การสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) โดยการรวมโพรโตพลาสต์

HYBRIDIZATION BETWEEN *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler AND *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer BY PROTOPLAST FUSION

จรัสรัช มั่นถาวร

JARUSRUCH MONDTHAVORN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2544

ISBN 974-648-407-9

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) โดยการรวมโพรโตพลาสต์

HYBRIDIZATION BETWEEN *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler AND *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer BY PROTOPLAST FUSION

T040793

จรัสรัช มั่นถาวร

JARUSRUCH MONDTHAVORN

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 40793
วัน, เดือน, ปี 26 พ.ย. 2544

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2544

ISBN 974-648-407-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HYBRIDIZATION BETWEEN *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler AND *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer BY PROTOPLAST FUSION

JARUSRUCH MONDTHAVORN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE

OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATED STUDIES

KING MONGKUT 'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2001

ISBN 974-648-407-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2001

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT 'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) โดยการรวมโพรโตพลาสต์

HYBRIDIZATION BETWEEN *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler AND *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer BY PROTOPLAST FUSION

ชื่อนักศึกษา นางสาวจรัสรัช มั่นถาวร

รหัสประจำตัว 40065215

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.อุ่นเรือน เพชรวาลย์	
รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต	
ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์	
รศ.ดร.สุมาลี พิชญางกูร	

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 28 สิงหาคม 2544 เวลา 10.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ ชั้น 4 ห้อง 439

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อัตชู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 26 **เดือน** ..... **พ.ศ.** 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*)โดยการรวมโพรโต-พลาสต์
นักศึกษา	นางสาวจรัสรัช มั่นถาวร
รหัสประจำตัว	40065215
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2544
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต

บทคัดย่อ

จากการวิจัยถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) และการคืนกลับของเซลล์โพรโตพลาสต์ที่แยกได้นั้น พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกโพรโตพลาสต์ ได้จากเส้นใยอายุ 3 วัน โดยบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ที่ประกอบด้วยไลซิ่งเอนไซม์ 4 มก./มล. โดยมีแมกนีเซี่ยมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.9 โมลาร์ ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์(Na-maleate buffer) 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.0 เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ผลการแยกโพรโตพลาสต์ พบว่าได้จำนวนโพรโตพลาสต์เท่ากับ 4.87×10^7 โพรโตพลาสต์/มล. และเมื่อได้ศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการคืนกลับเป็นเส้นใยของโพรโตพลาสต์ พบว่าโพรโตพลาสต์ที่แยกได้สามารถคืนกลับสู่สภาพเซลล์ปกติได้ประมาณ 1.06 % เมื่อเลี้ยงในอาหารพีดีเอที่มีซูโครส 0.6 โมลาร์ เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์

การใช้เครื่องบ่งชี้ตามธรรมชาติสำหรับการคัดเลือกลูกผสมของการศึกษาครั้งนี้คือ ใช้ลักษณะความสามารถในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา โดยเห็ดหอม(*Lentinula edodes*) สามารถต้านสารฆ่าเชื้อราไอโอดีน ได้เพียงชนิดเดียวที่ระดับความเข้มข้น 0.001-0.007% ขณะที่เห็ดนางรมสามารถต้านสารฆ่าเชื้อราได้ทั้งสองชนิดคือ ไนสเตติน และไอโอดีน โดยต้านไนสเตตินได้ที่ระดับความเข้มข้น 10 - 500 ยูนิต/มล. และต้านไอโอดีน ได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำมากคือ 0.001-0.002% เท่านั้น

สำหรับการรวมโพรโตพลาสต์ ทำโดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วย โพลีเอทธิลีน ไกลคอล 6000 ความเข้มข้น 40% บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำโพรโตพลาสต์ที่ผ่านขั้นตอนการหลอมรวมมาบ่มในอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ เป็นเวลา 9 - 12 วัน พบว่า มีเชื้อลูกผสม 5 สายพันธุ์จากเชื้อทั้งหมด 475 สายพันธุ์ ที่ถูกคัดเลือกบนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อรา โดยเส้นใยของลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถต้านสารฆ่าเชื้อราได้ทั้งสองชนิด และมีขนาดของเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดมากกว่าสายพันธุ์พ่อและแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อทดลองเพาะให้เกิดดอกทั้ง 5 สายพันธุ์ลูกผสมบนอาหารทดสอบการเกิดตุ่มดอกพบว่า ไม่พบตุ่มดอกเกิดขึ้นในลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Hybridization between *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler and *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer by Protoplast Fusion
Student	Miss Jarusruch Mondthavorn
Student ID.	40065215
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2001
Thesis Advisor	Associate Professor Dr.Pannee Dhitaphichit

ABSTRACT

The suitable conditions for the release of mycelia protoplasts of *Pleurotus ostreatus* and for the reversion of the isolated protoplasts were examined. The studies concluded that good results obtained when protoplasts of *P. ostreatus* were prepared from 3 days old mycelia by incubating in 4 mg./ml. lysing enzyme and 0.9 M $MgSO_4$ in 0.02 M Na-maleate buffer pH 5.0 as osmotic stabilizer. The cultures were incubated at room temperature for 2 hours and a yield of 4.87×10^7 protoplasts/ml. was obtained. Protoplasts from *P. ostreatus* mycelia regenerated into normal hyphae with the frequency about 1.06 % in potato dextrose agar supplemented with 0.6 M sucrose as the regeneration medium.

Using nature markers in the selected fusion products for this case were based on resistance to fungicides. *Lentinula edodes* could resist iodine in the concentration range of 0.001 - 0.007% while *P. ostreatus* could resist two fungicides: nistatin at the concentrations of 10 - 500 unit/ml. and iodine at the very low concentrations of only 0.001 - 0.002 % .

The protoplasts were fused by using 40% polyethylene glycol 6000 (PEG) for 20 min at room temperature. All fusants were regenerated in regeneration medium. Among the 475 fusants, 5 fusants were selected on medium supplemented with fungicides. Hyphae of 5 fusants were found to be resistant to two fungicides and they were significantly bigger in sizes and in total DNA contents from those of the two parents. Tests of fruiting body formation of the fusants on testing fruiting body medium were, however, found that there was no fruiting body occurred in any of the fusants.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณา คำแนะนำ และคำปรึกษาในทุกด้าน รวมทั้งการเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ที่ถูกต้องจากอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชต ผู้วิจัยรู้สึกทราบซึ้งในความกรุณาของท่าน และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุมาลี พิชญางกูร ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์ และ ผศ. อารี ฤทธิบรูณ์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง รวมทั้งให้ข้อคิดเห็นและเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อเกษม และคุณแม่เจตนา มั่นถาวร ผู้ซึ่งเป็นกำลังใจอันสำคัญยิ่งตลอดมา จนกระทั่งได้มีวันนี้ของลูก

ขอขอบพระคุณศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก ที่ให้ความอนุเคราะห์ก้อนเชื้อเห็ดหอมพร้อมดอก และคำแนะนำในการเพาะเห็ด รวมทั้งการอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณกรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์เห็ดนางรม

ขอขอบคุณ คุณอัศวิณี มั่นถาวร ที่ช่วยเหลือทุกด้าน รวมทั้งด้านทุนทรัพย์

ขอขอบคุณ คุณไชยวุฒิ เกตุหลิม ที่มีส่วนสำคัญในการช่วยเหลือผลักดัน และให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่มอบทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ นักศึกษาทุกคนที่ช่วยเหลือเป็นกำลังใจตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

จรัสรัช มั่นถาวร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ.....IV

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง..... IX

สารบัญภาพ..... X

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย..... 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....2

1.3 ขอบเขตการวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร.....4

2.1 เห็ดหอม.....4

2.2 เห็ดนางรม.....5

2.3 วงชีวิตและการสืบพันธุ์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม..... 6

2.4 โพรโตพลาสต์.....11

2.5 การรวมโพรโตพลาสต์.....11

2.5.1 รูปแบบการรวมโพรโตพลาสต์จากเชื้อต่างกลุ่ม.....11

2.5.2 ขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์..... 13

2.6 การคัดเลือกลูกผสม.....20

บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....23

3.1 แหล่งของเชื้อจุลินทรีย์.....25

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....25

3.2.1 สายพันธุ์เห็ดหอม.....25

3.2.2 สายพันธุ์เห็ดนางรม.....25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.2.1 การศึกษาสันฐานวิทยา (morphology) ทั้งลักษณะภายนอกและภายในของเห็ดนางรม.....25

3.2.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม.....26

3.2.2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโพรโตพลาสต์จากเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม.....27

3.2.2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรม.....28

3.2.3 การหาความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรม เพื่อใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ในการคัดเลือกลูกผสม.....29

3.2.4 การรวมโพรโตพลาสต์.....30

3.2.5 การคัดเลือกลูกผสม.....30

3.2.6 การเพาะลูกผสมให้เกิดดอก.....32

3.2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....32

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาสันฐานวิทยา (morphology) ทั้งลักษณะภายนอกและภายในของเห็ดนางรม.....33

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม.....33

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโพรโตพลาสต์จากเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม.....42

4.4 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์.....52

4.5 ผลการหาความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรมเพื่อใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ในการคัดเลือกลูกผสม.....56

4.6 ผลการรวมโพรโตพลาสต์.....58

4.7 ผลการคัดเลือกลูกผสม.....65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.8 การเพาะเห็ดลูกผสมให้เกิดดอก.....70

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....71

บรรณานุกรม.....78

ภาคผนวก.....84

ภาคผนวก ก.....85

ภาคผนวก ข.....90

ภาคผนวก ค.....91

ภาคผนวก ง.....92

ประวัติผู้เขียน.....104

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในเห็ดหอม (*L. edodes*(Berk.)Pegler).....7

2.2 รายชื่อเห็ดราที่มีรายงานการศึกษาการรวมโพรโตพลาสต์ของคู่เชื้อชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์.....11

2.3 รายชื่อเห็ดราที่มีรายงานการศึกษาการรวมโพรโตพลาสต์ของคู่เชื้อในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกัน.....12

2.4 รายชื่อเห็ดราที่มีรายงานการศึกษาการรวมโพรโตพลาสต์ของคู่เชื้อต่างสกุลกัน.....12

2.5 แสดงองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรากลุ่มต่างๆ.....15

2.6 แสดงสารละลายที่นิยมใช้เป็นสารออสโมติค สเตบิไลเซอร์ในเห็ดบางชนิด.....17

2.7 ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของสารต้านเชื้อราที่มีต่อเห็ดในสกุล *Pleurotus*.....21

4.1 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน.....37

4.2 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน เป็นเวลา 9 วัน.....38

4.3 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ ซึ่งมีระดับพีเอชที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน.....42

4.4 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....44

4.5 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. โดยมีระดับพีเอชที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....46

4.6 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. ระดับพีเอช 5 ซึ่งมีชนิดของออสโมติคสเตบิไลเซอร์ ที่แตกต่างกัน โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....48

4.7 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. ระดับพีเอช 5 โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.8 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. ระดับพีเอช 5 โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต 0.9 โมลาร์ เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างกัน.....52

4.9 เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรม บนอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์โดยมีออสโมติค สเตบิไลเซอร์ต่างชนิดกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน.....54

4.10 เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรมบนอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ โดยมีซูโครสเป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน.....56

4.11 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเห็ดหอมและเห็ดนางรม(ซม.) บนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไนสเตติน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ยูนิต/มล. 64

4.12 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเห็ดหอมและเห็ดนางรม(ซม.) บนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไนสเตติน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ยูนิต/มล. 64

4.13 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเห็ดหอมและเห็ดนางรม(ซม.) บนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไอโอดีน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.003, 0.005 และ 0.007 เปอร์เซ็นต์...64

4.14 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเห็ดหอมและเห็ดนางรม(ซม.) บนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไอโอดีน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.002, 0.003, 0.004 และ 0.005 เปอร์เซ็นต์..... 64

4.15 ความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา..... 67

4.16 แสดงปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด.....68

4.17 แสดงขนาดของเส้นใย (ไมโครเมตร)..... 68

4.18 แสดงตารางการตรวจสอบการคัดเลือกลูกผสมโดยลักษณะความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา ปริมาณดีเอ็นเอ ขนาดของเส้นใย และการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น.....69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 วงชีวิตของเห็ดราแบบเฮทเทอโรทาลิค (heterothallic life cycle).....8

2.2 การเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น.....9

2.3 แผนผังแสดงขั้นตอนการผสมพันธุ์ของเห็ดราที่เป็นเฮทเทอโรทาลิคสปีชีส์.....10

4.1 ก เห็ดนางรมบนก้อนขี้เลื่อย.....34

4.1 ข ขนาดดอกเห็ดนางรม.....34

4.2 แสดงแคลมป์คอนเนคชั่นของเส้นใยเห็ดนางรมจากสายพันธุ์ต้นแบบ.....35

4.3 ก การเก็บสปอร์ของเห็ดนางรม.....36

4.3 ข สปอร์ของเห็ดนางรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....36

4.4 การเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน.....39

4.5 การเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิต่างกัน เป็นเวลา 9 วัน.....40

4.6 การเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอซึ่งมีระดับพีเอชแตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน.....41

4.7 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....43

4.8 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. โดยมีระดับพีเอชต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....45

4.9 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. พีเอช 5 โดยมีชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....47

4.10 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. พีเอช 5 โดยมีแมกนีเซียม-ซัลเฟต เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.11 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. พีเอช 5 โดยมีแมกนีเซียม-ซัลเฟต 0.9 โมลาร์ เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน..... 51

4.12 เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ จากเส้นใยของเห็ดนางรม บนอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ โดยมีออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ต่างชนิดกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน.....53

4.13 เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ จากเส้นใยของเห็ดนางรม บนอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ โดยมีซูโครสเป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน.....55

4.14 ลักษณะโพรโตพลาสต์ของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว.....57

4.15 การเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไนสเตติน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ยูนิต/มล. 59

4.16 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไนสเตติน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ยูนิต/มล. 60

4.17 การเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไอโอดีน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.003, 0.005 และ 0.007 เปอร์เซ็นต์.....61

4.18 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไอโอดีน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.003, 0.005 และ 0.007 เปอร์เซ็นต์.....62

4.19 การรวมโพรโตพลาสต์..... 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

โพรโตพลาสต์ (protoplast) คือโครงสร้างที่ได้จากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น พวกพืช และจุลินทรีย์ที่ผนังเซลล์ (cell wall) ถูกทำลายหรือแยกเอาผนังเซลล์ออกโดยวิธีการต่างๆ จนกระทั่งได้เซลล์เปลือยที่เหลือเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane, cell membrane) โพรโตพลาสต์ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์สำหรับการศึกษาและการทำวิจัยหลายด้าน ในขณะที่เซลล์ที่มีผนังเซลล์จะมีอุปสรรคหรือข้อจำกัดทางด้านการศึกษาและวิจัยทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางอย่าง (Zhao and Chang, 1993) ปัจจุบันโพรโตพลาสต์ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือทางพันธุศาสตร์โดยการรวมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion) และกระบวนการทรานฟอร์เมชั่น (transformation) ซึ่งเป็นการปรับปรุงหรือเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเพื่อนำไปสู่การพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ (สาวิตรี, 2536)

การรวมโพรโตพลาสต์ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ด เนื่องจากสามารถสร้างลูกผสมที่มีลักษณะรวมกันของสายพันธุ์พ่อและแม่ (parent stains) โดยไม่ถูกจำกัดโดยเมททิงไทป์ (mating type) หรือยีนที่เข้ากันได้ (compatible) ของเชื้อเห็ดคู่ที่นำมาผสมพันธุ์กัน วิธีนี้จะมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงและสร้างสายพันธุ์เห็ดโดยการสร้างลูกผสมใหม่ที่โครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นชุดให้กลายเป็นดิพลอยด์ (diploid) หรือโพลีพลอยด์ (polyploid) ซึ่งอาจให้ลักษณะดอกที่แข็งแรงและดอกใหญ่ขึ้นได้ (Peberdy *et al.*, 1976) แต่การรวมโพรโตพลาสต์ในสายพันธุ์เห็ดซึ่งจัดเป็นราชั้นสูงยังไม่ประสบความสำเร็จมากนักเมื่อเทียบกับราชั้นต่ำ (Peberdy, 1991; Zhao and Chang, 1996) ดังนั้นจึงพบรายงานที่ตีพิมพ์ทางด้านนี้จำนวนไม่มาก ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเรื่องเกี่ยวกับการรวมโพรโตพลาสต์ในเห็ดชนิดเดียวกันหรือในสกุลเดียวกัน (Intraspecies หรือ Intragenus) และพบรายงานน้อยมากที่แสดงให้เห็นว่าสามารถปรับปรุงพันธุ์เห็ดโดยการสร้างลูกผสมพันธุ์ใหม่ ที่เป็นประโยชน์และเกิดขึ้นจากการรวมโพรโตพลาสต์ในเชื้อต่างสกุลกัน

ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโตพลาสต์และการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโตพลาสต์จากเห็ดนางรม เพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำโพรโตพลาสต์ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาและการวิจัยด้านอื่นๆต่อไป และการศึกษาครั้งนี้จะไม่ศึกษาการแยกโพรโตพลาสต์กับเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) เนื่องจากประภัสสร (2540) ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว และเพื่อจะทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมในการทดลองขั้นต่อไป ซึ่งอาจทำให้ได้ลูกผสมที่รวมลักษณะที่ดีของเห็ดหอมและเห็ดนางรมมาอยู่ด้วยกัน โดยเห็ดหอมจะเป็นเห็ดที่มีราคาแพงเนื่องจากมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว และยังมีสรรพคุณทางยาสูงแต่เพาะเลี้ยงยาก ส่วนเห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นางรมเป็นเห็ดที่มีราคาถูกและเพาะเลี้ยงง่ายจึงให้ผลผลิตมากตลอดทั้งปี การผสมพันธุ์โดยใช้เทคนิคการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมเข้าด้วยกันในงานวิจัยนี้ อาจทำให้ได้ลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ที่เป็นประโยชน์

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดนางรม(*Pleurotus ostreatus*)

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม

1.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรม

1.2.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรม

1.2.5 การหาเครื่องบ่งชี้ (marker) โดยธรรมชาติของเห็ดหอม (*Lentinula edodes*)และเห็ดนางรม

1.2.6 ศึกษาวิธีการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม และคัดเลือกลูกผสม

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายในและภายนอกของเห็ดนางรม การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์และการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ รวมทั้งการหาเครื่องบ่งชี้ (maker) โดยธรรมชาติของเห็ดหอมและเห็ดนางรม ซึ่งรายงานการทดลองจากต่างประเทศส่วนมากพบว่า ใช้วิธีการคัดเลือกลูกผสมที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์บนพื้นฐานของออกโซโทรบ (auxotrophs) ที่ขาดความสามารถในการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง (แต่เนื่องจากการหาออกโซโทรบ ประเภทดังกล่าวนี้ผู้วิจัยได้พยายามทำการทดลองแต่ไม่ประสบผลสำเร็จ) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทดลองหาเครื่องบ่งชี้โดยธรรมชาติบนพื้นฐานของความสามารถในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา (fungicides) แทน ขั้นสุดท้ายจะทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม ตลอดจนทำการคัดเลือกลูกผสมที่ได้ภายหลังจากการรวมโพรโตพลาสต์โดยตรวจสอบจากความสามารถในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราที่ใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด การวัดขนาดของเส้นใย และการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบกระบวนการที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์และการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรม

1.4.2 ทำให้ทราบวิธีการสร้างสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมโดยวิธีการรวมโพรโตพลาสต์

1.4.3 ผลการรวมโพรโตพลาสต์อาจทำให้ได้สายพันธุ์ลูกผสมระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม และบางสายพันธุ์อาจมีคุณสมบัติของทั้งสายพันธุ์พ่อและแม่

1.4.4 เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษา และพัฒนาวิธีการสร้างสายพันธุ์ใหม่โดยวิธีการรวมโพรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 เห็ดหอม (*Lentinula edodes*)

เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) มีชื่อเดิมทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. ซึ่งภายหลัง Pegler (1983) ให้ชื่อใหม่ที่ถูกต้องว่า *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler โดยมีหมวดหมู่ของการจัดจำแนก (categories of classification) (Alexopoulos and Mims, 1979) ดังนี้

Kingdom.....Fungi

Division.....Amastigomycota

Subdivision.....Basidiomycotina

Class.....Basidiomycetes

Subclass.....Holobasidiomycetidae II

Order.....Agaricales

Family.....Tricholomataceae

Genus.....*Lentinula*

Species.....*edodes*

เห็ดหอมเป็นที่รู้จักกันมานานและนิยมบริโภคกันมากในประเทศทางแถบเอเชีย ซึ่งเห็ดหอมจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละประเทศ เช่น ประเทศอังกฤษเรียก black mushroom ประเทศญี่ปุ่นเรียก shiitake และประเทศจีนเรียก shiang-gu ปัจจุบันเห็ดหอมมีการผลิตมากเป็นอันดับสองรองจากเห็ดกระดุมหรือเห็ดแชมปิญอง (*Agaricus brunnescens* ซึ่งชื่อเก่าคือ *Agaricus bisporus*) (Chang, 1987) การเพาะเห็ดหอมส่วนมากใช้เพาะในวัสดุที่เป็นท่อนไม้ และไม้ที่นิยมเพาะได้แก่ไม้จำพวกไม้โอ๊คหรือไม้ก่อ ในภาคเหนือของประเทศไทยได้มีการเพาะเห็ดหอมในท่อนไม้มานานกว่า 20 ปี แต่เนื่องจากขาดแคลนไม้เพาะ ทำให้การเพาะโดยใช้ขี้เลื่อยผสมวัสดุจากการเกษตรได้รับความสนใจและมีการวิจัยและพัฒนาเพิ่มขึ้นมาก (Triratana *et al.*,1988) การเพาะเห็ดหอมในท่อนไม้มีข้อดีคือ คุณภาพของเห็ดจะดีกว่าการเพาะในก้อนขี้เลื่อย เนื่องจากเห็ดที่ได้จากการเพาะด้วยท่อนไม้ มีเนื้อแน่นรวมทั้งมีกลิ่นและรสเข้มกว่า ส่วนข้อเสียคือ ใช้เวลาในการเพาะนาน โดยใช้เวลา 8 เดือนถึง 1 ปี นับตั้งแต่เริ่มเพาะจนกระทั่งการเก็บผลผลิต นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้ต่ำกว่าการเพาะในขี้เลื่อย โดยท่อนไม้ที่ใช้เพาะเห็ดมีน้ำหนักแห้งประมาณ 100 กิโลกรัม จะให้ผลผลิตเห็ดสด 10 ถึง 15 กิโลกรัม ส่วนในก้อนขี้เลื่อย ผลผลิตที่ได้อาจสูงถึง 80 กิโลกรัมต่อน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แห้งของวัสดุเพาะ 100 กิโลกรัม ซึ่งสูงกว่าการเพาะในท่อนไม้ประมาณ 8 เท่า และใช้เวลาในการเพาะสั้น ประมาณ 3 เดือน ก็สามารถเก็บผลผลิตได้ แต่การเพาะในก้อนขี้เลื่อยมีข้อเสียคือ ต้องทำในสถานที่ปลอดเชื้อ และต้องฆ่าเชื้อวัสดุเพาะด้วย ทำให้สิ้นเปลืองพลังงานในการอบฆ่าเชื้อ (Chang and Miles,1989; Diehl and Royse,1986)

เห็ดหอมเป็นเห็ดที่มีกลิ่นรสดี มีคุณค่าทางอาหารสูง และมีสรรพคุณทางยา ใช้เป็นอาหารสมุนไพรได้ สารที่พบในเห็ดหอมและมีสรรพคุณทางยา ได้แก่ สารอีริทาดีนีน (eritadenine) มีคุณสมบัติลดคอเลสเตอรอลในเลือด และสารเลนไทแนน(lentinan) ซึ่งมีโครงสร้างเป็น β-1, 3-glucan และมีคุณสมบัติต่อต้านเนื้องอก มะเร็งและเอดส์ โดยทำงานเกี่ยวข้องกับภูมิต้านทานที่สร้างจากไขกระดูก (thymus derived lymphocytes หรือ T-cell) ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ภูมิต้านทาน (Suzuki and Oshima, 1976; Hamuro *et al.*, 1976; Flynn, 1991) ปัจจุบันประเทศญี่ปุ่นมีการสกัดสารเลนไทแนนเพื่อใช้ควบคู่กับสารเคมีในการบำบัดโรคมะเร็ง สารออกฤทธิ์ในเห็ดหอมและคุณสมบัติต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1 (Przybylowicz and Donoghue,1988) นอกจากนี้สารสกัดจากดอกและสปอร์ของเห็ดหอมมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านเชื้อไวรัส(antiviral agents) โดยสามารถยับยั้งการเจริญและติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ (influenza A/SW15 virus) ที่เกิดขึ้น(infect)ในหนู(Tsunoda and Ishida,1969) นอกจากนั้นผลของสารสกัดจากเห็ดหอมยังมีฤทธิ์ยับยั้งต่อการจับตัวของเกล็ดเลือดอีกด้วย โดยพบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการจับตัวของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองเมื่อกระตุ้นด้วยเอดีพี (ADP) และคลอลาเจน (collagen) โดยจะทำให้สามารถป้องกันการอุดตันในหลอดเลือดเนื่องจากการจับตัวของเกล็ดเลือดได้ (Triratana *et al.*,1992)

2.2 เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*)

เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) หรือ oyster mushroom มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *"Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer" โดยเป็นเห็ดกินได้ที่มีการจัดหมวดหมู่เหมือนของเห็ดหอม โดยต่างถูกจัดอยู่ใน Family Tricholomataceae

เห็ดนางรมมีพื้นเพเดิมมาจากทางยุโรป ซึ่งมีลักษณะคล้ายเห็ดมะม่วง หรือเห็ดขอนขาวที่เกิดตามธรรมชาติในฤดูฝน แต่แตกต่างที่เห็ดนางรมสามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี ดังนั้นจึงทำให้เห็ดนางรมเป็นเห็ดอีกชนิดหนึ่งที่มีการผลิตกันมากและถือได้ว่าเป็นเห็ดเศรษฐกิจ เนื่องจากเพาะได้ง่าย และเพาะได้ในถุงขี้เลื่อย ทั้งนี้เพราะเห็ดนางรมสามารถย่อยสารประกอบซับซ้อนจำพวกเซลลูโลสและลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบของไม้ได้ดี (Block *et al.*, 1959) นอกจากนี้ยังสามารถเพาะเห็ดนางรมโดยใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรม เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์ (Hashimoto and Takahashi, 1974) ขี้เลื่อย (Zadrazil, 1974) และกากเมล็ดกาแฟ (Martinez *et al.*, 1985) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 วงชีวิตและการสืบพันธุ์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม

เห็ดหอมและเห็ดนางรมมีวงชีวิตเป็นแบบเฮทเทอโรทาลิค (heterothallic life cycle) ดังภาพที่ 2.1 โดยวงชีวิตของเห็ดส่วนใหญ่เป็นโมโนพลอยด์ (monoploid) หรือแฮบพลอยด์ (haploid) ซึ่งหมายถึงว่าในนิวเคลียสมีโครโมโซมเพียงหนึ่งชุด แต่เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดขึ้น จะทำให้นิวเคลียสของ 2 เซลล์ มารวมกันซึ่งเรียกว่า เกิดกระบวนการคารีโอแกมมี(karyogamy) และผ่านระยะการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส (meiosis) จะได้เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) 4 สปอร์บนเบสิเดียม (basidium) แต่ละสปอร์จึงมีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว ซึ่งจะงอก (germinate) และเจริญเป็นเส้นใย (hypha) ใหม่ ดังรายละเอียดต่อไปนี้ เมื่อเบสิดิโอสปอร์แต่ละสปอร์งอกจะให้เส้นใยที่เรียกว่าเส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) เส้นใยขั้นนี้จะมีผนังขวาง (septum) กั้นระหว่างแต่ละเซลล์ โดยที่แต่ละเซลล์มีหนึ่งนิวเคลียสและมีสภาพโครโมโซมเป็นโมโนพลอยด์หรือ monokaryotic mycelium เมื่อเซลล์สองเซลล์จากเส้นใยปฐมภูมิที่มีเมททิงไทป์ (mating type) ต่างชนิดมารวมกันและตามด้วยไซโตพลาซึมจากเซลล์หนึ่งไหลเข้าสู่อีกเซลล์หนึ่ง (เกิดplasmogamy) เส้นใยในระยะนี้เป็นเส้นใยขั้นที่สองหรือเส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) ซึ่งเส้นใยในขั้นที่สองนั้นจะแตกต่างจากขั้นที่หนึ่งโดยมีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection) ขึ้น ทำให้นิวเคลียสเคลื่อนที่มารวมกับเซลล์ที่อยู่ถัดมาเกิดเซลล์ที่มีสองนิวเคลียสโดยเซลล์จะอยู่ในสภาพไดคารีออน (dikaryon, n+n) (ภาพที่ 2.2) ต่อมาเส้นใยทุติยภูมิจะรวมตัวกันแน่นเป็นเส้นใยขั้นที่ 3 ที่เรียกว่าเส้นใยตติยภูมิ (tertiary mycelium) เพื่อพัฒนาเป็นดอกเห็ด (fruiting body) โดยที่เซลล์เส้นใยยังคงสภาพเป็นไดคารีออน เมื่อนิวเคลียสเกิดการรวมตัวได้เป็น 2n จะมีการแบ่งไมโอซิสเพื่อสร้างเบสิดิโอสปอร์ (สปอร์) 4 อัน บนเบสิเดียม เมื่อดอกเห็ดเจริญเต็มที่จะมีการปลดปล่อยสปอร์ และถ้าสภาวะแวดล้อมเหมาะสม สปอร์จะงอกเป็นเส้นใย โดยเส้นใยจะพัฒนาเป็นดอกเห็ดวนเวียนกันไป

ลักษณะการสืบพันธุ์ทางเพศของเห็ดหอมและเห็ดนางรมเป็นแบบเฮทเทอโรทาลิค กล่าวคือ ลักษณะที่เห็ดราไม่สามารถผสมตัวเองได้ภายในธาลัส (thallus) เดียวกัน แต่การสืบพันธุ์แบบใช้เพศจะเกิดขึ้นได้ต่อเมื่อนิวเคลียสจากต่างธาลัสและมีเมททิงไทป์ต่างกันมาผสมพันธุ์กันเท่านั้น โดยยีนที่ควบคุมเมททิงไทป์จะเป็น tetrapolar กล่าวคือ มีแฟคเตอร์หรือยีน (gene) ควบคุมอยู่ 2 ชุด คือ แฟคเตอร์ A และ B ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคนละแท่ง เบสิดิโอสปอร์จึงมีเมททิงไทป์ต่างกันได้ 4 แบบ (เพราะใน 1 แฟคเตอร์ ประกอบด้วย 2 อัลลีล โดยแฟคเตอร์ A มี A_1 และ A_2 ส่วนแฟคเตอร์ B มี B_1 และ B_2) คือ A_1B_1, A_2B_1, A_1B_2 และ A_2B_2 โดยสามารถสรุปลักษณะการผสมพันธุ์ได้ดังภาพที่ 2.3

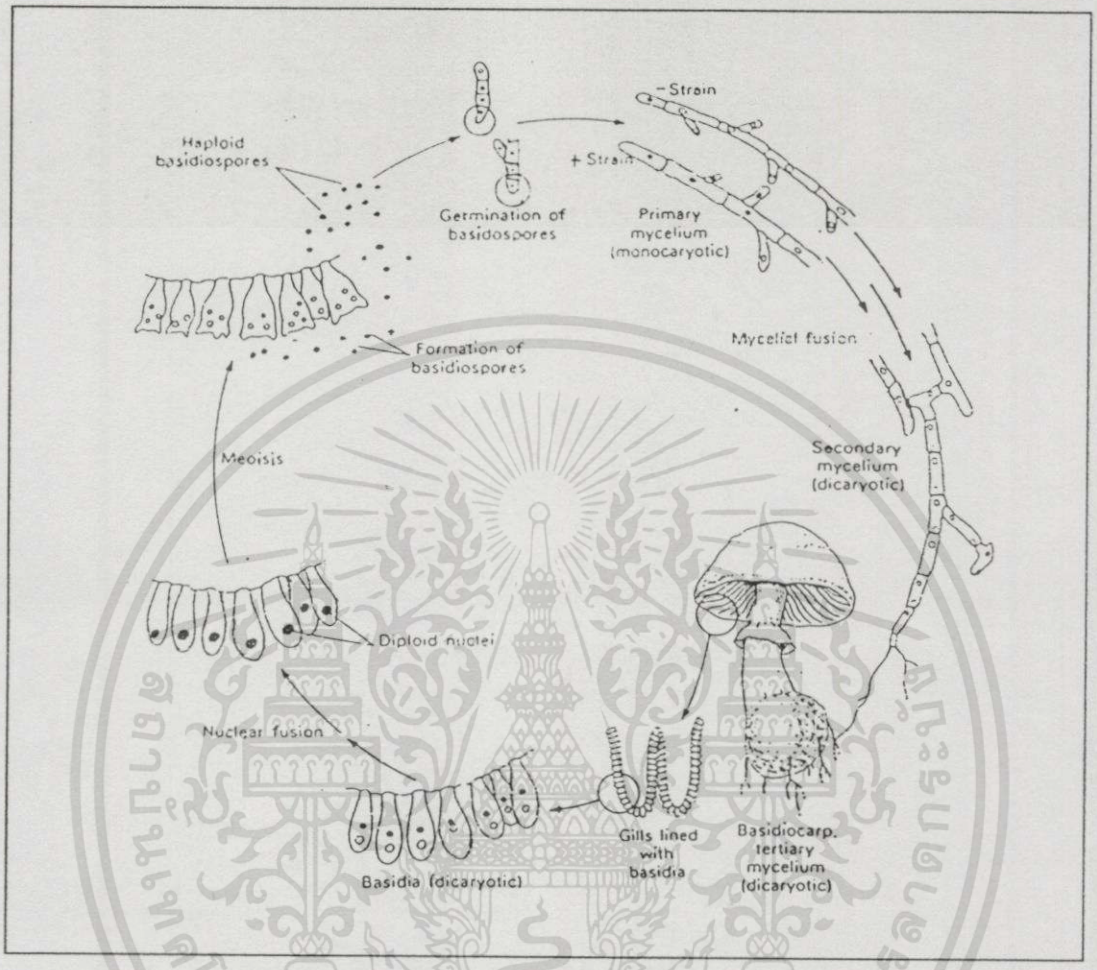
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในเห็ดหอม(*L. edodes*(Berk.)Pegler)

สารประกอบ	ผลของสารประกอบ	ประเภทของสารประกอบ	กิจกรรมของสารประกอบ(activity)
eritadenine	ลดคลอเรสเตอรอลต่อต้านเชื้อไวรัส (antiviral)	อนุพันธุ์ของอะดีนีน	กระตุ้นเมตาบอลิซึมและลดคลอเรสเตอ-รอล
Ac2P	ต่อต้านเชื้อไวรัส	โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide)	ยับยั้งการเพิ่มของเชื้อไวรัส
virus-like particles	ต่อต้านเชื้อไวรัส ต้านมะเร็ง(antitumor)	RNAสายคู่ (double stranded RNA)	กระตุ้นให้มีการสร้างสารอินเตอเฟอรอน (interferon)
KS-2	ต่อต้านเชื้อไวรัส ต้านมะเร็ง	โพลีแซคคาไรด์	กระตุ้นให้มีการสร้างสารอินเตอเฟอรอน
lentinan	ต้านมะเร็ง	โพลีแซคคาไรด์	กระตุ้นการทำงานของ T-cell
LAP-1	ต้านมะเร็ง	โพลีแซคคาไรด์	เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทาน
Polyphenol oxidase	ต้านมะเร็ง	โปรตีน	ไม่ทราบปฏิกริยา
unknown	ลดการแข็งตัวของเลือด (reduce blood coagulation)	อาจเป็น nucleosides หรือ nucleotides	ยับยั้งการจับตัวของเกล็ดเลือด (inhibits blood platelet aggregation)
cortinellin	ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial)	ไม่ทราบ	ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้สูง(broad spectrum antibiotic)
unknown	ต่อต้านเชื้อรา (antifugal)	ไดซัลไฟด์(disulfide)	ไม่ทราบปฏิกริยา
FBP	ต่อต้านเชื้อไวรัส	โปรตีน	ป้องกันเชื้อไวรัสเข้าสู่พืช(inhibits plant viral infection)

ที่มา: Przybylowicz and Donoghue(1988)

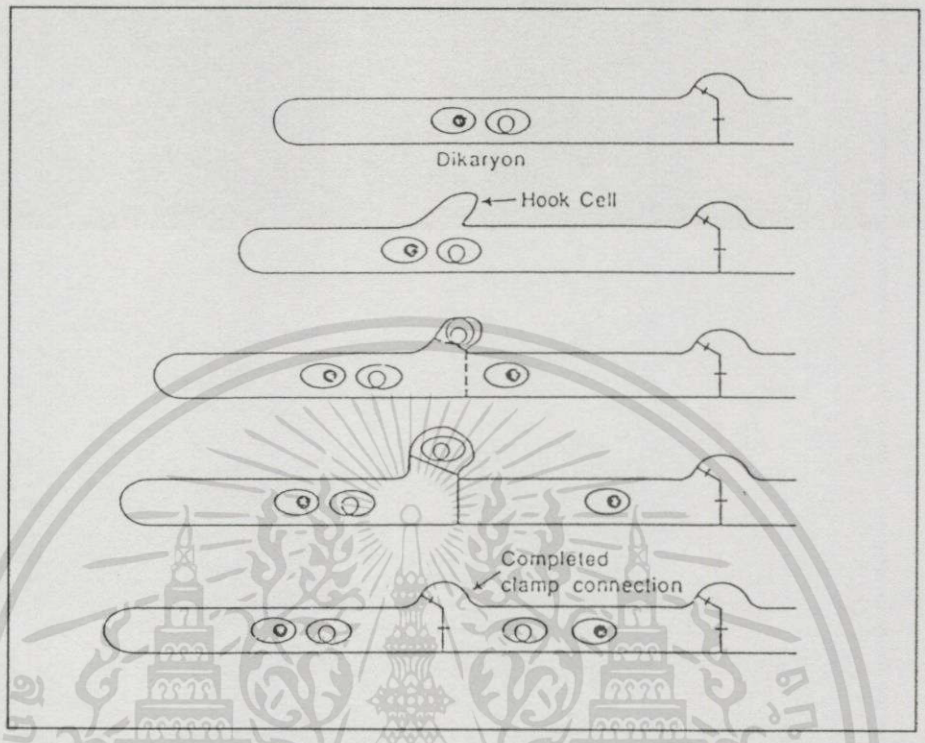
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 วงชีวิตของเห็ดราแบบเฮทเทอโรทาลิค (heterothallic life cycle)

ที่มา: Norton (1981)

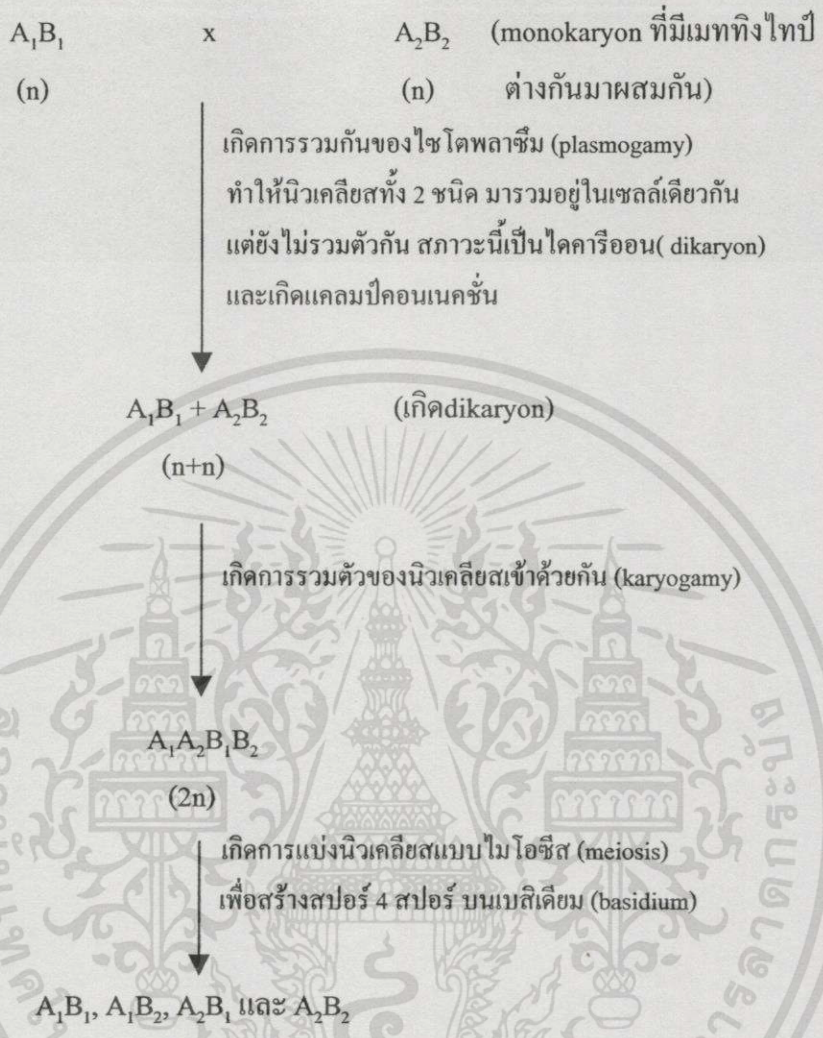
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 การเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น

ที่มา: Miles (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 แผนผังแสดงขั้นตอนการผสมพันธุ์ของเห็ดราที่เป็นเฮทเทอโรทาลิคสปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 โพรโตพลาสต์

โพรโตพลาสต์ เป็นเซลล์เปลือยที่อาจแตกหรือสลายตัวได้ง่าย และไวต่อการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติคจากภายนอก โพรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญแบ่งเซลล์ตามปกติต่อไปได้ เราสามารถนำโพรโตพลาสต์มาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น การเตรียมสารสกัดจากเซลล์ (cell free extract) เช่น เอนไซม์ ดีเอ็นเอ การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี รวมทั้งกระบวนการสังเคราะห์สารต่างๆภายในเซลล์ การศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ การเจริญของเยื่อหุ้มเซลล์ และการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ (สาวิตรี, 2536)

2.5 การรวมโพรโตพลาสต์

การรวมโพรโตพลาสต์ เป็นกระบวนการที่สามารถทำให้เกิดลูกผสมที่มีลักษณะรวมของสายพันธุ์พ่อและแม่ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ วิธีการทำได้โดยนำโพรโตพลาสต์ของสายพันธุ์พ่อและแม่มาเหนี่ยวนำให้เกิดการหลอมรวมกันเพื่อทำให้สารพันธุกรรมทั้งหมดเข้ามารวมอยู่ในโพรโตพลาสต์เดียวกัน

2.5.1 รูปแบบการรวมโพรโตพลาสต์จากเชื้อต่างกลุ่มกัน

การรวมโพรโตพลาสต์จากเชื้อต่างกลุ่มอาจแบ่งได้เป็น 3 แบบ โดยยึดหลักการจัดหมวดหมู่ตามอนุกรมวิธานดังนี้ คือ

2.5.1.1 Intraspecific fusion เป็นการรวมโพรโตพลาสต์ของคู่เชื้อที่เป็นชนิด (species) เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ (strain, variety) (ตารางที่ 2.2) ความถี่ในการหลอมรวมกันจะสูงเนื่องจากเซลล์พ่อและแม่ที่ผสมกันมีความแตกต่างในทางพันธุกรรมน้อย ทำให้เซลล์ลูกผสมที่เกิดขึ้นจากการรวมรูปแบบนี้มีความคงตัวสูง (Peberdy *et al.*, 1976)

ตารางที่ 2.2 รายชื่อเห็ดราที่มีรายงานการศึกษาการรวมโพรโตพลาสต์ของคู่เชื้อชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์

สปีชีส์ของเห็ดรา	เอกสารอ้างอิง
1. *Volvariella volvacea*	วีรวัฒน์ (2536)
2. *Pleurotus ostreatus*	Toyomasu and Mori (1987a)
3. *Pleurotus pulmonarius*	Toyomasu and Mori (1987b)
4. *Schizophyllum commune*	Zhao and Chang (1995)
5. *Coprinus macrorhizus*	Kiguchi and Yamagi (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.2 Interspecific protoplast fusion เป็นการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างคู่เชื้อต่างชนิดกันแต่อยู่ในสกุล (genus) เดียวกัน (ตารางที่ 2.3) ความถี่ในการรวมโพรโตพลาสต์จะต่ำกว่าแบบแรก เนื่องจากมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของเชื้อสองเชื้อนั้นมากขึ้น ทำให้ลูกผสมที่ได้ไม่ค่อยมีความคงตัว โดยนิวเคลียสอาจไม่รวมกันง่ายๆ

ตารางที่ 2.3 รายชื่อเห็ดราที่มีรายงานการศึกษาการรวมโพรโตพลาสต์ของคู่เชื้อในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกัน

สปีชีส์ของเห็ด	เอกสารอ้างอิง
1. *Pleurotus ostreatus* กับ *Pleurotus columbinus*	Toyomasu and Mori (1987a)
2. *Pleurotus columbinus* กับ *Pleurotus sajor-caju*	Toyomasu and Mori (1987b)
3. *Pleurotus ostreatus* กับ *Pleurotus cornucopiae*	Takehara *et al.* (1993)
4. *Pleurotus ostreatus* กับ *Pleurotus sajor-caju*	Matsumoto *et al.* (1997)

2.5.1.3 Intergeneric fusion เป็นการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างคู่เชื้อต่างสกุลกัน (ตารางที่ 2.4) ซึ่งพบว่าประสบความสำเร็จน้อย เนื่องจากจีโนมของเชื้อต่างสกุลกันมีความแตกต่างกันมาก ทำให้การรวมกันของนิวเคลียสเกิดขึ้นยาก นิวเคลียสของลูกผสมที่ได้จะเกิดการแยกตัวไปเหมือนกับสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีอยู่เดิมเมื่อเลี้ยงไปสักระยะหนึ่ง (Anne and Peberdy, 1976) อย่างไรก็ตามก็มีรายงานว่าสามารถรวมกันได้ในบางคู่ผสมดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 รายชื่อเห็ดราที่มีรายงานการศึกษาการรวมโพรโตพลาสต์ของคู่เชื้อต่างสกุลกัน

สปีชีส์ของเห็ด	เอกสารอ้างอิง
1. *Termitomyces* sp. กับ *Volvariella volvacea*	สุมาลี (2541)
2. *Pleurotus ostreatus* กับ *Agrocybe cylindracea*	Eguchi *et al.* (1993)
3. *Pleurotus ostreatus* กับ *Schizophyllum commune*	Zhao and Chang (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Eguchi *et al.* (1993) ได้รายงานถึงความเสถียรของลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างคู่เชื้อต่างสกุลกันของ *Pleurotus ostreatus* กับ *Agrocybe cylindracea* ว่ามีความคงตัวสูง เนื่องจากเมื่อทำการถ่ายเชื้อเห็ดลูกผสมทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 20 เดือน พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยและรูปแบบไอโซไซม์ยังคงแสดงว่าเป็นลูกผสมเหมือนเดิม

2.5.2 ขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์

ขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์มี 3 ขั้นตอน คือ การแยกโพรโตพลาสต์ (protoplast isolation) การรวมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion) และการกลับคืนของผนังเซลล์หรือการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ (protoplast regeneration)

2.5.2.1 การแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation)

การแยกโพรโตพลาสต์ คือ การเตรียมเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่ปราศจากผนังเซลล์ โดยการทำลายผนังเซลล์หรือแยกเอาผนังเซลล์ออกให้เหลือเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ การลอกผนังเซลล์ที่สมบูรณ์จะได้โพรโตพลาสต์แต่ถ้าเกิดการลอกผนังเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์โดยยังคงมีส่วนของผนังเซลล์เหลืออยู่จะได้สเฟียโรพลาสต์ (sphearoplast) (วีรวัฒน์, 2536) การแยกความแตกต่างระหว่างโครงสร้างทั้งสองประเภท คือ โพรโตพลาสต์ และสเฟียโรพลาสต์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดานั้นทำได้ยาก ดังนั้น การเรียกโครงสร้างที่แยกเอาผนังเซลล์ออกจึงมีผู้ใช้ทั้งคำว่าสเฟียโรพลาสต์และโพรโตพลาสต์ในความหมายที่เหมือนกัน (สุภาภรณ์, 2541) โครงสร้างของโพรโตพลาสต์นี้บอบบางมาก แตกสลายตัวได้ง่าย และไวต่อการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมซิสจากภายนอก เนื่องจากขาดการพยุงและปกป้องจากผนังเซลล์ ดังนั้น โพรโตพลาสต์จึงต้องถูกพยุงไว้ในสารที่ช่วยรักษาสภาพแรงดันออสโมซิส (osmotic stabilizer) ที่เหมาะสม และการที่โพรโตพลาสต์จะกลับคืนสู่สภาพเซลล์ปกติได้โดยการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่นั้นจะเกิดได้เฉพาะในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของสารที่รักษาสภาพแรงดันออสโมซิสที่เหมาะสมด้วย ส่วนกิจกรรมการสันดาปและระบบต่างๆของเซลล์โพรโตพลาสต์ยังคงเหมือนเซลล์เดิมไม่เปลี่ยนแปลง (Fox, 1991)

การแยกโพรโตพลาสต์สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีกล (mechanical method) หรือวิธีที่ไม่ใช้เอนไซม์ (non-enzymatic method) วิธีนี้เป็นวิธีแรกที่ใช้ในการแยกโพรโตพลาสต์ออกมา ได้แก่ การนำเซลล์ไปเขย่ากับลูกแก้วให้เกิดแรงกระแทก การใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูง (ultrasonic vibration) และการใช้สารเคมีที่มีผลต่อเมตาบอลิซึมของขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ และอาจมีผลต่อเมตาบอลิซึมอื่นๆของเซลล์ เช่น 2-ดีออกซีกลูโคส (2-deoxyglucose) และ แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate) (Foury and Goffeau, 1973) วิธีกลนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากเซลล์ถูกทำลายได้ง่ายทำให้ได้ปริมาณโพรโต-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พลาสต์น้อยและควบคุมได้ยาก รวมทั้งโพรโตพลาสต์ที่ได้ไม่สมบูรณ์และมีอัตราการอยู่รอดต่ำ (Peberdy, 1979)

2. วิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic method) วิธีนี้เป็นวิธีการใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (lytic enzyme) มาย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ วิธีการนี้เป็นวิธีที่นิยมเนื่องจากสะดวกและจะทำให้ได้โพรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์เป็นปริมาณมาก และสามารถควบคุมได้ดีกว่าวิธีแรก

การแยกโพรโตพลาสต์จากเห็ดรา

การเตรียมโพรโตพลาสต์จากเห็ดราอาจทำได้จากส่วนต่างๆดังนี้

1. เส้นใย (mycelium) โดยอาจจะใช้เส้นใยทั้งเส้นซึ่งโพรโตพลาสต์จะถูกปลดปล่อยออกมาจากส่วนปลายของเส้นใย (hyphal tip) การที่จะทำให้ได้โพรโตพลาสต์จำนวนมากควรจะใช้เส้นใยที่อายุน้อยซึ่งจะทำให้ไลติคเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายผนังเซลล์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เนื่องจากเส้นใยที่อายุน้อยจะมีผนังเซลล์บางจึงไม่มีความแข็งแรงเมื่อเทียบกับเส้นใยที่มีอายุมากซึ่งมีผนังเซลล์ที่หนากว่า ทำให้โอกาสจะเกิดโพรโตพลาสต์ในเส้นใยอายุมากจึงน้อยกว่า

2. สปอร์ (spores) สปอร์ที่ใช้ควรเป็นสปอร์ที่ยังไม่แก่เต็มที่ (immature spores) ซึ่งผนังจะบางจึงถูกย่อยสลายง่าย หรือเป็นสปอร์ที่กำลังงอก (germinating spores) โดยโพรโตพลาสต์จะถูกสร้างจากส่วนของ germ tube ซึ่งผนังเซลล์จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้ง่าย (สาวิตรี, 2536)

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโพรโตพลาสต์

การใช้เอนไซม์ย่อยสลายโพรโตพลาสต์ของเชื้อราจะต้องคำนึงถึงองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราที่นำมาแยกโพรโตพลาสต์นั้นๆ ซึ่งสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จะแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา องค์ประกอบที่พบในผนังเซลล์ของเส้นใยรา ได้แก่ ไคติน เซลลูโลส กลูแคน แมนแนน และโปรตีน เป็นต้น นอกจากนั้นปริมาณของสารประกอบแต่ละชนิดก็แปรผันตามชนิดของเชื้อราเช่นกัน (ตารางที่ 2.4) บางครั้งการใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวไม่สามารถที่จะทำให้ได้โพรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ อาจต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน ดังนั้นการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายผนังเซลล์ จึงต้องคำนึงถึง ชนิด ความเข้มข้น ปริมาณการใช้ และสัดส่วนที่เหมาะสมในการผสมเอนไซม์

เอนไซม์ที่นิยมใช้ย่อยสลายผนังเซลล์ของราและยีสต์มีหลายชนิดดังต่อไปนี้ เอนไซม์ที่ได้จากน้ำย่อยกระเพาะของหอยทาก (*Helix pomatia)* ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า helicase เอนไซม์ zymolyase ซึ่งแยกได้จากแบคทีเรีย (*Arthrobactor luteus)* และเอนไซม์ glucanase หรือ novozyme 234 จาก *Trichoderma harzianum* (Davies, 1988;Peberdy, 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 แสดงองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรากลุ่มต่างๆ

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	Galactomannoprotein α-(1-3)-glucan
Zygomycetes	Chitin Chitosan	Polyglucuronic acid Glucuronomannoproteins Polyphosphate

ที่มา : Neil and Geoffrey (1995)

ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโพรโตพลาสต์ โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

1. สายพันธุ์

องค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราจะขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงไม่เท่ากัน ควรเลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมกับสายพันธุ์นั้นๆ เพื่อให้สามารถทำลายผนังเซลล์ได้

2. อายุของเชื้อ

อายุของเชื้อที่เหมาะสมแก่การนำมาเตรียมโพรโตพลาสต์ ส่วนใหญ่ใช้เส้นใยอายุน้อย ซึ่งอยู่ในช่วงต้นและช่วงปลายของระยะการเจริญแบบทวีคูณ(exponential phase) เนื่องจากระยะที่กล่าวมานี้ มีความไวต่อการทำงานของไลติคเอนไซม์มากกว่าเชื้อราที่มีอายุมาก

Yamada *et al.* (1983) ได้ทดลองแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ด *Collybia velutipes* และ *Pleurotus ostreatus* พบว่าเส้นใยที่มีอายุน้อย (2-3 วัน) ให้โพรโตพลาสต์จำนวนมากในขณะที่เส้นใยที่มีอายุมาก (7-8 วัน และ 20-24 วัน) มีผลทำให้ได้จำนวนโพรโตพลาสต์จำนวนลดลงในเชื้อทั้งสองชนิด

Hong and Yeap (1985) ได้ทดลองแยกโพรโตพลาสต์จากสปอร์และเส้นใยของเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) พบว่า เส้นใยของเชื้อที่มีอายุ 3 วัน ซึ่งอยู่ในระยะการเจริญแบบทวีคูณได้ให้โพรโตพลาสต์จำนวนมาก ขณะที่เส้นใยอายุมากกว่า 3 วัน ให้โพรโตพลาสต์จำนวนน้อยลง

วีรวัฒน์ (2536) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) โดยการรวมโพรโตพลาสต์และได้ทำการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ โดยใช้เส้นใยที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อายุต่างกัน พบว่า เส้นใยอายุ 4 วัน ให้จำนวนโพรโตพลาสต์มากสุดเมื่อเทียบกับเส้นใยที่มีอายุมากกว่า 4 วัน

3. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้องค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกันไป ดังนั้น การเติมส่วนประกอบบางชนิดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบซึ่งได้แก่ L-methionine และ L-homocyteine จะมีผลทำให้ผนังเซลล์ไวต่อการถูกย่อยสลาย

Yamada *et al.* (1983) ได้ทดลองแยกโพรโตพลาสต์ของ *Pleurotus ostreatus* และพบว่าองค์ประกอบของอาหารมีผลต่อการแยกโพรโตพลาสต์เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 3 ชนิด โดยพบว่าใน อาหารออยเนียนซอยซอส (onion-soysauce medium) จะทำให้เกิดโพรโตพลาสต์สูงกว่าอาหารโพเตโตเดร็กโตรส (potato dextrose medium) และอาหารกลูโคสยีสต์เปปโตน (glucose yeast peptone medium)

4. สารรีดิวส์

เพื่อทำการทดลองเบื้องต้น (pretreatment) ก่อนการแยกโพรโตพลาสต์ เป็นการใช้สาร thiol compound จำพวก dithiothreitol, β-mercaptoethanol หรือ thioglycolate ก่อนการแยกโพร-โตพลาสต์ซึ่งจะมีผลให้การแยกโพรโตพลาสต์เกิดได้ง่ายขึ้น โดย thiol compound จะไปลด disulfide bond ของโปรตีนในผนังเซลล์ ทำให้โมเลกุลเปิดออก จึงสะดวกต่อการเข้าไปทำงานของไลติคเอนไซม์ (Davies and Elvin, 1964 ; Gascon *et al.*,1964; Andeson and Millbank, 1966)

5. บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแยกโพรโตพลาสต์อาจมีผลต่อการแยกโพรโตพลาสต์ ดังนั้นในการใช้ควรเลือกบัฟเฟอร์ที่มีคุณสมบัติที่ไม่เป็นตัวยับยั้งของเชื้อ รวมทั้งไม่ขัดขวางการย่อยของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ โดยทั่วไปบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแยกโพรโตพลาสต์ของเชื้อราส่วนมากจะเป็นฟอสเฟต (phosphate), มาลีเอท (maleate) และ ซัคซิเนตบัฟเฟอร์ (succinate buffer) ส่วนพีเอชของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.0 ถึง 8.0 (Fox, 1991)

6. ออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (osmotic stabilizer)

ออสโมติค สเตบิไลเซอร์เป็นสารรักษาสภาพแรงดันออสโมซีสของโพรโตพลาสต์ เนื่องจากโพรโตพลาสต์แตกหรือสลายตัวง่าย และมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมซิสจากภายนอก จึงจำเป็นต้องเก็บรักษาโพรโตพลาสต์ในสารละลายที่รักษาแรงดันออสโมซิส คือสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ละลายที่เป็นไอโซโทนิค (isotonic solution) หรือสารละลายไฮเปอร์โทนิค (hypertonic solution) ซึ่งโพรโตพลาสต์จะมีรูปร่างกลมและเต่งในสารละลายไอโซโทนิค และมีลักษณะเหี่ยวเล็กน้อยในสารละลายไฮเปอร์โทนิค เนื่องจากมีการเสียน้ำออกจากเซลล์ แต่ความมีชีวิตของโพรโตพลาสต์ไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งสารออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ไม่เพียงเป็นสารรักษาสภาพแรงดันออสโมซิสเท่านั้น แต่ยังมีผลต่อการผลิตโพรโตพลาสต์ด้วย สารที่นำมาใช้เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ควรมีคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษต่อโพรโตพลาสต์ ไม่ลดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ และควรช่วยส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ สารที่นิยมนำมาใช้เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ได้แก่ สารละลายของน้ำตาลหรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น ซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) ซอร์บิทอล (sorbitol) แมนนิทอล (mannitol) หรือสารละลายของเกลืออินทรีย์บางชนิด เช่นแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) เป็นต้น

ออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่ใช้กันมากในเชื้อราคลาสเบสิดิโอไมซีตีส ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต แมนนิทอล และซูโครส (Peberdy and Fox, 1993)

ความเข้มข้นของ ออสโมติค สเตบิไลเซอร์ก็มีผลต่อการเตรียมโพรโตพลาสต์ และความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อเชื้อแต่ละชนิดอาจแตกต่างกัน แต่โดยมากอยู่ในช่วงความเข้มข้นต่ำ (ตารางที่ 2.6)

ตารางที่2.6 แสดงสารละลายที่นิยมใช้เป็นสารออสโมติค สเตบิไลเซอร์ในเห็ดบางชนิด

สายพันธุ์เห็ด	ชนิดและความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์	เอกสารอ้างอิง
Pleurotus ostreatus	(1) 0.5M mannitol (2) 0.6M mannitol (3) 0.7M mannitol	Toyomasu and Mori(1987) Yamada *et al.*(1983) Eguchi and Higaki(1995) Toyomasu *et al.*(1986)
Pleurotus forida	0.6M mannitol	Zhao and Chang(1993)
Pleurotus cystidiosus	0.6M $MgSO_4$	Sudarat(1991)
Pleurotus sajor-caju	0.6M mannitol	Zhao and Chang(1993)
Lentinula edodes	(1) 0.6M $MgSO_4$ (2) 0.6M mannitol	Hong and Yeup (1985) ประภัสสร(2540) Zhao and Chang(1993)
Coprinus macrorhizus	0.5M mannitol	Yanagi *et al.*(1985)
Coprinus pellucidus	0.5M $MgSO_4$	Morinaga *et al.*(1985)
Coprinus cinereus	0.5M $MgSO_4$	Morinaga *et al.*(1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

40793

2.5.2.2 การรวมโพรโตพลาสต์ (Protoplast Fusion)

การรวมโพรโตพลาสต์ เป็นขั้นตอนในการเหนี่ยวนำให้โพรโตพลาสต์มาหลอมรวมกัน โดยทำได้ 2 วิธีใหญ่ คือ การใช้สารเคมี และการใช้กระแสไฟฟ้า

1. การใช้สารเคมี

สารเคมีที่นิยมใช้ คือโพลีเอทธิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol) หรือ PEG ร่วมกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) PEG เป็นสารโพลีเมอร์ที่มีสูตรโมเลกุลดังนี้ CH_2OH-(CH_2-O-CH_2)$_n$-CH_2OH ซึ่งมีคุณสมบัติในการส่งเสริมให้เกิดการรวมเซลล์ โดยมีผลต่อเซลล์ของสัตว์และโพรโตพลาสต์ของพืช เห็ดรา และแบคทีเรีย (Saunders and George, 1987) เนื่องจากมีพันธะอีเธอร์ (ether bond) จึงทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับประจุบวกของน้ำ โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ที่อยู่บนผิวของโพรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นผลให้เกิดการเกาะตัวกันของเซลล์โพรโตพลาสต์ ส่วนแคลเซียมไอออนจะช่วยเชื่อมระหว่างกลุ่มของโปรตีนที่ผิวของโพรโตพลาสต์ ยังไม่รู้กลไกที่แน่นอนในการทำงานของโพลีเอทธิลีนไกลคอลที่มีต่อเยื่อหุ้มเซลล์ในการรวมกันของโพรโตพลาสต์ แต่เชื่อว่า PEG มีหน้าที่ 2 อย่าง คือ ทำให้เกิดการเกาะตัวของเซลล์ (agglutination) และการเกิดการรวมกันของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อโพรโตพลาสต์เข้ามาเกาะกันจะมีผลให้เยื่อหุ้มโพรโตพลาสต์แตะกันและเกิดการหลอมรวมของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงมีผลทำให้โพรโตพลาสต์เกิดการรวมตัว (Perberdy, 1989) โดย PEG มีผลต่อการสร้างสารประกอบประเภทฟอสโฟลิปิดซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มโพรโตพลาสต์ PEG มีน้ำหนักโมเลกุลหลายขนาดแต่ที่พบว่าเหมาะแก่การรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดรา คือพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4000-6000 (Peberdy, 1985) และความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 25-30% และพบว่าถ้า PEG มีความเข้มข้นน้อยมากโพรโตพลาสต์ของรามักจะแตก ในขณะที่ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงมากๆอาจมีผลให้โพรโตพลาสต์เหี่ยว เนื่องจากสารละลายชนิดนี้มีสภาพเป็นสารละลายไฮเปอร์ทอนิคโอกาสที่เกิดการรวมตัวกันเป็นไปได้ยากขึ้น

วีรวัฒน์ (2536) ได้ทำการปรับปรุงเห็ดฟาง(*Volvariella volvacea*) ด้วยวิธีการหลอมรวมโพรโตพลาสต์ โดยใช้ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 ความเข้มข้น 30% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่ามีผลให้เกิดการรวมโพรโตพลาสต์

ประภัสสร (2540)ได้ทดลองผสมพันธุ์เห็ดโดยวิธีการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอม (*L. edodes*) และเห็ดขอนขาว (*L. squarrosulus*) พบว่าการใช้ PEG น้ำหนักโมเลกุล 8000 ความเข้มข้น 30% ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง มีประสิทธิภาพให้เกิดการหลอมรวมโพรโตพลาสต์ได้ดี

Kiguchi and Yanagi (1985) ได้ทำการผสมพันธุ์ระหว่างเชื้อ *Coprinus macrorhizus* ต่างสายพันธุ์ โดยวิธีการรวมโพรโตพลาสต์ พบว่า PEG น้ำหนักโมเลกุล 4,000 ความเข้มข้น 30% ร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 10 มิลลิโมลาร์ โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที มีผลให้เกิดการรวมโพรโตพลาสต์อย่างมีประสิทธิภาพ

Toyomasu *et al.* (1986) ได้ทำการผสมพันธุ์ระหว่าง *Pleurotus ostreatus* กับ *Pleurotus salmoneo-stranineus* พบว่า PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 4,000 และที่ความเข้มข้น 30% ร่วมกับ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งละลายอยู่ใน glycine-NaOH, pH 9.0 ทำให้เกิดการรวมกันของโพรโตพลาสต์ได้ดี

2. การใช้กระแสไฟฟ้า

การรวมโปรโตพลาสต์โดยอาศัยกระแสไฟฟ้ามาเหนี่ยวนำให้โพรโตพลาสต์เกิดการรวมกันเรียกว่าอิเลคโตรฟิวชั่น (electrofusion) โดยใช้หลักการของไดอิเลคโตรโฟริซิส (dielectrophoresis) ซึ่งจะไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์เมื่อได้รับกระแสไฟฟ้า Zimmermann and Vienlen (1982) ได้ประดิษฐ์เครื่องมือที่เรียกว่า Zimmermann cell fusion instrument ซึ่งอาศัยหลักการของไดอิเลคโตรโฟริซิส เพื่อทำให้เยื่อหุ้มโพรโตพลาสต์ที่อยู่ใกล้กันมาแตะกัน และกระแสไฟฟ้าจะทำลายเยื่อหุ้มโพรโตพลาสต์เป็นผลให้มีการหลอมรวมกัน กล่าวคือ เมื่อนำโพรโตพลาสต์ไปไว้ในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ โพรโตพลาสต์จะเคลื่อนที่มาเรียงต่อกันเป็นสายคล้ายสายไข่มุก จากนั้นจึงปล่อยไฟฟ้ากระแสตรงเป็นจังหวะ เยื่อหุ้มโพรโตพลาสต์จะเปิดออกและเกิดการหลอมรวมกัน (สาวิตรี, 2536)

Euchi and Higaki (1995) ได้ทำการสร้างเห็ดลูกผสมโดยการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *Pleurotus sajor-caju* และ *Mycoleptodonoides aitchisonii* โดยใช้วิธีในการรวมโพรโตพลาสต์ 3 วิธีคือ individual electric fusion method, pearl chain electric fusion method และ polyethylene glycol method โดยทำการตรวจหาสภาวะที่เหมาะสมในการรวมแต่ละวิธี และคำนวณอัตราการงอกของลูกผสมที่ได้ พบว่า individual electric fusion method มีประสิทธิผลในการหลอมรวมสูงสุด โดยมีอัตราการงอกเป็น 19.2%

Zhao and Chang (1996) ได้ทดลองผสมพันธุ์ภายในเชื้อชนิดเดียวกันของ *Coprinus cinereus* และ *Shizophyllum commune* โดยการใช้วิธีการรวมโพรโตพลาสต์ 2 วิธี คือการใช้สารเคมี PEG ชักนำให้เกิดการรวม และการใช้กระแสไฟฟ้า ทั้ง 2 วิธีให้ความถี่ในการรวมโพรโตพลาสต์เป็น 16.7% ถึง 50.0% และ 6.9% ถึง 8.4% ตามลำดับ

ในการทำโพรโตพลาสต์ฟิวชั่น ค่าที่ใช้บอกว่าเกิดการรวมกันมากหรือน้อย คือค่าความถี่ของการรวมกันของโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion frequency) ซึ่งหาได้จากจำนวนโพรโตพลาสต์ที่หลอมรวมกัน หารด้วยจำนวนโพรโตพลาสต์ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.3 การกลับคืนของผนังเซลล์หรือการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโตพลาสต์

การสร้างผนังเซลล์ใหม่บนผิวของโพรโตพลาสต์ และการกลับคืนสู่สภาพเซลล์ปกติ เป็นขั้นตอนสำคัญในการนำโพรโตพลาสต์ไปใช้ในด้านต่างๆ เช่น การประยุกต์ใช้ทางด้านพันธุศาสตร์ ประสิทธิภาพในการสร้างผนังเซลล์ใหม่และการเจริญต่อเป็นโคโลนีของโพรโตพลาสต์จะแสดงในรูปของค่าความถี่ของโพรโตพลาสต์ที่กลับคืนสู่สภาพเซลล์ปกติ (regeneration frequency หรือ reversion frequency) โดยหาได้จากการนำจำนวนโพรโตพลาสต์ที่เจริญกลับสู่สภาพเซลล์ปกติมาหารด้วยจำนวนโพรโตพลาสต์ทั้งหมด โดยทั่วไปความถี่ของโพรโตพลาสต์ในการกลับคืนสู่สภาพเซลล์ปกติของเชื้อราในชั้น (class) เบสิดิโอไมสิติส จะมีค่าต่ำ (Peberdy, 1989) ทำให้มีปัญหาต่อการที่จะนำโพรโตพลาสต์มาประยุกต์ใช้ในทางพันธุศาสตร์

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ใหม่บนผิวของโพรโตพลาสต์ ได้แก่ เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโพรโตพลาสต์ (lytic enzyme) การเทอาหารวุ้นทับ (overlay) ความเข้มข้นของวุ้น ออสโมติค สเตบิไลเซอร์ และบางครั้งส่วนประกอบที่จำเพาะของอาหารก็มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ใหม่ (Peberdy and Fox, 1993) เมื่อโพรโตพลาสต์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะสามารถสร้างผนัง-เซลล์ขึ้นได้อีกครั้งหนึ่ง โดยทำหน้าที่แบ่งเซลล์และเจริญเติบโตเป็นปกติ อาหารวุ้นประมาณ 3-5% พบว่าจะมีการกระตุ้นให้มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ดี (Peberdy, 1979)

2.6 การคัดเลือกลูกผสม (Screening for hybrid fusants)

การรวมโพรโตพลาสต์ของคู่เชื้อสองชนิด ซึ่งทำโดยการนำโพรโตพลาสต์จำนวนมากของเชื้อทั้งสองให้มาอยู่ด้วยกัน จึงไม่สามารถกำหนดได้ว่าการรวมโพรโตพลาสต์ต้องเกิดขึ้นระหว่างเชื้อที่ต้องการ ทั้งนี้อาจเกิดจากการรวมกันระหว่างเชื้อชนิดเดียวกันหรือเชื้อต่างชนิดกันก็ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการคัดเลือกลูกผสมประเภทที่เราต้องการออกจากประเภทอื่นๆ เช่น การใช้เครื่องบ่งชี้ (marker) ต่างชนิดกันของคู่เชื้อทั้งสอง เครื่องบ่งชี้ที่นิยมใช้ ได้แก่ ออกโซโทรฟิคมาร์กเกอร์ (auxotrophic markers) ซึ่งคัดเลือกโดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) สายพันธุ์พ่อแม่ทั้งสองฝ่ายที่เป็นออกโซโทรบ (auxotroph) จะขาดความสามารถในการสังเคราะห์ธาตุอาหารบางอย่าง เช่น กรดอะมิโน หรือวิตามินบางชนิดจึงทำให้ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารมินิมอล (minimal medium) แต่ถ้าเป็นโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากการหลอมรวมกันระหว่างพ่อและแม่จะมี complementation ของยีนเกิดขึ้น จึงได้ลูกผสมที่เป็นสายพันธุ์โปรโตโทรบ(prototroph) ซึ่งเจริญบนอาหารมินิมอลได้ อย่างไรก็ตามนอกจากออกโซโทรบชนิดที่ขาดความสามารถในการสังเคราะห์ธาตุอาหารบางอย่างดังกล่าวมาแล้ว มีออกโซโทรบชนิดที่ไม่มีความสามารถในการต้านทานต่อยา (หรือสารประกอบ) บางชนิด เช่น สารฆ่าเชื้อรา (fungicides) Peberdy and Fox (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้รายงานตัวอย่างความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญของสารต้านเชื้อราที่มีต่อเห็ดในสกุล *Pleurotus* ดังแสดงในตารางที่ 2.5

นอกจากนั้นการคัดเลือกอาจใช้เทคนิคที่เรียกว่า dead donor technique ซึ่งทำได้โดยทำให้โพรโตพลาสต์ได้รับสาร(lethal agent)บางอย่าง เช่น การใช้ความร้อน (heat treatment) สารปฏิชีวนะ การฉายรังสีอัลตร้าไวโอเลต หรือสารเคมี เช่นไอโอโดอะซิทาไมด์ (iodoacetamide) หรือไดเอทธิลไพโรคาร์บอเนต (diethylpyrocarbonate) (Zhao and Chang, 1995) โดยโพรโตพลาสต์หนึ่งในคู่ผสมจะถูกทำให้ตายหรือไม่ทำงาน (inactivated) ดังนั้น การคัดเลือกที่ใช้จะสัมพันธ์กับความมีชีวิตของอีกสายพันธุ์หนึ่ง

ตารางที่ 2.7 ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของสารต้านเชื้อราที่มีต่อเชื้อเห็ดในสกุล *Pleurotus*

Species	MIC ($\mu g.ml^{-1}$)							
	Hy	Ph	5-Fl	Cx	Cy	Pz	Fz	Iz
P. colombinus	-	40	-	0.6	10	60	200	20
P. florida	-	65	80	-	0.4	8	150	140
P. ostreatus	-	40	5	1	20	20	80	150
P. pulumonarius	60	>80	-	1.2	20	60	20	30
P. sapidus	-	-	-	-	1.2	8	50	200
P. sajor-caju	55	55	8	0.8	30	120	180	30

Key to agents: Cx = carboxin; Cy = cycloheximide; 5-Fi = 5-fluroiodole; Fz = flurilazole; Hy = hygromycin B; Ph = pheomycin; Iz = imazalil; Pz = propicomazole.

ที่มา : Peberdy and Fox (1993)

Zho and Chang (1996) ได้ทำการแยกและรวมโพรโตพลาสต์ที่เป็นออกโซโทรฟิค มิวแทนซ์ (auxotrophic mutant) ระหว่างเชื้อต่างสกุลของ *Pleurotus ostreatus* และ *Schizophyllum commune* โดยใช้ PEG ชักนำให้เกิดการรวม พบว่า ลูกผสมที่ได้เกิดจาก complementation ของสองเชื้อที่เป็น auxotrophic mutants และความถี่ของการเกิดลูกผสมมีค่าเท่ากับ 3.6 - 7.3 x 10^{-5} ลูกผสมที่ได้ส่วนใหญ่เป็นโมโนคารีออน(monokaryon) และเป็นหมัน (sterile)

Matsumoto *et al.* (1997) ได้ทำการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยโมโนคารีออน ที่เป็น auxotrophic mutant ของเชื้อ *Pleurotus ostreatus* กับ *P. sajor-caju* และนำโพรโตพลาสต์มารวมกันโดยใช้ PEG ชักนำให้เกิดการรวมสองวิธี คือ วิธีที่ใช้ PEG แบบปกติไม่ปั่นเหวี่ยง และวิธีการรวมแบบปั่นเหวี่ยง (PEG centrifuged fusion method) พบว่าวิธีหลังมีการหลอมรวมมากกว่าวิธีปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10% ลูกผสมที่ได้เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางไอโซไซม์ (isozyme) แสดงให้เห็นว่าเป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมของสองเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1. อุปกรณ์

		บริษัทผู้ผลิต
1	ตู้เขี่ยเชื้อ	ISSCO รุ่น HS123
2.	หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)	TOMY รุ่น 3S-325
3.	กล้องจุลทรรศน์ที่ได้ติดตั้งdrawing tube	NIKON
4.	ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator)	SHEL LAB รุ่น 2020
5.	ตู้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)	EDISON รุ่น 4230
6.	ไมโครปิเปตต์ (micropipette)	LABSYSTEMS
7.	เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	DENVER INSTRUMENT รุ่น 215
8.	เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	SHIMASU รุ่น UV1610
9.	อ่างปรับอุณหภูมิ (water bath)	MEMMERT
10.	อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (heamacytometer)	BOECO
11.	เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (centrifuge)	HERMEL รุ่น Z383K
12.	เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง	METTLER-TOLEDO รุ่น PG 5002
13.	เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง	METTLER-TOLEDO รุ่น AG204
14.	ซินเตอร์กลาส ฟิลเตอร์ (sinter glass filter)	DURAN
15.	เครื่องแก้วเช่น ฟลาสต์ บิกเกอร์ กระบอกตวง ฯลฯ	PYRAX
16.	ตู้อบ (oven)	MEMMERT
17.	ลูกแก้ว (glass bead) ขนาดเล็ก(เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.50 ซม.)	
18.	อุปกรณ์ตัดเส้นใย(cork borer)เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.50 ซม	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

	บริษัทผู้ผลิต
อาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (potato dextrose agar,PDA)	DIFFCO
อาหารเลี้ยงเชื้อพีดีบี (potato dextrose broth,PDB)	DIFFCO
อาหารเลี้ยงเชื้อมอล์ทสกัดอาการ์(malt extract agar,MEA)	DIFFCO
วุ้นผง (bacto agar)	DIFFCO
กลูโคส(glucose)	FLUKA
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$	MERCK
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	MERCK
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	MERCK
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$	MERCK
วิตามินบีหนึ่งไฮโดรคลอไรด์ (vitamin B1 hydrochloride)	FLUKA

3.1.2.2. สารเคมีสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์

ไลซิ่งเอนไซม์ (lysing enzyme) L-2265	SIGMA
เบต้า-กลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase)	SIGMA
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	MERCK
มาลิอิกแอนไฮไดร์ด (maleic anhydride)	SIGMA
แมนนิทอล (mannital)	FLUKA
ซอร์บิทอล (sorbital)	SIGMA
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	MERCK
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	MERCK
ซูโครส (sucrose)	-

3.1.2.3. สารเคมีสำหรับรวมโพรโตพลาสต์

โพลีเอทธิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol-6000)	SIGMA
แคลเซียมคลอไรด์ $(CaCl_2)$	MERCK

3.1.2.4. ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีฆ่าเชื้อรา (fungicide)

ไนสเตติน(nystatin) จาก mycrostatin oral suspension	BRISTOL-MYERS
(ประกอบด้วย nystatin B.P. 100,000 unit/ml)	SQUIBB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโอดีน(iodine) จากทิงเจอร์ไอโอดีน (ประกอบด้วย iodine 2%, sodium iodide 2.4 %)	วิทยาศิริบัญชา จำกัด

3.1.2.5. สารเคมีสำหรับหาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด

ไดฟีนิลลามีน (diphenylamine)	MERCK
อะเซทาดีไฮด์ (acetaldehyde)	MERCK
เอธานอล (ethanol)	MERCK
ไดเอธิลอีเทอร์ (diethyl ether)	MERCK
กรดน้ำส้ม (glacial acetic acid)	MERCK
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	MERCK
กรดเพอคลอริก (perchoric acid 70%)	MERCK
กรดซัลฟูริค (H_2SO_4)	MERCK
ดีเอ็นเอมาตรฐาน (deoxyribonucleic acid from calf thymus type l)	SIGMA

3.1.3 แหล่งของเชื้อจุลินทรีย์

3.1.3.1 สายพันธุ์เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก ถนนพุทธมณฑล สาย 4 จังหวัดนครปฐม

3.1.3.2 สายพันธุ์เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 สายพันธุ์เห็ดหอม

สำหรับสายพันธุ์เห็ดหอมในการศึกษาครั้งนี้ จะไม่ทำการทดลองเช่นเดียวกับในเห็ดนางรม (จากข้อ 3.2.2.1 – 3.2.2.4) เนื่องจากประภัสสร (2540) ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว

3.2.2 สายพันธุ์เห็ดนางรม

3.2.2.1 การศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology) ทั้งลักษณะภายนอกและภายในของเห็ดนางรม

นำเส้นใยเห็ดนางรมมาเพาะให้เกิดดอก (ภาคผนวก ก ข้อ12) จากนั้นนำดอกเห็ดนางรมที่บานเต็มที่มาทำการเก็บสปอร์โดยการทำสปอร์พิมพ์ (spore-print) ซึ่งทำโดยการตัดส่วนหมวกเห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกจากก้านแล้วคว่ำลงบนปากบิกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งภายในบิกเกอร์มีกระดาษกรองตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. บรรจุอยู่จำนวน 15-20 แผ่น จากนั้นนำมาวางทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน ในสถานที่ปลอดลม ที่อุณหภูมิห้อง ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทั้งภายนอก และภายในของเห็ดนางรมตามวิธีการของ Wating (1973) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มี ไมโครมิเตอร์ (ที่เทียบค่าแล้ว) และ drawing tube ประกอบอยู่

วิธีการเตรียมเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว (single spore) ของเห็ดนางรม

นำกระดาษกรองที่มีสปอร์ของเห็ดนางรมติดอยู่ซึ่งได้จากการทำสปอร์พิมพ์ตามวิธีในข้อ 3.2.2.1 มาแขวนลอยในสารละลายทวีน 80 (tween 80) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เขย่าให้สปอร์กระจาย นับจำนวนสปอร์ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (ภาคผนวก ข) จากนั้นทำให้สารละลายสปอร์แขวนลอยมีความเข้มข้น $1x10^3$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วใช้ปิเปตดูดสารละลายสปอร์มา 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ย (spread plate) ลงบนอาหารพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 คืน ต่อไปทำการคัดเลือกสปอร์ที่เพิ่งงอก germ tube ออกมาเลี้ยงบนหลอดอาหารผิวเอียงพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำเส้นใยที่เจริญเต็มที่มาทำการทดลองต่อไป

3.2.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม โดยทำการแปรผันชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และพีเอช

1 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย

ใช้อุปกรณ์ตัดเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ตัดเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม (ซึ่งได้จากวิธีการในข้อ 3.2.2.1) และถ่ายชิ้นเส้นใยลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน คือ พีดีเอ มอลต์สกัดอาการ์ และ วอเตอร์อาการ์ (water agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน วัดการเจริญของเส้นใยโดยวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ

2 การศึกษาระดับของอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย

จากข้อ 1 เมื่อทราบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเส้นใยแล้ว จากนั้นทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย ซึ่งมีวิธีการทำนองเดียวกับข้อ 1 แต่ผันแปร (vary) อุณหภูมิให้เป็นอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ คือ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ใช้อาหารชนิดที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการศึกษาในข้อ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 การศึกษาระดับพีเอชของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย

จากข้อ 1 และ 2 เมื่อทราบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเส้นใยแล้ว จึงทำการศึกษาหาระดับของพีเอชที่เหมาะสม โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 แต่แปรผันระดับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนผ่านการฆ่าเชื้อ (4.5, 5.0, 55, 6.0 และ 6.5) โดยใช้ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการศึกษามาแล้วในข้อ 1 และ 2

3.2.2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโพรโตพลาสต์จากเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรมให้ได้จำนวนมากที่สุด โดยผันแปรความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ พีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ ชนิด และความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ตลอดจนระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่ม ตามวิธีการทดลองของประภัสสร (2540)

1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

นำเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม มาเลี้ยงลงในอาหารเหลวพีดีบีปริมาตร 40 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีลูกแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. ปริมาณ 20 ลูกบรรจุอยู่ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ยีเส้นใยให้กระจายตัว จากนั้นเก็บเส้นใยโดยปั่นแยกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเส้นใยจากอาหาร เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ล้างเส้นใยที่ได้ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง ล้างต่อด้วยโพรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ จากนั้นนำเส้นใย 0.3 กรัม (น้ำหนักเปียก) ใส่ลงในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ 3 มล. เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ ซึ่งสารละลายไลซิ่งเอนไซม์นี้เป็นสารละลายเอนไซม์ผสมที่ประกอบไปด้วยเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) โปรติเอส (protinase) และ เซลลูเลส (cellulase) โดยผันแปรความเข้มข้นให้เป็น 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มก./มล. นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับจำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นโดยใช้อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (ภาคผนวก ข)

2 การศึกษาระดับพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

จากข้อ 1 เมื่อทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ไลซิ่งเอนไซม์แล้ว ให้นำความเข้มข้นนั้นๆมาศึกษาหาระดับของพีเอชที่เหมาะสม ซึ่งมีวิธีการทดลองในทำนองเดียวกับข้อ 1 โดยทำการแปรผันระดับพีเอชในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์เป็น 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 การศึกษาชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์

จากข้อ 1 และ 2 เมื่อทราบความเข้มข้นของเอนไซม์และระดับพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์แล้ว จึงนำมาศึกษาชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมต่อการแยกโพรโตพลาสต์ ซึ่งมีวิธีการทดลองในทำนองเดียวกับข้อ 1 แต่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์และระดับพีเอชที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการศึกษามาแล้วในข้อ 1 และ 2 ส่วนออสโมติค-สเตบิไลเซอร์ที่ใช้ศึกษา ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต โปตัสเซียมคลอไรด์ แอมโมเนียมคลอไรด์ แมนนิทอล ซอร์บิทอล และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์สำหรับสารทุกชนิด

4 การศึกษาความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์

จากข้อ 1 ถึง 3 เมื่อทราบความเข้มข้น ระดับของพีเอช และชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ หลังจากทำการทดลองแล้ว จึงทำการศึกษาหาความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสม โดยทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 1 แต่ผันแปรความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ เป็น 0.3, 0.6, 0.9 และ1.2 โมลาร์ ตามลำดับ ทั้งนี้ใช้ความเข้มข้นและระดับพีเอชของเอนไซม์ และชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองในข้อ 1 ถึง 3

5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่ม

การทดลองนี้ทำเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเส้นใยให้ได้โพรโตพลาสต์จำนวนมากที่สุด ซึ่งวิธีการทดลองทำในทำนองเดียวกับข้อ 1 โดยให้มีสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพร-โตพลาสต์ที่ได้จากการทดลองในข้อ 1 ถึง 4 แต่ทำการนับจำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นโดยอุปกรณ์นับเม็ดเลือดที่เวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.2.2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโต-พลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรม

หลังจากเตรียมโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรมได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปจะทำการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์

1 ชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์

ชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่ใช้ศึกษาคือ แมกนีเซียมซัลเฟต โปตัสเซียมคลอไรด์ แอมโมเนียมคลอไรด์ แมนนิทอล ซอร์บิทอล และ ซูโครส ที่ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ การทดลองเริ่มจากนำโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรมที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ มากรองแยกเส้นใยออกจากโพรโตพลาสต์ด้วยซินเตอร์กลาส ฟิลเตอร์ แล้วนำไปตก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยโพรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ 2 ครั้ง ต่อไปกระจายโพรโตพลาสต์ในสารละลายดังกล่าว ด้วยการเจือจางให้มีความเข้มข้น 10^5 โพรโตพลาสต์ต่อมล. โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายโพรโตพลาสต์ที่ได้จำนวน 0.1 มล. มาใส่อาหารเลี้ยงเชื้อชักนำการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ที่มีชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ชนิดต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับวิธีการทำให้โพรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ ทำได้โดยใส่โพรโตพลาสต์ปริมาณดังกล่าวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีบีที่เติมวุ้น 3% แล้วเททับด้วยอาหารชนิดเดิมแต่ลดความเข้มข้นของวุ้นเป็น 0.5 % นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์บนผิวอาหารแข็งทุกๆวัน และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความถี่ในการเจริญของโพรโตพลาสต์กลับสู่สภาพเซลล์ปกติ (regenerate frequency) โดยคำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ ความถี่ในการเจริญของโพรโตพลาสต์กลับสู่สภาพเซลล์ปกติ} = \frac{\text{จำนวนโพรโตพลาสต์ที่สามารถเจริญกลับสู่สภาพเซลล์ปกติ}}{\text{จำนวนโพรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

2 ความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์

จากข้อ 1 เมื่อทราบชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่เหมาะสมต่อการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโตพลาสต์แล้ว จะทำการศึกษาหาความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสม โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 แต่ใช้ชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสม โดยแปรผันความเข้มข้นเป็น 0.3, 0.6, 0.9 และ 1.2 โมลาร์ ตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ทุกวัน และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความถี่ในการเจริญของโพรโตพลาสต์กลับสู่สภาพเซลล์ปกติ

3.2.3 การหาความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรม เพื่อใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ในการคัดเลือกลูกผสม

การทดลองนี้ได้ทำขึ้นหลังจากไม่ประสบผลสำเร็จจากการพยายามสร้างออกโซโทรบ (auxotroph) ชนิดที่ไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งจุดประสงค์ของการหาออกโซโทรบ เพื่อหาลักษณะพิเศษที่แตกต่างกันระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม เพื่อใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ในการคัดเลือกลูกผสมที่ได้ภายหลังจากการหลอมรวมโพรโตพลาสต์ สำหรับการศึกษานี้ทำโดยการหาความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราบางชนิดและที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งทำโดยใช้อุปกรณ์ตัดเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ตัดเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดหอมและเห็ดนางรมมาถ่ายลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มม. ที่มีอาหาร minimal medium ที่ผสมสารฆ่าเชื้อรา 2 ชนิดซึ่งได้แก่ ไนสเตติน (nystatin) และไอโอดีน (iodine) โดยให้มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนสเตติน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ยูนิต/มล. ในการทดลองระยะแรก และต่อมาได้ทำการทดลองอีกหนึ่งชุดโดยลดช่วงระดับความเข้มข้นลงเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 ยูนิต/มล.

ไอโอดีน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.003, 0.005 และ 0.007% ในการทดลองระยะแรก และต่อมาได้ทำการทดลองอีกหนึ่งชุดโดยลดช่วงระดับความเข้มข้นลงเป็น 0.001, 0.002, 0.003, 0.004 และ 0.005%

ทั้งนี้เส้นใยของเห็ดหอมถูกบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนเส้นใยของเห็ดนางรมบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน วัดอัตราการเจริญของเส้นใยโดยการวัดความยาวของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี และทำการทดลอง 5 ซ้ำ

3.2.4 การรวมโพรโตพลาสต์

การรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม ทำได้โดยนำเส้นใยของเห็ดทั้ง 2 ชนิดมาแยกโพรโตพลาสต์ วิธีการแยกโพรโตพลาสต์ของเส้นใยเห็ดหอมทำตามวิธีของประภัสสร (2540) และของเห็ดนางรมทำตามข้อ 3.2.2.3 เมื่อได้โพรโตพลาสต์แล้วนำมากรองด้วย ซินเตอร์กลาส ฟิลเตอร์ แล้วนำไปปั่นแยกให้โพรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ต่อไปล้างด้วยแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ 2 ครั้ง หลังจากนั้นทำการกระจายโพรโตพลาสต์ที่ได้ในแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ โดยให้มีจำนวนโพรโตพลาสต์ประมาณ 10^6 โพรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำสารละลายโพรโตพลาสต์ของเห็ดชนิดละ 1 มล. มาใส่รวมกันในหลอดแก้วและนำไปปั่นแยกให้โพรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำใสทิ้งและใช้ปิเปตดูดสารละลายโพลีเอทธีลีน ไกลคอล(ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่มีโพรโตพลาสต์ดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที โดยเขย่าหลอดเบาๆทุก 5 นาที ทำการเจือจางจนได้โพรโตพลาสต์ปริมาณ 10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ใช้ปิเปตดูดสารละลายโพรโตพลาสต์ที่ผ่านขั้นตอนการรวมกันมาปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาใส่ในอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ที่มีวุ้น 3% (ภาคผนวก ก ข้อ 10) แล้วเททับด้วยอาหารชนิดเดิมที่มีความเข้มข้นของวุ้นเพียง 0.5% ต่อไปนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจดูการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์บนผิวหน้าอาหารแข็งทุกๆวัน ถ้าพบการเกิดใหม่ของโคโลนีจะทำการเก็บโคโลนีที่ขึ้นกระจายและไม่เจริญทับกันมาเลี้ยงบนอาหารพีดีเอผิวเอียงโดยให้มี 1 โคโลนีต่อ 1 หลอดทดลอง

3.2.5 การคัดเลือกลูกผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.1 ความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา

นำโคโลนีที่เก็บได้ภายหลังจากการรวมโพรโตพลาสต์(จากข้อ3.2.4)มาทำการทดสอบความความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา ซึ่งทำโดยถ่ายชิ้นเส้นใยของโคโลนีที่เก็บได้ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร minimal medium ที่ผสมสารฆ่าเชื้อราชนิดใดชนิดหนึ่งที่ใช้เป็น เครื่องบ่งชี้ (จากข้อ 3.2.3) และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ

3.2.5.4 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอ

1 การสกัดดีเอ็นเอ

การทดลองนี้ทำตามวิธีของ Schneider (1945,1946) โดยเลี้ยงเส้นใยสายพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมในอาหารเหลวพีดีบี 40 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีลูกแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. ปริมาณ 20 ลูกบรรจุอยู่ โดยเลี้ยงขวดละ 1 เชื้อ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำเส้นใยสดปริมาณ 5 กรัม ไปปั่นแยกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นเติมเอธานอล 95% ต่อน้ำ ในอัตราส่วน 4 :1 (ภาคผนวก ก ข้อ11) ปริมาตร 5 มล. นำมาปั่นแยกอีกครั้ง โดยนำส่วนของเส้นใยมาเติมด้วยเอธานอล ปั่นแยกอีกครั้ง เอาเฉพาะส่วนเส้นใยมาเติมสารละลายอีเธอร์ต่อเอธานอลในอัตราส่วน 1 : 3 (ภาคผนวก ก ข้อ11) ทำเช่นนี้ติดต่อกัน 3 ครั้ง แยกเส้นใยครั้งสุดท้ายออกมา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เติมกรดเพอคลอริด (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มล. นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เอาเฉพาะส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด

2 การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดตามวิธีของ Burton (1956) และใช้สารละลายไดฟีนิลลามีน (diphenylamine) (ภาคผนวก ก ข้อ 11) วัดสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และใช้ดีเอนเอจาก คาล์ฟ ไทมัสไทป์ I (calf thymus type I) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด

นำส่วนน้ำใสที่สกัดได้จากข้อ 1 ปริมาตร 1 มล. เติมสารละลายไดฟีนิลลามีน 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง ทำ 5 ซ้ำ

วัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าที่ได้ไปอ่านค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค) เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.3 ขนาดของเส้นใย

นำเส้นใยจากโคโลนีที่ได้จากข้อ 3.2.5.1 มาวัดขนาดเส้นใยและเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของพ่อแม่ โดยทำการวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ออคคูลาร์ ไมโครมิเตอร์(ocular micrometer) ที่เทียบค่าแล้วและติดตั้งอยู่กับกล้องจุลทรรศน์

3.2.5.4 การเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น

นำโคโลนีที่เก็บได้ภายหลังการรวมโพรโตพลาสต์มาทำการตรวจสอบการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.6 การเพาะเห็ดลูกผสมให้เกิดดอกเห็ด

นำสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้มาเลี้ยงในอาหารทดสอบการเกิดดอก(ภาคผนวก ก ข้อ13) จากนั้นนำเฉพาะสายพันธุ์ลูกผสมที่สามารถสร้างตุ่มดอกบนอาหารทดสอบดังกล่าวมาทำการเพาะเส้นใยของลูกผสมลงบนก้อนขี้เลื่อยสำหรับเพาะเห็ดสำเร็จรูป (ภาคผนวก ก ข้อ12) และศึกษาสันฐานวิทยาทั้งลักษณะภายนอกและภายในของดอกเห็ดที่เกิดขึ้น

3.2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (จรัญ, 2540)

ในการทดลองครั้งนี้วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทุกขั้นตอน ยกเว้นการทดลองในข้อ 3.2.2 (3.2.2.1), 3.2.3, 3.2.4 และ 3.2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology) ทั้งลักษณะภายนอก และภายในของเห็ดนางรม(*P. ostreatus*)

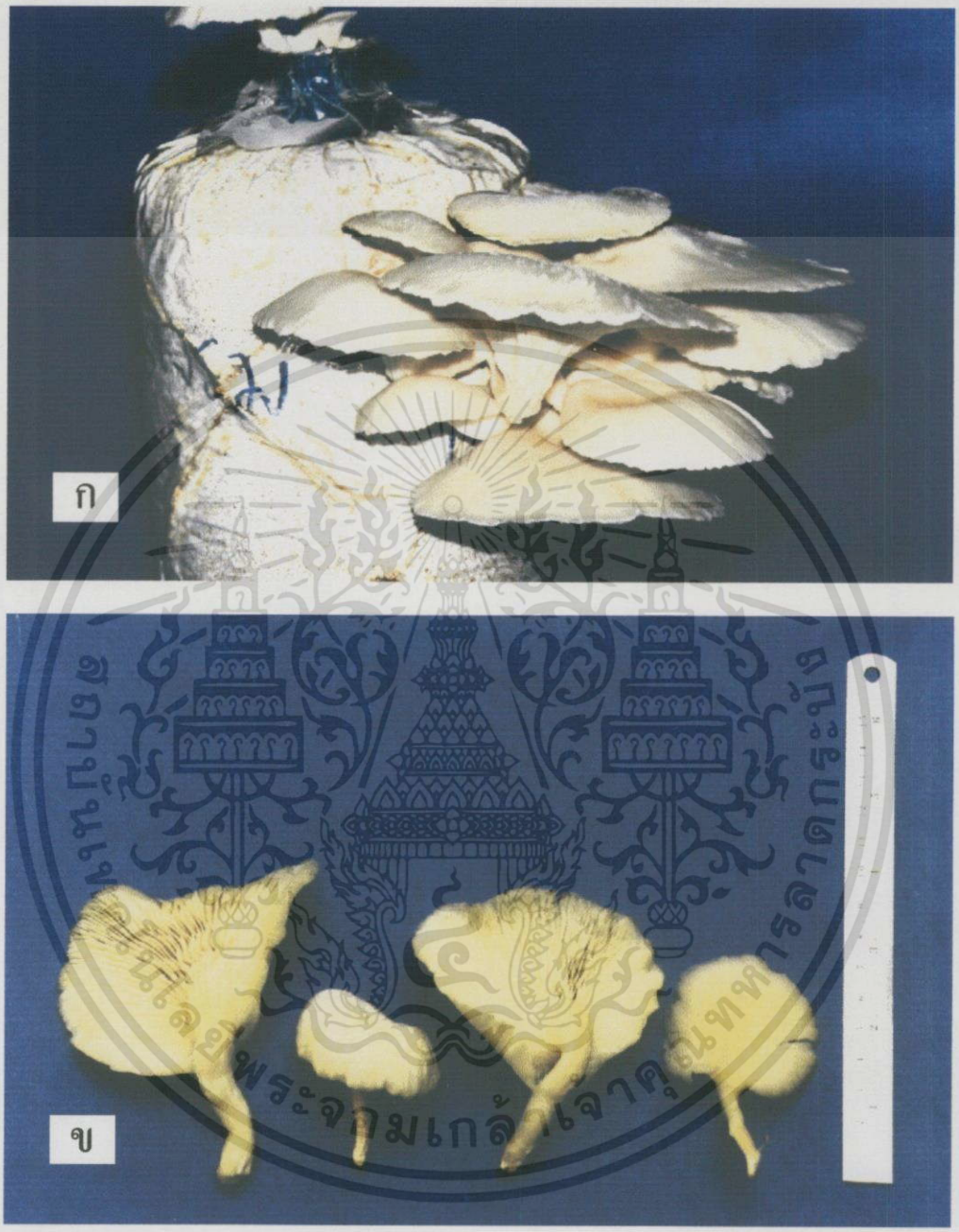
จากการนำเส้นใยของเห็ดนางรมที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตรมาเพาะให้เกิดดอกตามวิธีในภาคผนวก ก พบว่า การออกดอกของเห็ดนางรมมีลักษณะเป็นกลุ่ม โดยกลุ่มหนึ่งๆ จะประกอบไปด้วยดอกขนาดต่างๆ จำนวนหลายดอก (ภาพที่ 4.1) ดอกเห็ดมีขนาด 5 ถึง 15 ซม. มีสีขาวนวล ลักษณะของดอกเห็ดจะเว้าตรงก้าน ผิวของหมวกเห็ด (pileus,cap)โค้งเรียบ ดอกเห็ดเจริญยึดติดกับวัสดุ โดยมีก้านดอก (stipe) ติดกับหมวกเห็ดแบบ lateral ขอบดอกจะม้วนงอเข้าไปยังครีบ (gills,lamellae) เล็กน้อยเมื่อดอกเจริญเต็มที่ และเมื่อดอกแก่ขอบดอกจะมีสีเหลือง ครีบดอกมีสีขาวและอยู่ติดกับก้านดอกแบบ decurrent โดยครีบยาวติดถึงตัวก้านและลำแนวลงมาที่ตัวก้าน ประมาณ 1.25 ซม. ก้านดอกมีสีเดียวกับดอกเห็ด ผิวเรียบ โดยมีความยาวประมาณ 3.85 ซม. สปอร์พิมพ์มีสีขาวครีม(pale lilac) เกาะกันเป็นกลุ่มผลการศึกษาลักษณะภายใน พบว่าเส้นใยมีความกว้างเฉลี่ยแล้วประมาณ 3.23 ไมโครเมตร มีสีใส (hyline) พบแคลมป์คอนเนคชั่น และเห็นผนังกั้น (septum) (ภาพที่ 4.2) มี ซิสทิเดียม (cystidium) แทรกอยู่ระหว่าง เบสิเดียม (basidium) ซึ่งมีสเตอริกมา (sterigma) 4 อัน สปอร์มีขนาด 4.13 x 11.25 ไมโครเมตร และมีสีใส รูปรียาว ผนังบาง และเรียบ (elongate ellipsoid spores) และที่ส่วนฐานของสปอร์ด้านหนึ่งจะมีติ่งยื่นออกมา (hilar appendix) (ภาพที่ 4.3)

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม

4.2.1 ผลการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย

หลังจากการคัดแยกเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมตามวิธีในข้อ 3.2.2 แล้ว จะนำเส้นใยที่คัดแยกได้มาศึกษาหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ พีดีเอ มอลต์สกัด และวอเตอร์อาการ์ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน จากนั้นทำการวัดการเจริญเติบโตตามแนวราบบนผิวอาหาร พบว่าการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 3 ชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P_{0.05}$) (ภาค-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

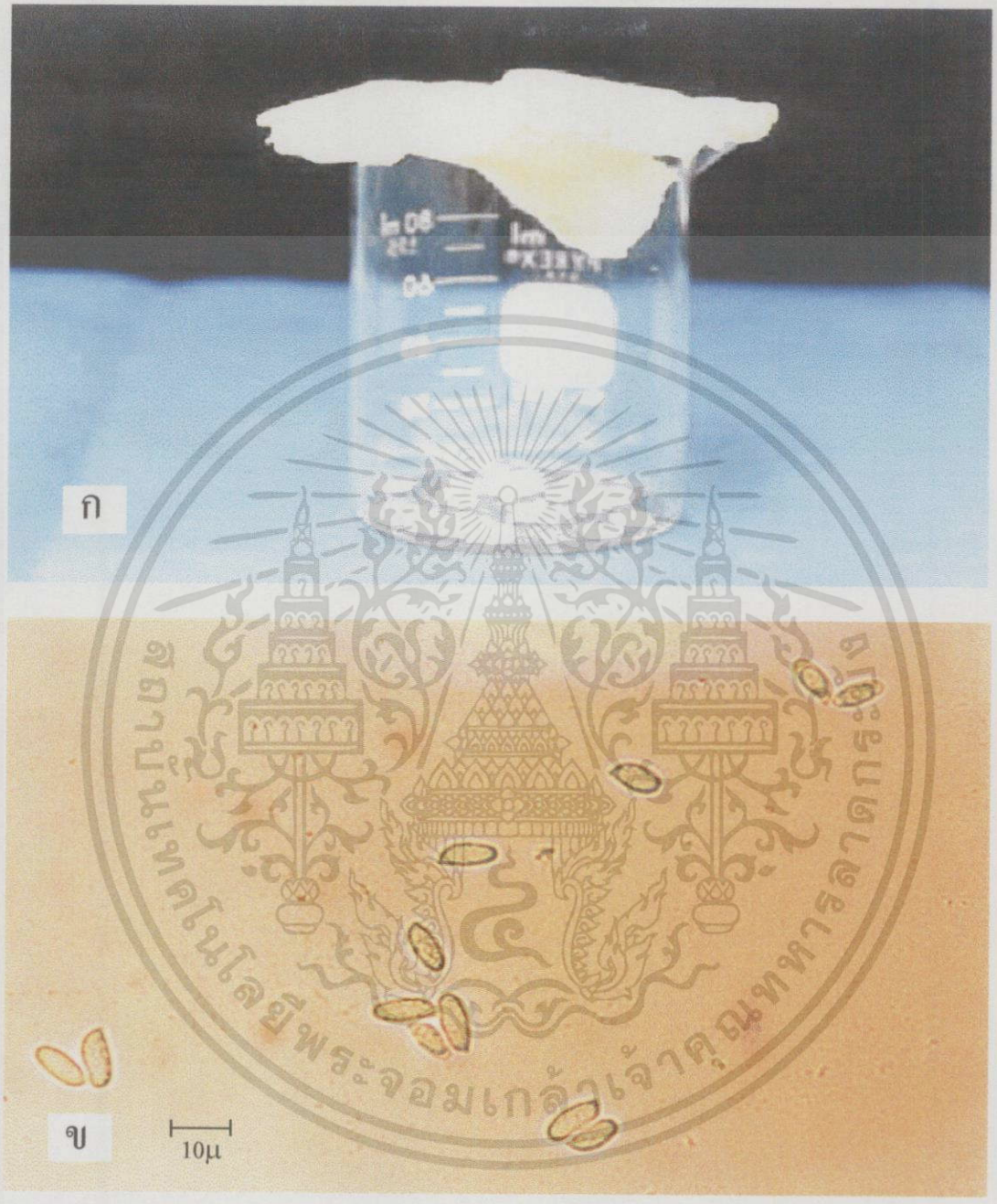


ภาพที่ 4.1 ก เห็ดนางรมบนก้อนขี้เลื่อย
ข ขนาดของเห็ดนางรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.2 แสดงแคลมป์คอนเนคชั่นของเส้นใยเห็ดนางรมจากสายพันธุ์ต้นแบบ (ที่ลูกศรชี้คือแคลมป์คอนเนคชั่น)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ก วิธีการเก็บสปอร์ของเห็ดนางรม
ข สปอร์ของเห็ดนางรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผนวก ง)โดยที่การเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พีดีเอมีการเจริญเติบโตมากที่สุดคือ 7.48 ซม. ในขณะที่การเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อมอลต์สกัด และวอเตอร์อาการ์ เท่ากับ 6.06 และ 5.93 ซม. ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของเส้นใยของเห็ดนางรมทีละคู่ โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) พบว่าการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อมอลต์สกัด และวอเตอร์อาการ์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 4.1) ส่วนลักษณะความหนาแน่นของเส้นใย พบว่าเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอและมอลต์สกัดมีความหนาแน่นของเส้นใยมาก ในขณะที่บนอาหารเลี้ยงเชื้อวอเตอร์อาการ์มีความหนาแน่นของเส้นใยน้อยที่สุด (ภาพที่ 4.4)

ตารางที่ 4.1 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี(ซม.) [1/]
พีดีเอ	7.48b [2/]
มอลต์สกัด	6.06a
วอเตอร์อาการ์	5.93a

หมายเหตุ 1/ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

2/ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.2.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย

จากการทดลองศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมโดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 5 ระดับคือ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดการเจริญเติบโตของเส้นใยในแนวราบ พบว่าระดับของอุณหภูมิในการบ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P_{0.05}$) (ภาคผนวก ง)โดยระดับอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิเหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใย เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ โดยมีการเจริญเติบโตของเส้นใยมากที่สุดคือ 7.35 ซม. ในขณะที่การเจริญเติบโตของเส้นใยที่ระดับอุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 35 องศาเซลเซียส เท่ากับ 4.30, 6.91, 2.22 และ 2.15 ซม.ตามลำดับ (ภาพที่4.5) เมื่อทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรมที่อุณหภูมิต่างกันทีละคู่โดยวิธี DMRT พบว่าการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอที่ระดับอุณหภูมิในการบ่ม 15 และ 35 องศาเซลเซียสไม่มีความแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเจริญของเส้นใยในการบ่มที่อุณหภูมิคู่อื่นๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พีดีเอ โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน เป็นเวลา 9 วัน

อุณหภูมิ(° ซ)	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี(ซม.) [1/]
15	2.20a [2/]
20	4.30b
25	6.91c
30	7.35d
35	2.15a

หมายเหตุ 1/ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

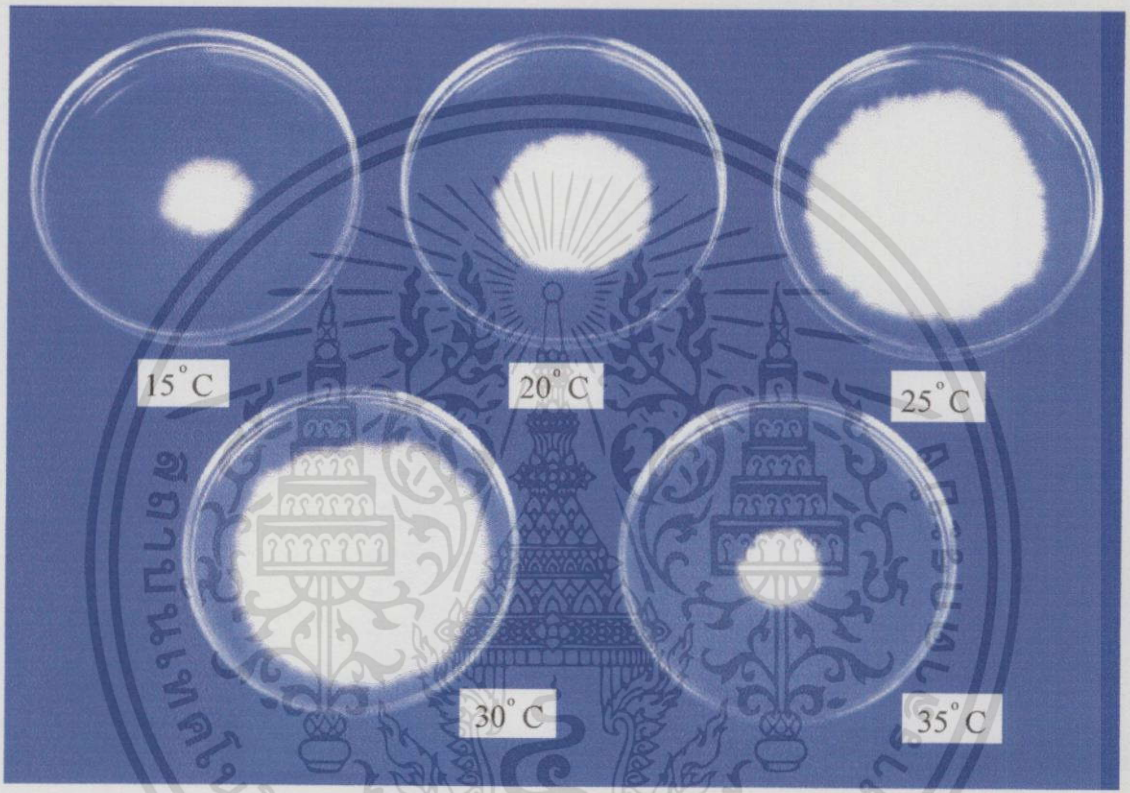
4.2.3 ผลการศึกษาระดับพีเอชของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใย

จากการทดลองหาระดับพีเอชของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมเมื่อเลี้ยงเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอซึ่งแปรผันระดับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 จากนั้นนำไปบ่มในอุณหภูมิอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วันแล้วทำการวัดการเจริญเติบโตของเส้นใยตามแนวราบ ผลปรากฏว่า ระดับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 5 ระดับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%($P_{0.05}$) (ภาคผนวก ง) โดยระดับพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใย คือระดับพีเอชที่ 5.0 ซึ่งมีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 7.86 ซม. ในขณะที่การเจริญเติบโตของเส้นใยที่ระดับพีเอช 4.5, 5.5, 6.0 และ 6.5 เท่ากับ 6.67, 7.54, 7.25 และ 6.91 ซม.ตามลำดับ (ภาพที่4.6) และเมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับพีเอชต่างกันทีละคู่โดยวิธี DMRT พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในทุกคู่ที่ทำการทดสอบ (ตารางที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

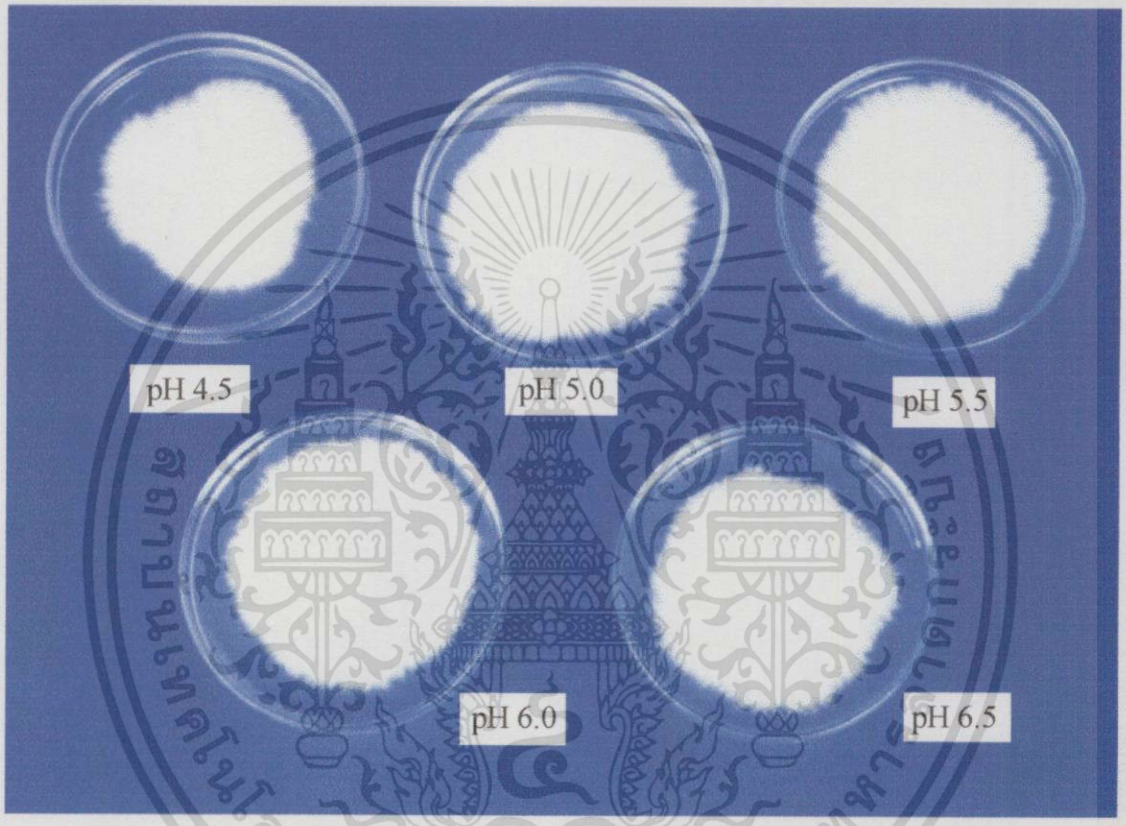
ภาพที่ 4.4 การเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 9 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิต่างกัน เป็นเวลา 9 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 การเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ ซึ่งมีระดับพีเอชแตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ ซึ่งมีระดับพีเอชที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

พีเอช	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี(ซม.) [1/]
4.5	6.67a [2/]
5.0	7.86b
5.5	7.54c
6.0	7.25d
6.5	6.91e

หมายเหตุ 1/ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

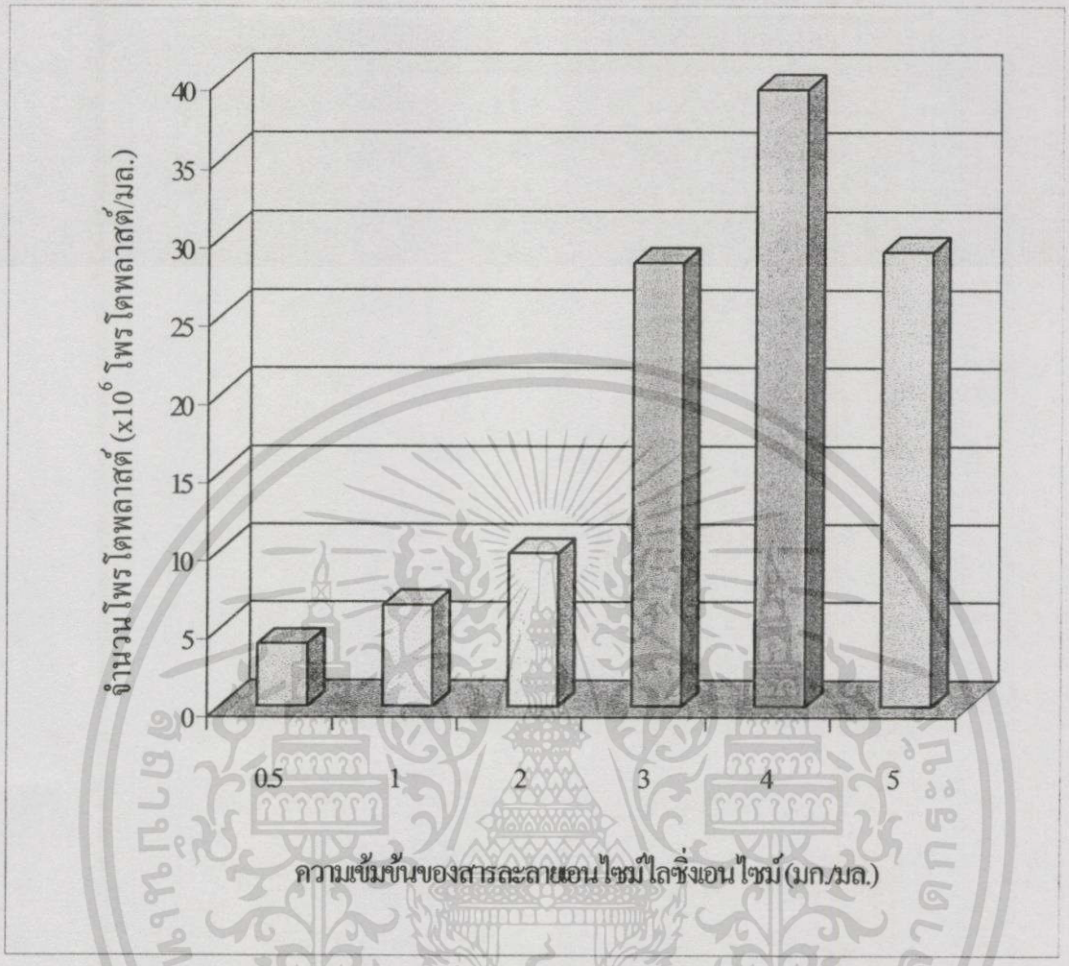
2/ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม

4.3.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

จากการหาระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ที่เหมาะสมหรับการแยกโพรโตพลาสต์ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้ไลซิ่งเอนไซม์ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ประกอบไปด้วยเอนไซม์ผสมหลายชนิดได้แก่ โปรตีเอส(proteinase), ไคติเนส(chitinase) และ เซลลูเลส(cellulase) โดยการทดลองปรากฏผลดังภาพที่ 4.7 เมื่อบ่มเส้นใยของเห็ดนางรมในสภาวะที่มีไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มก./มล. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ที่ระดับต่างกันมีผลทำให้จำนวนโพรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P_{0.05}$) (ภาคผนวก ง) โดยระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. เป็นระดับที่เหมาะสมที่สุดซึ่งมีจำนวนโพรโตพลาสต์สูงสุดเท่ากับ 3.94×10^7 โพรโตพลาสต์/มล. ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 มก./มล. มีจำนวนโพรโตพลาสต์เท่ากับ 4.01×10^6, 6.50×10^6 9.84×10^6, 2.84×10^7 และ 2.91×10^7 โพรโตพลาสต์ต่อมล.ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7) และเมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของจำนวนโพรโตพลาสต์ที่ระดับความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์แตกต่างกันทีละคู่โดยวิธี DMRT พบว่าระดับความเข้มข้นที่ 0.5 กับ 2.0 มก./มล. ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อใช้ระดับความเข้มข้น 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มก./มล. จำนวนโพรโตพลาสต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ (มก./มล.)	จำนวนโพรโตพลาสต์[1/] (โพรโตพลาสต์ต่อมล.)
0.5	4.01×10^6a[2/]
1.0	6.50×10^6a
2.0	9.84×10^6a
3.0	2.84×10^7b
4.0	3.94×10^7c
5.0	2.91×10^7b

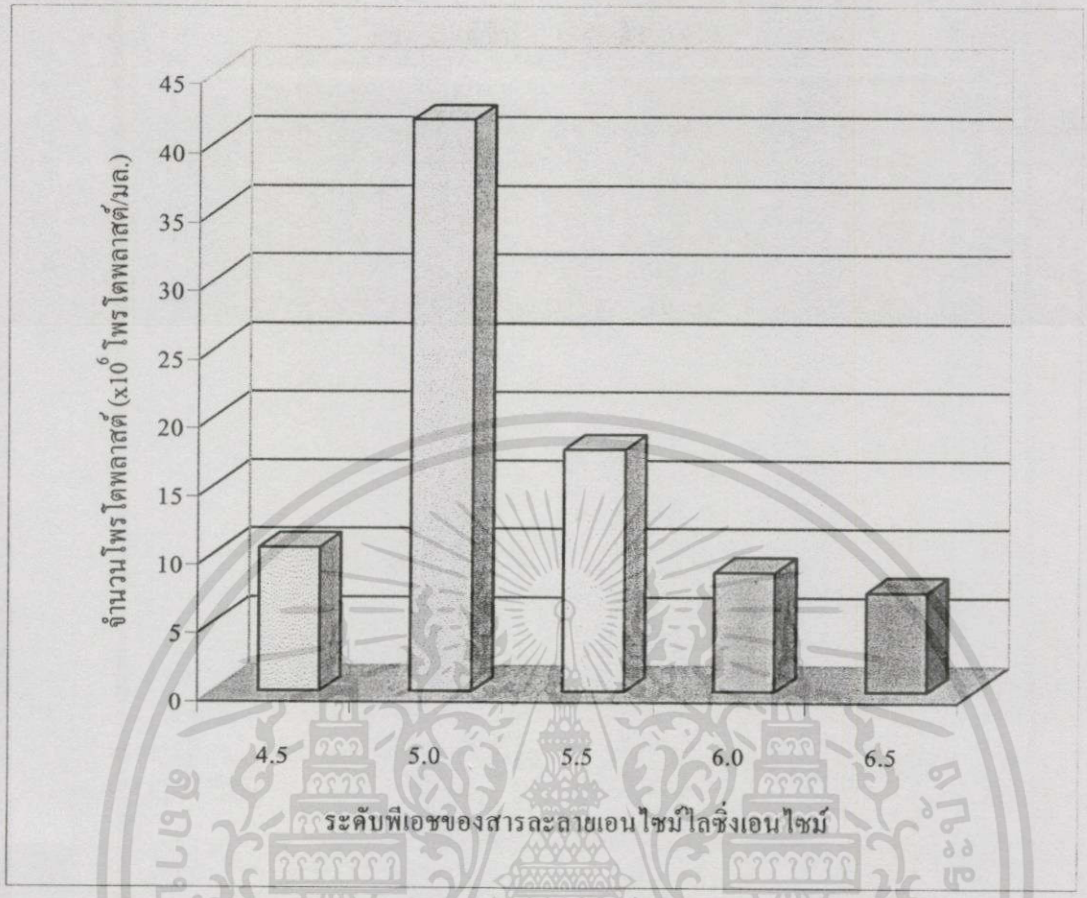
หมายเหตุ 1/ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

2/ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.3.2 ผลการศึกษาระดับพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์

ผลจากการศึกษาระดับพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ไลซิ่งเอนไซม์ในการแยกโพรโตพลาสต์ของเส้นใยเห็ดนางรม เมื่อบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์เท่ากับ 4 มก./มล. และแปรผันระดับพีเอชของสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ดังนี้คือ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ตามลำดับโดยบ่มเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองปรากฏดังภาพที่ 4.8 พบว่าระดับพีเอชของสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ที่แตกต่างกันมีผลทำให้จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P_{0.05}$) (ภาคผนวก ง) โดยที่ระดับพีเอช 5.0 มีความเหมาะสมที่สุด ซึ่งทำให้เกิดโพรโตพลาสต์ได้ถึง 4.17×10^7 โพรโตพลาสต์ต่อมล. ในขณะที่ระดับพีเอช 4.5 5.5 6.0 และ 6.5 มีจำนวนโพรโตพลาสต์เท่ากับ 1.05×10^7, 1.77×10^7, 8.72×10^6 และ 7.30×10^6 โพรโตพลาสต์ต่อมล.ตามลำดับ (ภาพที่ 4.8) เมื่อนำมาทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของจำนวนโพรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมที่บ่มในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ที่ระดับพีเอชต่างกันทีละคู่โดยวิธี DMRT พบว่าระดับพีเอช 4.5 กับ 6.0 และ 6.0 กับ 6.5 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. โดยมีระดับพีเอชที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. โดยมีระดับพีเอชที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

พีเอช	จำนวนโพรโตพลาสต์[1/] (โพรโตพลาสต์ต่อมล.)
4.5	1.05×10^{7} a[2/]
5.0	4.17×10^{7} c
5.5	1.77×10^{7} d
6.0	8.72×10^{6} ab
6.5	7.30×10^{6} b

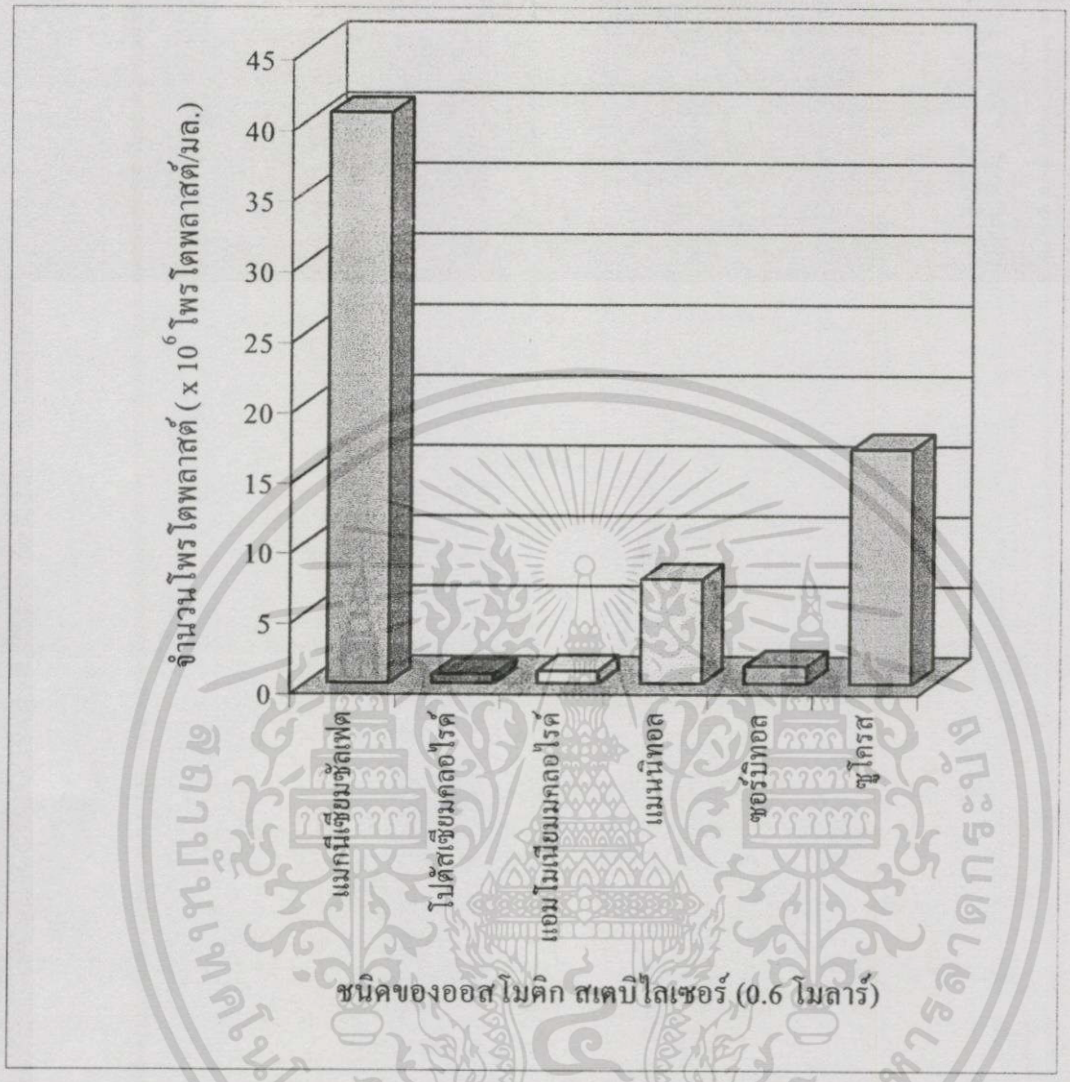
หมายเหตุ 1/ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.3.3 ผลการศึกษาชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์

ผลการศึกษาชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมในการแยกโพรโตพลาสต์ จากเส้นใยของเห็ดนางรม เมื่อบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 4 มก./มล. ระดับพีเอช 5.0 โดยมีชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่ใช้หลายชนิดได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต โปตัสเซียมคลอไรด์ แอมโมเนียมคลอไรด์ แมนนิทอล ซอร์บิทอล และซูโครส ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ผลการทดลองปรากฏดังภาพที่ 4.9 โดยพบว่าชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่แตกต่างกันแต่ละชนิดมีผลทำให้จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%($P_{0.05}$) (ภาคผนวก ง) โดยแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่เหมาะสมที่สุดซึ่งทำให้เกิดโพรโตพลาสต์จำนวน 4.05×10^{7} โพรโตพลาสต์/มล. ขณะที่การใช้ ซูโครส แมนนิทอล ซอร์บิทอล แอมโมเนียมคลอไรด์ และโปตัสเซียมคลอไรด์ เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ มีจำนวนโพรโตพลาสต์เท่ากับ 1.67×10^{7}, 7.41×10^{6}, 1.25×10^{6}, 9.00×10^{5} และ 6.50×10^{5} โพรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ (ภาพที่ 4.9) เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของจำนวนโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรมที่บ่มในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ที่มีชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ต่างกันทีละคู่โดยวิธี DMRT พบว่าซอร์บิทอล แอมโมเนียมคลอไรด์ และโปตัสเซียมคลอไรด์ เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอมไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. โดยมีชนิดของออสโมติค-สเตบิไลเซอร์ที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. โดยมีชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (0.6 โมลาร์)	จำนวนโพรโตพลาสต์[1/] (โพรโตพลาสต์ต่อมล.)
แมกนีเซียมซัลเฟต	4.05×10^{7} a[2/]
โปตัสเซียมคลอไรด์	6.50×10^{5} b
แอมโมเนียมคลอไรด์	9.00×10^{5} b
แมนนิทอล	7.41×10^{6} c
ซอร์บิทอล	1.25×10^{6} b
ซูโครส	1.67×10^{7} d

หมายเหตุ 1/ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.3.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์

ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมในการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรม เมื่อบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 4 มก./มล. ระดับพีเอช 5.0 โดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟตเป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้คือ 0.3, 0.6, 0.9 และ 1.2 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.10 โดยพบว่าระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของแมกนีเซียมซัลเฟต มีผลทำให้จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%($P_{0.05}$) (ภาคผนวก ง) โดยแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งทำให้เกิดจำนวนโพรโตพลาสต์ได้ถึง 4.89×10^{7} โพรโตพลาสต์/มล. ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 1.2 โมล มีจำนวนโพรโตพลาสต์ 2.00×10^{5}, 4.14×10^{7} และ 3.12×10^{7} โพรโตพลาสต์/มล.ตามลำดับ (ภาพที่ 4.10) เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของจำนวนโพรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมที่บ่มในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันทีละคู่โดยวิธี DMRT พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.10 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. ระดับพีเอช 5 โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. ระดับพีเอช 5 โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (แมกนีเซียมซัลเฟต)(โมลาร์)	จำนวนโพรโตพลาสต์[1/] (โพรโตพลาสต์ต่อมล.)
0.3	2.00×10^{5} a[2/]
0.6	4.14×10^{7} b
0.9	4.89×10^{7} c
1.2	3.12×10^{7} d

หมายเหตุ 1/ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

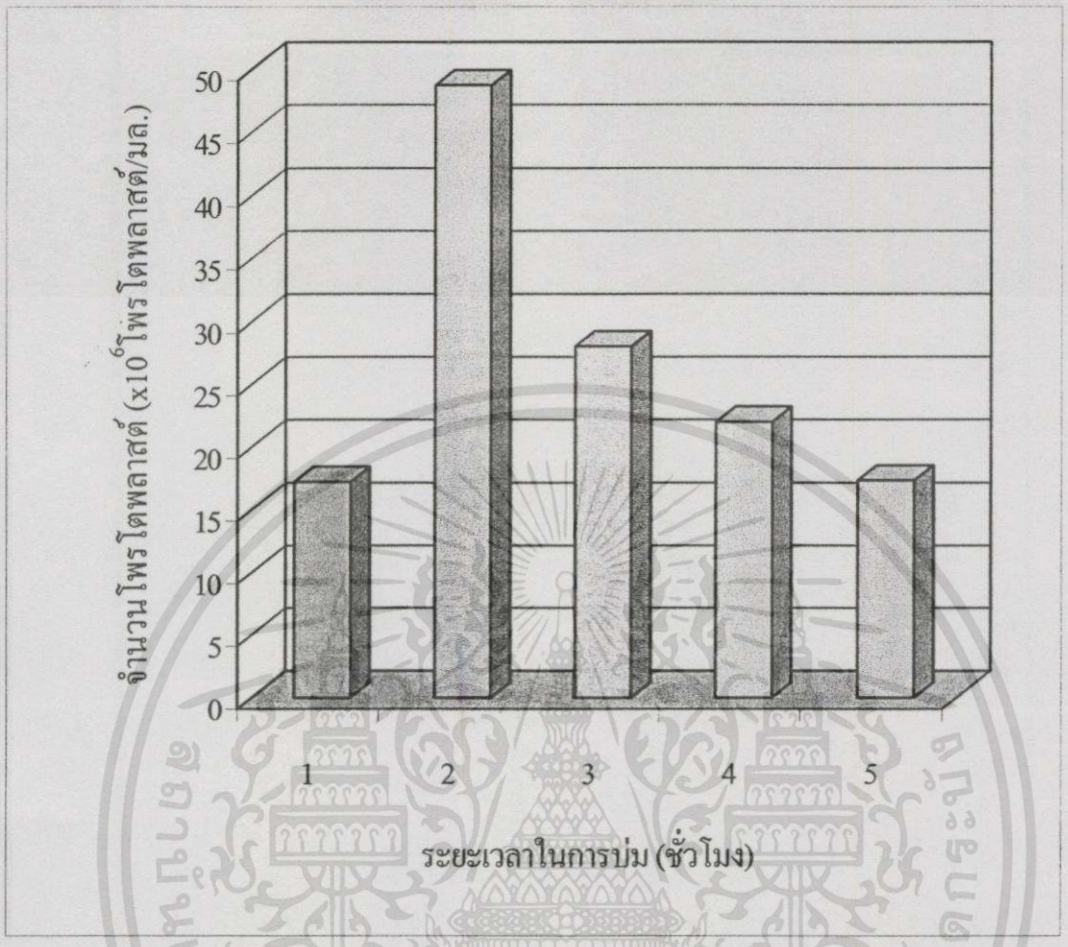
2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.3.5 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่ม

ผลการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่มเส้นใยให้ได้จำนวนโพรโตพลาสต์มากที่สุด โดยเมื่อบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ที่มีระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. พีเอช 5.0 โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ผลการทดลองปรากฏดังภาพที่ 4.11 โดยพบว่า เมื่อบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ที่ระยะเวลาต่างกัน มีผลให้จำนวนโพรโตพลาสต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%($P_{0.05}$) (ภาคผนวก ง) โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ในชั่วโมงที่ 2 เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด โดยให้จำนวนโพรโตพลาสต์สูงสุดเท่ากับ 4.87×10^{7} โพรโตพลาสต์/มล. ในขณะที่การบ่มในชั่วโมงที่ 1, 3, 4 และ 5 ได้จำนวนโพรโตพลาสต์ 1.72×10^{7}, 2.80×10^{7}, 2.20×10^{7} และ 1.73×10^{7} โพรโตพลาสต์/มล.ตามลำดับ เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของจำนวนโพรโตพลาสต์ในการบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ที่ระยะเวลาต่างกันทีละคู่โดยวิธี DMRT พบว่าชั่วโมงที่ 1 กับชั่วโมงที่ 5 ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.8)

สำหรับรูปร่างของโพรโตพลาสต์ที่ได้ พบว่าโพรโตพลาสต์ส่วนใหญ่จะมีรูปร่างกลมขนาดเล็กบ้าง ใหญ่บ้าง ดังแสดงในภาพที่ 4.14 โดยโพรโตพลาสต์มีขนาดประมาณ 3.0 - 4.8 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอมไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. ระดับพีเอช 5 โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต 0.9 โมลาร์ เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 จำนวนโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมที่มีอายุ 3 วัน เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มก./มล. ระดับพีเอช 5 โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต 0.9 โมลาร์เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาต่างกัน

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	จำนวนโพรโตพลาสต์[1/] (โพรโตพลาสต์ต่อมล.)
1	1.72×10^{7}a[2/]
2	4.87×10^{7}b
3	2.80×10^{7}c
4	2.20×10^{7}d
5	1.73×10^{7}a

หมายเหตุ 1/ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

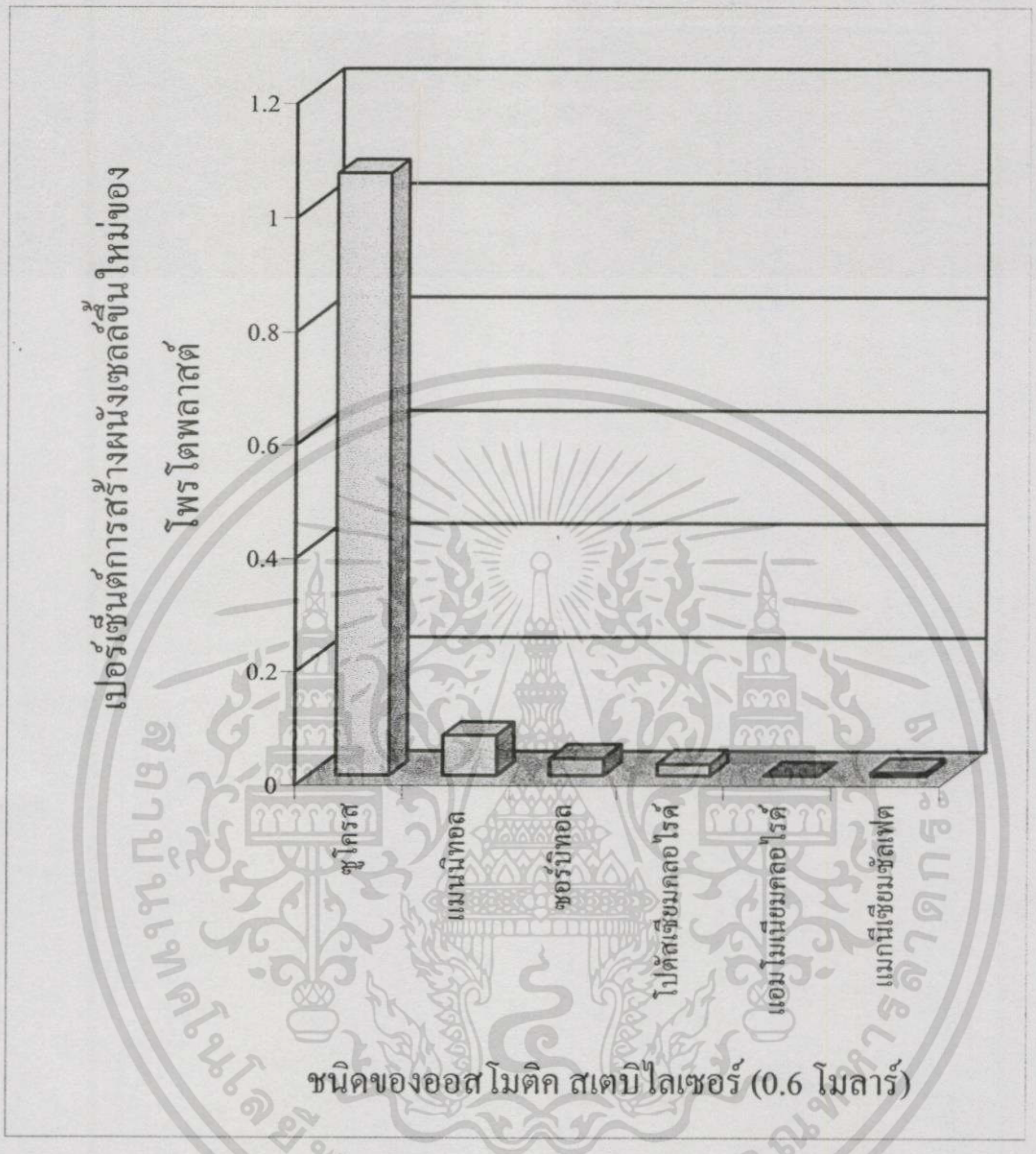
2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.4 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์

4.4.1 ชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์

จากการศึกษาชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่มีความเหมาะสมสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรม เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ความเข้มข้น 4 มก./มล. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำโพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยของเห็ดนางรม มาทำการเพาะลงบนอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ ตามวิธีในข้อ 3.2.2.5(1) โดยมีชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่ใช้ศึกษาดังนี้ คือ ซูโครส แมนนิทอล ซอร์บิทอล โปตัสเซียมคลอไรด์ แอมโมเนียมคลอไรด์ และ แมกนีเซียมซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ เป็นองค์ประกอบในอาหาร ผลการทดลองปรากฏดังภาพที่ 4.12 โดยพบว่าชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่แตกต่างกันแต่ละชนิด มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P_{0.05}$) (ภาคผนวก ง) โดยอาหารที่ใช้ซูโครสเป็นองค์ประกอบ มีผลต่อการชักนำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด 1.06% รองลงมาคือ แมนนิทอล ซอร์บิทอล โปตัสเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟต โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่เป็น 0.07, 0.03, 0.02 และ 0.006 ตามลำดับ ส่วนอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ และอาหารที่ไม่มีออสโมติค สเตบิไลเซอร์ เป็นองค์ประกอบไม่มีผลทำให้-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรม โดยมีชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่แตกต่างกันแต่ละชนิดเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 ° ซ เป็นเวลา 9 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์บนอาหารที่มีออสโมติค สเตบิไลเซอร์ต่างกันทีละคู่โดยวิธี DMRT พบว่าซอร์บิทอล กับโปตัสเซียมคลอไรด์ และโปตัสเซียมคลอไรด์ แอมโมเนียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟต ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ จากเส้นใยของเห็ดนางรมบนอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์โดยมีออสโมติค สเตบิไลเซอร์ต่างชนิดกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

ชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (0.6 โมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์
ซูโครส	1.06a[2/]
แมนนิทอล	0.07b
ซอร์บิทอล	0.03c
โปตัสเซียมคลอไรด์	0.02cd
แอมโมเนียมคลอไรด์	0.00d
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.006d

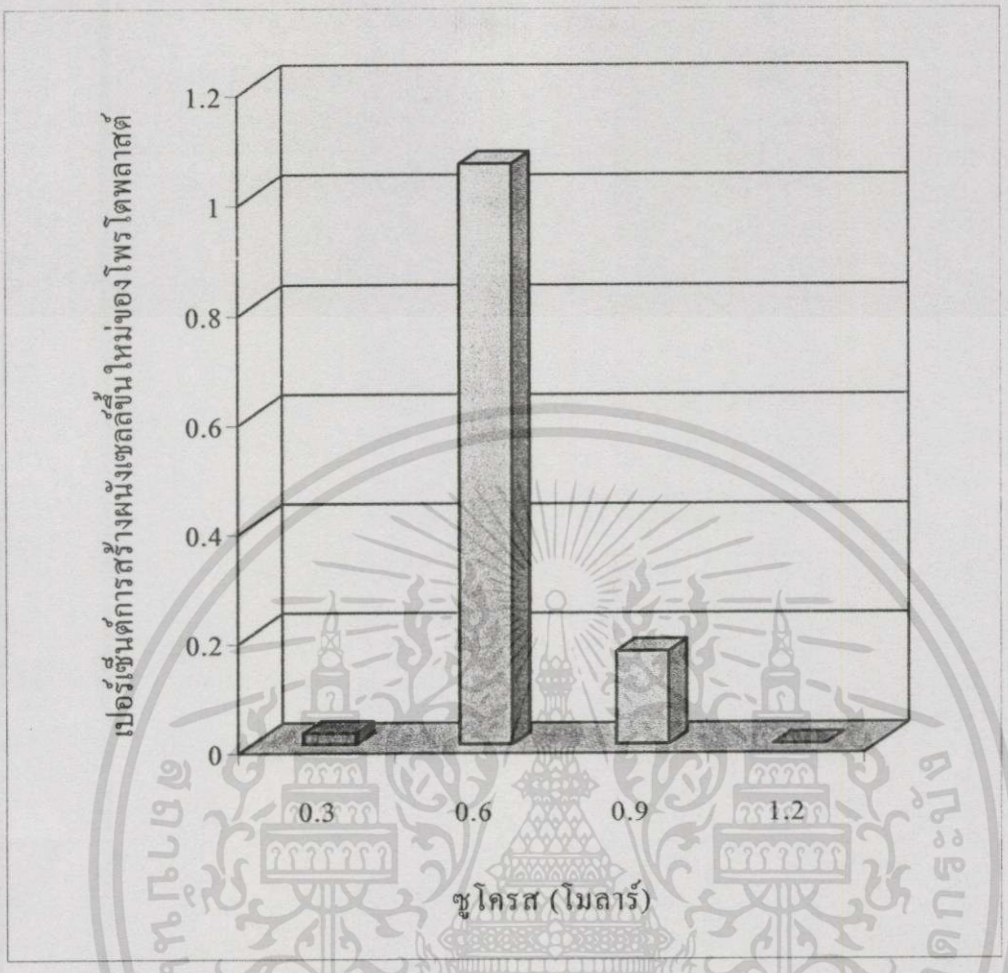
หมายเหตุ 1/ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

2/ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.4.2 ความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์

ผลการศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่มีความเหมาะสมสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรม เมื่อบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ความเข้มข้น 4 มก./มล. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำโพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยของเห็ดนางรม มาทำการเพาะลงบนอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ ตามวิธีในข้อ 3.2.2.5(1) โดยมีชนิดของ ออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ในการศึกษาครั้งนี้คือ ซูโครส โดยมีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.3, 0.6, 0.9 และ 1.2 โมลาร์ ผลการทดลองปรากฏดังภาพที่ 4.13 โดยพบว่าความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่แตกต่างกันมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P_{0.05}$) (ภาคผนวก ง) โดยอาหารที่มีซูโครส ที่ระดับความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ มีผลทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ได้ดีที่สุด 1.06% ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 0.3 และ0.9 โมลาร์ ทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรม โดยมีซูโครสเป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันแต่ละชนิดเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 ° ซ เป็นเวลา 9 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์เป็น 0.02 และ 0.17 % ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ พบว่าไม่มีผลทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์บนอาหารที่มีออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันโดยวิธี DMRT พบว่าระดับความเข้มข้น 0.3 0.9 และ 1.2 ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ จากเส้นใยของเห็ดนางรมบนอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์โดยมีซูโครส เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

ความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (ซูโครส)(โมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์[1/]
0.3	0.02a[2/]
0.6	1.06b
0.9	0.17a
1.2	0.00a

หมายเหตุ 1/ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

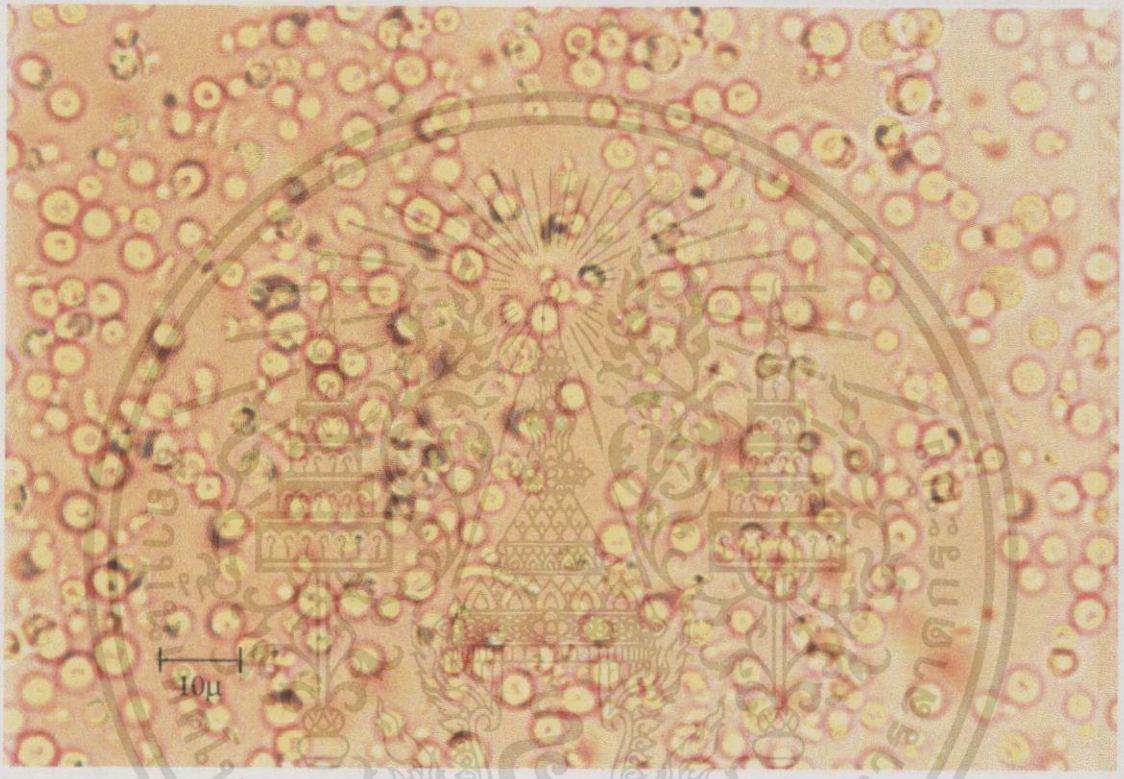
2/ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.5 ผลการศึกษาการหาความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรมเพื่อใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ในการคัดเลือกลูกผสม

4.5.1 ความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราไนสเตติน (nystitin)

จากการศึกษาความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา เพื่อหาความแตกต่างของความต้านทานระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม เพื่อใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ในการคัดเลือกลูกผสมที่ได้ภายหลังจากการรวมโพรโตพลาสต์ ทำได้โดยเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดหอม และเห็ดนางรมลงบนอาหารซึ่งผสมสารฆ่าเชื้อรานิสเตติน ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 10, 50, 100 และ 500 ยูนิต/มล. ผลการทดลองปรากฏดังตารางที่ 4.11 ซึ่งพบว่าเชื้อเห็ดหอมและเห็ดนางรมมีความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรานิสเตติน ที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยเห็ดนางรมสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรานิสเตติน ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 100 และ 500 ยูนิต/มล. โดยมีการเจริญเติบโตเป็น 1.90, 1.70, 1.52 และ1.41 ซม.ตามลำดับ(ภาพที่ 4.15) ในขณะที่เห็ดหอมไม่สามารถเจริญได้ในระดับความเข้มข้นทั้งหมดนี้ (ภาพที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.14 ลักษณะโพรโตพลาสต์ของเส้นใยเห็ดนางรมสายพันธุ์ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.16) และ เมื่อลดระดับความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อรานิสเตตินลงเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 ยู-นิต/มล. ผลปรากฏว่าเห็ดหอมไม่สามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราชนิดนี้ โดยไม่สามารถเจริญได้ในระดับความเข้มข้นที่ลดลงดังกล่าว ขณะที่เห็ดนางรมสามารถต้านทานได้โดยมีการเจริญเป็น 3.00, 2.54, 2.32, 2.00 และ 1.87 ซม.ตามลำดับ(ตารางที่ 4.12)

4.5.2 ความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราไอโอดีน (iodine)

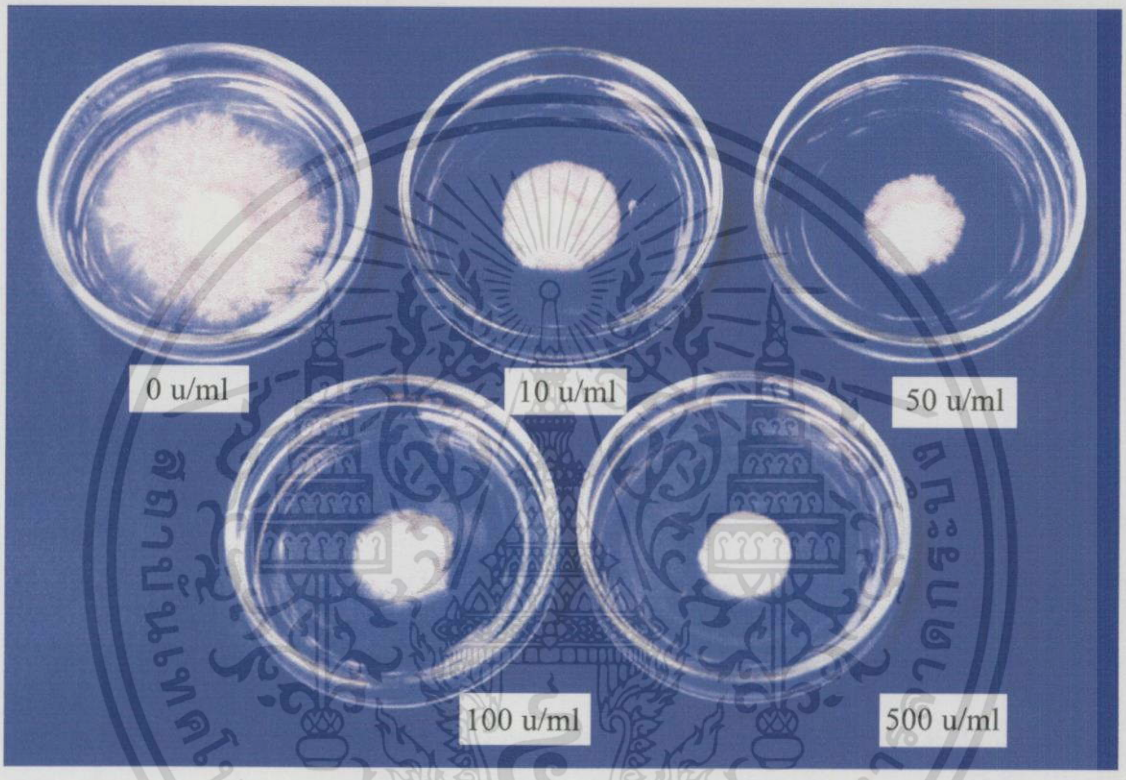
ผลการศึกษาความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราไอโอดีน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดลงบนอาหารมินิมอลที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไอโอดีนที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.001, 0.003, 0.004 และ 0.005 % ผลปรากฏดังตารางที่ 4.13 ซึ่งพบว่าเชื้อเห็ดหอม และเห็ดนางรม มีความต้านทานต่อสารเคมีฆ่าเชื้อราไอโอดีนแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยเห็ดหอมสามารถต้านทานต่อสารเคมีฆ่าเชื้อราไอโอดีนที่ระดับความเข้มข้น 0.001, 0.003, 0.005 และ 0.007 % โดยมีการเจริญเติบโตเป็น 2.12, 1.70, 1.30 และ 1.20 ซม.ตามลำดับ(ภาพที่ 4.18) ในขณะที่เห็ดนางรมสามารถต้านทานต่อสารเคมีฆ่าเชื้อราไอโอดีนที่ระดับความเข้มข้น 0.001% โดยมีการเจริญเติบโตเป็น 1.64 ซม.(ภาพที่ 4.17) และเมื่อลดความเข้มข้นของไอโอดีนลงโดยให้มีระดับความเข้มข้นที่ใช้ศึกษาเป็น 0.001, 0.002, 0.003, 0.004 และ 0.005 % พบว่าเห็ดนางรมสามารถต้านเชื้อราได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 และ 0.002% เท่านั้น โดยมีการเจริญเติบโตเป็น 1.64 และ 0.78 ซม.ตามลำดับ ขณะที่เห็ดหอมสามารถต้านทานได้ โดยมีการเจริญเติบโตเป็น 2.12, 1.84, 1.70, 1.56 และ 1.30 ซม.ตามลำดับ (ตารางที่ 4.14)

4.6 ผลการรวมโพรโตพลาสต์

เมื่อทำการรวมโพรโตพลาสต์ของเชื้อเห็ดหอมและเห็ดนางรมโดยใช้จำนวนโพรโตพลาสต์เชื้อละประมาณ 10^6 โพรโตพลาสต์/มล. ซึ่งมีโพลีเอทธิลีน ไกลคอล น้ำหนักโมเลกุล 6000 ความเข้มข้น 40% เป็นสารฟิวโซเจนท์ (fusogent) ในการหลอมรวมครั้งนี้ (ภาพที่ 4.19)

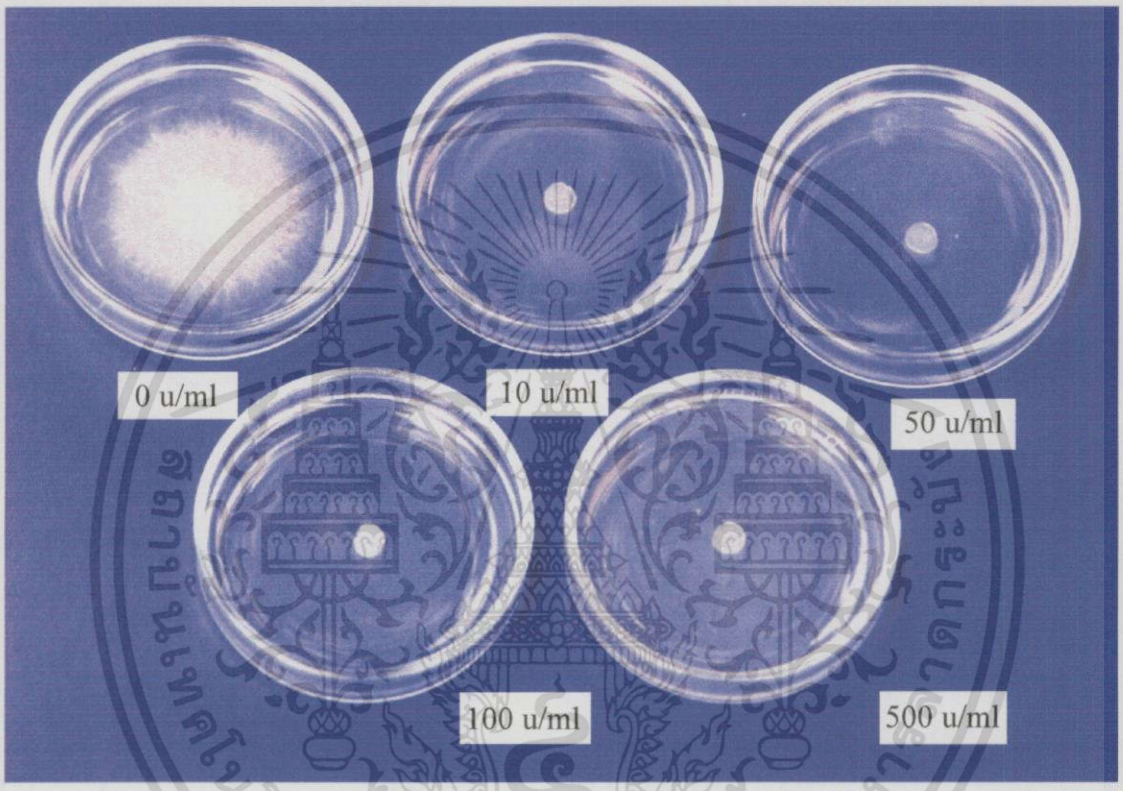
หลังจากรวมโพรโตพลาสต์แล้ว นำโพรโตพลาสต์ทั้งหมดที่ได้ไปคืนกลับให้เป็นเซลล์ปกติในอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ (ภาคผนวก ก ข้อ 10) ตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ นับจำนวน โคโลนีที่เกิดขึ้น และคำนวณความถี่ของการคืนกลับของเซลล์ พบว่าการรวมโพรโตพลาสต์ครั้งนี้ มีความถี่ในการคืนกลับของเซลล์โพรโตพลาสต์เป็น 0.00194 โดยมีระยะเวลาในการคืนกลับของเซลล์ เป็นเวลา 9 - 12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



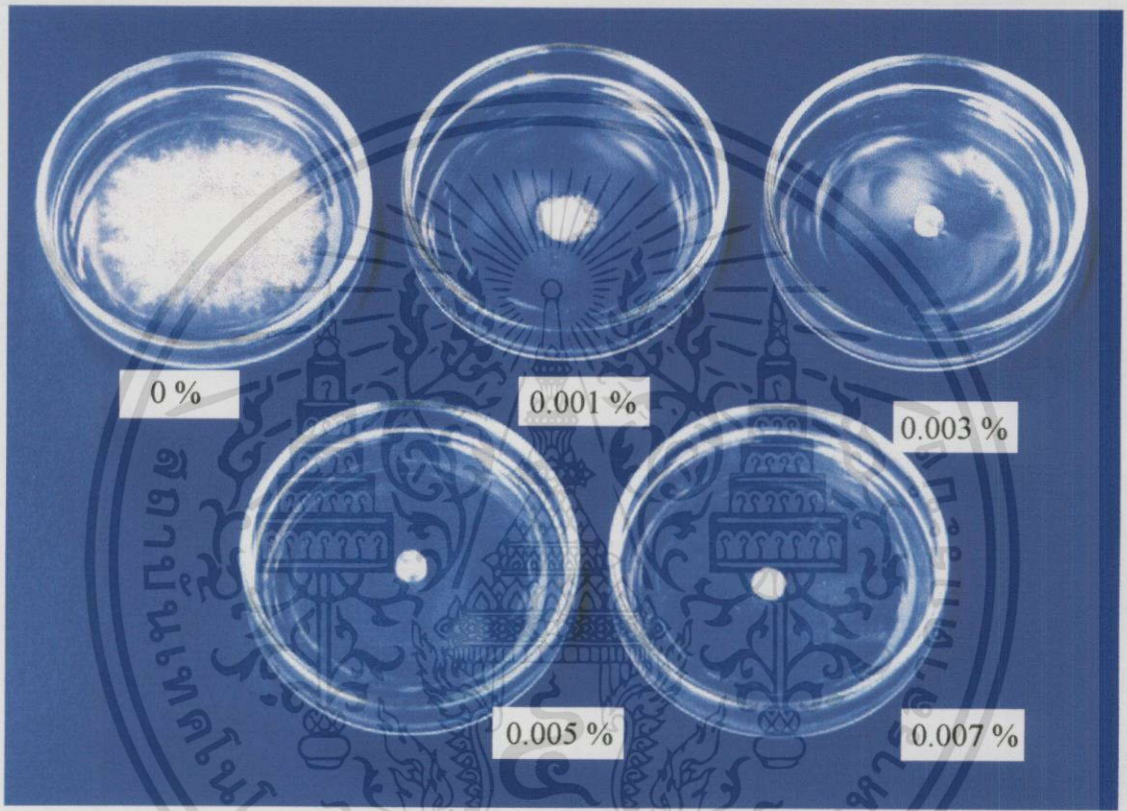
ภาพที่ 4.15 การเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไนสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ยูนิต/มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



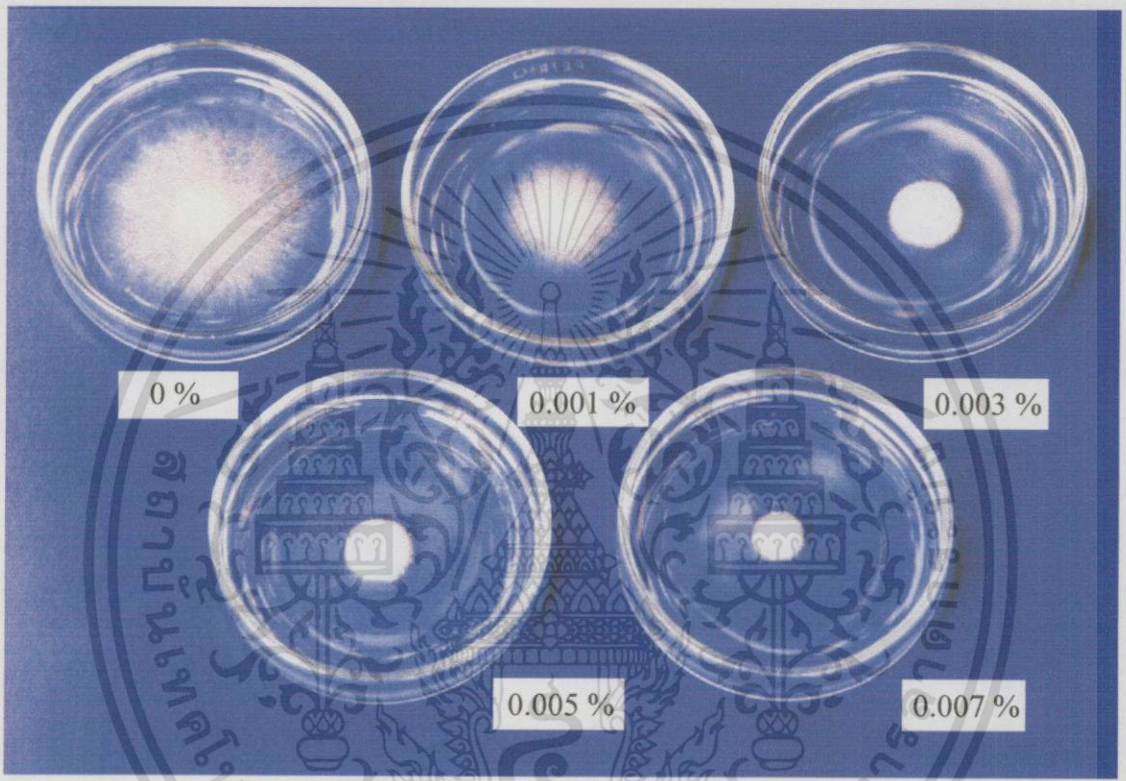
ภาพที่ 4.16 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไนสเตตินที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 ยูนิต/มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



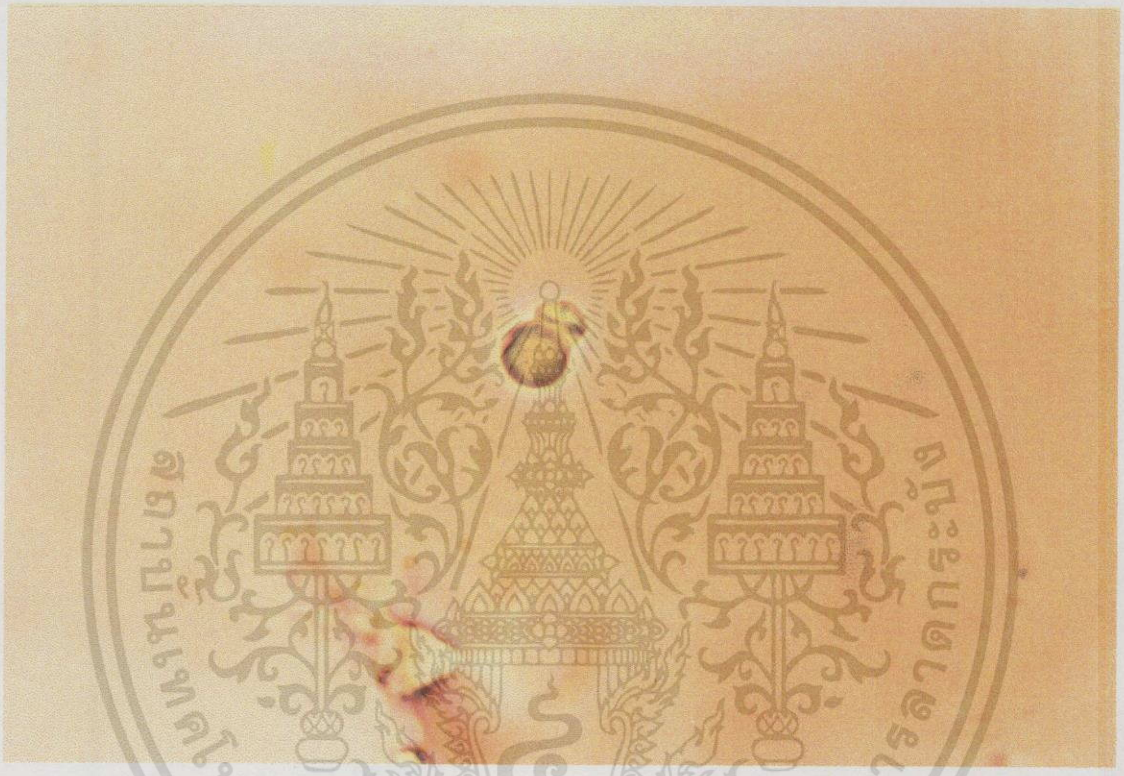
ภาพที่ 4.17 การเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไอโอดีนที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.003, 0.005 และ 0.007 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไอโอดีนที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.001, 0.003, 0.005 และ 0.007 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.19 การรวมโพรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเห็ดหอมและเห็ดนางรม(ซม.) บนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อรานิสเตติน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ยูนิต/มล.)

สายพันธุ์ (โมโนคารีออน)	ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อรานิสเตติน(ยูนิต/มล.)				
	0	10	50	100	500
นางรม(ซม.)	3.20	2.54	1.76	1.52	1.41
หอม(ซม.)	3.24	-	-	-	-

ตารางที่ 4.12 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเห็ดหอมและเห็ดนางรม(ซม.) บนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อรานิสเตติน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ยูนิต/มล.)

สายพันธุ์ (โมโนคารีออน)	ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อรานิสเตติน(ยูนิต/มล.)					
	0	5	10	15	20	25
นางรม(ซม.)	3.20	3.00	2.54	2.32	2.00	1.87
หอม(ซม.)	3.24	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.13 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเห็ดหอมและเห็ดนางรม(ซม.) บนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไอโอดีน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (%)

สายพันธุ์ (โมโนคารีออน)	ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อราไอโอดีน (%)				
	0	0.001	0.003	0.005	0.007
นางรม(ซม.)	3.20	1.64	-	-	-
หอม(ซม.)	3.24	2.12	1.70	1.30	1.20

ตารางที่ 4.14 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเห็ดหอมและเห็ดนางรม(ซม.) บนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อราที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (%)

สายพันธุ์ (โมโนคารีออน)	ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อราไอโอดีน (%)					
	0	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005
นางรม(ซม.)	3.20	1.64	0.78	-	-	-
หอม(ซม.)	3.24	2.12	1.84	1.70	1.56	1.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลการคัดเลือกลูกผสม

ทำการเก็บรวบรวมโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นบนอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่โดยวิธีการปลอดเชื้อมาได้ทั้งหมดจำนวน 475 โคโลนี ทำการตรวจสอบความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา การหาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด การวัดขนาดเส้นใยและเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและแม่ (เห็ดหอมและเห็ดนางรม) และตรวจสอบการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น

4.7.1 ความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา

จากการทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อรานิสเตติน และไอโอดีน โดยการทดสอบจะดูจากเครื่องบ่งชี้ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.5 (ซึ่งเส้นใยเห็ดหอมสามารถเจริญบนอาหารที่ผสมไอโอดีนได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 ถึง 0.005 % และไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อรานิสเตติน ขณะที่เส้นใยเห็ดนางรมสามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมไอโอดีนได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 ถึง 0.002 % เท่านั้น และสามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อรานิสเตติน) (ตารางที่ 4.11 ถึง 4.14) ดังนั้นลูกผสมที่ได้ควรมีคุณสมบัติดังนี้คือ สามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อราทั้งสองชนิด โดยสามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมไอโอดีนได้ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.003 % ขึ้นไป และสามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมนิสเตติน ได้ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ยูนิต/มล.ขึ้นไป ซึ่งผลการทดสอบปรากฏดังตารางที่ 4.15 ซึ่งพบว่ามีเชื้อลูกผสมที่มีคุณสมบัติตามต้องการ คือสามารถต้านทานสารฆ่าเชื้อราไอโอดีนได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 ถึง 0.005 % และต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรานิสเตตินได้ที่ระดับความเข้มข้น 5 ถึง 25 ยูนิต/มล. มีจำนวนทั้งสิ้น 2 สายพันธุ์ คือ F42 และ F266 และมีสายพันธุ์ที่สามารถต้านทานสารฆ่าเชื้อราไอโอดีนได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 ถึง 0.004 % และต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรานิสเตติน ได้ที่ระดับความเข้มข้น 5 ถึง 25 ยูนิต/มล. จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ F220, F249 และ F342

4.7.2 การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด

จากการทดลองสกัดและหาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด โดยวิธีสกัดดีเอ็นเอได้จาก Schneider (1945,1946) และวิธีหาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดจาก Burton (1956) ให้ผลดังตารางที่ 4.16 โดยพบว่าปริมาณดีเอ็นเอนของสายพันธุ์ F42, F220, F249, F266 และ F342 มีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าสายพันธุ์พ่อและแม่ (เห็ดหอมและเห็ดนางรม) โดยมีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 0.574, 0.524, 0.540, 0.665 และ 0.560 มก./มล.ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์พ่อและแม่มีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 0.403 และ 0.358 มก./มล. เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีทางสถิติ พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ลูกผสม F42, F220, F249, F266 และ F342 กับ สายพันธุ์พ่อและแม่ (เห็ดหอมและเห็ดนางรม) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P_{0.05}$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7.3 ขนาดของเส้นใย

นำโคโลนีที่ได้จากการทดสอบในข้อ 4.7.2 มาวัดขนาดของเส้นใย และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและแม่ โดยทำการวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลปรากฏดังตารางที่ 4.17 พบว่าเส้นใยสายพันธุ์ที่ F42, F220, F249, F266 และ F342 มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อและแม่ โดยเส้นใยมีขนาดเป็น 2.76, 2.40, 2.52, 3.00 และ 2.60 ไมโครเมตร ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์พ่อและแม่ (เห็ดหอมและเห็ดนางรม)มีเส้นใยขนาด 1.60 และ 1.44 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นใยโดยวิธีทางสถิติ พบว่าเส้นใยสายพันธุ์ F42, F220, F266, F249 และ F342 กับสายพันธุ์พ่อและแม่ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P_{0.05}$)

4.7.4 การเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น

นำโคโลนีที่เก็บได้ภายหลังจากการรวมโพรโตพลาสต์ ทั้งหมดจำนวน 475 โคโลนีมาทำการตรวจสอบการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลปรากฏว่าไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่นในทุกทุกโคโลนีที่ทำการทดสอบ

จากการคัดเลือกลูกผสม พบว่าสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติ เป็นลูกผสมมีจำนวนทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ที่ F42, F220, F249, F266 และ F342 โดยมีความสามารถเจริญบนอาหารที่ผสมสารฆ่าเชื้อราไอโอดีน และไนสเตติน ดังตารางที่ 4.15 และการวัดขนาดของเส้นใยสายพันธุ์ลูกผสมให้ผลการทดสอบซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อและแม่ (เห็ดหอมและเห็ดนางรม) รวมทั้งผลการวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดเทียบกับสายพันธุ์พ่อและแม่ โดยลูกผสมให้ผลปริมาณดีเอ็นเอที่สูงกว่า (ตารางที่ 4.16 และ 4.17) ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสามารถคิดความถี่ของการเกิดสายพันธุ์ลูกผสมจากสายพันธุ์ทั้งหมดที่นำมาทดสอบดังนี้

$$\text{ความถี่ของการเกิดสายพันธุ์ลูกผสม} = \frac{\text{จำนวนสายพันธุ์ลูกผสม}}{\text{จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมด}}$$

$$\text{เมื่อแทนค่าจะได้} = \frac{5}{475}$$

$$= 0.0105 \text{ หรือ } 1.05\%$$

เมื่อแทนค่าใส่สูตรจะพบว่า ความถี่ของการเกิดสายพันธุ์ลูกผสมมีค่าเท่ากับ 0.0105 หรือ 1.05%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา

สายพันธุ์	ความเข้มข้นไอโอดีน (%)					ความเข้มข้นไนสเตติน (ยูนิต/มล.)				
	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	5	10	15	20	25
เห็ดหอม	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
เห็ดนางรม	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
42 , 266	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
220, 249, 342	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
1-17,19, 21-38 ,40-41, 43-44,53,55 -57,61,63,65-66,69-72, 76, 81-85,89, 91,95,99, 111-113,115-118, 120-121, 142-145,148-151,155,157-158,161-162, 164,166, 168-169,171,174-175, 177, 181-182,186-189,191,193-195, 198-199,203,205,208-209,213,215-219,221-224,226-229,231,233, 235-237,240,241-244,250, 252,254, 258-260,262,264,267-269, 270,272,275, 277-278,280, 288,291,295-299,303-304,336-341,344,353,357-360,362-366,369,371-375,377,380-381,384-385,388-390,392-393,398,401-405, 409,413,429-431,441,443-444,447-449,454-458,460-461,463-465,467-468,472-475	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
(Total 225 สายพันธุ์มีลักษณะเหมือนเห็ดนางรม)										
18,20,39,45-52,54,58-60,62,64,67-68,73-75,77-80,86-88,90,92-94,96-98,100-110,114,119,122-141,146-147,152-154,156,159-160,163,165, 167,170,172-173,176,178-180,183-185,190,192,196-197,200-202,204, 206-207,210-212,214,225,230,232, 234-239,245-248,251,253,255-257, 261,263,265,271,273-274,276,279, 274,276,279,281,283-289,292-294, 300-302,305-225,343,345,352,354-356,361,367,-398,370,376,378-379, 382-383,386-387,391,394-397,399-400,406-408,410-412,414*428,432-440,442,445-446,450-453,459,462, 466,469-471	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
(Total 245 สายพันธุ์มีลักษณะเหมือนเห็ดหอม)										

หมายเหตุ - เครื่องหมาย + หมายถึง สามารถเจริญได้, เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่สามารถเจริญ

- เฉพต่างๆ ภายใต้คอลัมภ์"สายพันธุ์" หมายถึง สายพันธุ์ลูกผสมต่างๆ ที่ได้ผ่านการทดสอบลักษณะรวมตามขั้นตอนของการรวมโพรโตพลาสต์มาแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 แสดงปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด (มก./มล.)

สายพันธุ์	ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด (มก./มล.) [1/]
หอม	0.403a [2/]
นางรม	0.358a
F 42	0.574b
F 220	0.524b
F 249	0.540b
F 266	0.665b
F 342	0.560b

หมายเหตุ 1/ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

2/ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4.17 แสดงขนาดของเส้นใย (ไมโครเมตร)

สายพันธุ์	ขนาดของเส้นใย (ไมโครเมตร) [1/]
หอม	1.60a [2/]
นางรม	1.44a
F 42	2.76b
F 220	2.40b
F 249	2.52b
F 266	3.00b
F 342	2.60b

หมายเหตุ 1/ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง

2/ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 การตรวจสอบการคัดเลือกลูกผสมโดยลักษณะความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา ปริมาณดีเอ็นเอ ขนาดของเส้นใย และการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น

สายพันธุ์	ความต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา										ปริมาณดี-เอ็นเอ (มก./มล.)	ขนาดของเส้นใย (µ)	แคลมป์คอน-เนคชั่น
	ความเข้มข้นของไอโอดีน (%)					ความเข้มข้นของไนสเตติน (ยูนิต/มล.)							
	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	5	10	15	20	25			
เห็ดนางรม	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	0.358	1.44	-
เห็ดหอม	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	0.403	1.60	-
F42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.574	2.76	-
F266	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.665	3.00	-
F220	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	0.524	2.40	-
F249	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	0.540	2.52	-
F342	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	0.560	2.60	-

หมายเหตุ -เครื่องหมาย+ หมายถึง สามารถเจริญได้

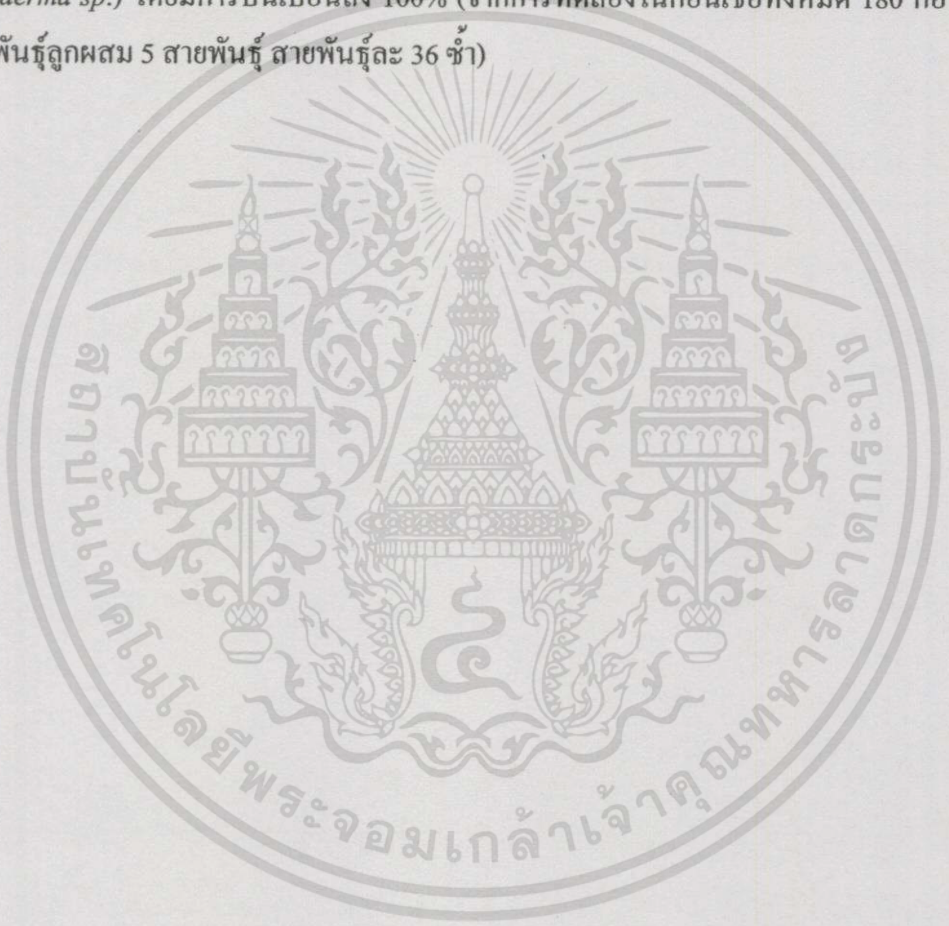
-เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่สามารถเจริญ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 การทดสอบการเกิดตุ่มดอก

นำสายพันธุ์ลูกผสม F42, F220, F249, F266 และ F342 มาเพาะลงอาหารทดสอบการเกิดตุ่มดอก (ภาคผนวก ก ข้อ 13) เพื่อทดสอบการเกิดตุ่มดอก ปรากฏผลว่า ไม่พบตุ่มดอกเกิดขึ้นในทุกๆ สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ และเมื่อนำมาทดสอบโดยการเพาะเชื้อลงก้อนขี้เลื่อยเพาะเห็ดสำเร็จรูป (ตามวิธีในภาคผนวก ก ข้อ 12) พบว่าเส้นใยลูกผสมมีลักษณะไม่แข็งแรง มีการเจริญของเส้นใยขึ้นบางและช้ามาก และส่วนใหญ่จะมีลักษณะเหมือนเส้นใยหยุดการเจริญ ซึ่งเมื่อเจริญไปสักระยะหนึ่งจะทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราตัวอื่นๆ ซึ่งเป็นศัตรูในการเพาะเห็ด เช่นราเขียว (*Trichoderma sp.*) โดยมีการปนเปื้อนถึง 100% (จากการทดลองในก้อนเชื้อทั้งหมด 180 ก้อน โดยใช้สายพันธุ์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 36 ซ้ำ)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายในและภายนอกพบว่า เห็ดนางรมมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกับแนววินิจฉัยของ Pegler (1986)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม พบว่าเส้นใยของเห็ดนางรมสามารถเจริญเติบโตบนอาหารพีดีเอได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับอาหารมอลต์สกัด และวอเตอร์อาการ์ ส่วนระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของประเสริฐ(2539) ที่ได้ศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดในตระกูล *Pleurotus* โดยเลี้ยงเส้นใยบนอาหารพีดีเอ ที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน 5 ระดับ และบ่มเชื้อเป็นเวลา 6 วัน พบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส และตามที่ Chang and Miles (1989) ได้รายงานผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดนางฟ้าว่า ช่วงอุณหภูมิที่ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิเหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเส้นใย ส่วนผลของระดับพีเอชที่เหมาะสมในการทดลองครั้งนี้พบว่าเส้นใยมีการเจริญสูงสุดที่ค่าพีเอช 5.0

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโพรโตพลาสต์ของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม โดยในการทดลองเตรียมโพรโตพลาสต์ครั้งนี้ ได้ใช้เส้นใยเห็ดนางรมอายุ 3 วัน ซึ่งอยู่ในระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) โดยเส้นใยในระยะนี้จะมีผนังเซลล์บาง จึงทำให้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากโดย Peberdy *et al.* (1976) ได้เคยรายงานไว้ว่า จำนวนโพรโตพลาสต์จะมีปริมาณมาก เมื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของเส้นใยในระยะที่มีการเจริญแบบทวีคูณและ Schwench *et al.* (1977) ได้รายงานว่าเซลล์ในระยะหยุดการเจริญ (stationary phase) หรือระยะท้ายๆของช่วงหยุดการเจริญ (late stationary phase) จะมีผลให้จำนวนโพรโตพลาสต์ลดลงอย่างมาก ซึ่งรวมทั้งผลการทดลองของ Yamada *et al.* (1983) ที่ได้รายงานไว้ว่าการแยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ด *Collybia veltipes* และ *Pleurotus ostreatus* ที่มีอายุน้อยจะให้โพรโตพลาสต์จำนวนมาก ขณะที่เส้นใยอายุมากมีผลให้จำนวนโพรโตพลาสต์ลดลงในเชื้อทั้งสองชนิด นอกจากนี้ Toyomasu *et al.* (1986) ได้รายงานว่าสามารถเตรียมโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ด *Pleurotus ostreatus* ได้ปริมาณมากสุดโดยใช้เส้นใยอายุ 2 ถึง 3 วัน และบ่มเส้นใยเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ส่วน Sudarat (1991) ได้แยกโพรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ด *Pleurotus cystidiosus* และพบว่าเส้นใยอายุ 3 วันให้จำนวนโพรโตพลาสต์สูงสุด ขณะที่เส้นใยที่มีอายุมากกว่า 4 วันมีผลให้จำนวนโพรโตพลาสต์ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้เอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ ซึ่งเป็นเอนไซม์ผสมที่ประกอบไปด้วยเอนไซม์ไคติเนส โปรติเอส และเซลลูเลส ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานหลายฉบับได้รายงานว่าการใช้เอนไซม์ผสมมีผลทำให้ปริมาณโพรโตพลาสต์สูงขึ้น โดยเอนไซม์ผสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายผนังเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ที่เหมาะสมคือ 4 มก./มล. โดยให้จำนวนโพรโตพลาสต์สูงสุด (3.94×10^7 โพรโตพลาสต์/มล.) นอกจากนี้ Iijima and Yanagi (1986) ได้กล่าวว่า ส่วนผสมและความเข้มข้นของเอนไซม์ในการแยกโพรโตพลาสต์จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ และโครงสร้างของผนังเซลล์ การสร้างผนังเซลล์ในเชื้อที่กำลังจะเจริญเติบโตของพวกเห็ดจะเป็นโครงสร้างแบบธรรมดาๆ และจะซับซ้อนมากขึ้น เมื่อเชื้อมีการเจริญมากขึ้น รวมทั้งจะแสดงความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ตามชนิดของเห็ด เมื่อเห็ดมีอายุมากขึ้น เส้นใยที่มีอายุน้อยจะแยกโพรโตพลาสต์ได้จำนวนมาก โดยใช้ส่วนผสมของเอนไซม์ไม่มากชนิด

จากการศึกษาผลของระดับพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโพรโตพลาสต์ในงานวิจัยนี้ พบว่าพีเอชที่ระดับ 5.0 มีผลให้จำนวนโพรโตพลาสต์สูงสุดคือ 4.17×10^7 โพรโตพลาสต์/มล. ซึ่งสอดคล้องกับที่ Fox (1991) ได้รายงานไว้ว่าระดับพีเอชที่เหมาะสมในการเตรียมโพรโตพลาสต์ของเชื้อราอยู่ในช่วง 4.0 ถึง 8.0

ผลการศึกษาชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโพรโตพลาสต์ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมที่สุดคือ แมกนีเซียมซัลเฟต โดยมีจำนวนโพรโตพลาสต์สูงสุดคือ 4.05×10^7 โพรโตพลาสต์/มล. ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sudarat (1991) ซึ่งได้ทำการศึกษาชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโพรโตพลาสต์ของเห็ด *Pleurotus cystioliosus* ซึ่งชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่ใช้ศึกษาคือ แมกนีเซียมซัลเฟต โปตัสเซียมคลอไรด์ แอมโมเนียมคลอไรด์ ซอร์บิทอล และแมนนิทอล โดยเขาพบว่าแมกนีเซียมซัลเฟตเหมาะสมที่สุดในการเตรียมโพรโตพลาสต์ โดยให้จำนวนโพรโตพลาสต์ในปริมาณสูงสุด จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่าแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโพรโตพลาสต์ในเห็ดหลายชนิดเช่น *P. cystioliosus* (Sudarat,1991), *Lentinula edodes* (Hong and Yeup,1985; ประภัสสร,2540), *Coprinus pellucidus, C. cinereus* (Morinaga,1995), *C. macrorhizus* (Yanagi *et al*,1985) และ *Shizophylum commune* (De varies and Wessles,1972) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าแมกนีเซียมซัลเฟต มีข้อดีที่เป็นเกลืออนินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญเติบโต หรือการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างการบ่มเลี้ยงโพรโตพลาสต์

ผลการศึกษาความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (แมกนีเซียมซัลเฟต) ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโพรโตพลาสต์ครั้งนี้ พบว่าแมกนีเซียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 0.9 โมลาร์ มีผลให้เกิดโพรโตพลาสต์จำนวนสูงสุดคือ 4.89×10^7 โพรโตพลาสต์/มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโพรโตพลาสต์ให้ได้จำนวนสูงสุด พบว่าที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงของการบ่มมีความเหมาะสมที่สุด โดยให้จำนวนโพรโตพลาสต์สูงสุดคือ 4.87×10^{7} โพรโตพลาสต์/มล. แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มมากขึ้นได้มีผลให้จำนวนโพรโตพลาสต์ลดลง การที่จำนวนโพรโตพลาสต์ลดลง เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น เนื่องจากโพรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นอาจถูกทำลายโดยไลซิ่งเอนไซม์ ซึ่งมีส่วนผสมของเอนไซม์โปรติเอสประกอบอยู่ด้วยโดยเอนไซม์นี้อาจมีคุณสมบัติในการย่อยสลายพลาสมาเมมเบรน(plasma membrane)ซึ่งห่อหุ้มโพรโตพลาสต์ เนื่องจากพลาสมาเมนเบรนของสิ่งมีชีวิตจะมีโปรตีนประกอบอยู่ร้อยละ 50 ขององค์ประกอบทั้งหมด จึงมีผลทำให้โพรโตพลาสต์มีจำนวนลดลง (Alberts *et al.*,1994) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวีรวัฒน์ (2534) ที่พบว่าระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์มีผลต่อจำนวนโพรโตพลาสต์ของเห็ดฟาง (*Volvariella volvacia)* สามสายพันธุ์ โดยระยะเวลาในการบ่ม 4 ชั่วโมง มีผลให้เกิดจำนวนโพรโตพลาสต์สูงสุด แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ในชั่วโมงที่ 5 ขึ้นไป พบว่าโพรโตพลาสต์ที่หลุดจากเส้นใยบางเซลล์เริ่มแตก ทำให้จำนวนโพรโตพลาสต์ที่นับได้มีปริมาณลดลง และนอกจากนี้ Kitamoto *et al.*(1988) ได้รายงานว่าโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของ *Trichoderma harzinum* จะแตกถ้าระยะเวลาในการบ่มนานเกินกว่า 4 ชั่วโมง หรือในปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไป

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ โดยทำการศึกษาปัจจัยชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ และความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสม พบว่าชนิดและความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมคือ ซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ โดยมีผลให้เปอร์เซ็นต์ความถี่ในการคืนกลับของเซลล์สูงสุด (1.06%) เมื่อเทียบกับชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ชนิดอื่นๆ ซึ่งการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Fox (1991) ที่พบว่าการคืนกลับของเซลล์สู่สภาพปกติของโพรโตพลาสต์ที่ได้จากเห็ด *L. edodes* และ *P. florida* มีค่าสูงเมื่อใช้ซูโครสเป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ โดยโพรโตพลาสต์ของ *L. edodes* คืนกลับสู่สภาพเซลล์ปกติสูงสุดเมื่อใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ส่วนโพรโตพลาสต์ของ *P. florida* คืนกลับของเซลล์สู่สภาพปกติสูงสุดเมื่อใช้ซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะพบว่าซูโครสถูกใช้เป็นออสโมติค สเตบิไลเซอร์ในเห็ดหลายชนิด เช่น *Coprinus macrorhizus* (Kiguchi and Yanagi,1985) และจากผลการทดลองครั้งนี้ไม่พบโคโลนีเกิดขึ้นในอาหารที่ไม่มีออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ซึ่งทำให้ทราบได้ว่าในการกรองโพรโตพลาสต์ครั้งนี้ไม่มีการปนเปื้อนของเศษเส้นใยโดยจะมีแต่เพียงโพรโตพลาสต์เท่านั้น ซึ่งโพรโตพลาสต์จะไม่สามารถเจริญได้ถ้าไม่มีสารละลายที่รักษาแรงดันออสโมติคประกอบอยู่

จากการใช้เครื่องบ่งชี้ตามธรรมชาติสำหรับการคัดเลือกลูกผสมในการทดลองครั้งนี้โดยใช้สารฆ่าเชื้อรา พบว่าเห็ดหอมสามารถต้านทานสารฆ่าเชื้อราไอโอดีนได้เพียงชนิดเดียว ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 - 0.007 % ในขณะที่เห็ดนางรมสามารถต้านทานสารฆ่าเชื้อราได้ทั้งสองชนิดคือ ไนสเตติน และไอโอดีน โดยต้านไนสเตตินได้ที่ระดับความเข้มข้น 10 - 500 ยูนิต/มล. และต้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโอดีนได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำมากคือที่ 0.001 - 0.002 % เท่านั้น การที่เห็ดหอมและเห็ดนางรมมีความสามารถในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราที่แตกต่างกัน อาจเป็นผลจากยีนต้านทานที่ต่างกันของเห็ดทั้งสองชนิด โดยต่างก็มีความสามารถในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราได้บางชนิด ซึ่งยีนที่แตกต่างกันนี้ ส่งผลให้มีความสามารถในการต้านทานที่ไม่เหมือนกัน หรือมีระดับความสามารถในการต้านทานที่ต่างกัน

จากการหลอมรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดสองสายพันธุ์นี้ โดยใช้สารละลายโพลีเอทธิลีน-ไกลคอล ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 6000 พบว่าความถี่ในการคืนกลับเป็นเซลล์มีค่าเท่ากับ 0.00194 และสามารถเก็บโคโลนีที่ผ่านขั้นตอนการหลอมรวมได้ทั้งสิ้น 475 โคโลนี โดยอาจเป็นโคโลนีลูกผสมที่เกิดจากการรวมกันระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดหอม เห็ดหอมกับเห็ดนางรม เห็ดนางรมกับเห็ดนางรม หรืออาจเกิดจากโพรโตพลาสต์ที่ไม่เกิดการหลอมรวมของเห็ดหอมและเห็ดนางรม ทั้งนี้เนื่องจากการรวมโพรโตพลาสต์โดยใช้สารเคมีโพลีเอทธิลีน ไกลคอลนี้เป็นวิธีการรวมกันแบบสุ่ม และจากผลการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ จากโคโลนีทั้งหมดที่เกิดขึ้น 475 โคโลนี โดยทำการตรวจสอบความสามารถในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา การหาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด การวัดขนาดของเส้นใยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและแม่ (เห็ดหอมและเห็ดนางรม) และการตรวจสอบการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น ทั้งนี้จากผลการศึกษาความสามารถในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราของสายพันธุ์ลูกผสมในงานวิจัยนี้พบว่าสายพันธุ์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ (F42, F220, F249, F266 และ F342) ที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราทั้งสองชนิดคือ ไอโอดีน และไนสเตติน

จากผลการหาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของสายพันธุ์ลูกผสมในการทดลองครั้งนี้ พบว่าสายพันธุ์ลูกผสมทั้ง 5 คือ F42, F220, F249, F266 และ F342 มีปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดมากกว่าสายพันธุ์พ่อและแม่ (เห็ดหอมและเห็ดนางรม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีปริมาณดีเอ็นเอเป็น 0.574, 0.524, 0.540, 0.665 และ 0.560 มก./มล.ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์พ่อและแม่มีปริมาณดีเอ็น-เอเป็น 0.403 และ 0.358 มก./มล. ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับของวีรวัฒน์ (2534) ที่ได้ทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของสายพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโต-พลาสต์ของเห็ดฟาง โดยพบว่าสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้มีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์พ่อและแม่โดยคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมที่มีการเพิ่มของปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 เท่าและ 3 เท่าของสายพันธุ์พ่อและแม่ และประภัสสร (2540) ได้ทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณ ดีเอ็นเอทั้งหมดของสายพันธุ์ลูกผสมเกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว พบว่าสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้มีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าสายพันธุ์พ่อและแม่ โดยปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ใกล้เคียงกับผลรวมของปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์พ่อและแม่ Zhao and Chang (1996) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสของสายพันธุ์ลูกผสม 6 สายพันธุ์ คือ Fsp1-6 ที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ของเชื้อต่างสกุลกันระหว่าง *P. ostreatus* (เห็ดนางรม) กับ *S. commune* (เห็ดแครง) โดยพบว่าส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ลูกผสม Fsp3, Fsp4 และ Fsp5 มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อและแม่ และFsp1 มีขนาดใหญ่กว่าเห็ดแครงแต่เล็กกว่าเห็ดนางรม ส่วน Fsp2 มีขนาดไม่แตกต่างจากสายพันธุ์พ่อและแม่ ประสาทพร (2541) กล่าวว่าการรวมโพรโตพลาสต์ของพืชชนิดเดียวกัน หรือใกล้เคียงกันมาก จะมีจำนวนโครโมโซมของลูกผสมเท่ากับผลรวมของโครโมโซมของโพรโตพลาสต์ทั้ง 2 กลุ่มที่นำมาทดลอง แต่ถ้าการรวมของโพรโตพลาสต์จากพืชที่มีความแตกต่างกันมาก มักจะพบว่าจำนวนของโครโมโซมจะแปรปรวนอย่างมาก ซึ่งในงานวิจัยของเราเป็นการรวมโพรโตพลาสต์จากเห็ดที่ต่างสกุลกันจึงอาจมีผลทำให้จำนวนโครโมโซมในลูกผสมที่ได้ ไม่เท่ากับผลรวมของโครโมโซมในสายพันธุ์พ่อแม่

ผลการวัดขนาดของเส้นใยสายพันธุ์ลูกผสมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสายพันธุ์ลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อและแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลงานของ Abe *et. al.* (1982) ที่ได้รายงานว่า ลูกผสมที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์จะมีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อและแม่ และวีรวัฒน์ (2534) ที่ได้ทำการวัดขนาดของเส้นใย สายพันธุ์ลูกผสม 6 สายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดฟาง เปรียบเทียบกับขนาดของ เส้นใยสายพันธุ์ ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ โดยพบว่าของเส้นใยของสายพันธุ์ลูกผสมมีขนาดใหญ่กว่า สายพันธุ์ต้นแบบ และประภัสสร (2540) ซึ่งได้ทำการวัดขนาดของเส้นใยสายพันธุ์ลูกผสม 3 สายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus*) โดยพบว่าลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์คือ PP_1 PP_2 และPP_3 มีขนาดเส้นใยใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อและแม่

ผลการตรวจการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นในสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า ไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่นเกิดขึ้นในทุกโคโลนีที่นำมาตรวจสอบ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Takehara *et al.* (1993) ที่รายงานการรวมโพรโตพลาสต์ในเชื้อต่างชนิด(species)ของเชื้อออกโซโทรบมิวแทนซ์ของเห็ดสกุล *Pleurotus* คือ *P. ostreatus* (Jacq:Fr.) Kummer, *P. pulmonarius* (Fr.) Quel. และ *P. cornucopiae* (Paul.)Rolla. var. *citrinopileatu* (Sing.)Ohira พบว่าเส้นใยของเชื้อชนิดที่ได้รับจากการหลอมรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อต่างชนิดของเห็ดสกุล *Pleurotus* ดังกล่าว ไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่นเกิดขึ้น และ Toyomasu and Mori (1987) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อมิวแทนซ์ต่างชนิดของสกุล *Pleurotus* จำนวน 4 ชนิด ซึ่งได้แก่ *P. ostreatus, P. columbinus, P. pulmonarius* และ *P. sajor-caju* พบว่าสายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมกันของ *P. ostreatus* กับ *P. columbinus* เท่านั้นที่สามารถพบแคลมคอนเนคชั่น ขณะที่สายพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *P. ostreatus* กับ *P. sajor-caju, P. pulmonarius* กับ *P. sajor-caju* และ *P. pulmonarius* กับ *P. sajor-caju* กลับไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่นเกิดขึ้น การที่เราตรวจไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่นในสายพันธุ์ลูกผสม อาจสันนิษฐานได้ว่าการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นนั้น โดยส่วนใหญ่จะพบได้จากการผสมพันธุ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีธรรมชาติ (convention method) ซึ่งต้องอาศัยเมทติ้ง ไทป์ (mating

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

type) หรือยีนที่เข้ากันได้ (compatible) ของคู่เชื้อที่นำมาผสมพันธุ์กันเท่านั้น แต่จากงานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการผสมพันธุ์โดยวิธีการรวมโพรโตพลาสต์ เพื่อที่จะขจัดปัญหาที่เกิดจากการถูกจำกัดด้วยเมททิ่ง ไทป์ที่เข้ากันไม่ได้ (incompatible) ของคู่เห็ดที่นำมาผสมพันธุ์กัน ประกอบกับเป็นการผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดสองชนิดที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก (ซึ่งการผสมพันธุ์ในลักษณะนี้มักจะไม่เกิดขึ้นในกระบวนการตามธรรมชาติ) ซึ่งอาจเป็นผลให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นได้

ผลการทดสอบการเกิดดอก พบว่าลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ไม่สามารถเกิดตุ่มดอกได้ในอาหารทดสอบการเกิดตุ่มดอก และเมื่อนำมาเพาะลงก้อนขี้เลื่อยเพาะเห็ดสำเร็จรูป พบว่าเส้นใยลูกผสมมีลักษณะไม่แข็งแรง มีการเจริญขึ้นบางและช้ามาก(ทั้งนี้การเกิดการแบ่งเซลล์ช้าอาจเป็นเพราะทั้งสองสายพันธุ์นั้นแตกต่างกันมาก) และส่วนใหญ่เส้นใยจะหยุดการเจริญเมื่อเจริญไปสักระยะหนึ่ง การที่ลูกผสมที่ได้มีลักษณะไม่แข็งแรง และไม่สามารถสร้างตุ่มดอกได้ อาจเกิดจากความแปรผันของสารพันธุกรรมที่เกิดจากการหลอมรวมโพรโตพลาสต์ ซึ่งประสาทพร(2541)ได้กล่าวไว้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อ"การสูญเสียลักษณะหรือรหัสพันธุกรรม" ของลูกผสมที่เกิดจากการหลอมรวมโพรโตพลาสต์อาจแยกได้ดังต่อไปนี้

1. ช่วงการรวมกันของโพรโตพลาสต์
2. ช่วงการรวมกันของนิวเคลียส
3. การแยกจากกันของนิวเคลียสที่ไม่ได้รวมกันอย่างแท้จริงในช่วงการแบ่งของเซลล์ลูกผสม
4. การรวมกันของรหัสพันธุกรรมในเซลล์ลูกผสม
5. การสูญหายของโครโมโซมที่ได้จากเซลล์ฝ่ายใดฝ่ายหนึ่งของลูกผสม
6. การแยกตัวหรือถูกคัดออกขององค์ประกอบของเซลล์จากเซลล์ลูกผสม
7. การสูญหายหรือการถูกทำลายขององค์ประกอบบางอย่างของเซลล์
8. การเพิ่มจำนวนขององค์ประกอบบางอย่างของเซลล์ฝ่ายใดฝ่ายหนึ่งภายในเซลล์ลูกผสม
9. ความไม่คงที่ของพันธุกรรมและโอกาสของการเกิดการกลายพันธุ์ในลูกผสม
10. ปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองอาจก่อให้เกิดการผันแปรทางพันธุกรรม
11. การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่ไม่ได้อยู่ในส่วนของนิวเคลียส ในระหว่างเกิดการรวมโพรโตพลาสต์

มีรายงานหลายฉบับที่รายงานผลการรวมโพรโตพลาสต์ (ในเห็ดหลายชนิด) ว่าทำให้เกิดการล้มเหลวต่อการสร้างตุ่มดอก ดังต่อไปนี้ Toyomasu and Mori (1987) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ของสายพันธุ์ 01-33A และ 02-4A มิวแทนซ์ของ *P. salmoneo-stramineus* และรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *Pleurotus* 4 ชนิด คือ *P. ostreatus, P. columbinus, P. pulmonarius* และ *P.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sajor-caju โดยพบว่าการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *P. ostreatus* กับ *P. pulmonarius* และระหว่าง *P. columbinus* กับ *P. pulmonarius* ไม่ประสบความสำเร็จในการสร้างดอกเห็ด Takehara *et al.* (1993) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *P. ostreatus* (Jacq:Fr.) Kummer, *P. pulmonarius* (Fr.)Quel. และ *P. cornucopiae*(Paul.) Rolla. var. *citrinopileatus* (Sing.) Ohira โดยพบว่าเส้นใยของสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการหลอมรวมโพรโตพลาสต์ทุกครั้งไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่นเกิดขึ้นและลูกผสมที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อ *P. ostreatus* กับ *P. cornucopiae* พบว่าไม่สามารถสร้างตุ่มดอกบนอาหารที่ผสมขี้เลื่อย ข้าวสาลีและรำข้าว (sawdust-wheat bran medium) Zhao and Chang (1996) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *P. ostreatus* และ *Shizophylum commune* พบว่าความถี่ของการเกิดลูกผสมที่ได้มีค่าเท่ากับ 3.6 ถึง 7.3×10^{-5} ลูกผสมที่ได้ส่วนใหญ่มีภาวะแบบโมโนคารีโอติค (monokaryotic) เป็นหมัน และไม่เกิดกระบวนการเฮทเทอโรคารีโอซิส(heterokaryosis) Matsumota *et al.* (1997) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* และพบว่า ลูกผสมจากการหลอมรวมไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้เช่นกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการคืนกลับสู่สภาพเซลล์ปกติของโพรโตพลาสต์ในเรื่องการเทอาหารเลี้ยงเชื้อทับ เนื่องจากความร้อนของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการเททับอาจส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ในการคืนกลับสู่สภาพเซลล์ปกติของโพรโตพลาสต์ต่ำได้

2. ผลการศึกษาด้านการรวมโพรโตพลาสต์จะมีน้ำหนักมากขึ้น ถ้าได้มีการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ฟิวแซนท์ที่ได้ ด้วยวิธีการตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอ และหรือรูปแบบไอโซไซม์ร่วมกับการคัดเลือกลูกผสมโดยวิธีอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จรัญ จันทลักขณา. 2540. *สถิติ วิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย.* พิมพ์ครั้งที่ 7 กรุงเทพ : ไทยวัฒนาพานิช.

ประสาทพร สมิตะมาน. 2541. *โพรโตพลาสต์เทคโนโลยี.* เชียงใหม่ : สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539. "การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และผลผลิตของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐาน และเห็ดนางรมสีเทา." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

ปัญญา โพธิฐิติรัตน์. 25338. *เทคโนโลยีการเพาะเห็ด.* พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : รั้วเขียว

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536. *โพรโตพลาสต์ฟิวชั่นของจุลินทรีย์.* กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุดารัตน์ บุญจันทร์.2534. "การศึกษาการสร้างโพรโตพลาสต์ การกลับคืนเป็นเส้นใย และการสร้างดอกเห็ด จากโพรโตพลาสต์ของเห็ดเป๋าฮื้อ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาสภาวะแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุทธพรรณ ตรีรัตน์. 2523. "ยาอายุวัฒนะจากเห็ดหอม." *วารสารสมาคมนักวิจัยและพัฒนาเห็ดแห่งประเทศไทย.* 1: 5-10.

สุภาภรณ์ จาริยุวัฒน์. 2541. "การใช้เทคนิคโพรโตพลาสต์และการศึกษาความแตกต่างของไอโซ-ไซม์จากเส้นใยโมโนคารีออนของเห็ดตีนแรด." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุมาลี พิชญางกูร. 2541. *เห็ดโคนและลูกผสมฟิวแสนท์.* กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

วีรวัฒน์ กนกนุเคราะห์. 2534. " การปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดฟาง (*Volvariaella volvaceae*) โดยการรวมโพรโตพลาสต์." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2542. "เห็ดอาหารเพื่อสุขภาพ." *กสิกร.* 72 : 218-224.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Albert,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M., Poberts,K.and Watson,J.D.1994. *Molecular biology of cell.* 3rd ed.London : Garland Publishing.

Alexopoulos, C.J.and Mims, C.W.1979 . *Introduction Mycology.* 3rd edition. 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.

Block, S. S., Tsao, G. and Han, L. 1959. " Experiments in the cultivation of *Pleurotus ostreatus."* *Mushroom Science.* 4: 309-319.

Byong,K.K., Ju,H.K., Mirim,J., Ha,W.K., Mi,J.S. and Eung ,C.C. 2000. " Mycelial protoplast and Regeneration of *Lentinus lepideus.* " *Life Sciences.* 66: 1359-1367.

Chang, S. T. 1987. " World production of cultivated edible mushroom in 1986." *Mush. J.* 7: 117-120.

Chang, S. T. and Miles, P. G. 1989. *Edible Mushrooms and Their Cultivation.* CRC Press, Boca Raton, Florida.

De Varies, O.M.H. and Wessles, J.G.H. 1972. "Release of protoplasts from *Shizophyllum Commune* by lytic enzyme preparation from *Trichiderma viride."* *J. Gen. Microbiol.* 73: 13-22.

Devies, K. E. 1988. *Genome analysis.* Washington DC: IRC Press.

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.

Diehle, D.A. and Royse, D.J. 1986." Shiitake cultivation on sawdust : Evaluation of selected genotypes for biological efficiency and mushroom size." *Mycologia.* 78: 929-933.

Eguchi, F., Fukuzumi,T. and Higaki, M. 1992. "Production of new species of edible mushrooms by Protoplasts Fusion Method II:Analysis of the mycelia and basidiospores of a fusant between *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe cylindracea."* *Mokuzai Gakkaish*i. 38: 403-410.

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 *Mycolepto donoides aitchisomii.* " *Mokuzai Gakkaish*i. 41: 342-348.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Foury, F. and Goffeau, A. 1973. "Combination of 2-deoxyglucose and snail gut enzyme treatments for preparing sphearoplasts of *Shizasaccharomyces pombe*." *J. of Gen. Microbiol.* 75: 227-229.

Fox, H. M. 1991. "Genetic Studies on the Edible Mushrooms *Lentinula edodes* and *Pleurotus Species*." PhD. Thesis of University of Nottingham.

Gascon, S., Ochoa, A.G. and Villanueva, J.R. 1964. "Production of yeast and mold protoplast by Treatment with the Strepzyme of *Micromonospora* AS." *Can. J. Microbiol.* 11: 573-580.

Hamuro, J., Mereda, Y., Fukuoka, F. and Chihara, G. 1976. "Antitumor polysaccharide, entinan and pachymaran as immunopotentiators." *Mushroom Science ix (part 1)*: 477-489.

Hashimoto, K. and Takahashi, Z. 1974. "Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus*." Mushroom Science ix (part 1): 585-593.

Hong, S. W. and Yeup, Y. 1985. "Formation and Regeneration of protoplasts in *Lentinula edodes*." *Mushroom Newsletter for the Tropics.* 5: 4-10.

Iijima,Y. and Yanagi,O.1986. "A Method for the High Yield Preparation of and High Frequncy Regeneration of Basidiomycete, *Pleurotus ostreatus* sulfite Pulp Waste Components." *Agric. Biol. Chem.* 49: 171-179.

Kiguchi, T. and Yanagi, S.O. 1985. " Intraspecific heterokaryon and fruit body formation in *Coprinus macrorhizus* by protoplast fusion of auxotrophic mutants." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 121-127.

Kitamoto,Y., Mori,N., Yamamoto,M., Ohiwa,T. and Ichikawa,Y. 1988. "A simple method for protoplast formation and and improvement of protoplast regeneraion from various fungi using an enzyme from *Trichoderma harzianum*." *App. Microbiol. Biotechnol.* 28: 445-450.

Martinez, D., Guzman, G. and Soto, C. 1985. "The effect of fermentation of coffee pulp in the cultuvation of *Pleurotus ostreatus* in Mexico." *Mushroom Newsletter for the Tropics.* 4: 21-22.

Matsumoto, M., Eguchi, F. and Higaki, M. 1997. "Polyethylene Glycol Centrifugal Fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*." 木材学会誌 43: 215-219.

Miles, P.G.1993. Biological Background for Mushroom Breeding . *Genetics and Breeding of Edible Mushrooms.* Gordon and Breach Science Publishers.

Morinaga,T.M.,Kikuchi and Nomi,R.1985. "Fromation and regeneration of protoplast *Coprinus pellucidus* and *Coprinus cinereus*." *Agric Biol. Chem.* 49: 171-179.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Neil, A. L. Gow. and Geoffrey, M. Gradd. 1995. *The Growing Fungus*. UK Chapman and Hall Press.

Norton, C. F. 1981. *Microbiology*. Addison-wesley Publishing Company.

Okwujiako,I.A.1990. "The effect of vitamins on the vegettive growth and fruitbody formation of *Pleurotus sajor-caju*(Fr)Singer. " *MUSH. J. Tropics*. 10: 35-39.

Peberdy, J. F. 1979. "Fungal protoplast: Isolation, reversion and fusion." *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 21-39.

Peberdy, J. F. 1985. *UNESCO regional workshop on application of microbial protoplasts in genetic manipulation and genetic engineering*. Hongkong : Department of Biology. Science Center. (Mimeographed)

Peberdy, J. F. 1989. "Fungi without coats-protoplast as tools for mycological research." *Mycological Research*. 93: 1-20.

Peberdy, J. F. 1991. *Fungal protoplasts In: More Gene Manipulation in Fungi*, eds. Bennett, J.W.G. Lasure, LL. NewYork: Academic Press.

Peberdy, J. F. and Fox, H. M. 1993. Protoplast technology and edible mushrooms. *Genetics and breeding of edible mushrooms*. Netherlands: Gordon and Breach Science Publisher S. A.

Peberdy, J. F. Rox, A. H., Rogrts, H. J. and Cocking, E. C. 1976. *Microbial and plant Protoplasts*. Academic Press.

Pegler, D. N. 1986. *Agaric flora of Srilanka*. Kew Bulletin additional series XII London : Hermajefty' s stationery office.

Pichyangkura, S. and Kanoknukroh, V. 1992. Mushroom Productivity from Fusant Intraspecies of *Volvariella volvavea*. *J. Sci. Res. Chula Univ*. 17: 47-52.

Przybylowicz,P. and Donoghue, J. 1988. *Shiitake Growers Handbook (The Art and Science of Mushroom Cultivation)*. U. S. A.: Kendall/ Hunt Publishing Company.

Saunders, J. A. and George, W. B. 1987. Chemically induced fusion of plant protoplasts. *In cell fusion*, ed Sowers, A. E. New York: Plenum Press. 497-520.

Schewench,J.,Magana-Schwenke and Laporte,J.1977. "Yeast Protoplasts from stationary and starved cells : Preparation, Ultrastructure and Vacuolar Development." *Ann. Microbiol.* 128A : 3-18.

Suzuki, S. and Oshima, S. 1976. Influence of Shiitake (*Lentinulus edodes*) on human serum cholesterol. *Mushroom science*. 9: 463-467.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Takehara, T., Kumata, A. and Aono, S. 1993. Interspecific Protoplast Fusion between Some *Pleurotus Species* using Auxotrophic Mutants. 木材学会誌 39: 855-859.

Townsed, G. E. and Lindgren, A. A. 1953. Viable Yeast Count. *Cytologia.* 18 : 183.

Toyomasu, T. and Mori, K. I. 1987a. "Intra-and interspecific protoplast fusion between Some *Pleurotus species*." *Agric. Biol. Chem.* 51: 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: 2037-2040.

Toyomasu, T., Matsumoto, T. and Mori, K. I. 1986. "Interspecific protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus salmoneostramineus*." *Agric. Biol. Chem.* 50: 223-225

Triratana, S. and Osathaphant, P. 1988. The cultivation of shiitake (*Lentinus edodes*) in sawdust substrates from different trees and agricultural wastes. *In Recent Advances in Biotechnology an applied Biology* (Chang, S.T., Chan , K.Y. and Woo, N.Y.S.), Chinese University of Honkong .

Triratana, S.Suwannuraks, R. and Tantikanjana, T . 1992. Effects of *Lentinus edodes* extracts on platelet aggregation. *Thai Journal of Health Research* . 6(1): 1-6

Tsunoda, A. and Ishida, N. 1969. " A mushroom extract as an interferon inducer. " *Ann. N. Y. Acad .Sci.* 2:173-179

Yamada,O., Magae,Y., Kashiwagi,Y., Kakimoto,Y. and Sasaki,T. 1983. "Preparation and regeneration of mycelial protoplast of Collybia veltipes and *Pleurotus ostreatus*." *Eur.J. Appl.Microbiol.Biotechnol.* 17:298-300.

Yanagi,S.O., Monama,M., Kawasumi,T., Hino,A.,Kito,M.and Takebe,I.1985. "Conditions for isolation of and colony formation by mycelial protoplast of *Coprinus macrochizus*." *Agric. Biol. Chem.* 49:171-179

Zadrazil, F. 1974. The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida, Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus eryngii*. *Mushroom Science ix* (part 1): 585-593

Zhao, J. and Chang, S. T. 1993. "Monokaryotization by protoplasting heterothallic species of edible mushrooms." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9: 538-543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhao, J. and Chang, S. T. 1995. "Intraspecific hybridization in *Coprinus cinereus* and *Schazophyllum commune* by PEG-induced protoplast fusion and electro-fusion." *World Journal of Microbiology and 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 and Biotechnology*. 12: 573-578.

Zimmermann,U. and Vienken,J. 1982. "Electric field induce cell-to-cell fusion." *J. Membr. Biol.* 67: 165-182.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. อาหารพีดีเอ (potato dextrose agar)

ใช้อาหารพีดีเอสำเร็จรูป โดยชั่งพีดีเอ 39 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มล. นำไปต้มให้อาหารละลายเข้ากับน้ำจนมีลักษณะใส จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารพีดีบี (potato dextrose broth)

ใช้อาหารพีดีบีสำเร็จรูป โดยชั่งพีดีบี 24 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มล. จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารมอลท์สกัด อาการ์ (malt extract agar)

ใช้อาหารมอลท์สกัด อาการ์ สำเร็จรูป โดยชั่งมอลท์สกัด อาการ์ 24 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มล. นำไปต้มให้อาหารละลายเข้ากับน้ำจนมีลักษณะใส จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารวอเตอร์ อาการ์ (water agar)

ชั่งวุ้น 15 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่มีปริมาตรครบ 1,000 มล. ต้มให้วุ้นละลายเข้ากับน้ำจนมีลักษณะใส จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. minimal medium (MM) (Toyomasu *et al.*, 1986)

ส่วนประกอบของ MM มีดังต่อไปนี้

glucose	20	กรัม
$(NH_4)_2HPO_4$	1.5	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
thiamine.HCl	0.12	กรัม
agar	15	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำ 1,000 มิลลิลิตร

(ปรับค่าพีเอชให้ได้ 5.6 และฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที)

6. การเตรียมบัฟเฟอร์

6.1 โซดียมมาลีท บัฟเฟอร์(โพรโตพลาสต์ บัฟเฟอร์) 0.05 โมล (ประภัสสร,2540)

สารละลาย ก : สารละลายโซดียมมาลีท 0.2 โมล

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ผสมกับกรดมาลิอิก 19.6 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.

สารละลาย ข : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมล

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัมในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล.

ในการปรับค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ให้ใช้สารละลาย ก ปริมาตร 50 มล.ผสมกับสารละลาย ข ปริมตร X มล.(ปรับจนกระทั่งได้ค่าพีเอชตามต้องการ) แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 200 มล.

7. การเตรียมออสโมติค สเตบิไลเซอร์

7.1 แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.6 โมลาร์

ละลายแมกนีเซียมซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต 147.84 กรัม ในสารละลายโพรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ 1000 มล.

7.2 โปตัสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์

ละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ 44.74 กรัม ในสารละลายโพรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ 1000 มล.

7.3 แอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์

ละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ 32.09 กรัม ในสารละลายโพรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ 1000 มล.

7.4 แมนนิทอลความเข้มข้น 0.6 โมลาร์

ละลายแมนนิทอล 109.3 กรัม ในสารละลายโพรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ 1000 มล.

7.5 ซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.6 โมลาร์

ละลายซอร์บิทอล 109.3 กรัม ในสารละลายโพรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ 1000 มล.

7.6 ซูโครสความเข้มข้น 0.6 โมลาร์

ละลายซูโครส 205.2 กรัม ในสารละลายโพรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ 1000 มล.

8. สารละลายไลซิ่งเอนไซม์

การเตรียมสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 4 มก./มล. ทำได้โดยละลายไลซิ่งเอนไซม์ 4 มก. ในสารออสโมติค สเตบิไลเซอร์ ปริมาตร 1 มล. คนให้เอนไซม์ละลายจนหมด จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นทำให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองผ่านชุดกรองสวินเน็ก (Swinnex) ที่มีกระดาษกรองมิลลิพอร์ (millipore) 0.45 ไมโครเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. สารละลายโพลีเอทธิลีน ไกลคอล 6000 ความเข้มข้น 40 %

สารละลายโพลีเอทธิลีน ไกลคอล เป็นสารฟิวโซเจนท์ใช้สำหรับการรวมโพรโตพลาสต์เข้าด้วยกัน เตรียมโดย ละลายโพลีเอทธิลีน ไกลคอล น้ำหนักโมเลกุล 6000 ปริมาณ 20 กรัม ในน้ำร้อน 30 มล.จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 45 มล. แล้วเติม แคลเซียมคลอไรด์ 500 มิลลิโมล ปริมตร 5 มล.จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. อาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่

เตรียมโดยนำอาหารพีดีบี ละลายในออสโมติค สเตบิไลเซอร์แล้วเติมวุ้นให้เป็น 3 % สำหรับอาหารส่วนที่ใช้เททับผิวหน้าทำได้โดยนำอาหารชนิดเดิมมาเติมวุ้นให้มีความเข้มข้น 0.5 % จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. การหาปริมาณดีเอ็นเอในเส้นใย

การเตรียมสารต่างๆ ในการหาปริมาณดีเอ็นเอ

11.1 การเตรียมเอธานอล 95% ต่อน้ำ ในอัตราส่วน 4:1 เตรียมโดยนำเอธานอล 95% 4 ส่วน ละลายในน้ำกลั่น 1 ส่วน

11.2 การเตรียมสารละลาย อีเธอร์ต่อเอธานอล เตรียมโดยนำไดเอธิลอีเธอร์ 1 ส่วน ละลายในเอธานอล 95% 3 ส่วน

11.3 การเตรียมกรดเพอคลอริค 6% เตรียมโดยนำกรดเพอคลอริค 70% ปริมาตร 6 มล. เติมน้ำกลั่นจนครบ 70 มล.

11.4 การเตรียมสารละลาย อะเซทัลดีไฮด์ เตรียมโดยนำอะเซทัลดีไฮด์ ปริมาตร 0.2 มล. ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล.

11.5 การเตรียมสารละลาย ไดฟีนิลลามีน เตรียมโดยนำไดฟีนิลลามีน 2 กรัม ละลายในกรด อะซิติก 100 มล. จากนั้นเติม กรดซัลฟูริก(H_2SO_4) ปริมาตร 1.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลาย อะเซทัลดีไฮด์ ปริมาตร 0.10 มล. เติมลงในสารละลายดังกล่าวข้างต้น 20 มล.

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ใช้ดีเอนเอจาก คาล์ฟ ไทมัส ไทป์ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยละลายดีเอ็นเอจาก คาล์ฟ ไทมัส ไทป์ 1 ด้วยสารละลายเจือจางโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ (sodium citrate buffer) 0.0015 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอช 7.0 โดยเตรียมสารละลายดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 0.05 0.10 0.15 0.20 0.25 และ 0.30 มก/มล. ตามลำดับ

นำสารละลายที่ดีเอ็นเอดังกล่าวปริมาตร 1 มล.ของทุกความเข้มข้นมาเติมสารละลายไดฟีนิลลามีน ปริมาตร 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง

วัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากคาล์ฟ ไทมัส ไทปี I (มก/มล.) ส่วนแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จาก สเปกโตโฟโต-มิเตอร์ 600 นาโนเมตร

12. การเพาะเห็ดให้เกิดดอก

12.1 การเตรียมหัวเชื้อเห็ด

ทำได้โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างมาคัดเอาสิ่งเจือปนออก แล้วแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างมาต้มจนกระทั่งสุก โดยต้มไม่ให้เมล็ดข้าวฟ่างบาน เพราะจะทำให้เมล็ดข้าวฟ่างชื้นมากเกินไป และเส้นใยจะจับกันแน่นไม่สะดวกในการเขี่ยเชื้อภายหลัง เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างสุก จึงนำมาผึ่งให้แห้งพอหมาดๆ บรรจุในขวดแบน โดยใส่เมล็ดข้าวฟ่างลงไปประมาณครึ่งขวด ปิดจุกด้วยสำลี แล้วหุ้มกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างเย็นตัวลง ให้เขย่าขวดเมล็ดข้าวฟ่าง เพื่อให้ความชื้นของเมล็ดข้าวฟ่างภายในขวดกระจายอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นเขี่ยเส้นใยของเห็ดที่เจริญบนอาหารวุ้นใส่ลงไป โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ภายใน 2-3 สัปดาห์ เส้นใยจะเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง ซึ่งพร้อมที่จะนำไปเขี่ยลงถุงขี้เลื่อยต่อไป

12.2 การเพาะเห็ดในถุงขี้เลื่อย

ทำได้โดยเขี่ยเชื้อเห็ดในหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างให้กระจายดีเพื่อความสะดวกในการเทเชื้อลงถุงขี้เลื่อย นำหัวเชื้อเห็ดที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่างเทลงถุงขี้เลื่อย ประมาณ 20-30 เมล็ด ต่อ 1 ถุงขี้เลื่อย ปิดจุกสำลี จากนั้นนำก้อนเชื้อเห็ดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (สำหรับเห็ดหอม) และ 30 องศาเซลเซียส (สำหรับเห็ดนางรม)

ในการทดลองครั้งนี้จะใช้ถุงขี้เลื่อย (วัสดุเพาะเห็ดสำเร็จรูป) จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก

12.3 การเปิดถุงก้อนเชื้อ เมื่อเส้นใยเจริญเต็มก้อนเชื้อ จะปล่อยเส้นใยทิ้งไว้ ประมาณ 5-7 วัน หรือจากการสังเกต เมื่อเห็นว่ามีเส้นใยหนาๆ ซึ่งเกิดจากการที่เส้นใยมากระจุกรวมกันที่ปากถุงขี้เลื่อย จากนั้นทำการเปิดออก โดยนำถุงขี้เลื่อยที่มีเส้นใยเจริญเต็มที่แล้ว มาเปิดออกโดยใช้มีดคมๆ ตัดปากถุงพลาสติกให้เสมอไหล่ถุง เพื่อให้เส้นใยรับอากาศมากที่สุด รดน้ำทุกวัน วันละ 3 ครั้ง จนมีตุ่มเห็ดปรากฏ ทำการเก็บดอกเห็ดเมื่อมีขนาดตามต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13 อาหารทดสอบการเกิดดอก

13.1 อาหารทดสอบการเกิดตุ่มดอก (testing fruiting body formation medium) (Okwujiako,1990)

ส่วนประกอบของอาหารมีดังต่อไปนี้

กลูโคส	25	กรัม
แอสพาราจีน(asparagine)	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
KH_2HPO_4	1.0	กรัม
กรดมาลิอิก(maleic acid)	1.32	กรัม
Na_2CO_3	1.12	กรัม
$Fe_2(SO_4)_3$	0.2	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	0.2	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	0.1	มิลลิกรัม
ยีสต์สกัด(yeast extract)	0.04	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำ	1000	มิลลิลิตร

ทำการฆ่าเชื้ออาหารโดยการนึ่งที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นส่วนประกอบ กลูโคส แอสพาราจีน และ ยีสต์สกัด ที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านชุดกรองที่มีกระดาษกรองมิลลิพอร์ขนาด 45 ไมโครเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13.2 อาหารทดสอบการเกิดตุ่มดอก

(วิธีการทำเช่นเดียวกับการเตรียมหัวเชื้อ ในข้อ 12.1) โดยนำเมล็ดข้างฟ่างมาคัดเอาสิ่งเจือปนออก แช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างมาต้มจนสุก โดยต้มไม่ให้เมล็ดข้าวฟ่างบาน เพราะจะทำให้เมล็ดข้าวฟ่างชื้นมากเกินไป เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างสุก จึงนำมาผึ่งให้แห้งพอหมาดๆ บรรจุในขวดทรงกลม(ขวดสปอนเซอร์) โดยใส่เมล็ดข้าวฟ่างลงไปประมาณครึ่งขวด ปิดจุกด้วยสำลี แล้วหุ้มกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างเย็นตัวลง ให้เขย่าขวดเมล็ดข้าวฟ่าง เพื่อให้ความชื้นของเมล็ดข้าวฟ่างภายในขวดกระจายอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นเขี่ยเส้นใยของเห็ดที่เจริญบนอาหารวุ้นใส่ลงไป โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. วิธีการนับจำนวนโพรโตพลาสต์ (ดัดแปลงจาก Townsed and Lindgren,1953)

วัสดุอุปกรณ์

- อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer)
- กล้องจุลทรรศน์
- ที่นับ

วิธีการ

1. วางกระจกปิดสไลด์ (cover slip) บนแชมเบอร์ (chamber) ที่ใช้นับโพรโตพลาสต์ (counting chamber)
2. ดูดสารละลายโพรโตพลาสต์แขวนลอยเข้าแชมเบอร์ด้วยปิเปต
3. นับโพรโตพลาสต์ 5 ช่อง จาก 25 ช่องเล็กโดยนับในตำแหน่งบนซ้าย บนขวา ล่างซ้าย ล่างขวา และตรงกลาง ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า
4. เมื่อนับครบ 5 ช่อง นำจำนวนโพรโตพลาสต์ทั้ง 5 ช่องมารวมกันแล้วคำนวณหาจำนวนโพร-โตพลาสต์ต่อมล.

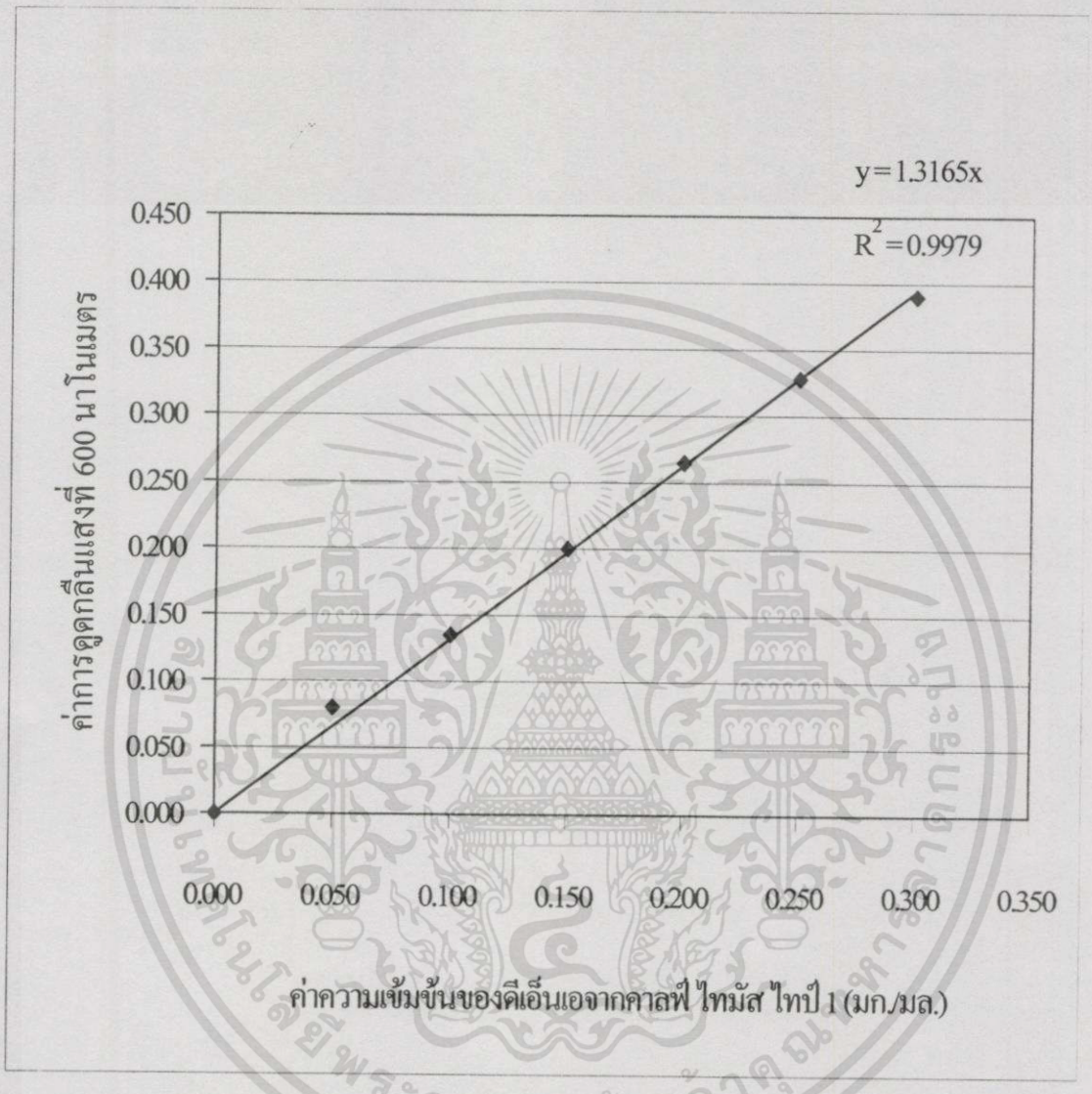
วิธีการคำนวณ

จำนวนโพรโตพลาสต์ทั้งหมด = $5ก \times 10^4 \times$ ความเจือจาง (dilution factor)

เมื่อกำหนดให้ ก คือ จำนวนโพรโตพลาสต์ที่นับได้ 5 ช่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค



ภาพภาคผนวก ค. กราฟมาตรฐานของดีเอ็นเอจากคาลฟ์ ไทมัส ไทป์ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

1. ผลการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม

ตารางภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	2	7.3930	3.6965	182.5432	3.89*
Within groups	12	0.2430	0.0202		
Total	14	7.6360			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

อาหาร	PDA	MEA	WA
ค่าเฉลี่ย	7.48	6.06	5.93

\- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

อาหารเลี้ยงเชื้อ	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
PDA	7.48b
MEA	6.06a
WA	5.93a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

2. ผลการศึกษาระดับของอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม

ตารางภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	4	123.2726	30.81815	926.8617	2.866*
Within groups	20	0.665	0.03325		
Total	24	123.9376			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30	25	20	15	35
ค่าเฉลี่ย	7.35	6.91	4.30	2.20	2.15

\- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
15	2.20a
20	4.30b
25	6.91c
30	7.35d
35	2.15a

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

3. ผลการศึกษาระดับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	4	4.5406	1.13515	44.6031	2.866*
Within groups	20	0.5090	0.02545		
Total	24	5.0496			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

พีเอช	5.0	5.5	6.0	6.5	4.5
ค่าเฉลี่ย	7.86	7.54	7.25	6.91	6.67

\- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

พีเอช	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
4.5	6.67a
5.0	7.86b
5.5	7.54c
6.0	7.25d
6.5	6.91e

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

4. ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์โดยไลซิ่งเอนไซม์ที่มีต่อการเตรียมโพรโตพลาสต์

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	5	5.36×10^{15}	1.07×10^{15}	57.28	2.62*
Within groups	24	4.49×10^{14}	1.87×10^{13}		
Total	29	5.80×10^{15}			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ความเข้มข้นไลซิ่งเอนไซม์ (มก./มล.)	4.0	5.0	3.0	2.0	1.0	0.5
ค่าเฉลี่ยโพรโตพลาสต์ (โพรโตพลาสต์/มล.)	3.94×10^{7}	2.91×10^{7}	2.84×10^{7}	9.84×10^{6}	6.50×10^{6}	4.01×10^{6}

\- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

ความเข้มข้นไลซิ่งเอนไซม์(มก./มล.)	จำนวนโพรโตพลาสต์(โพรโตพลาสต์/มล.)
0.5	4.01×10^{6}a
1.0	6.50×10^{6}a
2.0	9.84×10^{6}a
3.0	2.84×10^{7}b
4.0	3.94×10^{7}c
5.0	2.91×10^{7}b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

5. ผลการศึกษาระดับพีเอชที่เหมาะสมของสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของไลซิ่งเอนไซม์ที่มีต่อการเตรียมโพรโตพลาสต์

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	4	4.08×10^{15}	1.02×10^{15}	413.99	2.86*
Within groups	20	4.93×10^{13}	2.47×10^{12}		
Total	24	4.13×10^{15}			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ระดับพีเอช	5.0	5.5	4.5	6.0	6.5
ค่าเฉลี่ยโพรโตพลาสต์ (โพรโตพลาสต์/มล.)	4.17×10^{7}	1.77×10^{7}	1.05×10^{7}	8.73×10^{6}	7.30×10^{6}

\- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

ระดับพีเอช	จำนวนโพรโตพลาสต์(โพรโตพลาสต์/มล.)
4.5	1.05×10^{7} a
5.0	4.17×10^{7} c
5.5	1.77×10^{7} d
6.0	8.73×10^{6} ab
6.5	7.30×10^{6} b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

6. ผลการศึกษาชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมต่อการเตรียมโพรโตพลาสต์

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	5	6.10×10^{15}	1.22×10^{14}	545.95	2.62*
Within groups	24	5.36×10^{13}	2.23×10^{12}		
Total	29	6.15×10^{15}			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (0.6 โมล)	$MgSO_4$	sucrose	mannitol	sorbitol	NH_4Cl	KCl
ค่าเฉลี่ยโพรโตพลาสต์ (โพรโตพลาสต์/มล.)	4.05×10^7	1.67×10^7	7.43×10^7	1.25×10^6	9.00×10^6	6.50×10^6

\- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

ชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์(0.6 โมลาร์)	จำนวนโพรโตพลาสต์(โพรโตพลาสต์/มล.)
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	4.05×10^7 a
โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl)	6.50×10^6 b
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	9.00×10^6 b
แมนนิทอล (mannitol)	7.43×10^7 c
ซอร์บิทอล (sorbitol)	1.25×10^6 b
ซูโครส (sucrose)	1.67×10^7 d

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

7. ผลการศึกษาความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์($MgSO_4$)ที่เหมาะสมต่อการเตรียมโพรโตพลาสต์

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	3	6.84×10^{15}	2.29×10^{15}	1364.27	3.23*
Within groups	16	2.69×10^{13}	1.68×10^{12}		
Total	19	6.90×10^{15}			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (โมลาร์)	0.9	0.6	1.2	0.3
ค่าเฉลี่ยโพโตพลาสต์ (โพรโตพลาสต์/มล.)	4.88×10^{7}	4.14×10^{7}	3.12×10^{7}	2.00×10^{5}

\- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

ความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (โมลาร์)	จำนวนโพรโตพลาสต์(โพรโตพลาสต์/มล.)
0.3	2.00×10^{5}a
0.6	4.14×10^{7}b
0.9	4.88×10^{7}c
1.2	3.12×10^{7}d

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

8. ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่มของโพรโตพลาสต์

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	4	3.34×10^{15}	8.58×10^{14}	146.82	2.86*
Within groups	20	1.17×10^{14}	2.85×10^{12}		
Total	24	3.55×10^{15}			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	2.0	3.0	4.0	5.0	1.0
ค่าเฉลี่ยโพโตพลาสต์ (โพรโตพลาสต์/มล.)	4.87×10^7	2.80×10^7	2.20×10^7	1.73×10^7	1.72×10^7

\- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

ระยะเวลาในการบ่ม(ชั่วโมง)	จำนวนโพรโตพลาสต์(โพรโตพลาสต์/มล.)
1.0	$1.72 \times 10^7 a^2$
2.0	$4.87 \times 10^7 b$
3.0	$2.80 \times 10^7 c$
4.0	$2.20 \times 10^7 d$
5.0	$1.73 \times 10^7 a$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

9. ผลการศึกษาชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ที่มีต่อการคืนกลับเป็นเซลล์ปกติของโพร-โตพลาสต์

ตารางภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	5	4.477	0.895	4197.2	2.62*
Within groups	24	0.00512	0.000213		
Total	29	4.482			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (0.6 โมลาร์)	sucrose	mannitol	sorbitol	KCl	NH_4Cl	$MgSO_4$
ค่าเฉลี่ยโพรโตพลาสต์เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์	1.06	0.07	0.03	0.02	0.00	0.006

- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

ชนิดของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (0.6 โมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์
ซูโครส(sucrose)	1.06a
แมนนิทอล(mannitol)	0.07b
ซอร์บิทอล(sorbitol)	0.03c
โปตัสเซียมคลอไรด์(KCl)	0.02cd
แอมโมเนียมคลอไรด์(NH_4Cl)	0.00d
แมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4$)	0.006d

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

10. ผลการศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของออสโมติกสเตบิไลเซอร์คืนกลับเป็นเซลล์ปกติของโพรโตพลาสต์

ตารางภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	3	3.811	1.270	4619.848	2.23*
Within groups	16	0.0044	0.000275		
Total	19	3.815			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์	0.6	0.9	0.3	1.2
ค่าเฉลี่ยโพรโตพลาสต์เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์	1.06	0.17	0.02	0.0

\- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

ความเข้มข้นของออสโมติค สเตบิไลเซอร์ (ซูโครส)(โมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์
0.3	0.02a
0.6	1.06b
0.9	0.17a
1.2	0.00a

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

11. ขนาดของเส้นใยของเห็ดสายพันธุ์ลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและแม่

ตารางภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	6	10.363	1.7272	9.10	2.44*
Within groups	28	5.312	0.1897		
Total	34	15.675			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

สายพันธุ์	266	42	342	249	220	หอม	นางรม
ค่าเฉลี่ยขนาดของเส้นใย	3.00	2.76	2.60	2.52	2.40	1.60	1.44

- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

สายพันธุ์	ขนาดของเส้นใย (μ)
หอม	1.52a
นางรม	1.44a
F 42	2.64b
F 220	2.28b
F 249	2.32b
F 266	2.92b
F 342	2.56b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

12. ปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและแม่

ตารางภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

source	D.F.	SS	MS	F	F_{table}
Between groups	6	0.3305	0.05508	323.68	2.44*
Within groups	28	0.0048	0.00017		
Total	34	0.3352			

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P = 0.05)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

สายพันธุ์	266	42	342	249	220	หอม	นางรม
ปริมาณดีเอ็นเอ	0.665	0.574	2.560	0.544	0.524	0.403	0.358

- หมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

สายพันธุ์	ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด (มก./มล.)
หอม	0.403a
นางรม	0.358a
F 42	0.574b
F 220	0.524b
F 249	0.540b
F 266	0.665b
F 342	0.560b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจรัสรัช มั่นถาวร เกิดวันที่ 31 มีนาคม พ.ศ. 2516 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันราชภัฏสวนสุนันทา ปีการศึกษา 2537 และเข้าทำงานเป็นลูกจ้างโครงการณ์ ตำแหน่งนักวิชาการ ศูนย์การบรรจุหีบห่อไทย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เป็นเวลา 1 ปี จากนั้นเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตั้งแต่ปีการศึกษา 2540 จนถึงปีการศึกษา 2544

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้