alcohol." **Naturwissen.** 65 : 263-264.
- Ohira, I. 1990. "A Revision of the Taxonomic Status of *Pleurotus citrinopileatus*." **Reports of the Tottori Mycological Institute.** 28 : 143-150
- 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.** 89(5) : 474-478.
- Pacioni, G. 1981. **Simon & Schuster Guide to Mushroom.** New York : Simon & Schuster.
- Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F. and Davidian, J. B. 1988. **Practical Isozyme Genetics.** 1st ed. Chichester : Ellis Horwood Limited.
- Peberdy, J. F. 1976. "Isolation and Properties of Protoplasts from Filamentous Fungi." 39-50. in Peberdy, J.F., Rose, A. H., Rogers, H. J. and Cocking, E. C. **Microbial and Plant Protoplasts.** London : Academic Press INC.
- Peberdy, J. F., Rox, A. H., Rogrts, H. J. and Cocking, E. C. 1976. **Microbial and Plant Protoplasts.** London : Academic Press.
- Peberdy, J. F. 1979. "Fungal Protoplast : Isolation, Reversion and Fusion." **Ann. Rev. Microbiol.** 33 : 21-39.
- Peberdy, J. F. and Fox, H. M. 1993. "Protoplast Technology and Edible Mushrooms." 125-155. In Chang, S.T., Buswell, J. A. and Miles, P. G. **Genetics and Breeding of Edible Mushrooms.** Pennsylvania. : Gordon and Breach Science Publishers.
- Pegler, D. N. 1983. **Agaric Flora of the Lesser Antilles. Kew Balletn Additional Series IX.** London. : Hermajefty's Stationnerry Office.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Petersen, R. H. and Ridley, G. S. 1996. "A New Zealand *Pleurotus* with Multiple-Species Sexual Compatibility." **Mycologia**. 88(2) : 198-207.
- Raper, C. A. 1978. "Sexuality and Breeding." 83-117. In Chang, S. T. and Hayes, W. A. **The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms**. New York : Academic Press.
- Rjarathnam, S. and Bano, Z. 1991. "Biological Utilization of Edible Fruiting Fungi." 241-292. In Arora, D. K., Mukerji, K. G. and Marth, E. H. **Handbook of Applied Mycology**. Vol. 3. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Santiago, C. M. 1982. "Production of *Volvariella* Protoplasts by Use of Trichoderma Enzyme Mushroom." **Newsletter for the Tropics**. 3(2) : 3-5.
- Stamets, P. 1993. **Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms**. 2nd ed. Hong Kong : Ten Speed Press.
- Stamets, P. 2000. **Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms**. 1st ed. Canada : Ten Speed Press.
- Takechara, T., Kumata, A. and Aono, S. 1993. "Interspecific Protoplast Fusion between Some *Pleurotus* Species Using Auxotrophic Mutants." **Mokuzai Gakkaishi**. 39(7) : 855-859.
- Toyomasu, T., Matsumoto, T. and Mori, K. I. 1986. "Interspecific Protoplast Fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus salmoneo-stramineus*". **Agric. Biol. Chem.** 50(1) : 223-225.
- Toyomasu, T. and Mori, K. I. 1987a. "Intra-and Interspecific Protoplast Fusion between Some *Pleurotus* Species." **Agric. Biol. Chem.** 51(3) : 935-937.
- Toyomasu, T. and Mori, K. I. 1987b. "Fruit Body Formation of the Fusion Products Obtained on Interspecific Protoplast Fusion between *Pleurotus* Species." **Agric. Biol. Chem.** 51(7) : 2037-2040.
- Villanueva, J. R. and Acha, I. G. 1971. "Production and Use of Fungal Protoplast" 666-718. in Booth, C. **Microbiology**. Vol. 4. New York : Academic Press.
- Walting, R. 1973. **Identification of the Larger Fungi-Keys**. Amersham : Hulton Educational Publications.
- Wang, S. S. and Anderson, N. A. 1972. "A Genetic Analysis of Sporocarp Production in *Pleurotus sapidus*." **Mycologia**. 64 : 521-528.

- Wang, Z. S., Liao, J. H. and Wang, H. C. 1991. "Protoplast Fusion and Fusant variation in *Agaricus bisporus*." **Mushroom Science** **XII**. 1 : 17-22.
- Wang, F. D. 1992. "Interspecific Protoplast Fusion of Straw Mushroom and Behavior of Regeneration Strains." **Acta-Agriculture-Shanghai**. 8(1) : 14-19.
- Yokono, T., Tamai, Y., Azuma, T., Sakuma, Y., Miura, K., Kojima, Y., Sunagawa, M. and Ohmasu, M. 2000. "Karyotype Analysis of Interspecific Fusant of Basidiomycetes by Pulsed Field Gel Electrophoresis." **J. of Wood Science**. 46(6) : 480-484.
- Yoo, Y. B. and Cha, D. Y. 1993. "Gene Transfer in Edible Fungi Using Protoplasts." 157-191. In Chang, S. T., Buswell, J. A. and Miles, P. G. **Genetics and Breeding of Edible Mushrooms**. Amsterdam : Gordon and Breach Science Publishers.
- Zhang, C., Liang, Y. and Qin, H. 1995. "Protoplast Fusion of *Lentinus edodes* and Identification of Its Fusant." **Microbiology Beijing**. 22(2) : 67-71.
- Zhao, J. and Chang, S. T. 1995. "Intraspecific Hybridization in *Coprinus cinereus* and *Schizophyllum commune* by PEG-induced Protoplast Fusion and Electro-fusion." **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 11 : 585-590.
- Zhao, J. and Chang, S. T. 1996. "Intergeneric Hybridization between *Pleurotus ostreatus* and *Schizophyllum commune* by PEG-induced Protoplast Fusion." **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 12 : 573-578.
- Zimmermann, U. and Vienken, J. 1982. "Electric Field Induce Cell-to-Cell Fusion." **J. Membr. Biol.** 67 : 165-182.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ สารที่ใช้ในการแยกและรวมโพรโตพลาสต์

1. อาหารวอเตอร์อาการ์ (WA, water agar)

ชั่งวุ้น 15 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มล. ต้มให้วุ้นละลายเข้ากับน้ำจนมีลักษณะใส จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารพีดีเอ (PDA, potato dextrose agar)

ใช้อาหารพีดีเอสำเร็จรูป โดยชั่งพีดีเอ 39 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มล. นำไปต้มให้อาหารละลายเข้ากับน้ำจนมีลักษณะใส จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารมอลต์สีกัดอาการ์ (MEA, malt extract agar) (Atlas, 1993)

กลูโคส	20.0	กรัม
มอลต์สีกัด	20.0	กรัม
เปปโทน	1.0	กรัม
ผงวุ้น	20.0	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มล. นำไปต้มให้อาหารละลายเข้ากับน้ำจนมีลักษณะใส จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลวมอลต์สีกัด (MEB, malt extract broth)

กลูโคส	20.0	กรัม
มอลต์สีกัด	20.0	กรัม
เปปโทน	1.0	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มล. คนให้ส่วนประกอบทั้งหมดละลายเข้ากัน จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. การเตรียมบัฟเฟอร์

โซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ (โพแทสเซียม บัฟเฟอร์) 0.05 โมลาร์

เตรียมสารละลาย ก : สารละลายโซเดียมมาเลท 0.2 โมลาร์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ผสมกับมาลิกแอนไฮไดรด์ 19.6 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.

เตรียมสารละลาย ข : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.

การปรับค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ให้ใช้สารละลาย ก ปริมาตร 50 มล. ผสมกับสารละลาย ข ปริมาตร X มล. (จนกระทั่งได้ค่าพีเอชที่ต้องการ) แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 200 มล.

6. การเตรียมออสโมติกสเตบิลเซอร์

6.1. โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์

ละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 44.74 กรัม ในสารละลายในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1,000 มล.

6.2. แมกนีทอล 0.6 โมลาร์

ละลายแมกนีทอล 109.3 กรัม ในสารละลายโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1,000 มล.

6.3. แมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์

ละลายแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 147.84 กรัม ในสารละลายโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1,000 มล.

6.4. ซอร์บิทอล 0.6 โมลาร์

ละลายซอร์บิทอล 109.3 กรัม ในสารละลายโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1,000 มล.

6.5. ซูโครส 0.6 โมลาร์

ละลายซูโครส 205.2 กรัม ในสารละลายโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1,000 มล.

7. สารละลายไลซิ่งเอนไซม์

สารละลายไลซิ่งเอนไซม์ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มก./มล. เตรียมโดย ชั่งไลซิ่งเอนไซม์ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มก. ตามลำดับ ละลายในออสโมติกสเตบิลเซอร์ 1 มล. คนให้เอนไซม์ละลาย นำไปฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองมิลลิพอร์ (millipore filter) โดยใช้กระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. แคลเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์

ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 0.7351 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 0.5 ปริมาตร 100 มล.

9. สารละลายโพลิเอทรีนไกลคอล 6000 ความเข้มข้นร้อยละ 40

ชั่งโพลิเอทรีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุล 6000หนัก 40 กรัมละลายในแคลเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร. นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. อาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโตพลาสต์

แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

10.1 อาหารที่ใช้เลี้ยงโพรโตพลาสต์ ประกอบด้วย

มอลท์สกัด	20.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ผงวุ้น	30.0	กรัม
เปปโตน	1.0	กรัม
ซูโครส 0.6 โมลาร์	1.0	ลิตร

10.2 อาหารที่ใช้เทบับผิวหน้า

มอลท์สกัด	20.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ผงวุ้น	5.0	กรัม
เปปโตน	1.0	กรัม
ซูโครส 0.6 โมลาร์	1.0	ลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปต้มให้อาหารละลายเข้ากับน้ำจนมีลักษณะใส จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร. นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารที่ใช้เทบับผิวหน้า เป็นอาหารที่เทบับลงบนสารแขวนลอยของโพรโตพลาสต์ ดังนั้นนั้นต้องใช้ในสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. การเตรียม extraction buffer

Tris-HCl 0.2 M, pH 8.2

Stock solution

A : 0.2 M Solution of Tris (hydroxymethyl) aminomethane 2.4228 กรัม/100 มิลลิลิตร

B : 0.2 M HCl 1.66 กรัม/100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

นำ stock A 50 มิลลิลิตร ผสมกับ stock B 21.9 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วย NaOH ให้ได้ 8.2 บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม electrode buffer

Tris-glycine, pH 8.5 (X10)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 6.0 กรัม

Glycine 28.8 กรัม

H₂O adjust 1,000 มิลลิลิตร

3. การเตรียมส่วนประกอบของเจล

Stock A : acrylamide stock

Acrylamide 29.2 กรัม

N, N' -methylene- bis acrylamide 0.8 กรัม

H₂O adjust 100 มิลลิลิตร

Keep in dark condition at 4 °C

Stock B : 1.5 M tris-HCl, pH 8.8

Tris base 36.3 กรัม

1 M HCl 48.0 กรัม

Adjust to pH 8.8 with HCl

H₂O adjust 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keep in dark condition at 4 °C

Stock C : 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Tris base	6.0	กรัม
H ₂ O	60	มิลลิลิตร
Adjust to pH 6.8 with HCl		
H ₂ O adjust	100	มิลลิลิตร

Keep in dark condition at 4 °C

Stock D : 10% ammonium persulfate (fresh prepare)

(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0.1	กรัม
H ₂ O	1	มิลลิลิตร

ตารางที่ ข.1 แสดงอัตราส่วนที่ใช้ในการเตรียมเจล

Stock Solution	Running gel (7.5% gel)	Stracking gel (4.0% gel)
Stock A (ml)	2.5	1.3
Stock B (ml)	2.5	-
Stock C (ml)	-	2.5
Stock D (μl)	70	100
H ₂ O (ml)	4.85	6.1
TEMED (μl)	5.0	12.5
Total (ml)	10	10

4. การเตรียมสีย้อมเอนไซม์

4.1 Esterase

ละลาย fastblue RR salt 0.15 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติม 1% α-naphthyl acetate ใน absolute alcohol 3 มิลลิลิตร ย้อมเจลในที่มีด 30 นาที

การเตรียม 0.1 M phosphate buffer pH 6.0

Stock A : monosodium phosphate (NaH₂PO₄·H₂O) 13.9 กรัม/1000 มิลลิลิตร

Stock B : disodium phosphate (Na₂HPO₄) 53.65 กรัม/1000 มิลลิลิตร

นำ stock A 87.7 มล. ผสมกับ stock B 12.3 มล. เติมน้ำกลั่นพร้อมปรับพีเอชให้ได้ 6.0 ที่ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 Malate dehydrogenase

ประกอบด้วย

Tris-A buffer	35	มิลลิลิตร
Malic acid 2 M (pH 7.0)	5	มิลลิลิตร
MgCl ₂ (0.5 M)	0.3	มิลลิลิตร
NAD (1% ใน H ₂ O)	2	มิลลิลิตร
ก่อนใช้เติม		
NBT (1% ใน H ₂ O)	1	มิลลิลิตร
PMS (1% ใน H ₂ O)	0.5	มิลลิลิตร
MTT (1% ใน H ₂ O)	1	มิลลิลิตร

บ่มเจลในที่มีดจนกระทั่งเกิดแถบสีน้ำเงิน (ประมาณ 30-60 นาที)

การเตรียม 2 M Malic acid (pH 7.0)

Malic acid	536.4	กรัม
NaOH	320	กรัม

ในการเตรียมจะเกิดปฏิกิริยาที่อันตรายควรวางอุปกรณ์แก้วบนน้ำแข็ง แล้วค่อยๆ เติม

NaOH

4.3 Alcohol dehydrogenase

Tris-A buffer	40	มิลลิลิตร
0.5 M MgCl	0.2	มิลลิลิตร
ethanol (95%)	3	มิลลิลิตร
NAD (1% ใน H ₂ O)	2	มิลลิลิตร
ก่อนใช้เติม		
NBT (1% ใน H ₂ O)	1	มิลลิลิตร
MTT (1% ใน H ₂ O)	0.3	มิลลิลิตร
PMS (1% ใน H ₂ O)	0.5	มิลลิลิตร

บ่มเจลในที่มีดจนกระทั่งเกิดแถบสีน้ำเงิน (ประมาณ 30-60 นาที)

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การวิเคราะห์ทางสถิติของภาพที่ 4.8

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	2	14.721	7.360	530.894**
ความคลาดเคลื่อน	9	0.125	0.014	
ผลรวม	11	14.845		

C.V. =1.54%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05		
	1	2	3
วอเตอร์อาร์	6.2500		
พีดีเอ		7.9150	
มอลท์สก็ดอาร์			8.9375

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	2	7.675	3.838	117.380**
ความคลาดเคลื่อน	9	0.294	0.033	
ผลรวม	11	7.970		

C.V. =3.34%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05		
	1	2	3
วอเตอร์อาร์	4.4375	5.4825	6.3950
พีดีเอ			
มอลท์สก็ดอาร์			

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	2	18.628	9.314	3982.151**
ความคลาดเคลื่อน	9	0.021	0.002	
ผลรวม	11	18.649		

C.V. =0.61%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05		
	1	2	3
วอเตอร์อาร์	5.5875	8.0275	8.3950
พีดีเอ			
มอลท์สก็ดอาร์			

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมวทที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	2	13.419	6.709	750.808**
ความคลาดเคลื่อน	9	0.080	0.009	
ผลรวม	11	13.499		

C.V. =2.37%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05		
	1	2	3
วอเตอร์อาร์	2.6975	4.0225	5.2875
พีดีเอ			
มอลท์สก็ดอาร์			

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดป้าสื้อที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	2	1.768	0.884	60.075**
ความคลาดเคลื่อน	9	0.132	0.015	
ผลรวม	11	1.901		

C.V. = 5.17%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05	
	1	2
วอเตอร์อาร์	1.835	2.5375
พีดีเอ		
มอลท์สก็ดอาร์		2.7275

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 แสดงผลการศึกษานาชนิดของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวอเตอร์อาการ์ อาหารพีดีเอ อาหารมอลท์สกัดอาการ์ พีเอช 6.0 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน

ชนิดของเห็ด	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนิบนอาหารชนิดต่างๆ (ซม.)		
	วอเตอร์อาการ์	พีดีเอ	มอลท์สกัดอาการ์
นางรม	6.25c	7.92b	8.94a
นางฟ้า	4.44c	5.48b	6.40a
นางรมทอง	5.59c	8.03b	8.40a
นางนวล	2.70c	4.02b	5.29a
เป้าฮื้อ	1.84b	2.54a	2.73a

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

2. การวิเคราะห์ทางสถิติของภาพที่ 4.9

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	6	14.158	2.360	3623.728**
ความคลาดเคลื่อน	21	0.014	0.001	
ผลรวม	27	14.172		

C.V. =0.37%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

พืชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05			
	1	2	3	4
4.0	6.9325	8.2100	8.5700	9.0000
4.5				
5.0				
5.5				9.0000
6.0				9.0000
6.5				9.0000
7.0				9.0000

พืชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
พืชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	6	73.267	12.211	215.035**
ความคลาดเคลื่อน	21	1.193	0.057	
ผลรวม	27	74.460		

C.V. =4.33%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

พืชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
4.0	2.8275	3.4575	5.1825	6.6575	7.1275
4.5					
5.0					
5.5				6.6825	
6.0				6.7325	
6.5					
7.0					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พื้เอชของอาหารเลียงเชื้อที่เหมะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมทองที่เจริญมาจากสปอร์เคียว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
พื้เอชของอาหารเลียงเชื้อ	6	164.724	10.787	949.728**
ความคลาดเคลื่อน	21	0.2375	0.011	
ผลรวม	27	64.962		

C.V. =1.46%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

พื้เอชของอาหารเลียงเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05					
	1	2	3	4	5	6
4.0	4.2375					
4.5		5.6600				
5.0			7.2250			
5.5				7.9825		
6.0					8.2925	
6.5					8.4450	8.4450
7.0						8.4950

พื้เอชของอาหารเลียงเชื้อที่เหมะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมขาวที่เจริญมาจากสปอร์เคียว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
พื้เอชของอาหารเลียงเชื้อ	6	37.532	6.255	211.229**
ความคลาดเคลื่อน	21	0.622	0.030	
ผลรวม	27	38.154		

C.V. =3.78%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

พืชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
4.0	2.3775				
4.5		4.0450			
5.0		4.0900			
5.5			4.4725		
6.0				5.4175	
6.5				5.5750	
7.0					6.0975

พืชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดเป๋าฮื้อที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
พืชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	6	13.837	2.306	55.804**
ความคลาดเคลื่อน	21	0.868	0.041	
ผลรวม	27	14.705		

C.V. =6.86%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

พืชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05			
	1	2	3	4
4.0	1.7825			
4.5	2.0650			
5.0		2.8050		
5.5			3.2350	
6.0			3.5325	3.5325
6.5				3.6000
7.0				3.6200

ตารางที่ ค.2 แสดงผลการศึกษาหาพีเอชของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารมอลต์สัปดาห์ที่พีเอชต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน

ชนิดของเห็ด	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ที่ระดับพีเอชต่างๆ (ซม.)						
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
นางรม	6.93d	8.21c	8.57b	9.00a	9.00a	9.00a	9.00a
นางฟ้า	2.83e	3.46d	5.18c	6.66b	6.68b	6.73b	7.13a
นางรมทอง	4.23f	5.64c	7.23d	7.98c	8.29b	8.45ab	8.50a
นางนวล	2.38e	4.05d	4.09d	4.47c	5.42b	5.58b	6.10a
เป่าฮือ	1.78d	2.07d	2.81c	3.24b	3.53ab	3.60a	3.62a

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

3. การวิเคราะห์ทางสถิติของภาพที่ 4.10

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ	4	237.971	59.493	2126.894**
ความคลาดเคลื่อน	15	0.420	0.028	
ผลรวม	19	238.391		

C.V. =2.47%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

อุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05			
	1	2	3	4
35	0			
15		7.2000		
20			8.6750	
25				8.9775
30				9.0000

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ	4	175.105	43.776	2978.654**
ความคลาดเคลื่อน	15	0.220	0.015	
ผลรวม	19	175.326		

C.V. =2.13%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

อุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
35	0				
15		5.9750			
20			7.0900		
25				7.6075	
30					8.0775

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ	4	151.74	37.935	1383.739**
ความคลาดเคลื่อน	15	0.411	0.027	
ผลรวม	19	152.152		

C.V. =3.47%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

อุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
35	0				
15		4.3675			
20			4.6925		
30				6.3300	
25					8.3175

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ	4	90.224	22.556	649.123**
ความคลาดเคลื่อน	15	0.521	0.035	
ผลรวม	19	90.745		

C.V. =5.07%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

อุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
35	0				
15		3.3675			
20			3.6925		
30				5.0800	
25					6.3175

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดเป๋าฮื้อที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ	4	33.747	8.437	644.932**
ความคลาดเคลื่อน	15	0.196	0.013	
ผลรวม	19	33.943		

C.V. =4.98%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

อุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
35	0				
15		1.9275			
20			2.6400		
30				3.0875	
25					3.8075

ตารางที่ ก.3 แสดงผลการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดจำนวน 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว เมื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารมอลต์สัปดาห์การที่พีเอช 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 9 วัน

ชนิดของเห็ด	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) ที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ต่างๆ				
	15	20	25	30	35
นางรม	7.20c	8.68b	8.98a	9.00a	0d
นางฟ้า	5.98d	7.09c	7.61b	8.08a	0e
นางรมทอง	4.37d	4.69c	8.32a	6.33b	0e
นางนวล	3.37d	3.69c	6.32a	5.08b	0e
เป้าฮื้อ	1.93d	2.64c	3.18a	3.09b	0e

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

4. การวิเคราะห์ทางสถิติของภาพที่ 4.11

ความเข้มข้นของสารละลายไลซิงเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ความเข้มข้นของสารละลายไลซิงเอนไซม์	6	27.183	4.530	343.964**
ความคลาดเคลื่อน	21	0.277	0.013	
ผลรวม	27	27.460		

C.V. =3.90%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของสารละลายไลซิงเอนไซม์	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
4	1.3800				
5		2.0000			
6			2.6500		
7			2.7800		
8				3.5000	
10				3.5200	
9					4.5900

ความเข้มข้นของสารละลายไลซิงเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ความเข้มข้นของสารละลายไลซิงเอนไซม์	6	14.960	2.493	581.773**
ความคลาดเคลื่อน	21	0.090	0.004	
ผลรวม	27	15.050		

C.V. =3.49%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของสารละลายไลซิงเอนไซม์	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
4	0.6400				
10		1.1200			
9			1.5900		
5			1.6000		
6				2.4100	
7				2.4600	
8					2.8200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของสารละลายไคซิงเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ความเข้มข้นของสารละลายไคซิงเอนไซม์	6	8.353	1.392	302.658**
ความคลาดเคลื่อน	21	0.097	0.005	
ผลรวม	27	8.450		

C.V. =4.04%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของสารละลายไคซิงเอนไซม์	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05						
	1	2	3	4	5	6	7
4	0.9200						
5		1.3300					
6			1.4500				
7				1.6400			
10					2.0000		
9						2.2300	
8							2.6600

ความเข้มข้นของสารละลายไคซิงเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ความเข้มข้นของสารละลายไคซิงเอนไซม์	6	27.875	4.646	390.443**
ความคลาดเคลื่อน	21	0.250	0.012	
ผลรวม	27	28.125		

C.V. =5.77%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของสารละลายไลซิงเอนไซม์	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
4	0.5200	1.4000	1.9600	2.6100	3.3600
5	0.7800				
6					
7					
10				2.6100	
8				2.6800	
9					3.3600

ความเข้มข้นของสารละลายไลซิงเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ด
เห็ดที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ความเข้มข้นของสารละลายไลซิงเอนไซม์	6	0.258	0.043	32.898**
ความคลาดเคลื่อน	21	0.027	0.001	
ผลรวม	27	0.286		

C.V. =6.73%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของสารละลายไลซิงเอนไซม์	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
4	0.3600	0.3700	0.4200	0.5300	0.5800
5	0.3700				
6					
7					
8				0.5300	
9				0.5800	0.5800
10					0.6200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.4 แสดงผลของความเข้มข้นของสารละลายไลซิงเอนไซม์ (4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 มก./มล.) ที่มีต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด (อายุ 4 วัน) 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์ ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0

ชนิดของเห็ด	ปริมาณโปรโตพลาสต์ x10 ⁶ เมื่อบ่มเส้นใยเห็ดในสารละลายไลซิงเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ						
	4	5	6	7	8	9	10
นางรม	1.38e	2.00d	2.65c	2.78c	3.50b	4.59a	3.52b
นางฟ้า	0.64e	1.60c	2.41b	2.46b	2.82a	1.59c	1.12d
นางรมทอง	0.92g	1.33f	1.45e	1.64d	2.66a	2.23b	2.00c
นางนวล	0.52e	0.78e	1.40d	1.96c	2.68b	3.36a	2.61b
เป้าฮื้อ	0.36e	0.37ed	0.42cd	0.43c	0.53b	0.58ab	0.62a

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

5. การวิเคราะห์ทางสถิติของภาพที่ 4.12

ชนิดของออสโมติกสเทปีไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ชนิดของออสโมติกสเทปีไลเซอร์	3	37.718	12.573	1594.837**
ความคลาดเคลื่อน	12	0.095	0.008	
ผลรวม	15	37.813		

C.V. =4.38%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05			
	1	2	3	4
ออสโมติกสเตรปีไลเซอร์				
แมนนิทอล	0.8300			
ซอร์บิทอล		1.1700		
โพแทสเซียมคลอไรด์			1.5000	
แมกนีเซียมซัลเฟต				4.6700

ชนิดของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ชนิดของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์	3	4.310	1.437	41.161**
ความคลาดเคลื่อน	12	0.419	0.035	
ผลรวม	15	4.728		

C.V. =9.40%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05		
	1	2	3
ออสโมติกสเตรปีไลเซอร์			
ซอร์บิทอล	1.3100		
แมนนิทอล		1.8500	
โพแทสเซียมคลอไรด์		2.0400	
แมกนีเซียมซัลเฟต			2.7600

ชนิดของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ชนิดของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์	3	4.013	1.338	52.356**
ความคลาดเคลื่อน	12	0.3.07	0.026	
ผลรวม	15	4.320		

C.V. =8.44%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05		
ออสโมติกสเตรปีไลเซอร์	1	2	3
ซอร์บิทอล	1.2400		
แมนนิทอล		1.8300	
โพแทสเซียมคลอไรด์		1.9300	
แมกนีเซียมซัลเฟต			2.6500

ชนิดของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางพลที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ชนิดของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์	3	22.715	7.572	1130.085**
ความคลาดเคลื่อน	12	0.080	0.007	
ผลรวม	15	22.795		

C.V. =5.65%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของ	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05			
ออสโมติกสเตรปีไลเซอร์	1	2	3	4
แมนนิทอล	0.1700			
ซอร์บิทอล		0.6700		
โพแทสเซียมคลอไรด์			1.8000	
แมกนีเซียมซัลเฟต				3.2700

ชนิดของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดเป๋าฮื้อที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ชนิดของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์	3	0.701	0.234	113.608**
ความคลาดเคลื่อน	12	0.025	0.002	
ผลรวม	15	0.725		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C.V. =16.56%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของ ออสโมติกสเตรปีไลเซอร์	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05	
	1	2
ซอร์บิทอล	0.1200	0.6300
แมนนิทอล	0.1475	
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.1800	
แมกนีเซียมซัลเฟต		

ตารางที่ ๕.5 แสดงผลของชนิดของออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ (โพแทสเซียมคลอไรด์ ซอร์บิทอล แมนนิทอล และแมกนีเซียมซัลเฟต ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) ที่มีต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* เมื่อ บ่มและเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ ไลซิงเอนไซม์ ที่มีความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ

ชนิดของเห็ด	ปริมาณโปรโตพลาสต์ x10 ⁶			
	โพแทสเซียมคลอไรด์	ซอร์บิทอล	แมนนิทอล	แมกนีเซียมซัลเฟต
นางรม	1.50b	1.17c	0.83d	4.67a
นางฟ้า	2.04b	1.31c	1.85b	2.76a
นางรมทอง	1.93b	1.24c	1.83b	2.65a
นางนวล	1.80b	0.67c	0.17d	3.27a
เป้าฮื้อ	0.18b	0.12b	0.15b	0.63a

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ ความเป็นไปได้ .05

6. การวิเคราะห์ทางสถิติของภาพที่ 4.13

ความเข้มข้นของออสโมติกสเดบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ความเข้มข้นของออสโมติกสเดบิไลเซอร์	4	236.860	59.215	13376.910**
ความคลาดเคลื่อน	15	0.066	0.004	
ผลรวม	19	236.927		

C.V. =1.53%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของ ออสโมติกสเดบิไลเซอร์	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05			
	1	2	3	4
0	0			
0.3	0.1000			
0.6		4.6800		
1.2			6.1700	
0.9				8.7800

ความเข้มข้นของออสโมติกสเดบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ความเข้มข้นของออสโมติกสเดบิไลเซอร์	4	201.362	50.341	17642.706**
ความคลาดเคลื่อน	15	0.043	0.003	
ผลรวม	19	201.405		

C.V. =1.46%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของ ออสโมติกสเทปีไลเซอร์	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
0	0				
0.3		1.3300			
0.6			2.6300		
1.2				6.3200	
0.9					8.5000

ความเข้มข้นของออสโมติกสเทปีไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมทองที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ความเข้มข้นของออสโมติกสเทปีไลเซอร์	4	307.797	76.949	17978.813**
ความคลาดเคลื่อน	15	0.064	0.004	
ผลรวม	19	307.861		

C.V. =1.44%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของ ออสโมติกสเทปีไลเซอร์	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
0	0				
0.3		1.5000			
0.6			2.6500		
0.9				7.2800	
1.2					10.5500

ความเข้มข้นของออสโมติกสเทปีไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ความเข้มข้นของออสโมติกสเทปีไลเซอร์	4	212.503	53.126	9615.507**
ความคลาดเคลื่อน	15	0.083	0.006	
ผลรวม	19	212.586		

C.V. =2.15%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของ ออสโมติกสเทปีไลเซอร์	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
0	0				
0.3		0.1575			
0.6			3.2800		
1.2				6.5000	
0.9					8.0500

ความเข้มข้นของออสโมติกสเทปีไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดเป๋าฮื้อที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ความเข้มข้นของออสโมติกสเทปีไลเซอร์	4	16.757	4.189	669.928**
ความคลาดเคลื่อน	15	0.094	0.006	
ผลรวม	19	16.851		

C.V. =7.05%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ความเข้มข้นของ ออสโมติกสเตรปีไลเซอร์	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05			
	1	2	3	4
0	0			
0.3		0.5800		
0.6		0.6600		
1.2			1.6700	
0.9				2.5800

ตารางที่ ๑.6 แสดงผลของความเข้มข้นของสารออสโมติกสเตรปีไลเซอร์ที่เหมาะสม (แมกนีเซียมซัลเฟต ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) ที่มีต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ (ต่อมล.) ของเส้นใยเห็ด 5 ชนิดในสกุล *Pleurotus* เมื่อต้มและแช่ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ไลซิงเอนไซม์ ที่มีความเข้มข้น 9, 8, 8, 9 และ 10 มก./มล. สำหรับเห็ดแต่ละชนิด ตามลำดับ

ชนิดของเห็ด	ปริมาณโปรโตพลาสต์ x 10 ⁶				
	0	0.3	0.6	0.9	1.2
นางรม	0d	0.10d	4.68c	8.78a	6.17b
นางฟ้า	0e	1.33d	2.63c	8.50a	6.32b
นางรมทอง	0e	1.50d	2.65c	7.28b	10.55a
นางนวล	0e	0.30d	3.28c	8.05a	6.50b
เป้าสื้อ	0d	0.58c	0.66c	2.58a	1.67b

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

7. การวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาขนาดของเส้นใยเห็ด

ขนาดของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ขนาดของเส้นใยเห็ด	4	5.538	1.384	15.949**
ความคลาดเคลื่อน	20	1.736	0.087	
ผลรวม	24	7.274		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C.V. =10.28%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของเห็ด	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05		
	1	2	3
เห็ดนางรมทอง	2.3800		
เห็ดนางรม	2.4300		
ลูกผสม Fu1		2.8400	
ลูกผสม Fu2		3.0000	
ลูกผสม Fu3			3.6800

ตารางที่ ก.7 แสดงผลการวัดขนาดของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่

ชนิดของเห็ด	ขนาดของเส้นใยเห็ด (ไมโครเมตร)
นางรม	2.43c
นางรมทอง	2.38c
เห็ดลูกผสม Fu1	3.00b
เห็ดลูกผสม Fu2	3.68a
เห็ดลูกผสม Fu3	2.84b

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

ขนาดของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ขนาดของเส้นใยเห็ด	3	1.865	0.622	12.612**
ความคลาดเคลื่อน	16	0.789	0.049	
ผลรวม	19	2.654		

C.V. =8.42%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของเห็ด	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05	
	1	2
เห็ดนางรม	2.2400	
เห็ดนางรม	2.4300	
ลูกผสม Fu4		2.8400
ลูกผสม Fu5		3.0000

ตารางที่ ค.8 แสดงผลการวัดขนาดของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่

ชนิดของเห็ด	ขนาดของเส้นใยเห็ด (ไมโครเมตร)
เห็ดนางรม	2.43b
เห็ดนางรม	2.24b
เห็ดลูกผสม Fu4	2.76a
เห็ดลูกผสม Fu5	3.00a

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

8. การวิเคราะห์ทางสถิติของตารางที่ 4.4

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเห็ด	4	41.915	10.479	1936.320**
ความคลาดเคลื่อน	15	0.081	0.005	
ผลรวม	19	41.996		

C.V. =0.95%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของเห็ด	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05				
	1	2	3	4	5
เห็ดลูกผสม Fu2	5.0000	7.0700	7.3150	8.8325	9.0000
เห็ดลูกผสม Fu3					
เห็ดนางรมทอง					
เห็ดนางรม					
เห็ดลูกผสม Fu1					

ตารางที่ ค.9 แสดงผลการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่

ชนิดของเห็ด	ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)
เห็ดนางรม	8.83b
เห็ดนางรมทอง	7.32c
เห็ดลูกผสม Fu1	9.00a
เห็ดลูกผสม Fu2	5.00e
เห็ดลูกผสม Fu3	7.07d

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง โค โลนีของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่

แหล่งความแปรผัน	DF	SS	MS	F
ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง โค โลนีของเส้นใยเห็ด	3	97.687	32.562	10539.433**
ความคลาดเคลื่อน	12	0.037	0.003	
ผลรวม	15	97.724		

C.V. =0.73%

** หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ชนิดของเห็ด	เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ 0.05		
	1	2	3
เห็ดนางนวล	3.2400	8.8325	9.0000
เห็ดนางรม			
เห็ดลูกผสม Fu4			
เห็ดลูกผสม Fu5			

ตารางที่ ค.10 แสดงผลการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่

ชนิดของเห็ด	ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)
เห็ดนางรม	8.83b
เห็ดนางนวล	3.24c
เห็ดลูกผสม Fu4	9.00a
เห็ดลูกผสม Fu5	9.00a

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

ภาคผนวก ง

ผลการศึกษาความเสถียรของลูกผสม

1. การศึกษาความเสถียรของเห็ดลูกผสม

หลังจากทำการเก็บรักษาเชื้อเห็ดลูกผสมโดยวิธีเก็บไว้ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แล้วนำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 45 วัน ได้ทำการถ่ายเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็งมอลต์สกัด พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ 7 วัน จนครบ 5 ครั้ง และได้นำเชื้อแต่ละครั้งมาวัดการเจริญของโคโลนีและขนาดของเส้นใย แล้วจึงนำไปเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างต้มสุกที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเส้นใยเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่างได้นำไปเพาะในก้อนขี้เลื่อย แล้วทำการเปิดดอกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดเปรียบเทียบกับดอกเห็ดที่ได้ในครั้งแรก พบว่าลูกผสมแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะต่างๆ ดังนี้

1.1 เห็ดลูกผสม Fu1

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu1 เมื่อทำการถ่ายเชื้อในแต่ละครั้ง พบว่าการเจริญของโคโลนีและขนาดของเส้นใยไม่แตกต่างจากครั้งแรก แต่เมื่อนำไปเพาะในก้อนขี้เลื่อย พบว่าในครั้งที่ 4 และ 5 ของการถ่ายเชื้อ เมื่อนำไปเพาะจะไม่เกิดดอก ส่วนครั้งที่ 1, 2 และ 3 พบว่าในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ดอกเห็ดมีขนาดเล็กและไม่มีสปอร์ ส่วนครั้งที่ 2 พบว่าเห็ดลูกผสมเริ่มเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยสีของดอกเปลี่ยนเป็นสีขาวครีมเหมือนเห็ดนางรมแต่ขนาดและรูปทรงของดอกเห็ด และสีของสปอร์พิมพ์ยังคงเหมือนเห็ดนางรมทอง สำหรับครั้งที่ 3 พบว่าดอกเห็ดลูกผสมมีขนาดและรูปทรงของดอกเห็ด และสีของสปอร์พิมพ์ เหมือนเห็ดนางรม ซึ่งแสดงว่าเชื้อลูกผสมไม่มีความเสถียร (ภาพที่ ง.1 และภาพที่ ง.6) โดยที่ลูกผสมยังคงไว้เฉพาะลักษณะของเห็ดนางรม แสดงว่านิเวศนิสัยของเห็ดนางรมทองไม่เสถียร

1.2 เห็ดลูกผสม Fu2

เห็ดลูกผสม Fu2 เป็นเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ที่ไม่เกิดดอก และเมื่อนำเส้นใยเห็ดที่เก็บไว้มาทำการถ่ายเชื้อ พบว่าโคโลนีของลูกผสมไม่เปลี่ยนไปจากเดิม ซึ่งแสดงว่าเชื้อเห็ดลูกผสมมีความเสถียรในการถ่ายเชื้อทั้ง 5 ครั้ง (ภาพที่ ง.2)

1.3 เห็ดลูกผสม Fu3

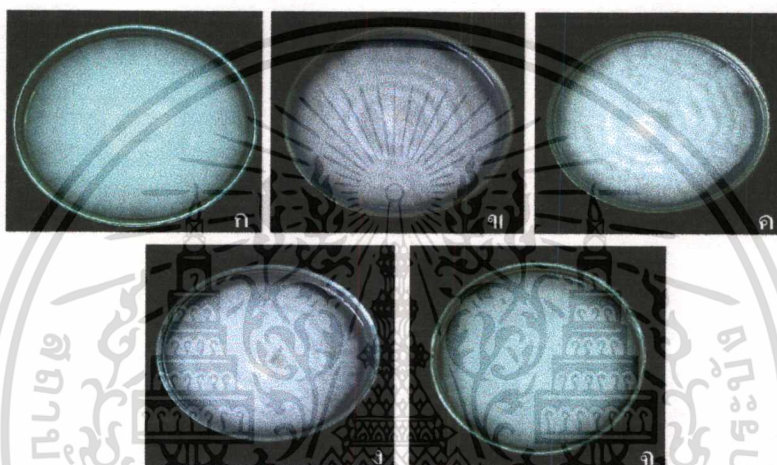
เห็ดลูกผสม Fu3 เป็นเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ที่ไม่เกิดดอก และเมื่อนำเส้นใยเห็ดที่เก็บไว้มาทำการถ่ายเชื้อ พบว่าโคโลนีของลูกผสมเปลี่ยนไปจากเดิม ซึ่งแสดงว่าเชื้อลูกผสมไม่มีความเสถียร (ภาพที่ ง.3)

1.4 เห็นดูลูกผสม Fu4

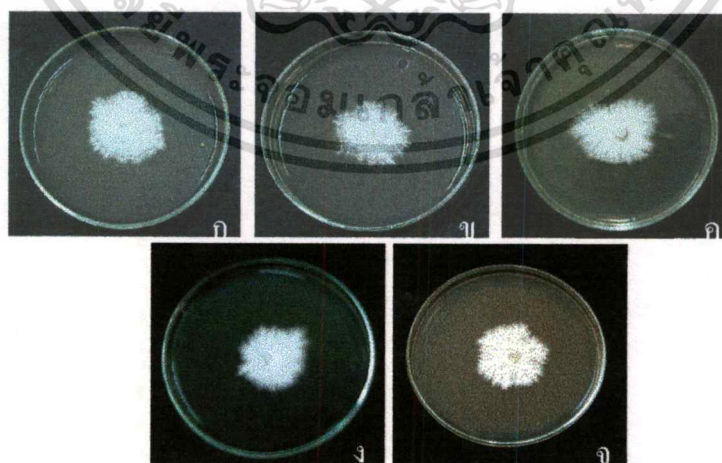
เห็นดูลูกผสม Fu4 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปรวมทั้งมีสีของสปอร์พิมพ์เป็นสีชมพูปนเทาเหมือนกับที่เพาะได้ในครั้งแรก (ภาพที่ ง.4 และภาพที่ ง.7) ซึ่งแสดงว่าเชื้อเห็นดูลูกผสมมีความเสถียรในการถ่ายเชื้อทั้ง 5 ครั้ง

1.5 เห็นดูลูกผสม Fu5

เห็นดูลูกผสม Fu5 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปรวมทั้งมีสีของสปอร์พิมพ์เหมือนกับที่เพาะได้ในครั้งแรก (ภาพที่ ง.5 และภาพที่ ง.8) ซึ่งแสดงว่าเชื้อเห็นดูลูกผสมมีความเสถียรในการถ่ายเชื้อทั้ง 5 ครั้ง

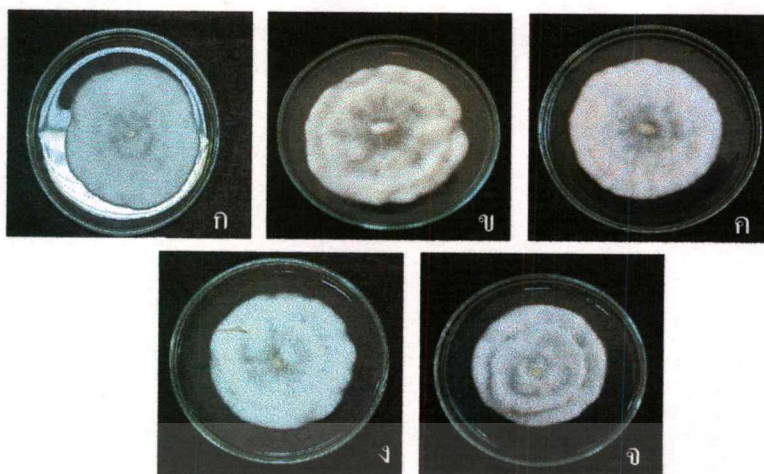


ภาพที่ ง.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเห็นดูลูกผสม Fu1 ที่เลี้ยงบนอาหารมอลต์สกัด พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 7 วัน ก. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ข. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ค. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ง. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 จ. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 5

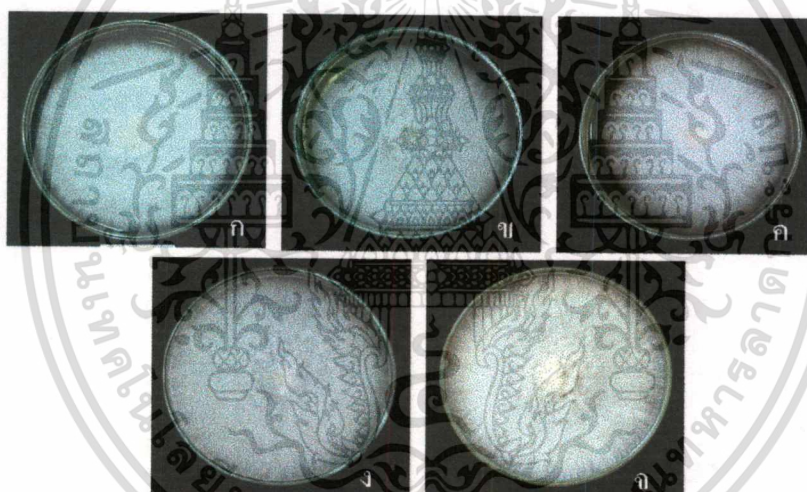


ภาพที่ ง.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเห็นดูลูกผสม Fu2 ที่เลี้ยงบนอาหารมอลต์สกัด พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 7 วัน ก. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ข. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ค. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ง. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 จ. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

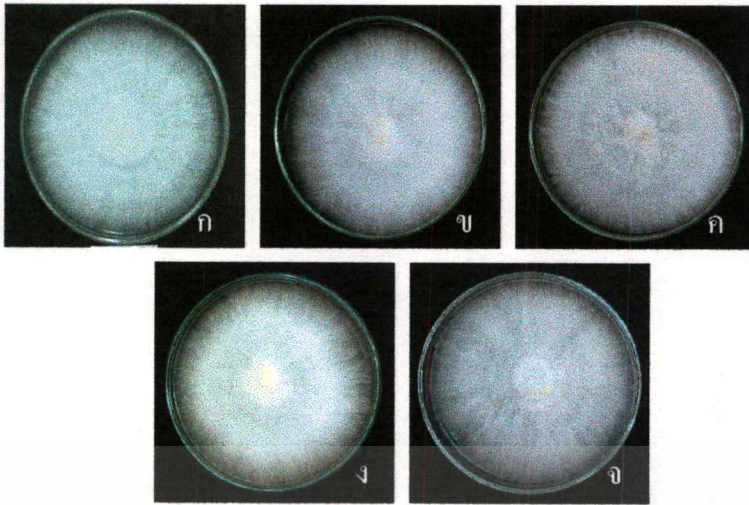


ภาพที่ 3.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเห็ดลูกผสม Fu3 ที่เลี้ยงบนอาหารมอลต์สกัด พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายภาพเชื้อทุกๆ 7 วัน ก. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ข. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ค. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ง. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 จ. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 5



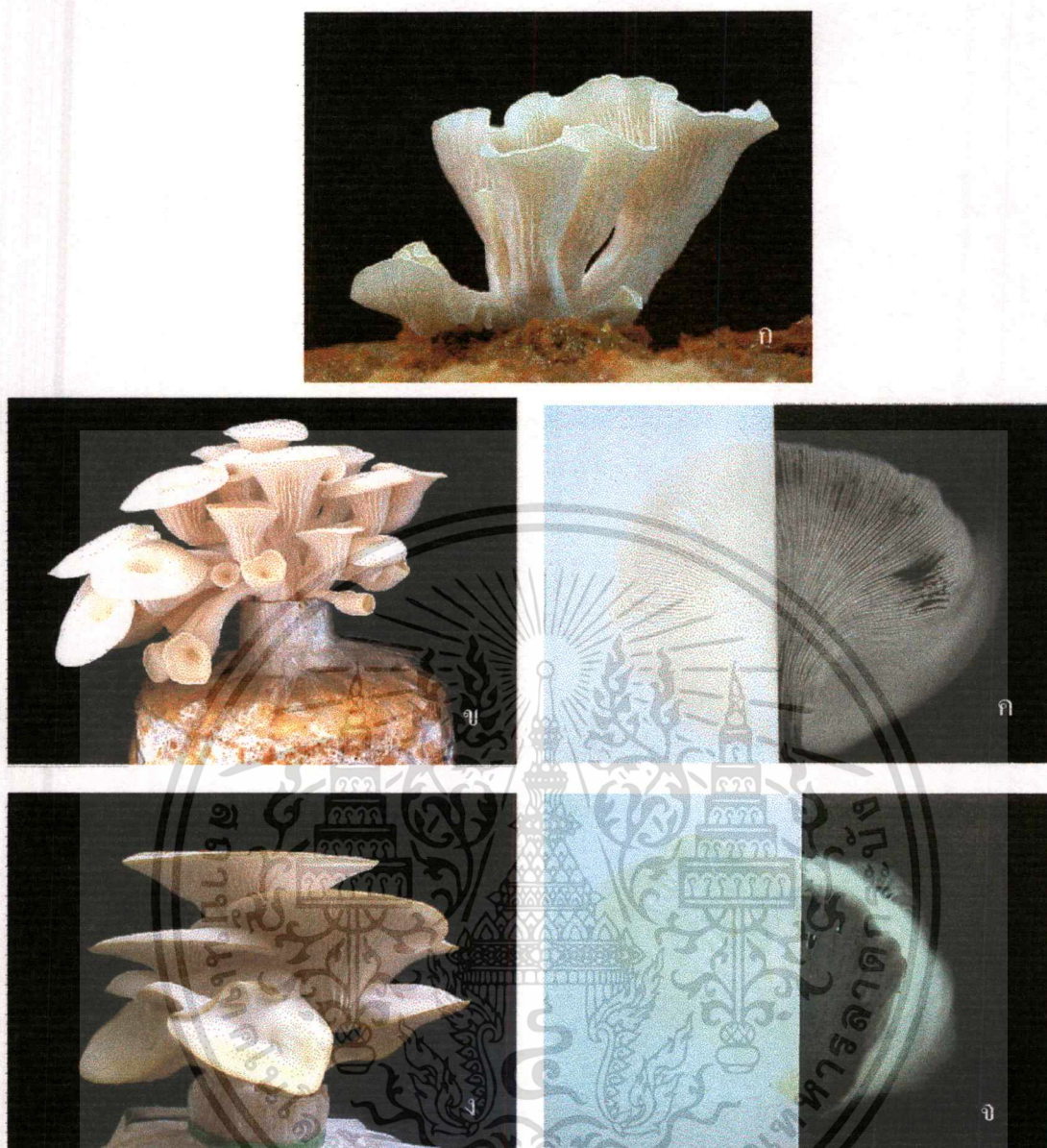
ภาพที่ 3.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเห็ดลูกผสม Fu4 ที่เลี้ยงบนอาหารมอลต์สกัด พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายภาพเชื้อทุกๆ 7 วัน ก. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ข. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ค. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ง. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 จ. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

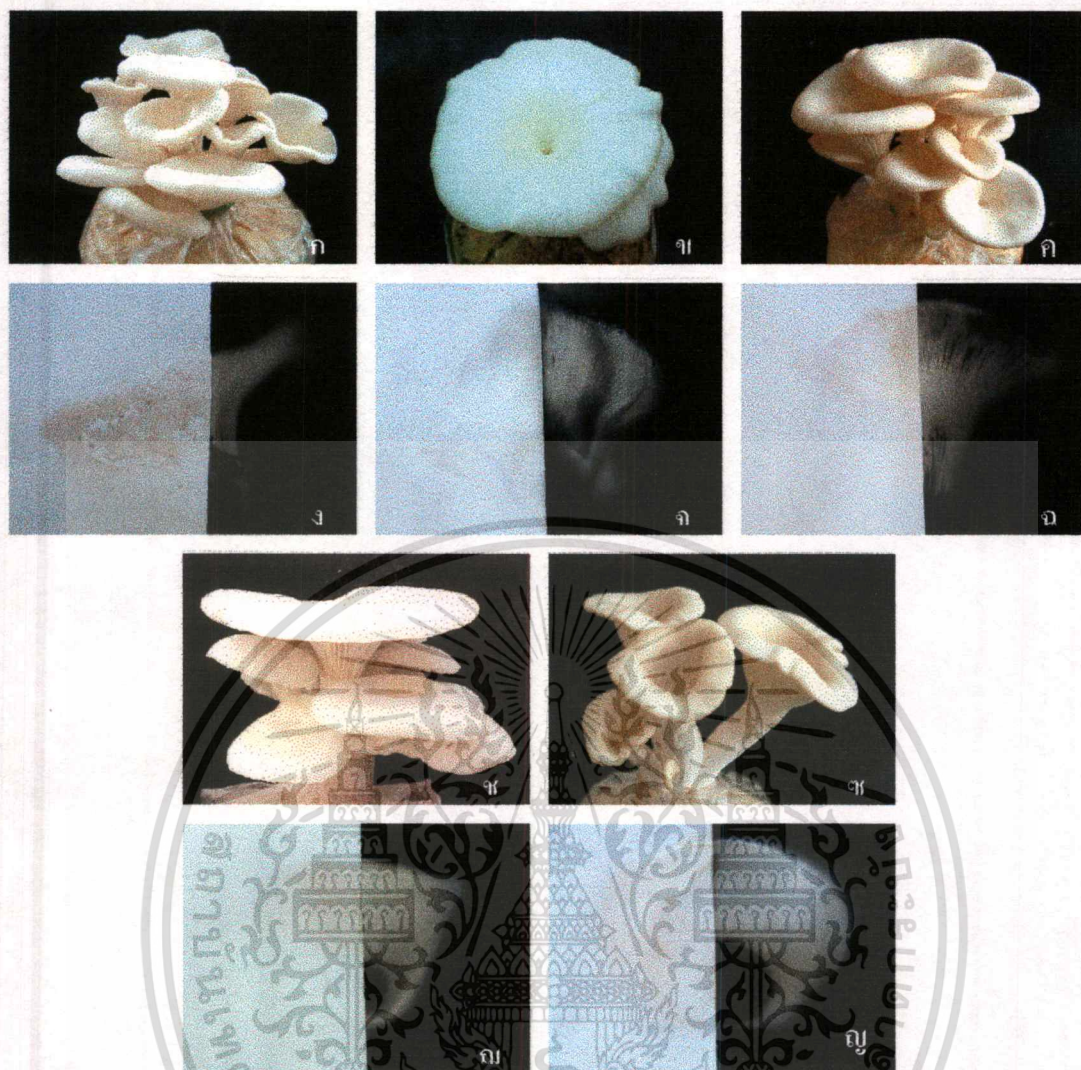


ภาพที่ 3.5 แสดงลักษณะโคโลนีของเห็ดรา Fusarium ที่เลี้ยงบนอาหารมอลต์สกัด พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายภาพเชื้อทุกๆ 7 วัน ก. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ข. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ค. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ง. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 จ. ถ่ายเชื้อครั้งที่ 5





ภาพที่ 3.6 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสม Fu1 หลังจากทำการถ่ายเชื้อแล้วนำมาเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย ก. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ข. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ค. สปอร์พิมพ์ของเห็ดลูกผสม Fu1 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ง. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 จ. สปอร์พิมพ์ของเห็ดลูกผสม Fu1 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3



ภาพที่ ๗.๗ แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดดอกผสม Fu4 หลังจากทำการถ่ายเชื้อแล้วนำมาเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย ก. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ข. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ค. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ง. สปอร์พิมพ์ของเห็ดดอกผสม Fu4 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 จ. สปอร์พิมพ์ของเห็ดดอกผสม Fu4 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ฉ. สปอร์พิมพ์ของเห็ดดอกผสม Fu4 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ช. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 ซ. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 5 ฌ. สปอร์พิมพ์ของเห็ดดอกผสม Fu4 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 ญ. สปอร์พิมพ์ของเห็ดดอกผสม Fu4 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 5



ภาพที่ ๘.๘ แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสม Fu5 หลังจากทำการถ่ายเชื้อแล้วนำมาเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย ก. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ข. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ค. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ง. สปอร์พิมพ์ของเห็ดลูกผสม Fu5 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 จ. สปอร์พิมพ์ของเห็ดลูกผสม Fu5 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ฉ. สปอร์พิมพ์ของเห็ดลูกผสม Fu5 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ช. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 ซ. ดอกเห็ดที่เกิดหลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 5 ฌ. สปอร์พิมพ์ของเห็ดลูกผสม Fu5 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 ญ. สปอร์พิมพ์ของเห็ดลูกผสม Fu5 หลังทำการถ่ายเชื้อครั้งที่ 5

ประวัติผู้เขียน

นางสาวชนินันท์ พรสุริยา เกิดเมื่อวันที่ 4 เมษายน พุทธศักราช 2518 ที่จังหวัดพัทลุง
สำเร็จการศึกษาวชิราวุธวิทยาลัย (การจัดการศัตรูพืช) จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบัน
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2540



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้