การรวมโพรโตพลาสต์ ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมและการตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

PROTOPLAST FUSIONS BETWEEN *Lentinula edodes* AND *Pleurotus ostreatus* AND HYBRID DETECTIONS BY ISOZYME STUDIES

ปาจารีย์ อินทรทองคำ

PAJAREE INTARATHONGKOM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-462-9

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมและการตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

PROTOPLAST FUSIONS BETWEEN *Lentinula edodes* AND *Pleurotus ostreatus* AND HYBRID DETECTIONS BY ISOZYME STUDIES

ปาจารีย์ อินทรทองคำ

PAJAREE INTARATHONGKOM

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 49416
วัน, เดือน, ปี..... 2 ธ.ค. 2547

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-462-9

PROTOPLAST FUSIONS BETWEEN *Lentinula edodes* AND *Pleurotus ostreatus* AND HYBRID DETECTIONS BY ISOZYME STUDIES

PAJAREE INTARATHONGKOM

A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE
OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATED STUDIES KING MONGKUT'S INSTITUTE OF
TECHNOLOGY LADKRABANG
2003

ISBN 974-324-762-9

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมและการตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

PROTOPLAST FUSIONS BETWEEN *LENTINULA EDODES* AND *PLEUROTUS OSTREATUS* AND HYBRID DETECTIONS BY ISOZYME STUDIES

ชื่อนักศึกษา นางสาวปาจารีย์ อินทรทองคำ

รหัสประจำตัว 41065204

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.พรรณี จิตาภิชิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.มาลินี	ตันติยาภรณ์	
รศ.ดร.พรรณี	จิตาภิชิต	
ผศ.อารี	ฤทธิบูรณ์	
คุณอัญชลี	เชียงกูล	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 28 พฤษภาคม 2546 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อัตชู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 7 **เดือน** มกราคม **พ.ศ.** 2547

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมและการตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยการศึกษารูปแบบไอโซไซม์
นักศึกษา	นางสาวปาจารีย์ อินทรทองคำ
รหัสประจำตัว	41065204
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต

บทคัดย่อ

โพรโตพลาสต์ของเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และ เห็ดนางรม *(Pleurotus ostreatus)* ได้จากการนำเส้นใยอายุ 5 วัน (สำหรับเห็ดหอม) และอายุ 3 วัน (สำหรับเห็ดนางรม) มาบ่มในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ความเข้มข้น 4 และ 8 มก. ต่อ มล. (ตามลำดับ)โดยมีแมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์ ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ (ที่พีเอช 5.5 สำหรับเห็ดหอม และ 5.0 สำหรับเห็ดนางรม) เป็นออสโมติกสเตบิไลเซอร์ โดยสามารถแยกโพรโตพลาสต์ได้จำนวน 6.6×10^6 และ 2.6×10^7 โพรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร สำหรับเห็ดทั้ง 2 ชนิดตามลำดับ สำหรับการรวมโพรโตพลาสต์ ทำโดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วยโพลีเอทธิลีนไกลคอล 6000 ความเข้มข้น 40% บ่มเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำโพรโตพลาสต์มาบ่มในอาหารชักนำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์เป็นเวลา 9-11 วัน พบว่ามีเชื้อลูกผสม 7 สายพันธุ์ที่มี clamp connection ซึ่งได้แก่ PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17, และ PL21 และเมื่อนำมาศึกษารูปแบบไอโซไซม์ โดยใช้เทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อบ่งบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง พ่อ แม่ และลูกผสม พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase และ malate dehydrogenase สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดหอมเห็ดนางรมและลูกผสม ส่วนรูปแบบของ phosphogluconate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase และ laccase โดยทั่วไป ไม่อาจพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่และลูกผสมได้ สำหรับการทดลองด้านการเพาะเห็ดลูกผสมให้เกิดดอกพบว่าเห็ดลูกผสมที่สามารถเพาะให้ออกดอก โดยทั่วไปมีลักษณะคล้ายเห็ดนางรมมากกว่าเห็ดหอม ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบไอโซไซม์ ที่พบว่าลูกผสมส่วนมากมีแถบไซโมแกรมเหมือนของเห็ดนางรมทุกแถบแต่มีแถบที่เหมือนของเห็ดหอมเพียงบางแถบเท่านั้น

Thesis Title	Protoplast Fusions between *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* and Hybrid Detections by Isozyme Studies
Student	Ms.Pajaree Intarathongkom
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2003
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr. Pannee Dhitaphichit

ABSTRACT

Protoplasts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* were derived from 5 days- (for *L. edodes*) and 3 days-(for *P. ostreatus*) old mycelia by incubating in 4 and 8 mg. /ml. Lysing Enzyme supplemented with 0.6 molar $MgSO_4$ in 0.02 molar sodium maleate buffer as osmotic stabilizer and the results were that 6.6×10^6 (of *L. edodes*) and 2.6×10^7 (of *P. ostreatus*) protoplasts/ml. were obtained. Protoplast fusion of the two species were performed by using 40% polyethylene glycol 6000 and seven fusants (PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 and PL21) containing clamp connections were obtained. When isozyme studies were performed, only esterase and malate dehydrogenase gave results in showing the relationships between the two parents and the hybrids. For fusants those produced fruitbodies on sawdust cultures, it was found that generally the morphology of these fusants were more similar to that of *P. ostreatus* than to *L. edodes* which was relevant to the results of the zymogrames obtained that the fusants had all the bands of *P. ostreatus* but had only some bands of *L.edodes*.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ ในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต ที่ได้ให้ความกรุณา ให้คำแนะนำ และคำปรึกษา รวมทั้งการเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ที่ถูกต้อง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ และอาจารย์ อัญชลี เชียงกูล ที่กรุณาให้คำปรึกษา ให้ข้อคิดเห็นและเสนอแนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ ต่อการทำวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ ประสิทธ์ และ คุณแม่ อุรัญ อินทรทองคำ ด้วยความซาบซึ้ง เนื่องจากเป็นผู้ซึ่งมอบความรัก และกำลังใจอันยิ่งใหญ่ และให้การสนับสนุนเป็นอย่างดีเลิศจนกระทั่งได้มีวันนี้ของลูก

ขอขอบคุณ คุณจรัสรัช เกตุหลิม และคุณพรทิพย์ ภูมิแกดำ ที่ช่วยให้คำแนะนำในการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณกัญจน์ธิดา คุณปาลม์ อินทรทองคำ ที่เป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณประเสริฐวิทย์ คำแพง คุณพยอม เกียรติกำจร คุณจิราพร นิลฉวี คุณสาทินี ซื่อตรง และคุณทวีสิริ มาลาพันธุ์ รวมทั้งเพื่อนนักศึกษาปริญญาโททุกๆคนที่เป็นกำลังใจและมีส่วนช่วยสนับสนุนในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณแม่แดง และคุณชนิสสา โอภาส และพี่น้องที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จได้

ขอขอบคุณ พระเยซูคริสต์ที่ทรงประทานพระคุณ ความรัก กำลัง และสติปัญญาในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ปาจารีย์ อินทรทองคำ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....IV

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง.....VIII

สารบัญภาพ.....X

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 เห็ดหอม.....3

2.2 เห็ดนางรม.....6

2.3 การรวมโพโตพลาสต์.....7

2.3.1 ขั้นตอนการแยกโพรโตพลาสต์.....7

2.3.2 ขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์.....13

2.3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรวมโพรโตพลาสต์.....13

2.3.4 การกลับคืนของผนังเซลล์หรือการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสต์.....16

2.3.5 การวิเคราะห์เชื้อที่ได้จากการทำโพรโตพลาสต์ฟิวชั่น.....17

2.4 หลักการและเทคนิคทางอิเลคโตรฟอรีซิส.....19

2.5 อิเลคโตรฟอรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล.....19

2.6 ไอโซไซม์.....20

2.6.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโพรโตพลาสต์และไอโซไซม์.....21

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....23

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....23

3.1.1 แหล่งของเชื้อจุลลินทรีย์.....23

3.1.2 สารเคมี.....23

3.1.3 อุปกรณ์.....25

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....26

3.2.1 การรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมเห็ดนางรม
โดยใช้สาร PEG 6000.....26

3.2.2 การคัดเลือกฟิวแซนท์.....27

3.2.3 การศึกษาลักษณะของลูกผสม.....27

3.2.4 การศึกษาไอโซไซม์.....28

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....31

4.1 ผลการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม..... 31

4.2 ผลการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและนางรม.....32

4.3 ผลของการคัดเลือกฟิวแซนท์.....33

4.4 ผลของการศึกษาลักษณะของลูกผสม.....33

4.4.1 ผลการตรวจดูการเกิด clamp connection.....33

4.4.2 ผลการวัดอัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมที่อุณหภูมิต่างๆ.....35

4.4.3 ผลการวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใยฟิวแซนท์.....40

4.4.4 ผลการทดลองการเพาะให้เกิดดอกของฟิวแซนท์.....41

4.5 ผลของการศึกษาไอโซไซม์อิเลคโตรฟอรีซิส.....43

4.5.1 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ esterase.....44

4.5.2 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ malate dehydrogenase.....44

4.5.3 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase.....50

4.5.4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ phosphogluconate dehydrogenase.....52

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.5.5 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ laccase.....54
4.6 ผลการวิเคราะห์ไซโมแกรม.....55

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....56

บรรณานุกรม.....57

ภาคผนวก.....62
ภาคผนวก ก.....62
ภาคผนวก ข.....63
ภาคผนวก ค.....65
ประวัติผู้เขียน.....78

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ตัวอย่างสารPoly Saccharide ที่พบในเห็ด.....5

2.2 ค่า% เหมาะสมกับช่วงโมเลกุลของสาร.....20

2.3 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.) ของเส้นใยเห็ดหอม เห็ดนางรม
และเห็ดลูกผสม (บนอาหาร PDA โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน
เป็นเวลา 7 วัน.....36

2.4 น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยเห็ดลูกผสมที่เลี้ยงไว้ในอาหาร MYG
อุณหภูมิ 25 องศเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน.....41

4.3 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ esterase ของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือ
เห็ดหอมโมโนคาริออน(Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)
และเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21.....47

4.4 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ esterase ของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่คือ
เห็ดหอมโมโนคาริออน(Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)
เห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi)
และเห็ดลูกผสมF42, F220, F266 และ F342 47

4.5 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ malated dehydrogenase ของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือ
เห็ดหอมโมโนคาริออน(Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)
และเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21 50

4.6 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ malated dehydrogenase ของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่คือ
เห็ดหอมโมโนคาริออน(Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)
เห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi)
และเห็ดลูกผสมF42, F220, F266 และ F342 50

4.7 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ glucose-6-phosphogluconateของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือ
เห็ดหอมโมโนคาริออน(Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)
และเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21.....52

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.8 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ glucose-6-phosphogluconateของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่คือ
เห็ดหอมโมโนคาริออน(Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)
เห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi)
และเห็ดลูกผสมF42, F220, F266 และ F342 54

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 วงชีวิตของเห็ดหอม (ปัญญา โพธิ์จิติรัตน์, 2537).....4

2.2 แสดงลักษณะวงชีวิตของเห็ดนางรม ซึ่งเป็นแบบ Heterothallic Life Cycle (ปัญญา โพธิ์จิติรัตน์, 2537) 8

4.1 ลักษณะของโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดหอมโมโนคาริออน (400X).....31

4.2 ลักษณะของโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมโมโนคาริออน (400X).....32

4.3 แสดงโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรมที่เจริญในอาหารชักนำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสระยะเวลา 9 วัน 33

4.4 ลักษณะของเส้นใยเห็ดลูกผสมที่ตรวจพบ clamp connection a = PL6, b = PL7, c = PL9, d = PL12, e = PL15, f = PL17, g = PL21 34

4.5 ลักษณะของเส้นใยไดคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดนางรม (400X) a = เห็ดหอม b = เห็ดนางรม 35

4.6 ลักษณะของเส้นใยไดคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดนางรม (400X) a = เห็ดหอม b = เห็ดนางรม 35

4.7 เส้นใยเห็ดลูกผสม 7 สายพันธุ์ ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน 37

4.8 เส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดนางรมและเส้นใยไดคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดนางรมที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน 37

4.9 เส้นใยเห็ดลูกผสม 7 สายพันธุ์ ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน 38

4.10 เส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดนางรมและเส้นใยไดคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดนางรมที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน 38

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.11 เส้นใยเห็ดลูกผสม 7 สายพันธุ์ ที่เจริญบนอาหาร PDA
ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน 39

4.12 เส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดนางรมและเส้นใย
ไดคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดนางรมที่เจริญบนอาหาร
PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน 39

4.13 เส้นใยเห็ดลูกผสม 7 สายพันธุ์ ที่เจริญบนอาหาร PDA
ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน 40

4.14 เส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดนางรมและเส้นใย
ไดคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดนางรมที่เจริญบนอาหาร
PDA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน 40

4.15 ดอกเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL6 ที่เจริญบนวัสดุเพาะ
a = อายุ 3 วัน b = อายุ 7 วัน 42

4.16 ดอกเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL9 ที่เจริญบนวัสดุเพาะ
a = อายุ 3 วัน, b = อายุ 7 วัน , c = อายุ 7 วัน และ d = อายุ 8 วัน..... 42

4.17 ดอกเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL12 ที่เจริญบนวัสดุเพาะ
a = อายุ 3 วัน, b = อายุ 7 วัน..... 43

4.18 ดอกเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL15 ที่เจริญบนวัสดุเพาะ a และ b = อายุ 7.....43

4.19 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ estrase ของเห็ดลูกผสม
PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21 และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่
คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)..... 45

4.20 ไดอะแกรมแสดงลักษณะของไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ esterase
ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21
และสายพันธุ์พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono)
และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)..... 45

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.21 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ estrase ของเห็ดลูกผสม
F42, F220, F249, F266, และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi)
เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่
คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono).....46
4.22 ไดอะแกรมแสดงลักษณะของไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ esterase
ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249, F266, และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi)
เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่
คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono).....46
4.23 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ malate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม
PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21 และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่
คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono) 48
4.24 ไดอะแกรมแสดงลักษณะของไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ malate dehydrogenase
ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21
และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono)
และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono) 48
4.25 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ malate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม
F42, F220, F249, F266, และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi)
เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่
คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono).....49
4.26 ไดอะแกรมแสดงลักษณะของไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์
malate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249, F266, และ F342
และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi)
และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono)
และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)..... 49

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.27 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ glucose-6-phosphogluconate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21 และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono) 51

4.28 ไดอะแกรมแสดงลักษณะของไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ glucose-6-phosphogluconate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21 และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono) 51

4.29 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ glucose-6-phosphogluconate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249, F266, และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน(Pomono)..... 52

4.30 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21 และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)..... 53

4.31 ไดอะแกรมแสดงลักษณะของไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21 และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)..... 53

4.32 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249, F266, และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน(Pomono)..... 54

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

เห็ดเป็นคำที่ดึงดูดความสนใจของคนทั่วไป คนไทยส่วนใหญ่รู้จักและนิยมใช้เห็ดมาเป็นอาหารนานมาแล้ว และในปัจจุบันนี้มีการส่งเสริมจากทั้งภาครัฐบาล และเอกชนทำให้มีเกษตรกรเพาะเห็ดมากขึ้นทั้งยังเพาะกันได้ทุกภาคทุกฤดูของประเทศ เช่น เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumer) และเห็ดหอม (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler)

เห็ดนางรมมีพื้นเพเดิมมาจากทางยุโรป สามารถเพาะให้เกิดดอกได้ตลอดทั้งปี ทั้งยังเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางอาหารสูงคือ ประกอบไปด้วยธาตุอาหารประเภทคาร์บอไฮเดรต โปรตีน และไขมัน รวมทั้งแร่ธาตุต่างๆและวิตามินหลายชนิด (สมศักดิ์ วรรณศิริ และคณะ, 2530) ส่วนเห็ดหอมเป็นเห็ดชนิดหนึ่งที่รสชาติดีมาก และมีกลิ่นหอมเป็นเอกลักษณ์ของมันเอง ซึ่งได้รับความนิยมแพร่หลายและมีราคาแพง โดยปกติพบเห็ดหอมขึ้นกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศที่มีอากาศอบอุ่น เช่น แถบเอเชียตะวันออก ตั้งแต่ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน เกาะไต้หวัน ญี่ปุ่น เกาหลี แต่ไม่พบในประเทศเขตหนาวและเขตร้อนเลย (กลุ่มบัณฑิตเกษตรก้าวหน้า, 2538)

ประเทศไทยสามารถเพาะเห็ดหอมได้ โดยการเพาะเชื้อแล้วเอามาเพาะต่อในก้อนขี้เลื่อย ทำให้มีผู้เพาะเพื่อจำหน่ายกันอย่างแพร่หลาย ในภาคเหนือของประเทศไทยซึ่งมีดินฟ้าอากาศที่หนาวเย็นกว่าทางภูมิภาคอื่นๆ เห็ดหอมจึงออกดอกได้ดี (ธนพันธุ์ เมธาพิทักษ์, 2537)

ปัจจุบันได้มีผู้ทำการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์เห็ดกินได้หลายชนิด และได้นำเทคนิค protoplast fusion มาใช้ทำให้ได้เห็ดลูกผสม จรัสรัช มั่นถาวร (2544) ได้สร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม ซึ่งเป็นเห็ดที่ต่างสกุลกัน โดยวิธีการรวมโพรโตพลาสต์ ทำให้ได้ฟิวแซนท์หรือลูกผสมจำนวน 5 สายพันธุ์คือ F42, F220, F266, F249, และ F342 ในงานวิจัยนี้จะทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมเช่นกัน และจะตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ที่ได้ รวมทั้งฟิวแซนท์ที่ได้จากการทดลอง โดย จรัสรัช มั่นถาวร (2544) โดยใช้เทคนิค ไอโซไซม์ เพื่อเป็นแนวทางในการวิเคราะห์ความแตกต่างของฟิวแซนท์และเพื่อพิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่ ลูก ที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมทั้งที่ได้เป็นงานวิจัยในครั้งนี้ และของจรัชรัช (2544)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม
2. เพื่อศึกษาลักษณะของฟีวแซนท์ที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม
3. เพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ และลูกในงานวิจัยครั้งนี้ ที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์
4. เพื่อพิสูจน์ความเป็นฟีวแซนท์ที่ได้จากงานวิจัยของจรัสรัช (2544) โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอม และเห็ดนางรม และตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟีวแซนท์โดยใช้วิธีการศึกษารูปแบบของไอโซไซม์โดยใช้เอนไซม์ esterase, malate dehydrogenase, phosphogluconate dehydrogenase, glucose-6-phophate dehydrogenase และ laccase

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตเห็ดลูกผสมระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม โดยวิธีจากการรวมโพรโตพลาสต์
2. สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟีวแซนท์ที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมโดยใช้วิธีการศึกษารูปแบบไอโซไซม์
3. เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีรวมโพรโตพลาสต์ในเห็ดชนิดอื่น ๆ ต่อไป

บทที่ 2
หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 เห็ดหอม

เห็ดหอมถูกจำแนกตามลำดับขั้นดังนี้ (Alexopoulos and Mims, 1979)

Class : Basidiomycetes

Subclass : Holobasidiomycetidae

Order : Agaricales

Family : Tricholomataceae

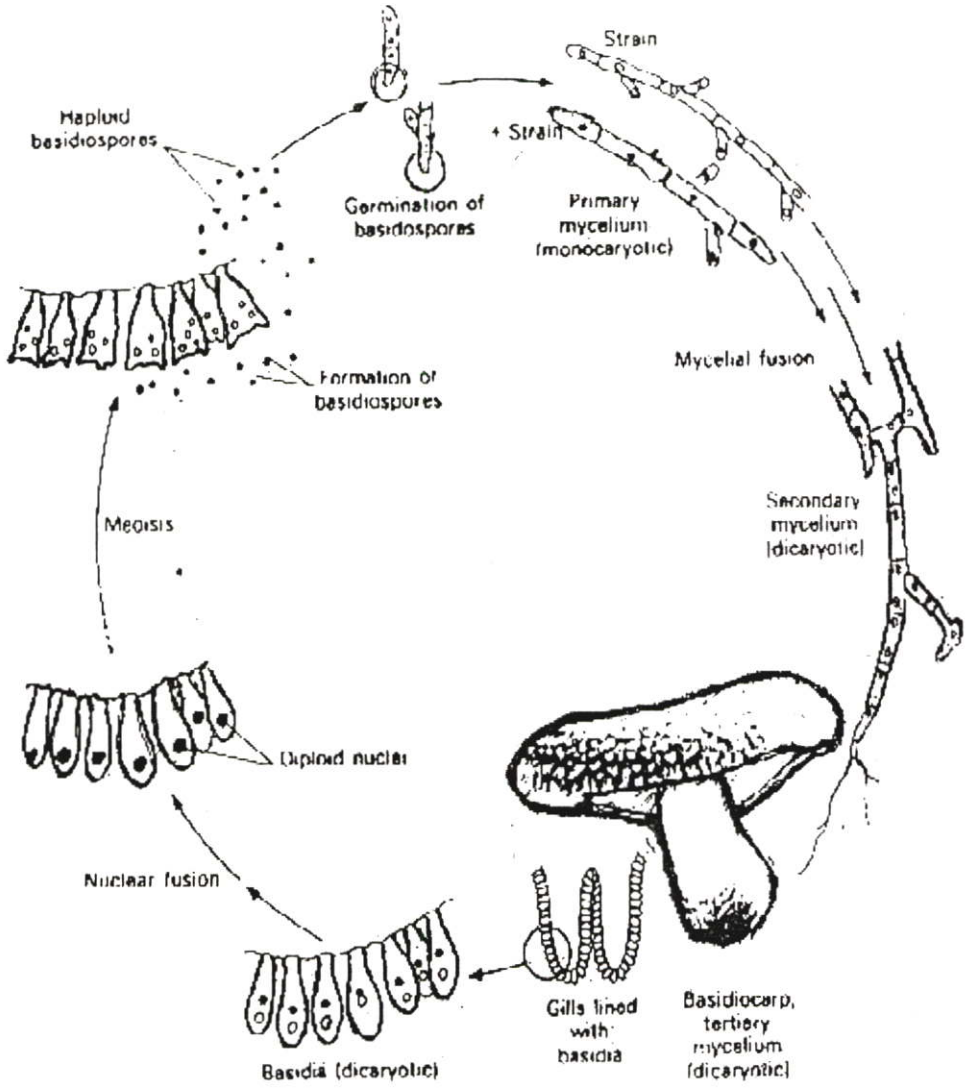
Genus : Lentinula

Species : edodes

เห็ดหอมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinula edodes* (Berk.) Singer. มีชื่อสามัญว่า Hoang-Ko หรือ Shiitake หมวกดอกมีลักษณะกลมซึ่งด้านบนจะมีสีน้ำตาล น้ำตาลปนแดง หรือน้ำตาลเข้ม ขนาดของหมวกดอกจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเห็ดหอม บางพันธุ์อาจมีขนหรือเกล็ดหยาบๆ ติดอยู่บนหมวก ครีบดอกมีลักษณะเป็นแผ่นบางสีขาว เรียงเป็นรัศมีรอบก้านดอก เมื่อดอกเห็ดแก่ ครีบดอกจะมีสีเข้ม ส่วนสปอร์ (basidiospore) ของเห็ดหอมมีผนังบาง และมีลักษณะค่อนข้างกลม สปอร์พิมพ์มีสีขาวครีม มีขนาดประมาณ 10.62 x 11.25 ไมโครเมตร ก้านดอกมีสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อน แต่ถ้าถูกกับอากาศจะมีสีเข้ม ก้านดอกมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 เซนติเมตร วงชีวิตของเห็ดหอมเป็นแบบ Heterothallic ดังแสดงในภาพที่ 2.2 (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์, 2537)

เห็ดหอมเป็นเห็ดที่มีรสชาติดี มีกลิ่นหอม และมีสรรพคุณในทางยาหลายประการ เช่น ช่วยลดไขมันในเลือด และต่อต้านไวรัสบางชนิด ในเห็ดหอมยังมีสารชื่อ Lentinan และ KF-2 ช่วยต้านหรือป้องกันโรคมะเร็งและยังมีสารประกอบอื่น ๆ (ตารางที่ 2.1) ที่ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโรคหวัดและโรคความดันโลหิตสูง และยังมีคุณค่าทางอาหารสูง มีโปรตีนสูงรองจากเนื้อสัตว์ จึงเป็นที่นิยมกันทั่วไปและทำให้มีราคาแพง ปกติเห็ดหอมจะขึ้นในประเทศที่มีอากาศหนาว เช่น ประเทศจีนและญี่ปุ่น โดยในธรรมชาติจะขึ้นตามขอนไม้เก่าที่ล้มอยู่ตามป่า การเพาะเห็ดหอมในถุงพลาสติก ได้ประสบความสำเร็จมา ตั้งแต่ พ.ศ. 2521 ปัจจุบันการเพาะเห็ดหอมด้วยวิธีเพาะเลียนแบบธรรมชาติโดยไม่ต้องใช้ไม้ก่อ โดยใช้หลักการที่ว่า เห็ดหอมสามารถย่อยเซลลูโลสและลิกนินได้ ขี้เลื่อยจึงเป็นวัสดุเพาะที่ใกล้

เคียงที่สุด และช่วยแก้ไขปัญหาการนำไม้ก่อมาใช้เพาะเห็ดหอมได้อีกทางหนึ่ง (พิมพ์กานต์ อร่ามพงษ์พันธุ์, 2541)



ภาพที่ 2.2 วงชีวิตของเห็ดหอม (ปัญญา โพธิ์จิดิรัตน์, 2537)

เห็ดหอมมีวงชีวิตแบบ Heterothallic เมื่อดอกเห็ดเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้าง basidiospore ซึ่งมีโครโมโซมชุดเดียว (n) เมื่อสปอร์ปลิวไปตกในบริเวณที่เหมาะสม จะงอกเส้นใย ระยะที่หนึ่ง (primary mycelium) ออกมา เส้นใยระยะที่หนึ่งจากสปอร์ที่เข้ากันได้จะรวมตัวกันเป็นเส้นใยระยะที่สอง (secondary myccelium) เส้นใยระยะที่สองจะมีการสะสมอาหาร และพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดต่อไป

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างชนิดและการออกฤทธิ์ของสาร polysaccharide ที่พบในเห็ดหอมและเห็ดอื่นๆอีกบางชนิด

Polysaccharide	ชนิดของเห็ด	การออกฤทธิ์
Lentinan	*Lentinula edodes* (เห็ดหอม)	ยับยั้งการเจริญของ ไวรัส HIV เพิ่มการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย
LEM (protein-bound polysaccharide)	*Lentinula edodes*	ช่วยรักษาโรคตับอักเสบชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง มีantitumor activity ในคนและสัตว์ โดยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย
PSK / Krestin (protein-bound polysaccharide)	*Trametes versicolor*	ช่วยยืดอายุของผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็ง
Polysaccharide	*Pleurotus ostreatus*	ลดระดับคอเลสเตอรอลในสัตว์ทดลอง
Polysaccharide	*Grifola frondosa*	ยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้องอก
Polysaccharide	*Ganoderma lucidum*	ยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้องอก กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย

ที่มา : www.rdi.gpo.or.th

2.2 เห็ดนางรม

เห็ดนางรมถูกจำแนกตามลำดับขั้นดังนี้ (Alexopoulos and Mims, 1979)

Class : Basidiomycetes

Order : Agaricales

Family : Agaricaceae

Genus : Pleurotus

Species : ostreatus

เห็ดนางรมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus ostreatus* (Jackex Fz.) Kummer Florida มีชื่อสามัญว่า oyster mushroom หรือ hiratake เป็นเห็ดกินได้มีรสชาติดีและมีคุณค่าทางโภชนาการ ในภาษาลาติน pleurotus มีความหมายว่า ลักษณะคล้ายใบหู และ ostreatus มีความหมายว่ารูปร่างเหมือนหอยนางรม เป็นเห็ดที่สามารถพบในพื้นที่เขตร้อนและในพื้นที่โดยทั่วไป (Hilber ,1997)

ดอกเห็ดนางรมมีลักษณะขาวนิ่มเมื่ออากาศร้อน และมีสีขาวอมเทาเมื่ออากาศเย็น ก้านดอกจะเป็นเนื้อเดียวกับหมวก เกิดเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกระจุก ก้านดอกชูตั้งขึ้นไปในอากาศ หันหน้าเข้าหาแสงสว่าง ครีบ (gills) สีขาวหรือสีเหลืองซีดยาวตลอด สปอร์ (basidiospore) รูปไข่ สปอร์พิมพ์เป็นสีขาวเทา ขนาดประมาณ 6-10 ไมครอน ดอกเห็ดกว้างประมาณ 3 - 8 นิ้ว สูง ประมาณ 6 นิ้ว ถ้าขึ้นตามธรรมชาติบนต้นไม้จะขึ้นลดหลั่นเป็นชั้นๆ ดอกอาจมีก้านหรือไม่มีก็ได้ ลักษณะของเส้นใย (mycelium) สีขาวเมื่อเลี้ยงในหลอดทดลองจะเจริญขึ้นฟูเต็มหลอด เห็ดนางรมมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสารประกอบจำพวกเซลลูโลส และลิกนินได้เป็นอย่างดี เห็ดนางรมสามารถมีชีวิตอยู่ในสภาพที่แห้งแล้งด้วยคลามิโดสปอร์ (chlamydospores) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย คือ 32 องศาเซลเซียส และต่อการสร้างดอกเห็ดคือ 25 องศาเซลเซียส ลักษณะวงชีวิตของเห็ดนางรมได้แสดงในภาพที่ 2.1 (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์, 2537)

เห็ดนางรมเป็นเห็ดได้รับความนิยมในการเพาะเลี้ยงเป็นอันดับหนึ่งของโลก (Chang 1996,1999; Miles and Chang, 1997) มีผลผลิตที่เพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า ระหว่างปี 1986 และ 1990 ซึ่งคิดเป็น 1 ล้านตันต่อปี (Chang, 1991) และในประเทศจีนพบว่ามีการผลิตได้ประมาณ 700,000 ตัน ส่วนในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการเพาะเลี้ยงเห็ดนางรม เป็นอันดับ 2 รองจากเห็ดกระดุม *(Agaricus bisporus*) และในปี 1995 ประเทศสหรัฐอเมริกาผลิตเห็ดนางรมได้ถึง 880 ตัน คิดเป็น 94 เปอร์เซนต์เพิ่มขึ้นจากทุก ๆปี (Wasser and Weis, 1999)

Cohen *et al.* (2002) พบว่าสาเหตุที่ทำให้เห็ดนางรมได้รับความสนใจมากในการบริโภคเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการเช่นมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และเกลือแร่ในปริมาณที่สูง แต่มีไขมัน

และโซเดียมในปริมาณที่ต่ำ นอกจากนี้เห็ดจำพวก Pleurotus ยังสามารถผลิตเอนไซม์ laccase, peroxidese, cellulase , hemicellulase และ xylanase ได้

2.3 การรวมโพรโตพลาสต์ (Protoplast Fusion)

การรวมโพรโตพลาสต์เป็นเทคนิคในการสร้างลูกผสมระหว่างเซลล์ 2 เซลล์ที่ไม่สามารถเข้าคู่กันได้โดยอาจเป็นเซลล์ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันซึ่งเซลล์ที่จะนำมารวมกันได้จะต้องปราศจากผนังเซลล์ เรียกเซลล์ที่รวมกันใหม่นี้ว่าฟิวแซนท์ (fusant) (Gurbachan, 1998)

วิธีการรวมโพรโตพลาสต์เป็นวิธีที่ง่ายเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี conventional method เพราะวิธี conventional method ต้องใช้หลายขั้นตอน ในการทำให้เกิดดอก เกิดสปอร์ และเกิดการงอกของสปอร์ แต่สำหรับเทคนิคการรวมโพรโตพลาสต์ เมื่อได้โพรโตพลาสต์แล้ว โพรโตพลาสต์จะรวมกันแล้วจึงเกิดการสร้างผนังเซลล์ จากนั้นจึงพัฒนาเป็นเส้นใยและดอกเห็ดซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วกว่า เทคนิคการรวมโพรโตพลาสต์จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์ของเห็ดกินได้และยังทำให้เกิดลูกผสมที่เป็น interspecific (ผสมข้ามชนิด) และ intergeneric (การผสมข้ามสกุล) ในเห็ดกินได้ และข้อได้เปรียบคือ สามารถใช้ได้ในกรณีที่วิธี conventional method ไม่สามารถทำให้เกิดการผสมระหว่างเส้นใยได้ (Peberdy, 1987)

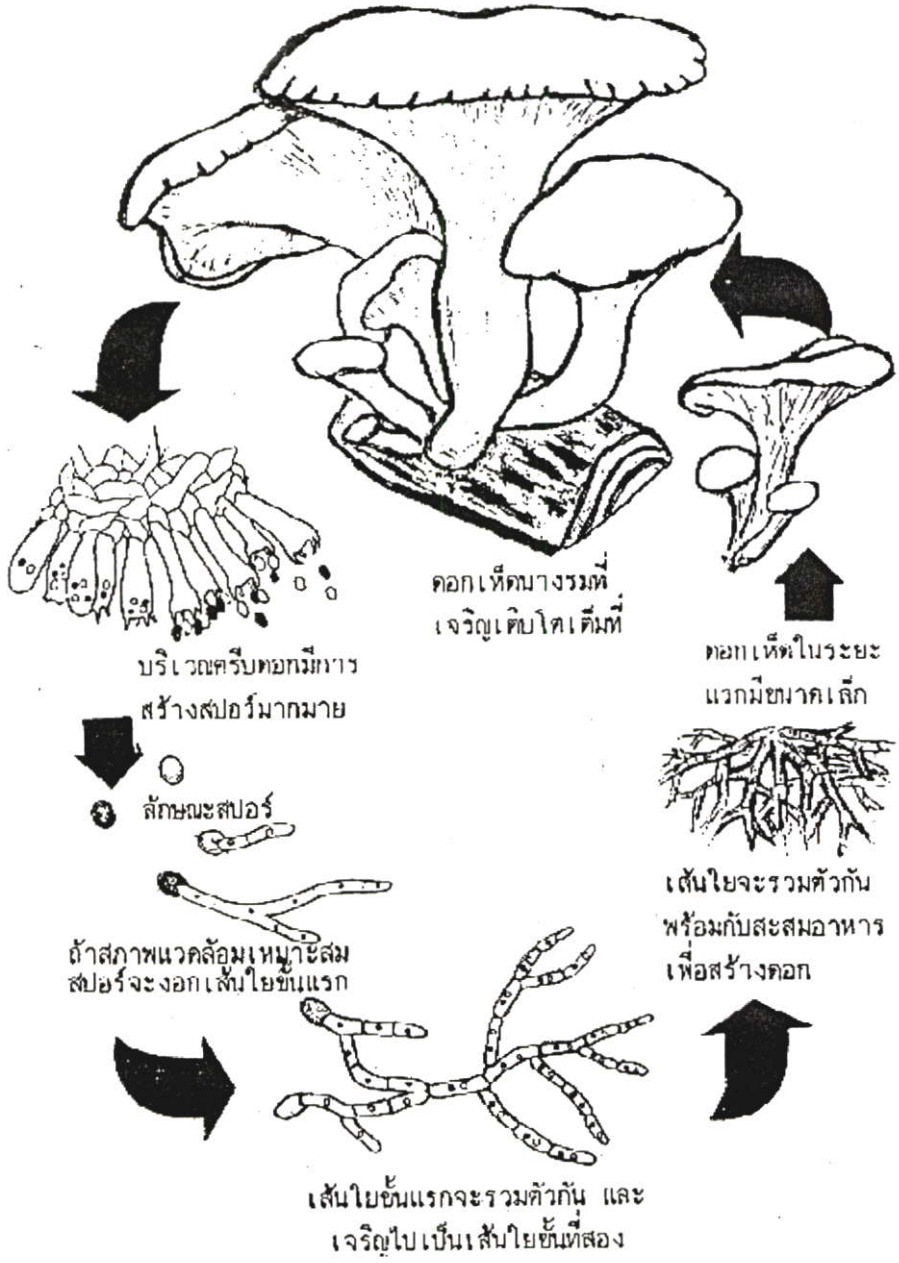
ขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์มี 3 ขั้นตอน ตามลำดับ คือ การแยกโพรโตพลาสต์ (Protoplast Isolation) การรวมโพรโตพลาสต์ (Protoplast Fusion) และ การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ (Protoplast Regeneration) ที่รวมกันแล้ว

2.3.1 ขั้นตอนการแยกโพรโตพลาสต์ (Protoplast Isolation)

การแยกโพรโตพลาสต์ คือ การเตรียมเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่ไม่มีผนังเซลล์ โดยการทำลาย หรือย่อยผนังเซลล์ให้เหลือแต่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งการแยกโพรโตพลาสต์จะทำได้ 2 วิธี

2.3.1.1 วิธีกล (mechanical method)

เป็นวิธีแรกที่ใช้ในการแยกโพรโตพลาสต์ออกมา เช่น การใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูง การนำเซลล์ไปเขย่ากับลูกแก้วเพื่อให้เกิดแรงกระแทก และการใช้สารเคมีที่มีผลต่อเมตตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ วิธีกลนี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากเซลล์ถูกทำลายได้ง่ายและให้ปริมาณโพรโตพลาสต์น้อย และอัตราการอยู่รอดของโพรโตพลาสต์ต่ำ (Peberdy, 1979)



ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะวงจรชีวิตของเห็ดนางรม ซึ่งเป็นแบบ Heterothallic Life Cycle (ปัญญา โพธิ์จิติรัตน์, 2537)

2.3.1.2 วิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic method)

เป็นวิธีที่ย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ โดยการใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเนื่องจากจะให้โพรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ในปริมาณมาก สะดวกและควบคุมได้ดีกว่าวิธีกล ถ้าการสลายผนังเซลล์เกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์โดยมีผนังเซลล์บางส่วนเหลืออยู่จะเรียกลักษณะของเซลล์เช่นนี้ว่า สเฟียโรพลาสต์ (sphaeroplast) เมื่อการย่อยผนังเซลล์เกิดสมบูรณ์จะเรียกเซลล์เช่นนี้ว่า โพรโตพลาสต์ (protoplast) เมื่อผนังเซลล์ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ รูปร่างของเซลล์จะเปลี่ยนเป็นรูปร่างกลม (จรัสรัช มั่นถาวร, 2544)

ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโพรโตพลาสต์มีหลายประการ เช่น อายุของเซลล์ที่นำมาเตรียมควรมีอายุน้อย เนื่องจากรามีการเจริญที่ปลายสายใยและเจริญต่อไปเรื่อย ๆ การเตรียมเส้นใยจึงมักนิยมเตรียมในอาหารเหลวเพื่อให้ได้ปริมาณเส้นใยในช่วงของ log phase ทำให้ได้ปริมาณของโพรโตพลาสต์มาก ดังนั้นการทราบกราฟการเจริญเติบโต (growth phase) ของแต่ละสายพันธุ์จึงเป็นประโยชน์ในการแยกโพรโตพลาสต์ (จรัสรัช มั่นถาวร, 2544)

นอกจากนี้ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้องค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกันไป การเติมกรดอมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะช่วยให้ผนังเซลล์ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ได้ง่ายขึ้น และการเติมสารอาหารบางชนิดให้เซลล์ขณะที่เลี้ยงเช่น thiol compound จำพวก dihiothreitol , ß-mercaptoethanal หรือ thioglycolate ก่อนนำเซลล์มาย่อยผนังเซลล์ จะช่วยให้เอนไซม์สลายผนังเซลล์ได้ดีขึ้น และเกิดโพรโตพลาสต์ได้ง่าย (จรัชรัส มั่นถาวร, 2544)

ในการแยกโพรโตพลาสต์จากเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใยนั้น ต้องมีการย่อยสลายองค์ประกอบส่วนที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ซึ่งมีปริมาณสูง คือประมาณ 60-80 เปอร์เซนต์ ของผนังเซลล์ นอกจากนั้นโพลีแซคคาไรด์ที่พบในเชื้อราชนิดต่าง ๆ ยังมีชนิดและปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนั้น lytic enzyme ที่ใช้จำเป็นต้องประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด โดยปกติ key lytic enzyme ที่ใช้ประกอบด้วยเอนไซม์ chitinase และ glucanase สำหรับ lytic enzyme ที่พบว่าใช้ได้ผลดีสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์ของเชื้อรา ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยมีหลายประเภท เช่น เอนไซม์จากหอยทาก *Helix pomatia* ซึ่งมีชื่อทางการค้าหลายอย่างเช่น helicase, glusuldase, sulfatase และ cytohelicase เอนไซม์ Novozyme (=TM234 (NOVO industries, Denmark)) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายผนังเซลล์ของราหลายกลุ่ม เช่น *Ascomycetes* และ *Basidiomycetes* ราชนิดที่ผนังเซลล์มีองค์ประกอบของ chitin สูง อาจเติมเอนไซม์ chitinase ลงไปช่วยย่อย จะทำให้ปริมาณโพรโตพลาสต์ที่ได้สูงขึ้น (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์, 2536) เอนไซม์ zymolyase ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Arthrobacter lustes* เอนไซม์ cellulase จากบริษัท Novo ที่เตรียมได้จากสายพันธุ์รา (สุมาลี พิชญางกูร, 2541)

เอนไซม์จากเชื้อ *Thrichoderma hazianum* ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดเช่น cellulase, xylanase, alpha (1-3) glucan, glucanohydrolase, beta (1-3) glucan glucanohydrolase และ neutral protease นอกจากนี้ยังมี เอนไซม์ผสม เช่น เอนไซม์ผสมระหว่าง chitinase, zymolyase, และ hemicellulase ระหว่าง chitinase กับ Novozyme 234 ระหว่าง chitinase กับ zymolyase และระหว่าง chitinase กับ เอนไซม์จากหอยทาก และจากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์พบว่า เอนไซม์ที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ โดยเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์พวกแอคติโนมัยสีท เช่น *Streptomyces* และ *Micromonospora* ให้ผลในการแยกโพรโตพลาสต์ของเชื้อราดีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้าทั่วไป เพราะ crude enzyme ที่ผลิตได้มีองค์ประกอบของเอนไซม์หลายชนิด

นอกจากนี้อาจใช้สารบางอย่าง เพื่อทำให้โพรโตพลาสต์ได้มากขึ้นโดยเติมเข้าไปก่อนที่จะนำเซลล์ไปทำโพรโตพลาสต์ เช่น ใช้สารประกอบ thiol, beta-mercaptoethanol dithiothreitol และ glutathione และ cystein โดยจะไปทำลายผนังเซลล์ได้ง่ายขึ้น (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2536)

เนื่องจากโพรโตพลาสต์เป็นโครงสร้างที่แตกง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมซีส จึงจำเป็นต้องเก็บรักษาโพรโตพลาสต์ให้คงตัวอยู่ได้ ซึ่งสารละลายที่ใช้สำหรับรักษาให้โพรโตพลาสต์คงตัวเรียกว่า osmotic stabilizer, osmoticum หรือ osmoticant ซึ่งนิยมใช้สารละลายที่เป็น hypertonic คุณสมบัติที่สำคัญของ osmotic stabilizer คือต้องไม่เป็นพิษต่อโพรโตรพลาสต์และไม่ลดกิจกรรมของ lytic enzyme และควรเป็นสารละลายที่ส่งเสริมกิจกรรมของ lytic enzyme สารที่นิยมนำมาใช้เป็น osmotic stabilizer มี 2 ชนิด คือ สารละลายของน้ำตาล หรือ น้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น raffinose, sucrose, mannitol และอีกชนิดที่นิยมใช้ คือ สารละลายของเกลืออนินทรีย์ เช่น KCI $MgSO_4$ และ NaCl เป็นต้น ซึ่งชนิดและความเข้มข้นของ osmotic stabilizer ที่ใช้จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์

Yanagi and Takebe (1984) ได้ทำการทดลองใช้เอนไซม์ผสมระหว่างไคติเนสและเซลลูเลสทำให้ได้โพรโตพลาสต์จากเส้นใยของ *Coprinus macrorhizus* มากกว่า 10^8 ต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 1ชั่วโมง และ โพรโตพลาสต์ จาก *C. macrorhizus* สามารถสร้างเส้นใยได้ในความถี่ 2-50 เปอร์เซ็นต์ โพรโตพลาสต์ที่ได้เตรียมโดยเลี้ยงเส้นใยในอาหารวุ้นเอียงที่ประกอบด้วยมอลท์สกัด 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 0.4 เปอร์เซ็นต์ (MYG medium) จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MYG และเลี้ยงเส้นใยเป็นเวลา 50-80 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเส้นใย 200-400 มิลลิกรัม (น้ำหนักเปียก) ใส่ลงในสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแมนนิทอล 0.5 โมล และโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมล ที่ pH 5.5 โดยสารละลายเอนไซม์มาตราฐานประกอบด้วย ไคติเนส 0.2 เปอร์เซนต์ และ เซลลูเลส โอโนซูก้า R 10 2 เปอร์เซนต์ และกรองสาร

ละลายเอนไซม์ก่อนที่จะนำไปใช้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจนับจำนวนโพรโตพลาสต์ด้วยเฮมาไซโตมิเตอร์ ซึ่งโพรโตพลาสต์ที่ได้จะมีความเสถียรมากที่สุดในสารละลายแมนนิทอล 0.5-0.7 โมลแต่ในขณะเดียวกัน ซอลบิทอล แมกนีเซียมซัลเฟต และ โปแตส เซียมคลอไรด์ ก็เป็นออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน พบว่าโพรโตพลาสต์ที่ได้จาก *Pleurotus ostreatus, Pholiota nameko, Tremella fuciformis* และ *Lentinus edodes* มีปริมาณ 2-5 x 10^7 ต่อมิลลิลิตร และพบว่าวิธีเดียวกัน ก็สามารถทำให้เกิดโพรโตพลาสต์ในเห็ดกินได้สายพันธุ์อื่นๆด้วย

Yukitaka *et al.*, (1994) ได้ค้นพบวิธีการใหม่ที่มีประสิทธิภาพ ในการแยกโพรโตพลาสต์ และการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ คือการสร้าง dedikaryotizing จากเส้นใยไดคาริออน ของ *Lentinula edodes* โดยนำโพรโตพลาสต์ ที่เกิดจาก ไดคาริออน ไปบ่มในอาหารที่ทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่ามีเส้นใยที่เริ่มสร้างผนังเซลล์ และเกิดการงอกของเส้นใย ได้ 11 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 3 วัน และสามารถสังเกตเห็น โคโลนี ได้หลายขนาดภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 7 วัน และโดยการแยกเอาโคโลนี ที่เล็กกว่าโคโลนีอื่น ที่มองเห็นได้และตรวจพบ neohaplont ที่ความถี่ 40-92 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างที่เป็น ไดคาริออน และพบว่ามีส่วนประกอบของทั้งสองนิวเคลียส โดย neohaplont ได้แสดงให้เห็นถึงการเจริญของเส้นใยที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม neohaplont มีความแข็งแรงซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางชีวภาพ เช่นลักษณะสันฐานของ โคโลนี และอิเลคโตรโฟริซีส ไซโมแกรม ของ esterase และ malate dehydrogenase ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถรักษาลักษณะเด่นทางพันธุกรรมไว้ได้

เนื่องจากไดคาริออน เป็นลักษณะเด่นอย่างหนึ่งที่พบในวงชีวิตของเห็ดชั้นสูงเช่น basidiomycetes ซึ่งเกิดจากการจับคู่กันระหว่างโมโนคาริออนที่มียีน 1 หรือ 2 คู่ ที่เป็น incompatibility และไดคาริออน สามารถสังเกตได้ โดยดูจากคุณลักษณะทางสันฐานวิทยา มักจะพบนิวเคลียส 2 อัน และมีการสร้าง clamp connection ในแต่ละเซลล์ของเส้นใย ซึ่งสภาวะนี้มักจะเกิดขึ้นเป็นปกติและมีความเสถียรในการเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตามพบว่าใน basidiomycetes ชั้นสูงหลายชนิดนั้น ไดคาริออนสามารถเปลี่ยนกลับไปสู่สภาพ โมโนคาริออน โดยการทดลองทางกายภาพหรือทางเคมี (Yukitaka *et al.* 1994)

Michael H. Gold *et al.* (1983) ได้ทำการทดลองในการแยกโพรโตรพลาสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ ออกโซโทรฟ (auxotraph) ของ Basidiomycetes สายพันธุ์ *Phanerochaete chrysosporium* โดยเก็บเส้นใยโดยการกรองและล้างด้วย แมกเนเซียมซัลเฟต 0.6 โมล จากนั้น นำเส้นใย 0.1 ถึง 1.0 กรัม ใส่ลงในสารละลาย แมกเนเซียมซัลเฟต 0.6 โมล ที่ประกอบด้วย Novozyme 234 (0.1 กรัมต่อกรัมของเซลล์) และ cellulase CP (0.1 กรัมต่อกรัมของเซลล์) จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่

อุณหภูมิ 38 เซลเซียส แล้วจึงกรองเส้นใยออก และตกตะกอนโพรโตพลาสต์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และและทำการเจือจางในสารละลาย แมกเนเซียมซัลเฟต 0.6 โมล ตรวจนับโพรโตพลาสต์ด้วยเฮมาไซโตมิเตอร์

Yanagi *et al.* (1985) ทดลองแยกโพรโตพลาสต์ของ *Coprinus macrorhizus* พบว่า เอนไซม์ ไคติเนส เซลลูเลส และ เบต้า-กลูโคเนส ให้จำนวนโพรโตพลาสต์ $2x10^8$ ต่อมิลลิลิตร ภายในเวลา 2 ชั่วโมง และโพรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ในอาหาร complex medium ที่มี มอลท์ และยีสต์สกัดเป็นองค์ประกอบ และพบว่า ซูโครส เป็นออสโมติกสเตบิไลเซอร์ ที่ดีกว่า แมนนิทอล ในการสร้างโคโลนี

Masami *et al.* (1982) พบว่า เส้นใย *Tricholoma matstake* อายุ 15-25 วัน เหมาะสมสำหรับการทำโพรโพลาสต์ เมื่อบ่มด้วยสารละลายเอนไซม์ เป็นเวลา เป็นเวลา 30-60 นาทีจะเริ่มสังเกตเห็นโพรโตพลาสต์ และเมื่อเวลา 3-4 ชั่วโมง จะได้จำนวนโพรโพลาสต์สูงสุด ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลาง ของโพรโตพลาสต์ คือ 2-10 ไมโครเมตร

Toyomasu *et al.* (1986) ได้ทำการแยกโพรโตพลาสต์จากสายพันธุ์โมโนคาริออน ของ *P. ostreatus* 909 และ *P. salmoneo-stramineus* 01 ที่เป็นไดคาริออน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน PDA โดยโพรโตพลาสต์ ได้จากเส้นใยอายุ 2-3 วัน ในอาหารเหลว MYG โดยนำเส้นใยมาล้างด้วย แมนนิทอล 0.7 โมล และบ่มโดยการเขย่า เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสารละลายเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลส 2 เปอร์เซนต์ Onozuka Rs (Kinki Yakult Mfg. Co.) ไดซาเลส 2 เปอร์เซนต์ (Kyowa Hakko Kogyo Co.) และเบต้ากลูโคโรนิเดส H-2 (Sigma)

Eguchi *et al.* (1995) ได้ทำการแยกโพรโตพลาสต์ของ *P. ostreatus* และ*Agrocybe cylindracea* โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในสารละลายโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมล 2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย แมนนิทอล 0.6 โมล Novozym —234 2.0 เปอร์เซนต์ , Zymolyase — 20T 0.5 เปอร์เซนต์ และ ไคติเนส GODO 0.2 เปอร์เซนต์ โดยเขย่าด้วยความเร็ว 75 ครั้งต่อนาที และทำการกรองโพรโตพลาสต์ จากนั้นจึงทำให้โพรโตพลาสต์ตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 1100 รอบ เป็นเวลา 10 นาที และทำเจือจางโพรโตพลาสต์ด้วยแมนนิทอล 0.6โมล จะทำให้ได้โพรโตพลาสต์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (giant protoplast) โดยนำสารละลายโพรโตพลาสต์ที่ได้หยดลงในสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมใหม่และบ่มเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้โพรโตพลาสต์ที่มีขนาดใหญ่ 20 — 25 ไมโครเมตร แล้วจึงนำไปทำการรวมโพรโตพลาสต์

Zhao and Chang (1993) พบว่าการแยกโพรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลัก 3 ประการ คือ ลักษณะทางสรีรวิทยาของเซลล์ เอนไซม์ที่ใช้ย่อยผนังเซลล์และออสโมติกสเตบิไลเซอร์

2.3.2 ขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์ (Protoplast Fusion)

การรวมโพรโตพลาสต์เป็นการเหนี่ยวนำให้โพรโตพลาสต์ตั้งแต่ 2 โพรโตพลาสต์เกิดการรวมกัน สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

2.3.2.1 การใช้สารเคมีชื่อ polyethylene glycol (PEG)

โดยใช้สารเคมี PEG ร่วมกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ซึ่งเป็น fusogenic agent ทำให้โปรตีนที่ผนังเซลล์ถูกทำลายเกิดเป็นบริเวณที่ไม่มี phospholipid ทำให้เกิดการรวมตัวของโพรโตพลาสต์ สันนิษฐานว่า PEG เป็นตัวเชื่อมโพรโตพลาสต์ให้ติดกัน เนื่องจาก PEG มีประจุเป็นลบเล็กน้อย เพราะมีพันธะอีเธอร์ (ether linkage) จึงทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับประจุบวกของน้ำ โปรตีน คาร์บอไฮเดรต และสารอื่น ๆ ที่อยู่บนผิวของโพรโตพลาสต์ และเชื่อว่า PEG เป็นตัวทำให้โพรโตพลาสต์เข้ามารวมกลุ่มกัน (agglutination) เยื่อหุ้มเซลล์ของโพรโตพลาสต์แตะกันแล้วทำให้เกิดการรวมกัน และทำให้เกิดการสลายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) ทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่างกลุ่มของโปรตีน ที่ผิวของโพรโตพลาสต์ สิ่งที่ต้องคำนึงถึงการใช้ PEG เพื่อให้การรวมโพรโตพลาสต์ได้ผลอย่างมีประสิทธิภาพ คือ เวลาที่ใช้ PEG ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PEG และน้ำหนักโมเลกุลของ PEG (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2536)

2.3.2.2 การใช้กระแสไฟฟ้าหรือ อิเลคโตรฟิวชั่น (electrofusion)

เป็นการรวมโพรโตพลาสต์โดยอาศัยกระแสไฟฟ้ามาเหนี่ยวนำให้โพรโตพลาสต์เกิดการรวมกันโดยใช้หลักการของ electrophoresis โดย Zimmermann and Vienlen (1982) ได้ประดิษฐ์เครื่องมือที่เรียกว่า Zimmermann cell fusion instrument เมื่อนำโพรโตพลาสต์ไปไว้ในสนามกระแสไฟฟ้าสลับ โพรโตพลาสต์จะเคลื่อนมาเรียงต่อกันเป็นสายคล้ายสายไข่มุก จากนั้นจึงปล่อยไฟฟ้ากระแสตรงเป็นจังหวะ เยื่อหุ้มโพรโตพลาสต์จะเปิดออกและเกิดการรวมกัน (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2536)

2.3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรวมโพรโตพลาสต์

Zhang *et al.* (1995) ได้ทำการทดลองสร้างฟิวแซนท์ที่ได้จาก intraspecific ของ *Lentinus edodes* (*Lentunula edodes*) (Fu_2) โดยการรวมโพรโตพลาสต์ที่ได้มาจากเส้นใย monokaryotic ของสายพันธุ์ 740(2) และ 9101(12) ซึ่งตรวจสอบความเป็นฟิวแซนท์ได้โดยการตรวจสอบลักษณะด้านสัณฐานวิทยาของเส้นใย ตลอดจนวิเคราะห์ไอโซไซม์เพื่อตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วย

เอนไซม์ esterase และ catalase เมื่อทำการเพาะเลี้ยงฟิวแซนท์ที่ได้พบว่าเจริญได้เร็วกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ และมีลักษณะของเส้นใยต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่

Kiguchi and Yonagi (1985) ทำการรวมโพรโตพลาสต์ของ *Coprinus macrorhizus* โดย เจือจางโพรโตพลาสต์ ด้วยแมนนิทอล 0.5 โมล ที่ประกอบด้วย โซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ pH 5.5 50 มิลลิโมล ให้ได้โพรโตพลาสต์ $1x10^7$ ต่อมิลลิลิตร และนำสารละลาย โพรโตพลาสต์อย่างละ 1 มิลลิลิตรมาผสมรวมกัน และปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น นำมาตกตะกอน ใน สารละลายเพื่อรวมโพรตพลาสต์ ที่ประกอบด้วย โซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิโมล แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมล และ โพลีเอทธิลีนไกลคอน 30 เปอร์เซนต์ (PEG น้ำหนักโมเลกุล 4,000)

Masami *et al.* (1982) ได้ใช้ glycine-NaOH buffer (PH 8.0) ความเข้มข้น 0.05 โมล ที่ ประกอบด้วย แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 M และ โซเดียมคลอไรด์ 0.55 โมล ทำให้เกิดการรวมของ โพรโตพลาสต์ *Tricholoma matsutake* โดยการปั่นเหวี่ยงให้โพรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 นาที และทำการเจือจางโพรโตพลาสต์ด้วยสารละลายข้างต้น แล้วสังเกตการ รวมของโพรโตพลาสต์ใต้กล้องจุลทรรศน์

Toyomasu *et al.* (1986) ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *P. ostreatus* 909 และ *P. salmoneo-sstramineus* 01 โดยใช้วิธีของ Anne and Peberdy (1976) โดยใช้ PEG 4000 ความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ (w/v) และ glycine-NaOH 0.05 โมล (PH 9.0) และ $CaCl_2H_2O$ 50 มิลลิโมล บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการรวมกันของโพรโตพลาสต์

Michael H. Gold *et al.* (1983) ทำการแยกโพรโตพลาสต์ จากสายพันธุ์กลายของ ออกโซโทรฟ 2 สายพันธุ์ *Phanerochaete chrysosporium* โดยการทำให้ตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง และล้างด้วย แมกเนเซียมซัลเฟต 0.6 โมล 2 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จาก นั้นนำสารละลายที่ได้มาผสมกันและตกตะกอน โดยการปั่นเหวี่ยงแล้วนำโพรโตพลาสต์มาเจือจางใน PEG 30 เปอร์เซนต์ ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ 0.05 โมล ปริมาตร 10 มิลลิโมล (pH 7.5)

Eguchi *et al.*(1995) ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *Pleurotus osteratus* และ *Agrocybe cylindracea* ทำโดยใช้ PEG น้ำหนักโมเลกุล 1540, 4000 และ 6000 ความเข้มข้น 10-40 เปอร์เซนต์ ในเวลา 3-10 นาที และใช้แมนนิทอลเป็นออสโมติกสเตบิไลเซอร์ ที่ความเข้มข้น 0.2-0.5 โมล ที่ PH 5.0-9.0 ทำให้โพรโตพลาสต์เกิดการสร้างผนังเซลล์ โดยใช้ อาหาร minimal agar (1.5 เปอร์ เซนต์ pH 6.5) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแมนนิทอล 0.6 โมล เป็นออสโมติกสเตบิไลเซอร์ ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 90 มิลลิลิตร และเททับด้วยอาหารชนิดเดียวกันปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี

อุณหภูมิต่ำ (โดยลดความเข้มข้นของอะกาโรส เพียง 0.7 เปอร์เซนต์) โดยทำการบ่มเป็นเวลา 13 วันที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นมากกว่า 80 เปอร์เซนต์ จึงเกิดเป็นโคโลนีของเส้นใย จากการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโตพลาสต์

Okamura *et al.* (2000) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ ระหว่าง *L. sulphureus* และ *Hypsizygus marmoreaus* (ซึ่งเป็นเห็ดสายพันธุ์ basidiomycete ที่เพาะได้ง่าย) โดยใช้กระแสไฟฟ้าทำให้เกิดการรวมของโพรโตพลาสต์ และทำการคัดเลือกลูกผสมมา 43 สายพันธุ์ เพื่อวิเคราะห์โดย วิธีอิเลคโตรฟอรีซิส พบว่า ลูกผสม 4 สายพันธุ์มีแถบสีซึ่งแสดงรูปแบบของไอโซไซม์เหมือนกับของสายพันธุ์พ่อแม่ และ ดอกเห็ดที่เกิดจากลูกผสมมีลักษณะที่คล้ายกับ *H. marmoreaes* การรวมโพรโตพลาสต์ที่ได้จากเส้นใย monokaryotic และเป็น auxotrophic mutant ของ *Pleurotus ostreatus* และ *P. sajor-caju* ที่เตรียมในสภาวะเหมาะสมและ ใช้ PEG ในการรวมโพรโตพลาสต์ พบว่าได้ผลที่ดี โดยอัตราการเจริญและความหนาแน่นของเส้นใยจะแตกต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่ แต่ไม่สามารถเพาะให้เกิดดอกได้ (Matsumoto *et. al.* 1997)

Eguchi *et al.* (1995) พบว่าอัตราการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่าง *P. sajor – caju* และ *M. aitchisonii* โดยใช้กระแสไฟฟ้าคิดเป็น 19.2 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการรวมโพรโตพลาสต์แบบ pearl chain fusion ซึ่งมีค่า 3.9 เปอร์เซนต์ ส่วนวิธีการรวมด้วย PEG คิดเป็น 2.1 เปอร์เซนต์ และอัตราการรวมโพรโตพลาสต์ โดยใช้ giant – protoplast มีอัตราการรวมที่สูง ระหว่าง *P. ostreatus* และ *A. cylindracea* ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสำหรับการรวมโพรโตพลาสต์ของเชื้อพวก Basidiomycetes

Zhao and Chang (1996) ได้ทำการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่าง *Pleurotus ostreatus* และ *Schizophyllum commune* โดย ใช้ PEG ให้เกิดการรวมกันของ โพรโตพลาสต์ ที่เป็นสายพันธุ์ ออกโซโทรฟิคมิวแทนซ์ (auxotrophic mutant) ซึ่งความถี่ของการรวมกันของโพรโตพลาสต์เท่ากับ 7.3×10^{-5} พบว่าโพรโตพลาสต์ที่ได้เป็น monokaryotic เป็นหมัน และลูกผสมส่วนใหญ่มีปริมาณ DNA ในนิวเคลียส มากกว่าในสายพันธุ์พ่อ แม่ และไม่เกิด diploids และลูกผสมบางสายพันธุ์มีชิ้นส่วนของ พ่อแม่ ในนิวเคลียส และในไมโตรคอนเดรีย เมื่อทำการตรวจสอบ rDNA PCR

Liang *et al.* (2001) พบว่าฟิวแซนท์จำนวนมากที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์แบบ polarized protoplast ระหว่าง inactivated monokaryotic โพรโตรพลาสต์ของ *Schizophyllum commune* และ viable โพรโตพลาสต์ของ *Pleurotus sajor-caju* เมื่อทำการทดสอบพบว่า ฟิวแซนท์ที่ได้จะมีคุณลักษณะของ donor parent แทนที่จะเป็น recipient parent และหลังจากการทำ subculture หลายๆ ครั้ง พบว่าฟิวแซนท์สร้าง clamp connection และจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าภายในเส้นใยนั้น

มีนิวเคลียส 2 อัน ผลการทดลองทำให้ทราบว่า วิธีรวมโพรโตพลาสต์แบบ polarized protoplast จะมีผลต่อการผลิตลูกผสมในการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดกินได้

Liang *et al.* (1999) พบว่าฟิวแซนท์ที่เกิดจาก polarized protoplast fusion ระหว่าง inactivated dikaryotic protoplast ของ *P.cystidiosus* และ monokaryotic protoplast ของ *P.sajor-caju* มีคุณลักษณะของ donor parent มากกว่า recipient parent เมื่อทำการ subcultureหลายๆครั้งพบว่าฟิวแซนท์บางตัวสร้าง clamp connection และจากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าแต่ละเซลล์ของเส้นใยมีนิวเคลียส 2 นิวเคลียสและเมื่อนำฟิวแซนท์ที่ได้มาทำโพรโตพลาสต์ และนำไปสร้างผนังเซลล์ใหม่พบว่าจะมีลักษณะคล้ายกับ donor parent สรุปได้ว่า polarized protoplast fusion เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสร้างลูกผสมเพื่อปรับปรุงพันธุ์ในเห็ดกินได้

2.3.4 การกลับคืนของผนังเซลล์หรือการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสต์ (Cell Wall Reversion of Protoplasts)

การสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโตพลาสต์สามารถเกิดขึ้นได้ โดยนำโพรโต พลาสต์มาเลี้ยงในอาหารและบ่มในสภาวะที่เหมาะสมตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ โพรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ได้มากหรือน้อย ถูกกำหนดเป็นค่าเปอร์เซนต์ความถี่ของการเปลี่ยนโพรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ปกติ (protoplast regeneration freguency)
ซึ่งคำนวณได้จากสูตร % ความถี่ของการเปลี่ยนโพรโตพลาสต์กลับสู่เซลล์ปกติ

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

Masami *et al.*(1982) ได้ทำการสร้างผนังเซลล์ของโพรโตพลาสต์ ของเชื้อ *Tricholoma matsutake* โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงเล็กน้อย จากวิธีของ Ferenczy *et al* .(1974) โดยถ่ายโพรโต พลาสต์ที่อยู่ในสารละลายแมนนิทอล 10 โมล ลงในอาหาร สำหรับสร้างผนังเซลล์ ที่ประกอบด้วย วุ้น 2.0 เปอร์เซนต์ ในหลอดเลี้ยงเชื้อและเททับบาง ๆ ด้วยอาหารชนิดเดียวกันที่ประกอบด้วยวุ้น 0.5 เปอร์เซนต์ ให้มีความหนาประมาณ 0.5 มิลลิลิตร โดยอาหารที่นำมาเทปิดทับนั้นต้อง อุ่นให้ได้อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ นอกจากนี้ยังใช้อาหารเหลวเป็นอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ใหม่ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วถ่ายโพรโตพลาสต์ที่อยู่ในสารละลายแมนนิทอล 1.0 โมล ลง

สำนักหอสมุดกลาง_พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ไป พบว่าโพรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้หลังจากการบ่มเป็นเวลา 3-4 วัน ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง และค่าความถี่ของโพรโตพลาสต์ที่กลับคืนสู่สภาพเซลล์ปกติเท่ากับ 10 เปอร์เซนต์

Morinaga *et al.* (1985) พบว่า *Coprinus pellucidus* และ *C.cinereus* เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ได้บนผิวอาหารแข็ง และความถี่ของการเปลี่ยนจากโพรโตพลาสต์ไปเป็นเซลล์ของ *C. pellucidus* เท่ากับ 35-40 เปอร์เซนต์ ใน *C .cinereus* เท่ากับ 10-20 เปอร์เซนต์ นอกจากนั้นยังพบว่าโพรโตพลาสต์จะสร้างเซลล์คล้ายเซลล์ยีสต์ต่อกันเป็นสายสั้นๆ

ในเชื้อราโดยทั่วไป ไม่เคยพบว่ามีรายงานที่มีการเปลี่ยนจากโพรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ที่มีค่าสูงถึง 100 เปอร์เซนต์ ไม่ว่าจะทำในอาหารเหลวหรืออาหารแข็ง และสามารถตรวจพบการพัฒนารูปร่างจากการสร้างผนังเซลล์ในช่วงของโพรโตพลาสต์ ในเชื้อราเส้นใยมีลักษณะ 2 แบบ คือ โพรโตพลาสต์สร้าง germ tube ที่มีรูปร่างไม่ปกติเหมือนกับเซลล์ที่กำลังแตกหน่อและต่อกันเป็นสาย ซึ่งต่อไปจึงเปลี่ยนเป็นเส้นใย และโพรโตพลาสต์เริ่มสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาล้อมรอบโพรโตพลาสต์ที่มีรูปร่างกลมได้เซลล์ใหม่ที่มีรูปร่างกลมเช่นกัน ต่อจากนั้นจึงมีการสร้าง germ tube ที่มีลักษณะปกติ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2539)

Zhao and Chang (1993) พบว่าแมนนิทอลเป็น ออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ แต่ปัจจัยที่ยากในการควบคุมคือ ลักษณะทางสรีรวิทยาของเส้นใยซึ่งพบว่า เส้นใยที่อายุน้อยหรือเจริญเติบโตได้เร็วมีแนวโน้มที่จะเกิดโพรโตพลาสต์ได้ดีกว่า

Eguchi *et al.*(1995) ได้ทำให้โพรโตพลาสต์เกิดการสร้างผนังเซลล์ ของ *Pleurotus ostreatus* และ *Agrocybe cylindracea* โดยใช้ อาหาร minimal agar (1.5 เปอร์เซนต์) (pH 6.5) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแมนนิทอล 0.6 โมล เป็นออสโมติกสเตบิไลเซอร์ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 90 มิลลิลิตร และเททับด้วยอาหารชนิดเดียวกันปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิต่ำ(โดยลดความเข้มข้นของอะกาโรส เพียง 0.7 เปอร์เซนต์) โดยทำการบ่มเป็นเวลา 13 วันที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นมากกว่า 80 เปอร์เซนต์ จึงเกิดเป็นโคโลนีของเส้นใยจากการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโตพลาสต์

2.3.5 การวิเคราะห์เชื้อที่ได้จากการทำโพรโตพลาสต์ฟิวชัน (Analysis of Protoplast Fusion Product)

การพิสูจน์ว่าฟิวแซนท์ที่ได้เป็นลูกผสมที่แท้จริงหรือไม่นั้นมีหลายดังต่อไปนี้ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2536)

1. ศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์และโคโลนีเช่น ตรวจสอบ clamp connection และ

49416

การวิเคราะห์ลักษณะของเบซิดิโอสปอร์

2. วัดขนาดของเซลล์

3. หาปริมาณ DNA ภายในเซลล์

4. การย้อมสีนิวเคลียส

5. การปล่อยให้ selectable genetic marker เกิดการแยกตัวออกจากกันเอง (spontaneous segregation)

6. การเหนี่ยวนำให้ selectable genetic marker เกิดการแยกตัวออกจากกัน (induced segregation) โดยการใช้สารเคมี เช่น para-flurophenyl-alanine และ benomyl หรือใช้ physical agent เช่นรังสีอัลตราไวโอเลต ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าชักนำให้เกิดการแยกตัวออกจากกันโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส (mitotic segregation) ได้

7. การเปรียบเทียบแบบอย่างของ assimilation และการหมัก (fermentation) สารประกอบคาร์บอน และไนโตรเจน

8. ทำ DNA hybridzation โดยมีตัวติดตาม (prob) ที่เหมาะสม

9. การวิเคราะห์แบบอย่างของไอโซไซม์ (isoenzyme pattern) โดยการใช้อิเลคโตรโฟรีซิสสำหรับโปรตีน

10. การวิเคราะห์แบบอย่างของโครโมโซม (chromosome pattern)

11. การทดลองโดยการทำให้เกิดดอก

ในการคัดเลือกลูกผสมนิยมใช้ markers ชนิดต่างๆเช่น auxotrophic markers ซึ่งคัดเลือกโดยการทำ mutation ถ้าใช้เป็น double markers ในแต่ละสายพันธุ์ได้จะยิ่งดี เนื่องจาก reversion frequency จะต่ำมาก นอกจากนี้ marker ชนิดอื่นๆเช่น antibiotic resistance markers หรือmorphological markers ก็ใช้ได้เช่นกัน (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์, 2536) อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ยังไม่ดีที่สุด เช่น การเกิด clamp connection จะพบในลูกผสมบางชนิดที่เกิดจาก interspecific เท่านั้น และพบในอัตราที่ต่ำมาก (Toyomasu and Mori,1989) ส่วนการวิเคราะห์ ไอโซไซม์จะขึ้นอยู่กับการพิสูจน์ทางชีวเคมี แต่ต้องใช้เวลานานในการวิเคราะห์และผลที่ได้จะขึ้นกับสภาพแวดล้อมและสภาพทางกายภาพ (Stasz *et al.* 1988)

Toyomasu *et al.* (1986) ได้ทำการตรวจสอบลูกผสมจากการรวมโพรโตพลาสต์ ระหว่าง *P. ostreatus* 909 และ *P. salmoneo – stramineus* 01 โดยนำรูปแบบของไอโซไซม์ของลูกผสมมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งใช้อิเลคโตรฟอรีซิส โดยใช้ polyacrylamide slap gel 7.5 เปอร์เซนต์ ความหนา 1 มิลลิเมตร ยาว 15 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ 14 โวลต์ ต่อ

เซนติเมตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และตรวจสอบแถบสีของไอโซไซม์ ด้วย malate dehydrogenase (MDH) , succinate dehydrogenase (SDH) , non – specific esterase (EST) , acid phosphatase (ACP) และ leucine aminopeptidase (LAP) พบว่า ไม่เกิดแถบสีใน SDH และ ACP และเกิดแถบสีใน MDH EST และ LAP ซึ่งมีลักษณะแถบสีเหมือนกับสายพันธุ์พ่อแม่

Eguchi *et al.* (1995) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์โดยวิธี individual electric fusion ระหว่าง *P.sajor-caju* และ *M.aitchisonii* และทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยไอโซไซม์ โดยพิจรณา จากการย้อมสีด้วย EST พบแถบสีของสายพันธุ์พ่อแม่ คือ *P. sajor-caju* และ *M. aitchisonii* ในรูปแบบของแถบสีที่ได้จากสายพันธุ์ลูกผสม และตรวจพบรูปแบบของ *P. sajor-caju* ในสายพันธุ์ลูกผสมเมื่อตรวจสอบด้วย MDH และตรวจพบลักษณะของ *M. aitchisonii* ในสายพันธุ์ลูกผสมเมื่อทดสอบด้วย ADH จากผลที่ได้ทำให้สรุปได้ว่า ลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์มีลักษณะของทั้งสายพันธุ์พ่อและแม่ นอกจากนี้ยังตรวจพบลักษณะกลิ่นเฉพาะของสายพันธุ์ *M. aitchisonii* ในสายพันธุ์ของลูกผสม 81 เปอร์เซนต์

2.4 หลักการและเทคนิคทาง Electrophoresis

อิเลคโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์ชีวโมเลกุล โดยอาศัยหลักว่าชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน โปรตีนมีประจุได้เนื่องจากมีการแตกตัวของหมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่อื่นๆ ที่ค่า pH หนึ่งๆ ของสารละลายโปรตีนแต่ละชนิด จะมีปริมาณของประจุสุทธิแตกต่างกันออกไป โปรตีนที่มีประจุจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม การเคลื่อนที่นี้จะถูกต้านโดยปฏิกิริยาระหว่างสารกับร่างแหของเจล ซึ่งทำหน้าที่เป็น molecular sieve ดั้งนั้นการเคลื่อนที่ของโปรตีน จึงขึ้นอยู่กับทั้งขนาด รูปร่าง และประจุสุทธิของโปรตีน โดยจะมีตัวกลางเป็นที่รองรับให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่านไป ซึ่งตัวกลางนั้นต้องมีคุณสมบัติเฉื่อยและที่ใช้กันมากสำหรับอิเลคโตรโฟรีซิสในปัจจุบันคือ polyacrylamide gel (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์, 2536)

2.5 อิเลคโตรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล

อิเลคโตรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel electrophoresis) มีตัวกลางค้ำจุนคือ polyacrylamide gel ซึ่งเตรียมได้จากการ polymerization ของ acrylamide monomer โดยมี N,N'-methylene-bis-acrylamide เป็นตัวเชื่อมให้เป็นโพลีเมอร์ ปฏิกิริยาการเกิดเป็นเจลนี้เร่งโดย ammoniumpersulfate และ TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine) เจลที่เกิดขึ้นนี้มี

ลักษณะเป็นตาข่ายสามมิติที่มีรูพรุน ความพรุนของเจลขึ้นอยู่กับสัดส่วนของ acrylamide monomer และตัวเชื่อมคือ BIS (bisacrylamide) คือแสดงเป็น %T และ %C กล่าวคือ %T เป็น เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของ monomer ทั้งหมด (acrylamide และ bisacrylamide) และ %C เป็นปริมาณของ bisacrylamide จาก monomer ทั้งหมด ขนาดของรูพรุนจะลดลงเมื่อ %T เพิ่มขึ้น โดยทั่วไป %T จะมีค่าอยู่ระหว่าง 3-30 เปอร์เซนต์ ขึ้นอยู่กับขนาดโปรตีนที่ต้องการ (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์, 2536)

ตารางที่ 2.2 %T ที่เหมาะสมกับมวลโมเลกุลของสาร

%T	มวลโมเลกุลที่เหมาะสม
3-5	สูงกว่า 100,000
5-12	20,000-150,000
10-15	10,000-80,000
15+	ต่ำกว่า15,000

ที่มา: อาภัสสรา ชมิดท์, 2537

2.6 ไอโซไซม์ (Isozyme Technique)

ไอโซไซม์ หมายถึง เอนไซม์ที่มีโมเลกุลหลายรูปแบบ แต่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน สามารถแยกจากกันโดยใช้อิเลคโตรโฟรีซิส เนื่องจากไอโซไซม์เป็นผลจากการทำงานของยีนโดยการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งมีรูปแบบแตกต่างกัน และมีคุณสมบัติคงตัวไม่ขึ้นกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการศึกษาไอโซไซม์ จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ การศึกษาไอโซไซม์ ทำได้โดยใช้เทคนิคอิเลคโตรฟอรีซิส คือเอนไซม์ที่มีประจุจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็นเจลในสนามไฟฟ้าในอัตราที่แตกต่างกัน จากนั้นนำสารละลายที่มี substrate กับ co-enzyme ไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่เราสนใจ ทำให้เกิดการตกตะกอนเป็นแถบ (band) ที่สามารถมองเห็นได้ ซึ่งมีรูปแบบเฉพาะเรียกว่า ไซโมแกรม (zymogram) การศึกษาไอโซไซม์สามารถทำได้ง่ายโดยสกัดจากตัวอย่างสด แล้วนำมาใช้ได้โดยตรงไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ ใช้ปริมาณน้อยในการตรวจสอบ สามารถ

ตรวจสอบพร้อมๆกันได้หลายตัวอย่างสะดวกในการเปรียบเทียบและให้ผลที่แม่นยำ (เทพบุตร ดีรักษา พร และคณะ,2540 ; ฐิติพร อำพนพิบูลย์, 2544)

2.6.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโพรโตพลาสต์และไอโซไซม์

มังกร เทวสิงห์ (2540) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ estrease และ peroxidase ของผลผลิตจากการรวมโพรโตพลาสต์ ไม่ว่าจะเป็นการหลอมรวมภายในชนิด (spicies) เดียวกันหรือต่างสกุล (genus) กัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่พบว่ามีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่กับผลผลิตที่ได้จากการรวมของโพรโตพลาสต์ ในรูปแบบไอโซไซม์ esterase

ชัชฎาพร อินทำมา (2538) ได้ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมเห็ดโคนจาก 3 จังหวัด ได้เห็ดโคนมาทั้งสิ้น 12 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค horizontal starch gel electrophoresis เพื่อศึกษา isozyme patterns พบว่าเห็ดโคนในตัวอย่างที่ 4, 8 และ 11 มีรูปแบบของไอโซไซม์ 4 ชนิด คือ 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH), IDH, malate dehydrogenase (MDH) และ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6PDH) ที่เหมือนกัน ส่วนรูปแบบไอโซไซม์ที่เหลืออีก 8 ชนิดนั้น ไม่สามารถอ่านค่าได้เนื่องจากให้แถบสีที่ไม่ชัดเจน จากไซโมแกรมของไอโซไซม์ 4 ชนิด สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ของเห็ดโคน 11 ชนิดออกเป็น 6 กลุ่ม

ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์ (2539) ได้รวบรวมเชื้อเห็ดสกุล Pleurotus จำนวน 60 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ไอโซไซม์ alcohol dehydrogenase, esterase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, laccase, และ malate dehydrogenase โดยใช้ polyacrylamide gel 10 เปอร์เซนต์ ผลปรากฏว่า สามารถใช้รูปแบบของไอโซไซม์ esterase ประกอบกับลักษณะทางสันฐานวิทยา จำแนกกลุ่มของเห็ดดังกล่าวออกเป็น 5 ชนิด ได้แก่ เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sp.*) เห็ดนางรมสีเทา (*P. ostreatus*) เห็ดนางรมสีขาว (*P. florida*) และเห็ดอีกชนิดที่ไม่ทราบชนิด ไอโซไซม์ laccase อาจจะใช้จำแนกเห็ดกลุ่มนี้ได้เนื่องจากมีแนวโน้มที่จะมีรูปแบบได้หลายอย่าง (polymophic) แต่รูปแบบของแถบยังไม่สม่ำเสมอและยังไม่ชัดเจนเพียงพอ ส่วนไอโซไซม์อื่นๆนอกจากนี้ใช้จำแนกเห็ดกลุ่มนี้ไม่ได้ เนื่องจากมีรูปแบบของแถบเพียงอย่างเดียว (monomorphic)

สุภาภรณ์ จาริยวัฒน์ (2541) ทำการแยกโพรโตพลาสต์ จากเส้นใยของเห็ดตีนแรด โดยใช้ไลซิงเอนไซม์ (lysing enzyme), เซลลูเลส (cellulase) และไคติเนส (chitinase) พบว่าปริมาณของโพรโตพลาสต์ที่ได้ขึ้นอยู่กับ อายุของเส้นใย บัฟเฟอร์ pH และปริมาณของเอนไซม์ และจากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ esterase, lactate dehydrogenase, leucine aminopeptidase และmalate

dehydrogenase ของเส้นใยโมโนคารีออนที่ได้จากสปอร์เดี่ยวพบว่ามีลักษณะแถบเอนไซม์ที่ต่างกัน 59 แบบ ซึ่งสามารถนำมาจัดกลุ่มของเส้นใยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมได้แตกต่างกันได้ 10 กลุ่ม

Zhu-Bao Cheng *et al.*(1995) ได้ทำการเปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์ esterase และ peroxidase ของ *P.ostreatus* และ *P. sapidus* และลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ด 2 สายพันธุ์นี้ พบรูปแบบที่แตกต่างกัน 3 ชนิด และพบ แถบของสายพันธุ์พ่อแม่ในลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ แสดงให้เห็นว่าลูกผสมที่ได้นี้เกิดจากการรวมกันระหว่างพ่อและแม่

Yokono *et al.* (2000) ทำการวิเคราะห์ลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดกินได้ในสกุล Pleurotus ที่ต่างชนิดกัน โดยใช้ auxotrophic mutant ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *P. ostreatus* และ *P.cornucopiae* ทำการคัดเลือกลูกผสมโดยใช้ auxotrophic complementation และพบรูปแบบของเอนไซม์ estrease ของพ่อแม่ในฟิวแซนท์ที่เป็นลูกผสม บางฟิวแซนท์ และเมื่อนำลูกผสมนี้ไปตรวจวิเคราะห์ด้วย pulsed-field gel electrophoresis ก็แสดงแถบ DNA ของทั้งพ่อและแม่

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 แหล่งของเชื้อจุลลินทรีย์

เชื้อพันธุ์เห็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก

1. เห็ดหอม (*Lentinula edodes*)
2. เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*)
3. เชื้อพันธุ์เห็ดลูกผสมระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) สายพันธุ์ F42, F220, F249, F266, และ F342 ที่ได้จากงานวิจัยของ จรัสรัช มั่นถาวร (2544)

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลลินทรีย์

อาหารสำเร็จรูป PDA (potato dextrose agar)

อาหารเลี้ยงเชื้อ MYG (malt yeast extract , ภาคผนวก 1)

อาหารที่ทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโตพลาสต์ (regeneration medium , ภาคผนวก 1)

อาหารสำหรับเททับเพื่อทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโตพลาสต์ (ภาคผนวก 1)

วุ้นผง (bacto agar)

กลูโคส (glucose)

แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(NH_4)_2HPO_4$

โพรแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอตเฟต (KH_2PO_4)

ไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

แมกเนเซียมซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต $(Mg_2SO_4.7H_2O)$

วิตามินบีหนึ่งไฮโดรคลอไรด์ (vitaminB1 hydrochloride)

3.1.2.2 สารเคมีสำหรับการแยกโพรโตพลาสต์

ไลซิ่งเอนไซม์ (Lysing Enzyme) ของบริษัท Sigma

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

มาลิอิกแอนไฮไดรด์ (maleic anhydride)

แมกนีเซียมซัลเฟต (Mg_2SO_4)

3.1.2.3 สารเคมีสำหรับรวมโพรโตพลาสต์

โพลีเอทธิลีนไกลคอล (PEG, polyethylene glycol-6000)

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

3.1.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำไอโซไซม์

กลีเซอรอล

ไนโตรเจนเหลว

บิวทานอล (butanol)

fast blue BB salt

alpha napthyl acetate

acitic acid

bis-acrylamide

phenazine methosulphate

polyacrylamide

NAD

$MgCl_2.6H_2O$

Tetrazolium MTT

TEMED

Tris base

D,L-malice acid

O-Tolidine

น้ำกลั่นสองครั้ง

3.1.3 อุปกรณ์

ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)

(International Scientific Supply Co.,LTD.ประเทศไทย)

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

(Delta Laboratory ประเทศไทย)

เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)

(บริษัท HRAYAMA, HV-50 ประเทศญี่ปุ่น)

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Cemtrifuge)

(บริษัทHermle-Labortech.ประเทศเยอรมัน)

เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (Balance)

(Scientific Promotion Co.,LTD.ประเทศไทย)

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

(Denver Instrucment สหรัฐอเมริกา)

เครื่องกวน (magnetic stirer)

ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot Air Oven)

(Delta Laboratory ประเทศไทย)

ไมโครปิเปต (Micropopette)

(บริษัทกิบไทย ประเทศไทย)

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

(Science industries, Inc. สหรัฐอเมริกา)

เครื่องฉายแสง UV (Gel documentation)

(Advision of synoptic LTD.ประเทศแคนนาดา)

เครื่องอิเลคโตรโฟรีซิส (Electrophoresise quipment)

(Phaemacia Biotech ประเทศสวีเดน)

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power Supply)

(EC.APPARATUS INC.ประเทศไทย)

กล้องจุลทรรศน์

(โอลิมปัส ประเทศไทย)

เฮมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

(BOECO)

เครื่องแก้วต่างๆ
ซินเตอร์กลาส ฟิลเตอร์ (sinter glass)
(DURAN)
เครื่องกรองสวินเน็ก (swinnex)
กระดาษกรองมิลลิพอร์ (milipore) 0.45 ไมโครเมตร
ผ้าขาวบาง
เข็มเขี่ยเชื้อ
หลอดเซนตริฟิวส์, โกร่งบด

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรมโดยใช้สาร PEG 6000

ดำเนินการแยกโพรโตพลาสต์ และรวมโพรโตพลาสต์ ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม ดังต่อไปนี้ (จรัสรัช มั่นถาวร. 2544)

3.2.1.1 การแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม

นำเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดหอมและเห็ดนางรมมาเลี้ยงลงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเส้นใยมาเลี้ยงในอาหารเหลว MYG ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสค์ขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันสำหรับเส้นใยเห็ดหอม และ 3 วันสำหรับเส้นใยของเห็ดนางรม จากนั้นยีเส้นใยให้กระจายแยกจากกันด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ และเก็บเส้นใยโดยปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเส้นใยจากอาหาร เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ครั้งล้างต่อด้วยโพรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ จำนวน10 มิลลิลิตร จากนั้นนำเส้นใย 0.3 กรัม (น้ำหนักเปียก) ใส่ลงในสารละลาย Lysing Enzyme 3 มิลลิลิตร (เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์) ที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเห็ดหอม และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเห็ดนางรม นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมงสำหรับเห็ดหอมและ 2 ชั่วโมงสำหรับเห็ดนางรม จากนั้นกรองโพรโตพลาสต์ด้วย sinterglass filter แล้วนับจำนวนโพรโตพลาสต์ด้วยเฮมาไซโตมิเตอร์ ให้ได้ปริมาณโพรโตพลาสต์ประมาณ 10^6 โพรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เพื่อทำการรวมโพรโตพลาสต์ในขั้น 3.2.1.2

3.2.1.2 การรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม

นำโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรมที่กรองได้ (3.2.1.1)ไปปั่นแยกให้โพรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีแล้วล้างด้วยแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ (จำนวน 10 มิลลิลิตร) 2 ครั้ง หลังจากนั้นทำการกระจายโพรโตพลาสต์ที่ได้ในแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ โดยให้มีจำนวนโพรโตพลาสต์ประมาณ 10^6 โพรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นำสารละลายโพรโตพลาสต์ของเห็ดชนิดละ 1 มิลลิลิตร มาใส่รวมกันในหลอดเซนตริฟิวส์ และนำไปปั่นแยกให้โพรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำใสทิ้งและใช้ ปิเปตดูดสารละลาย PEG ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีโพรโตพลาสต์ดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที โดยเขย่าหลอดเบาๆทุกๆ 5 นาที ทำการเจือจางโดยใช้สารละลายออสโมติกซเตบิไลเซอร์แล้วตรวจนับจำนวนโพรโตพลาสต์ให้ได้ปริมาณ 10^5 โพรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายโพรโตพลาสต์ที่ผ่านขั้นตอนของการรวมกันมาปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาใส่ในอาหารชักนำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ที่มีวุ้น 3 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก) แล้วเททับด้วยอาหารชนิดเดิมที่มีความเข้มข้นของวุ้นเพียง 0.5 เปอร์เซนต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.2.2 การคัดเลือกฟิวแซนท์

นำโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรมที่ผ่านการรวมโพรโตพลาส์แล้วมาบ่ม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและทำการตรวจดูการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโต พลาสต์ ซึ่งจะสังเกตเห็นเส้นใยของโพรโตพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์ใหม่ได้จะมีลักษณะเป็นโคโลนีเล็กๆ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อคัดเลือกโคโลนีเหล่านี้ไปเลี้ยงในอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำมาทดสอบความเป็นลูกผสม โดยการตรวจสอบ clamp connaction ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งถ้าเป็นเส้นใยของเห็ดลูกผสมจะตรวจพบ clamp connaction ตั้งชื่อลูกผสมที่ได้โดยใช้สัญลักษณ์ PL ตามด้วยหมายเลข

3.2.3 การศึกษาลักษณะของลูกผสม

3.2.3.1 การวัดอัตราการเจริญของเส้นใยลูกผสม

วัดอัตราการเจริญเส้นใยของเห็ดลูกผสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDAเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อ แม่ โดยบ่มเส้นใยที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันและถ่ายรูปเก็บไว้ ต่อไปทำการวัดขนาดของเส้นใยของเห็ดลูกผสมโดยใช้ไมโครมิเตอร์ และวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและถ่ายรูปของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.3.2 การวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใยลูกผสม

นำเส้นใยของเห็ดหอม เห็ดนางรม และเห็ดลูกผสม รวมทั้งเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ F42, F220, F249, F266 และ F342 (ได้จากงานวิจัยของ จรัสรัช มั่นถาวร, 2544) มาเลี้ยงในอาหาร PDA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7วัน จากนั้นตัดบริเวณปลายเส้นใยมาเลี้ยงในอาหารเหลว MYG โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำเส้นใยมา กรองด้วยผ้าขาวบาง และล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วนำเส้นใยไปใส่ในกระทงอลูมิเนียมที่ได้เตรียมและได้ชั่งน้ำหนักของกระทง และนำไปใส่ไว้ในเดซิเคเตอร์ (dessicator) จากนั้นนำเส้นใยพร้อมกระทงไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา24 ชั่วโมง จากนั้นนำกระทงไปอบในเดซิเคเตอร์แล้วจึงนำไปชั่งเพื่อวัดหาค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ และนำค่าน้ำหนักแห้งที่ได้ไปคำนวณหาค่าความแตกต่างทางสถิติ

3.2.3.4 การทดลองเพาะเส้นใยของเห็ดลูกผสมให้เกิดดอก

นำเส้นใยของเห็ดลูกผสมที่ได้แต่ละสายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จึงนำเส้นใยที่ได้มาถ่ายเชื้อลงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่างบรรจุขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มเป็นเวลาประมาณ 7 วัน จนเส้นใยเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง จากนั้นจึงใช้เข็มเขี่ยเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเส้นใยเจริญอยู่เต็มประมาณ 10-15 เมล็ดใส่ลงในอาหารก้อนขี้เลื่อยที่เตรียมไว้โดยทำในสภาวะที่ปลอดเชื้อ แล้วปิดด้วยสำลี นำไปบ่มไว้ในตู้ที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยเจริญเต็มก้อนขี้เลื่อย แล้วจึงทำการเปิดดอกและรดน้ำและสังเกตและบันทึกลักษณะของดอกที่ได้รวมทั้งถ่ายรูปของดอกเห็ด

3.2.4 การศึกษาไอโซไซม์

3.2.4.1 การเก็บตัวอย่าง

กรองเส้นใยของเห็ดหอมและเห็ดนางรมที่เลี้ยงในอาหารเหลว MYG เป็นเวลา 30 วัน โดยการกรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำเส้นใยใส่หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 0.1-0.3 กรัม จากนั้นเติมสารละลาย extraction buffer ในอัตราส่วน 5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักเส้นใย 3 กรัม เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเส้นใยใส่ในโกร่งที่เย็นที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส โดยเติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมเส้นใย แล้วบดเส้นใยอย่างรวดเร็วให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำเส้นใยใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ทำการทดลอง

ต่อไป หากยังไม่นำมาทำอิเลคโตรโฟรีซีสควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 หรือ –80 องศาเซลเซียส โดยเติมกลีเซอรีนเข้มข้น 1 ส่วนต่อตัวอย่าง 9 ส่วน

3.2.4.2 การเตรียม polyacrylamide gel (ขนิษฐา พรเจริญโรจน์, 2543)

ก. การเตรียมสารละลาย separating gel

เติมสารละลาย acrylamide-bis 2.5 มิลลิลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการกรองสองครั้ง ปริมาณ 4.85 มิลลิลิตร และ separating gel buffer 2.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่เตรียมใหม่) 70 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร วนขวดเบาๆให้สารละลายผสมกัน จากนั้นเทสารละลายของเจลลงบนช่องว่างของแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ และเทสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลให้ห่างจากขอบบน 2-3 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้แข็งตัว(ประมาณ 20-30 นาที) เมื่อเห็นเจลแข็งแล้วจึงเทสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลทิ้ง

ข. การเตรียมสารละลาย stacking gel

เติมสาร acrylamide-bis 2.6 มิลลิลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการกรองสองครั้ง 12.2 มิลลิลิตร และ stacking gel buffer 5.0 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่เตรียมใหม่) 100ไมโครลิตร และ TEMED 12.2 ไมโครลิตร วนขวดเบาๆให้สารละลายผสมกัน จากนั้นเทสารละลายของ stacking gel เจลลงบน separating gel ใส่หวี (template comp) ลงใน stacking gel ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว ปิเปตสารละลายตัวอย่างจำนวน 20-30 ไมโครลิตร และหยดลงบนเจลช่องละหนึ่งตัวอย่าง ระวังไม่ให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 200 โวลต์ ด้วยกระแส 60 มิลลิแอมป์ โดยควบคุมอุณภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ลงมาจนสังเกตเห็นสีของ sample buffer ห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร จึงหยุดกระแสไฟฟ้า ต่อไปนำเจลออกจากชุดอิเลคโตรโฟรีซิส โดยนำเจลออกจากแผ่นกระจก และล้างเจลด้วยน้ำสะอาด นำไปใส่กล่องย้อมสีเอนไซม์แต่ละชนิด (esterase, malate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, phosphogluconate dehydrogenase และ laccase) วางไว้ในที่มืดที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเทสารละลายสีย้อมออกแล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น นำไปแช่ใน acetic acid ความเข้มข้น 7 เปอร์เซนต์ เพื่อล้างสีที่เกินออกจากแผ่นเจล จากนั้นถ่ายรูปไซโมแกรม (Zymograme) และวาดแถบที่ปรากฏบนแผ่นกระดาษ (ฐิติพร อำพลพิบูลย์, 2544)

3.2.4.3 การวิเคราะห์ไซโมแกรม (ฐิติพร อำพนพิบูล, 2544)

นำไซโมแกรมที่ได้มาประเมินผลโดยเปรียบเทียบแถบสีที่ปรากฏ ด้วยการคำนวณหาค่า Rf (Relative fraction) ของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสม ซึ่งมีสูตรดังนี้ คือ

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางเคลื่อนที่ของไอโซไซม์}}{\text{ระยะทางทั้งหมดที่สารสกัดเคลื่อน}}$$

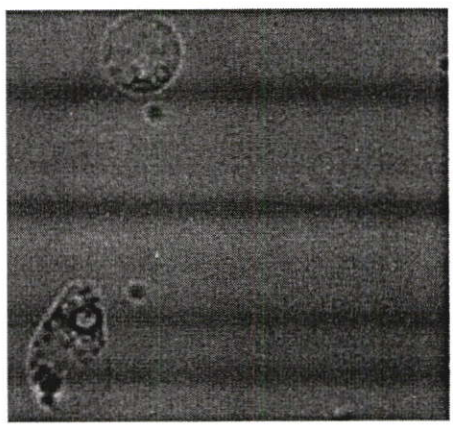
นำค่า Rf ที่บันทึกลงในแถบไซโมแกรมมาเปรียบเทียบหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเส้นใยเห็ดลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่

บทที่ 4

ผลการทดลอง

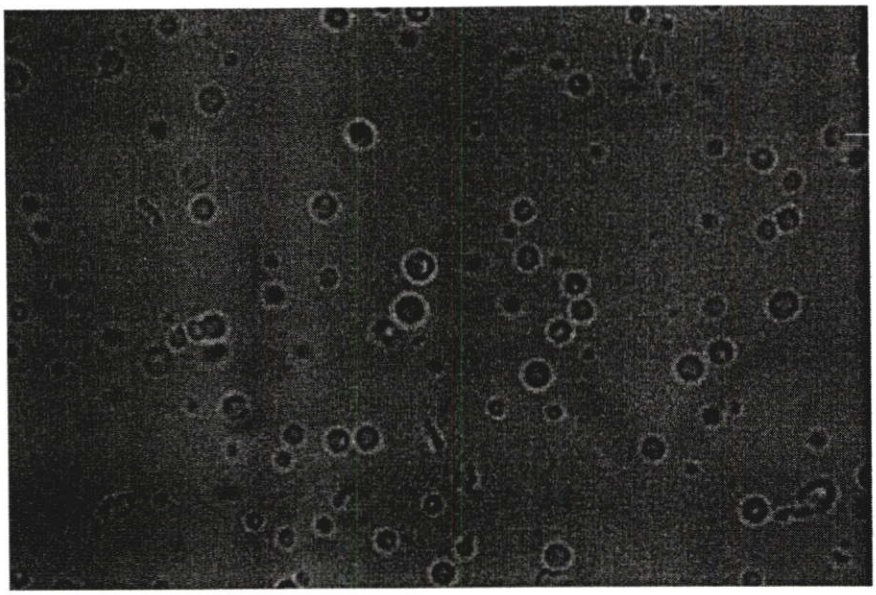
4.1 ผลการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม

โพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมเตรียมได้จากการนำสปอร์เดี่ยวของเห็ดหอม มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเส้นใยใส่ลงในอาหารเหลว PDAปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสต์ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน จึงนำเส้นใยมาล้าง 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว และตามด้วยออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่ประกอบด้วยแมกเนเซียมซัลเฟต 0.6 โมล pH 5.5 นำเส้นใยที่ได้มาบ่มด้วยสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงกรองโพรโตพลาสต์ด้วยซินเตอร์กลาสต์ ฟิวเตอร์ เมื่อตรวจนับจำนวนโพรโตพลาสต์ด้วยเฮมาไซโตมิเตอร์ พบว่ามีโพรโตพลาสต์จำนวน 6.6 X 10^6 โพรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรและเมื่อวัดขนาดของโพรโตพลาสต์ด้วยไมโครมิเตอร์ พบว่าโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมมีขนาด 7.1 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดหอมโมโนคาริออน (400 X)

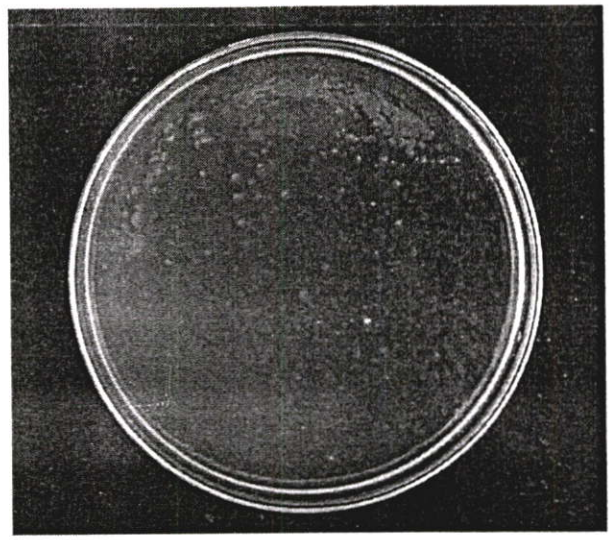
โพรโตพลาสต์ที่ได้จากเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ดนางรม มีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการแยกโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมแตกต่างกันตรงที่สารละลายออสโมติกสเตบิไลเซอร์คือจะใช้ที่ pH 5.0 และบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โพรโตพลาสต์ของเห็ดนางรมที่ได้มีจำนวน $2.6X10^{7}$ โพรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และวัดขนาดของโพรโตพลาสต์ได้ 4.1 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดนางรมโมโนคาริออน (400 X)

4.2 ผลจากการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม

หลังจากทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมแล้ว นำโพรโตพลาสต์ทั้งหมดที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ใหม่ (ภาคผนวก ก) เพื่อทำให้โพรโตพลาสต์กลับคืนเป็นเซลล์ จากนั้นตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ โดยตรวจดูการเจริญของโพรโตพลาสต์ทุกวัน และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น เมื่อคำนวณหาค่าความถี่ของการกลับคืนของเซลล์ พบว่าการรวมโพรโตพลาสต์ครั้งนี้ พบว่ามีความถี่ของการกลับคืนของเซลล์โพรโตพลาสต์เป็น 0.00192 % โดยมีระยะเวลาในการคืนกลับของเซลล์เป็นเวลา 9-11 วัน



ภาพที่ 4.3 แสดงโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรมที่เจริญในอาหารชักนำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสระยะเวลา 9 วัน

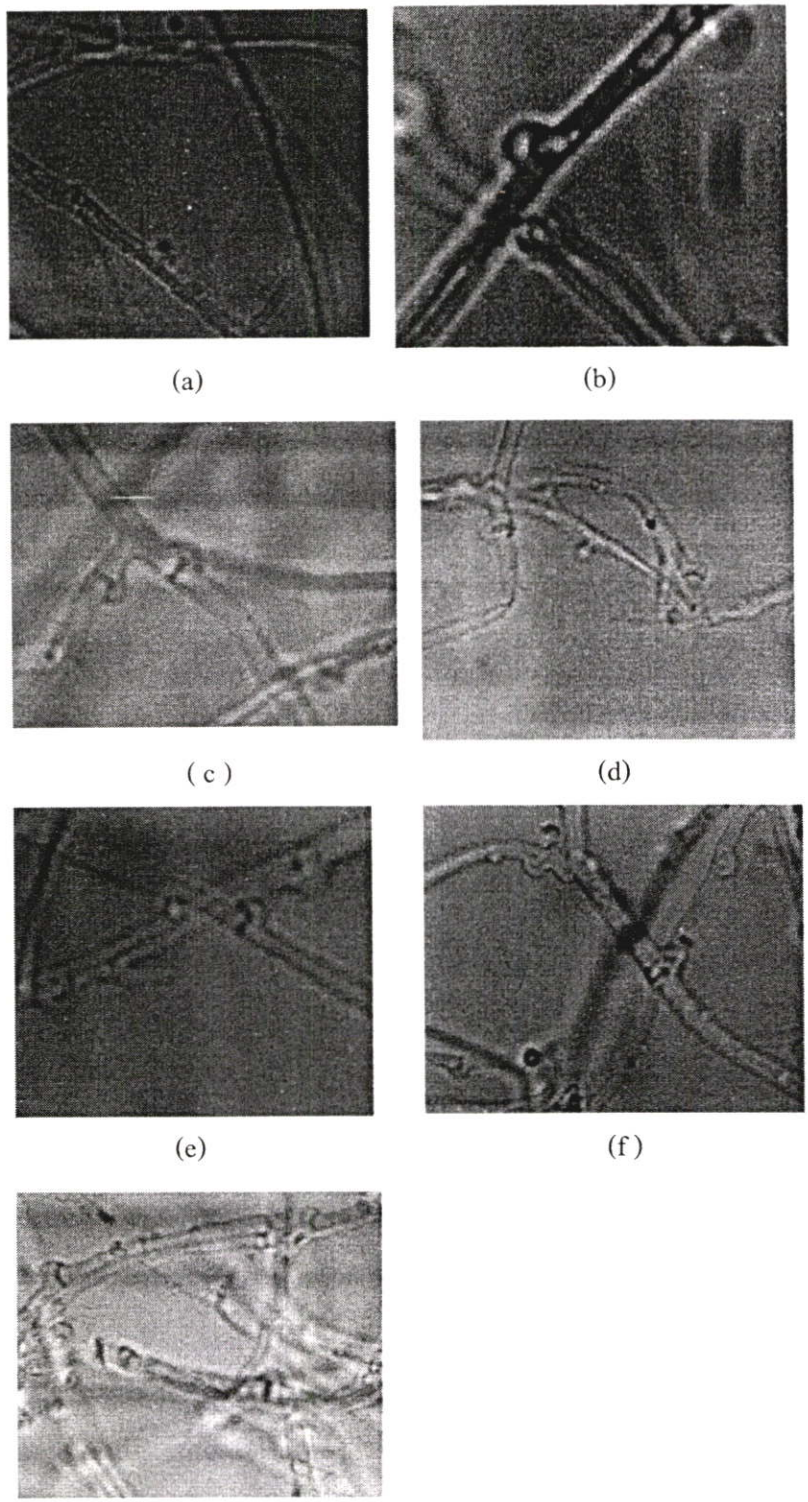
4.3 ผลการคัดเลือกฟิวแซนท์

จากการนำโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรมที่ผ่านการรวมโพรโตพลาสต์ (โดยใช้ โพลีเอทธิลีนไกลคอล 6000 ที่ความเข้มข้น 40 เปอร์เซนต์) บ่มเป็นเวลา 9-11 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในอาหารที่ชักนำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่ และทำการรวบรวมโคโลนีที่ได้จากการเจริญของโพรโตพลาสต์ ซึ่งจะสังเกตเห็นเป็นโคโลนีเล็กๆ ทำการเก็บรวบรวมในสภาพที่ปลอดเชื้อ และคัดเลือกโคโลนีมา 63 โคโลนี และตั้งชื่อแต่ละโคโลนีเป็น PL1, PL2, PL3 ตามลำดับ

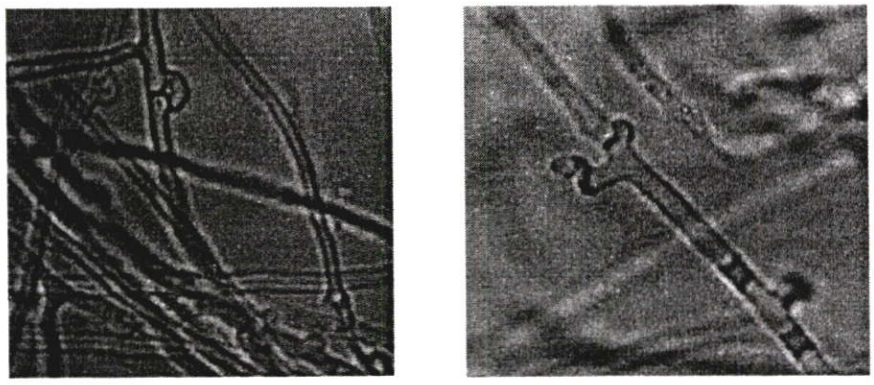
4.4 ผลของการศึกษาลักษณะของลูกผสม

4.4.1 ผลการตรวจการเกิด clamp connection

จากการตรวจสอบดูการเกิด clamp connection ทั้งหมด 63 โคโลนีด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีโคโลนีที่มี clamp connection จำนวน 7 โคโลนี คือสายพันธุ์ PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21

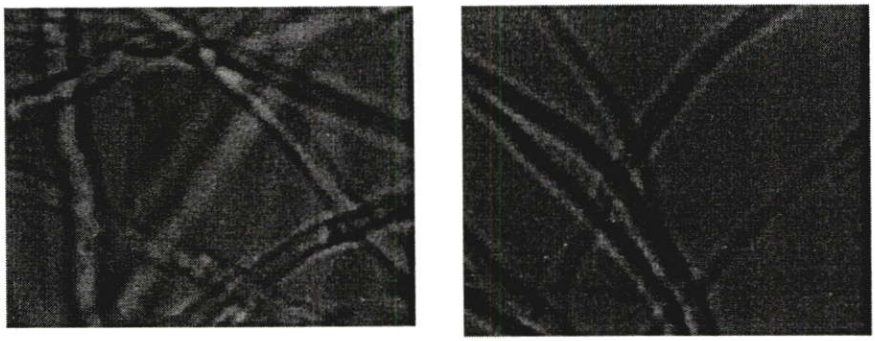


ภาพที่ 4.4 ลักษณะของเส้นใยเห็ดลูกผสมที่ตรวจพบ clamp connection a = PL6 (400X), b = PL7 (1000X), c =PL9 (400X), d =PL12 (400X), d =PL15 (400X), e =PL17 (400X) และ f =PL21(400X)



(a) (b)

ภาพที่ 4.5 ลักษณะของเส้นใยไดคาริออนของเห็ดหอมและของเห็ดนางรม (400 X)
a = เห็ดหอม และ b = เห็ดนางรม



(a) (b)

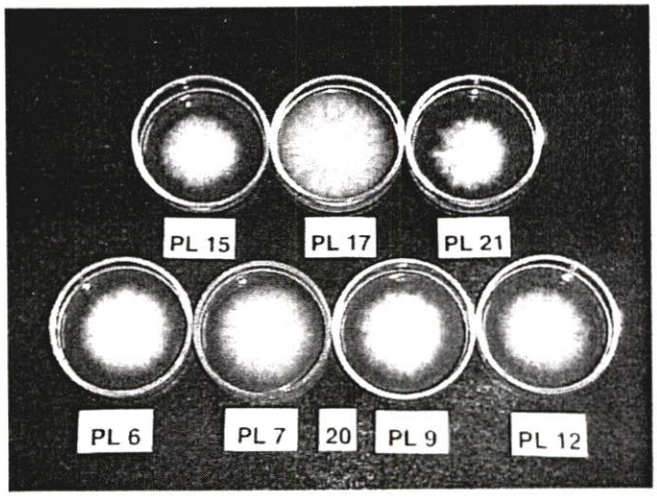
ภาพที่ 4.6 ลักษณะของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมและเห็ดนางรม (400 X)
a = เห็ดหอม และ b = เห็ดนางรม

4.4.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่

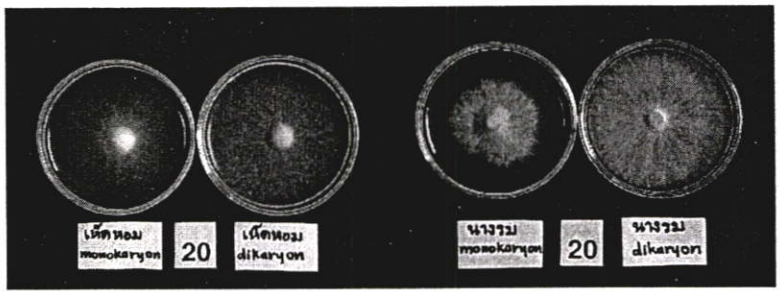
เมื่อนำเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21 มาเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน โดยบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส และนำมาตรวจวัดการเจริญของเส้นใยโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีแล้วหาค่าเฉลี่ยได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1 และผลทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติได้แสดงใน ภาคผนวก ค

ตารางที่ 4.1 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.) ของเห็ดหอม เห็ดนางรม และ เห็ดลูกผสม (บนอาหาร PDA โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างกันเป็นเวลา 7 วัน)

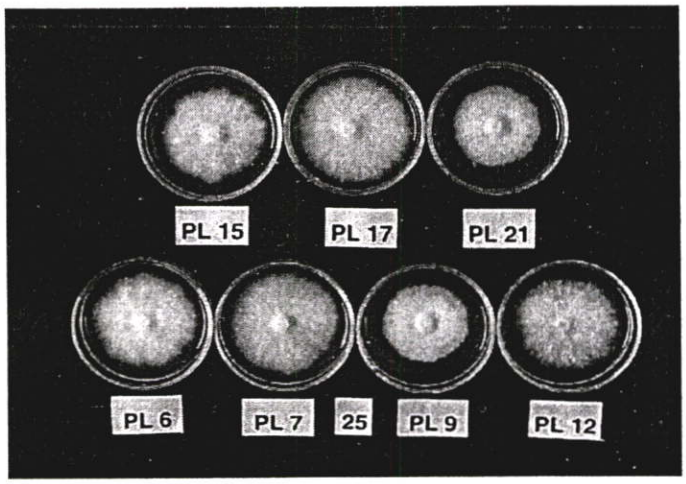
	อุณหภูมิ			
สายพันธุ์	20°c	25°c	30°c	35°c
PL6	3.52	4.21	3.91	0
PL7	4.2	4.7	4.48	0
PL9	3.46	4.12	3.58	0
PL12	3.51	4.2	4.1	0
PL15	3.53	4.15	4.02	0
PL17	4.74	4.93	5.09	0
PL21	3.98	4.08	3.45	0
เห็ดนางรม (โมโนคาริออน)	3.56	4.02	3.51	0
เห็ดหอม (โมโนคาริออน)	3.63	4.17	1.04	0



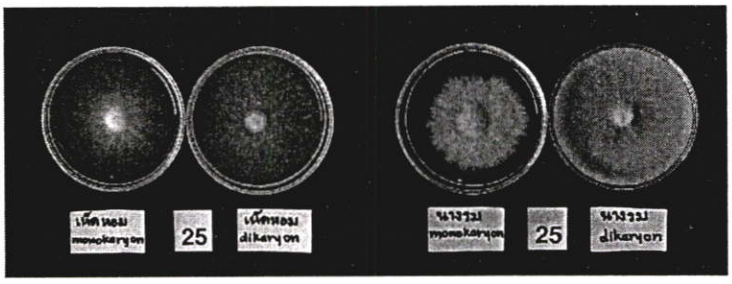
ภาพที่ 4.7 เส้นใยเห็ดลูกผสม 7 สายพันธุ์ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



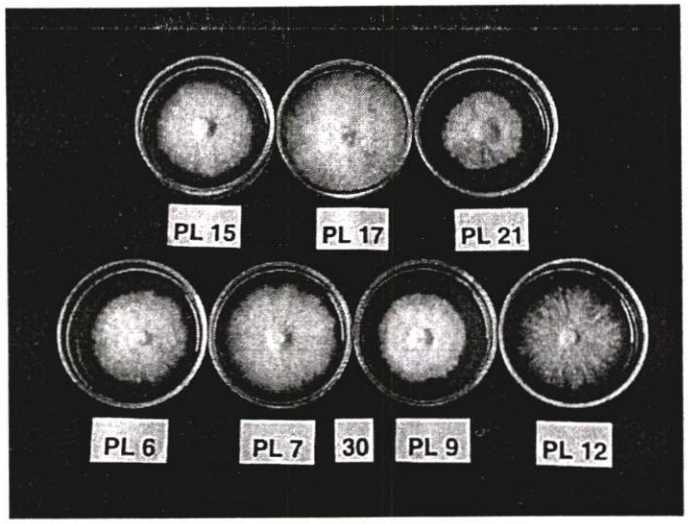
ภาพที่ 4.8 เส้นใยเห็ดหอม เส้นใยเห็ดนางรมโมโนคาริออน และเส้นใยเห็ดหอม เส้นใยเห็ดนางรมไดคาริออนที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



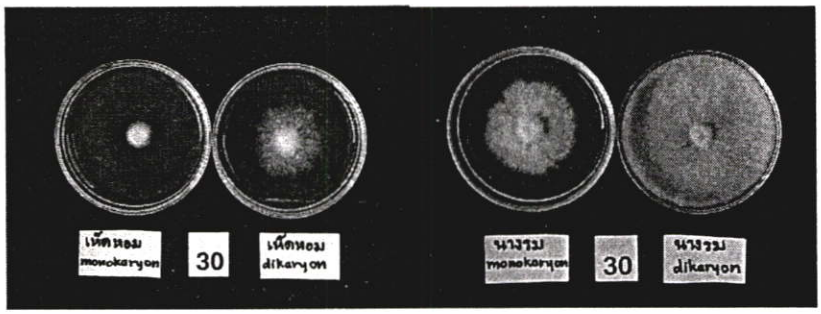
ภาพที่ 4.9 เส้นใยเห็ดลูกผสม 7 สายพันธุ์ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



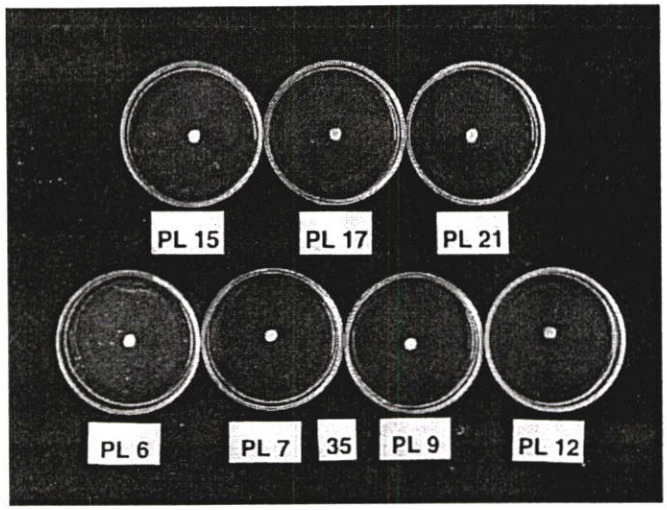
ภาพที่ 4.10 เส้นใยเห็ดหอม เห็ดนางรมโมโนคาริออน และเส้นใยเห็ดหอม เห็ดนางรมไดคาริออน ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



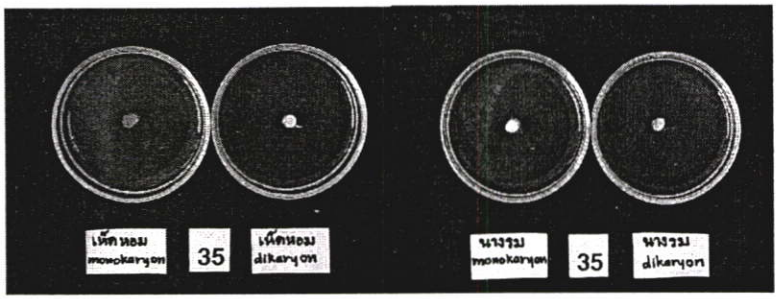
ภาพที่ 4.11 เส้นใยเห็ดลูกผสม 7 สายพันธุ์ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.12 เส้นใยเห็ดหอม เห็ดนางรมโมโนคาริออน และเส้นใยเห็ดหอม เห็ดนางรมไดคาริออน ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.13 เส้นใยเห็ดลูกผสม 7 สายพันธุ์ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.14 เส้นใยเห็ดนางรมโมโนคาริออน และเส้นใยเห็ดนางรมไดคาริออนที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.4.3 ผลการวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใยฟิวแซนท์

เมื่อนำเส้นใยของเห็ดหอมโมโนคาริออนและ เห็ดนางรมโมโนคาริออนที่เป็นสายพันธุ์พันธุ์พ่อแม่ และเห็ดลูกผสมไปเลี้ยงในอาหารเหลว MYG โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำเส้นใยที่เจริญมาล้างและนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 4.2 จากการทดลองพบว่าค่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL21 มีค่ามากที่สุด คือ 0.31 กรัม ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ส่วนค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL6, PL7, PL9, PL12, PL17, F266 และ F342 มีค่าที่มากกว่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเห็ดหอมโมโนคาริออน แต่น้อยกว่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเห็ดนางรมโมโนคาริออน ส่วนค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ด

ลูกผสมสายพันธุ์ F220 และ F249 มีค่าที่ไม่แตกต่างกับเห็ดหอมโมโนคาริออนอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าค่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ F42 มีค่าเท่ากับ 0.012 กรัม ซึ่งมีค่าน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดลูกผสมทั้งหมดและสายพันธุ์พ่อแม่

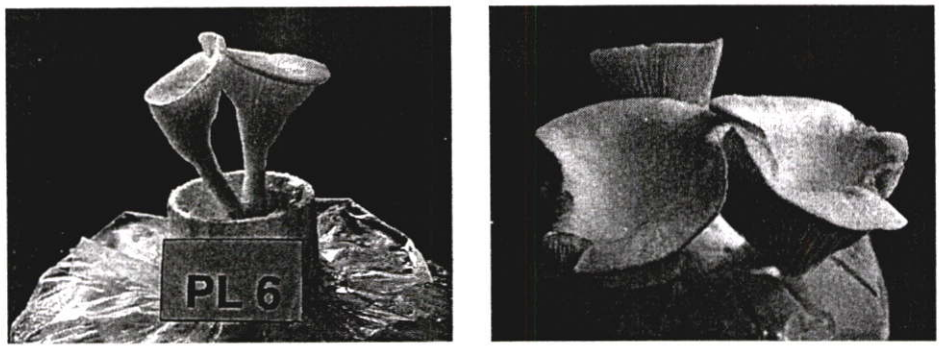
ตารางที่ 4.2 น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยเห็ดลูกผสมที่เลี้ยงไว้ในอาหาร MYG อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน

สายพันธุ์	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (กรัม)
เห็ดนางรมโมโนคาริออน	0.315b
เห็ดหอมโมโนคาริออน	0.024i
PL6	0.254d
PL7	0.263d
PL9	0.216e
PL12	0.219e
PL15	0.277c
PL17	0.104f
PL21	0.358a
F42	0.012j
F220	0.026i
F249	0.031i
F266	0.049h
F342	0.086g

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

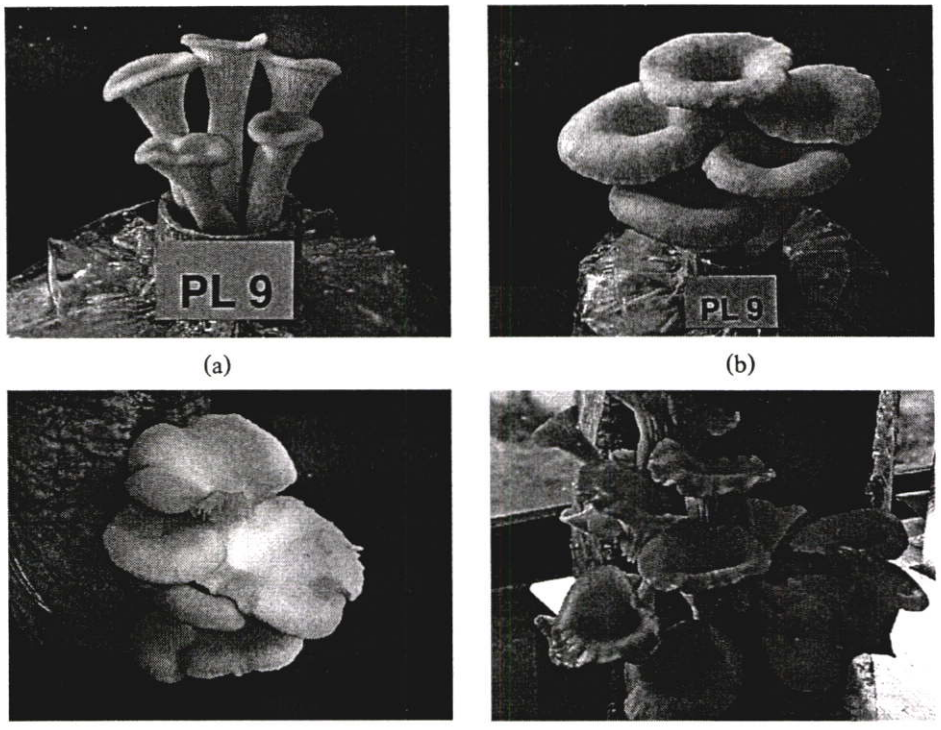
4.4.4 ผลการทดลองการเพาะให้เกิดดอกของฟิวแซนท์

เมื่อนำเส้นใยของฟิวแซนท์จำนวน 7 สายพันธุ์ คือ PL6, PL7, PL9, PL12, PL15 PL17 และ PL21 ที่ผ่านการตรวจสอบความเป็นลูกผสมมาทำการเพาะเลี้ยงในวัสดุเพาะก้อนขี้เลื่อยโดยบ่มที่อุณหภูมิห้องพบว่า PL6, PL9, PL12, PL15 สามารถเพาะให้เกิดดอกได้ ซึ่งพบว่าลักษณะของดอกเห็ดลูกผสมที่ได้จะมีความคล้ายคลึงกับเห็ดนางรมมากกว่าเห็ดหอม



(a) (b)

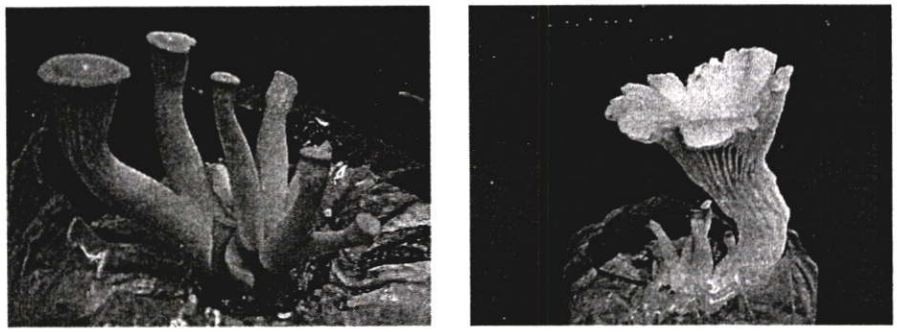
ภาพที่ 4.15 ดอกเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL6 ที่เจริญบนวัสดุเพาะ a = อายุ 3 วัน b = อายุ 7 วัน



(a) (b)

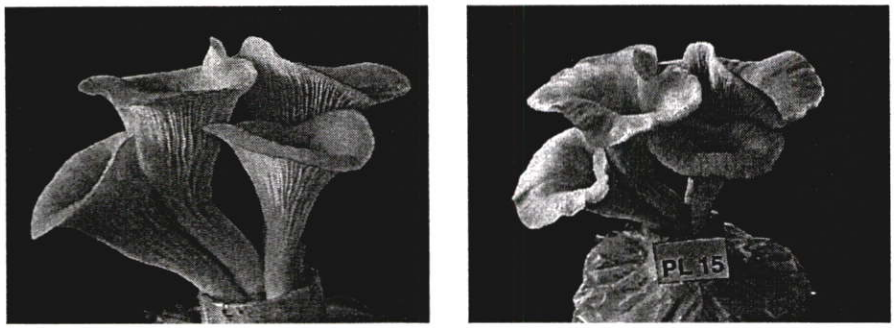
(c) (d)

ภาพที่ 4.16 ดอกเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL9 ที่เจริญบนวัสดุเพาะ a = อายุ 3 วัน b = อายุ 7 วัน c = อายุ 7 วัน และ d = อายุ 8 วัน



(a) (b)

ภาพที่ 4.17 ดอกเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL12 ที่เจริญบนวัสดุเพาะ (a อายุ 3วัน b อายุ 7วัน)



(a) (b)

ภาพที่ 4.18 ดอกเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL15 ที่เจริญบนวัสดุเพาะ a และ b = อายุ 7 วัน

4.5 ผลการศึกษาไอโซไซม์

ผลการวิเคราะห์ไอโซไซม์ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ esterase, laccase, malate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase และ phosphogluconate dehydrogenase พบว่า ไอโซไซม์ esterase และ malate dehydrogenase มีรูปแบบของ ไอโซไซม์ (zymogram) ได้หลายรูปแบบ ในเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17, และ PL21 ส่วน ไอโซไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase และ phosphogluconate dehydrogenase ให้แถบสีของไอโซไซม์ ไม่ค่อยชัดเจน ส่วนไอโซไซม์ laccase ไม่ปรากฏแถบของเอนไซม์ และเมื่อทำการวิเคราะห์ไอโซไซม์ ในเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ F42, F220, F249, F266, และ F342 (โดยจรัสรัช, 2544) พบรูปแบบของเอนไซม์ esterase และ malate dehydrogenase ส่วนรูปแบบของ glucose-6-phosphate

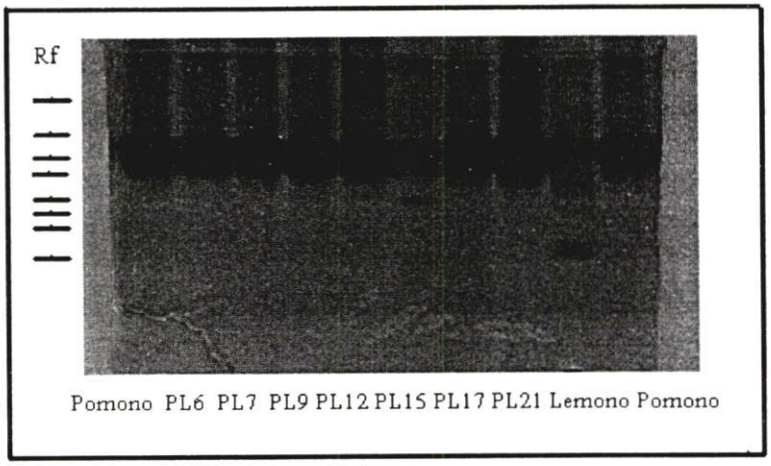
dehydrogenase และ phosphogluconate dehydrogrogenase ไม่สามารถอ่านค่าไซโมแกรมได้ เนื่องจากมีแถบสี ไม่ชัดเจน ส่วน ไอโซไซม์ laccase ไม่พบแถบของเอนไซม์

4.5.1 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ esterase

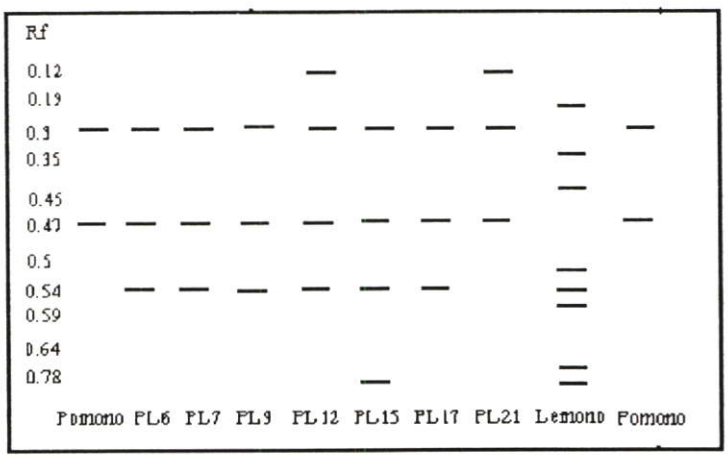
จากการศึกษาไอโซไซม์ esterase ของเห็ดลูกผสมและเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่พบว่าไซโมแกรมของ ไอโซไซม์ esterase ที่เกิดขึ้นบนแผ่นพอลีอะคลิลาไมด์เจล (ภาพที่ 4.19) แสดงความแตกต่างระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมและลูกผสมสายพันธุ์ F42, F220, F249, F266, และ F342 ได้คือมีแถบไอโซไซม์ที่เป็นทั้งของพ่อและของแม่ ซึ่งจำนวนแถบของไอโซไซม์ และค่า Rf ได้แสดงไว้ในภาพที่ 4.21 และ ตารางที่ 4.4 ไอโซไซม์ esterase ยังให้ไซโมแกรมที่ แสดงความแตกต่างของเห็ดหอม เห็ดนางรมและเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 ได้ ส่วน PL21 ไม่สามารถแยกความแตกต่างกับสายพันธุ์พ่อและแม่ได้ ซึ่งจำนวนแถบของไอโซไซม์ และค่า Rf ได้แสดงไว้ในภาพที่ 4.19 และ ตารางที่ 4.3

4.52 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ malate dehydrogenase

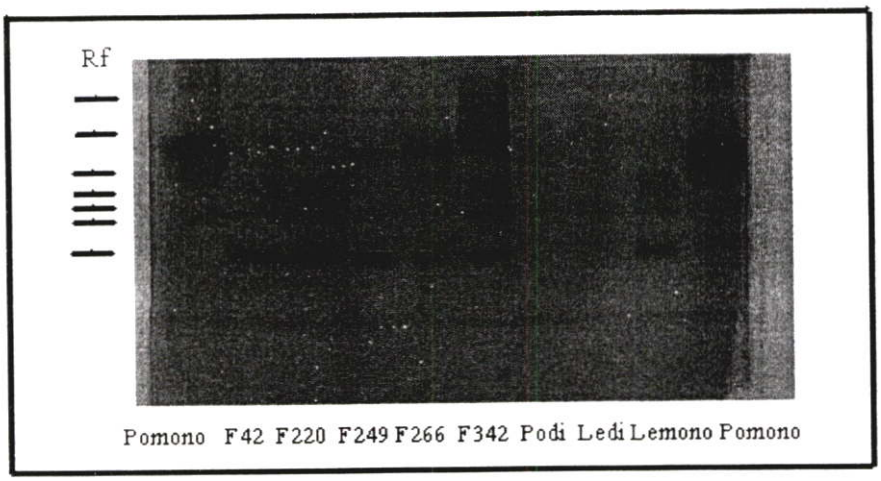
จากการศึกษา ไอโซไซม์ malate dehydrogenase พบว่าไซโมแกรมที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดหอมออกจากเห็ดนางรมและลูกผสมสายพันธุ์ F42, F220, F249, F266, และ F342 ได้ดังภาพที่ 4.24ไซโมแกรมของเห็ดนางรมมีจำนวนแถบไอโซไซม์จำนวน 3 แถบ ตัวแสดงไว้ในตารางที่ 4.6ไซโมแกรมของเห็ดหอมมีจำนวน 3 แถบ นอกจากนั้นไซโมแกรมที่ได้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมกับลูกผสมสายพันธุ์ PL7, PL9 และ PL12 ส่วนลูกผสมสายพันธุ์ PL6, PL15, PL17 และ PL 21 มีแถบไซโมแกรมที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างกับสายพันธุ์พ่อแม่



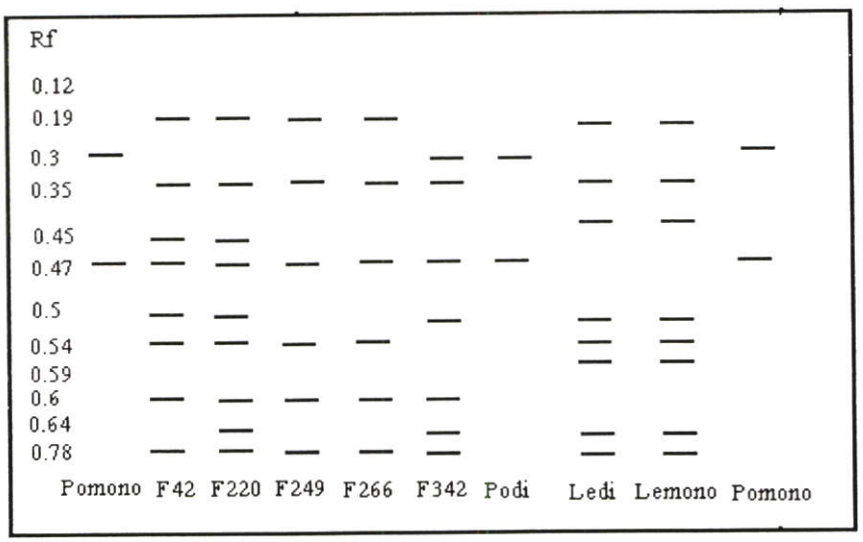
ภาพที่ 4.19 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ esterase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9 PL12, PL15, PL17 และ PL 21และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือสายพันธุ์พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และ เห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)



ภาพที่ 4.20 ไดอะแกรมแสดงลักษณะของไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ esterase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9 PL12, PL15, PL17 และ PL 21และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือสายพันธุ์พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริ ออน (Lemono) และ เห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)



ภาพที่ 4.21 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ esterase ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249 , F266 และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)



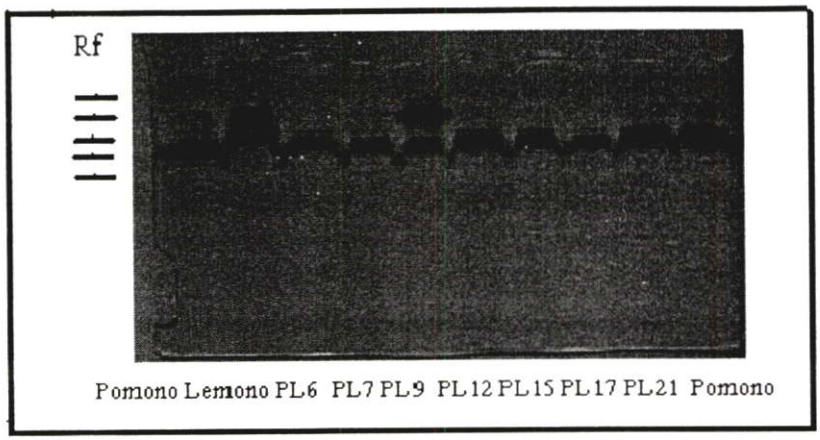
ภาพที่ 4.22 ไดอะแกรมแสดงลักษณะไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ esterase ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249 , F266 และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์ พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ esterase ของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono) และเห็ดลูกผสม PL6, PL7 PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL21

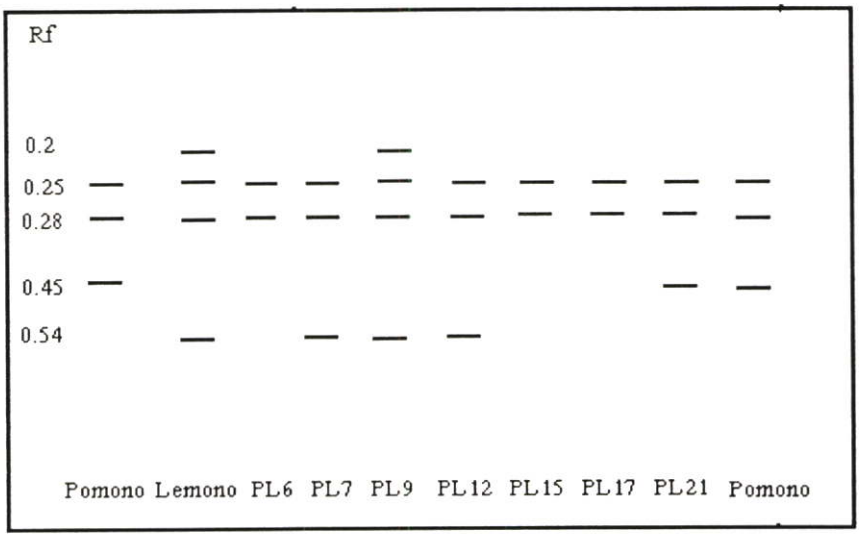
แถบไอโซไซม์	Pomono	PL6	PL7	PL9	PL12	PL15	PL17	PL21	Lemono
แถบที่ 1	0.3	0.3	0.3	0.12	0.3	0.3	0.19	0.12	0.19
แถบที่ 2	0.47	0.47	0.47	0.3	0.47	0.47	0.3	0.3	0.35
แถบที่ 3	-	0.54	0.54	0.47	0.54	0.54	0.47	0.47	0.45
แถบที่ 4	-	-	-	0.54	-	0.78	-	-	0.5
แถบที่ 5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.54
แถบที่ 6	-	-	-	-	-	-	-	-	0.59
แถบที่ 7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.64
แถบที่ 8	-	-	-	-	-	-	-	-	0.78

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ esterase ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249 , F266 และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์ พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)

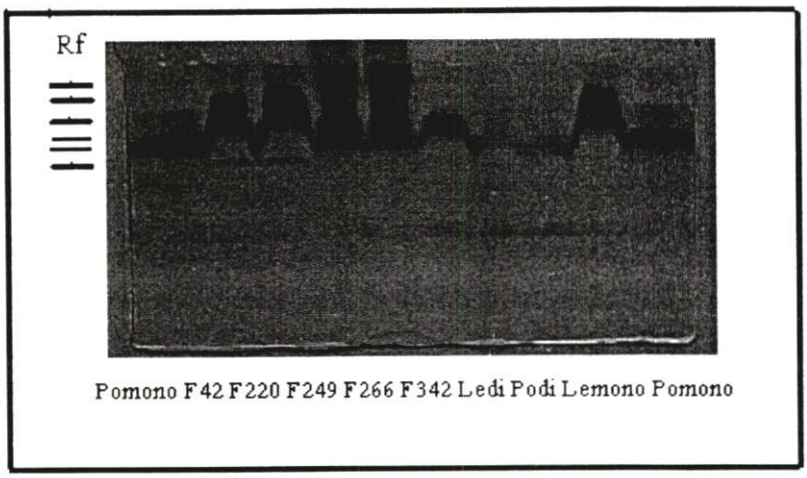
แถบไอโซไซม์	Pomono	F42	F220	F249	F266	F342	Podi	Ledi	Lemono
แถบที่ 1	0.3	0.19	0.19	0.19	0.19	0.3	0.3	0.19	0.19
แถบที่ 2	0.47	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.47	0.35	0.35
แถบที่ 3	-	0.45	0.45	0.47	0.47	0.47	-	0.45	0.45
แถบที่ 4	-	0.47	0.47	0.54	0.54	0.5	-	0.5	0.5
แถบที่ 5	-	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	-	0.54	0.54
แถบที่ 6	-	0.54	0.54	0.78	0.78	0.64	-	0.6	0.6
แถบที่ 7	-	0.6	0.6	-	-	0.78	-	0.64	0.64
แถบที่ 8	-	0.78	0.64	-	-	-	-	0.78	0.78
แถบที่ 9	-	-	0.78	-	-	-	-	-	-



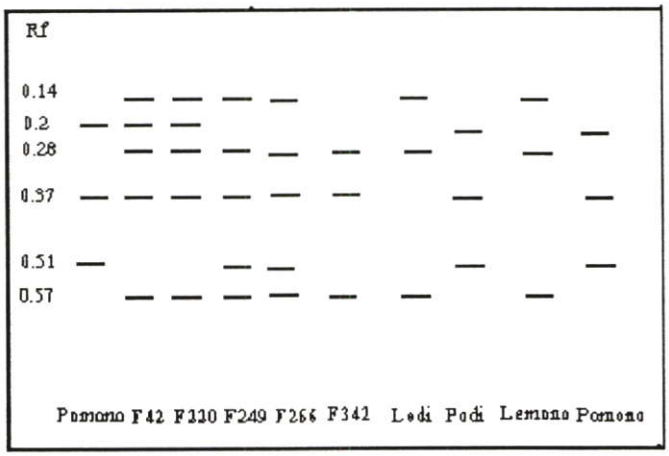
ภาพที่ 4.23 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ malate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9 PL12, PL15, PL17 และ PL 21และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือสายพันธุ์ พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริ ออน (Lemono) และ เห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)



ภาพที่ 4.24 ไดอะแกรมแสดงลักษณะที่ได้จากเอนไซม์ malate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL 21และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือสายพันธุ์พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริ ออน (Lemono) และ เห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)



ภาพที่ 4.25 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ malate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249 , F266 และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์ พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)



ภาพที่ 4.26 ไดอะแกรมแสดงลักษณะที่ได้จากเอนไซม์ malate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249 , F266 และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์ พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)

ตารางที่ 4.5 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ malate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9 PL12, PL15, PL17 และ PL 21และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือสายพันธุ์ พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริ ออน (Lemono) และ เห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)

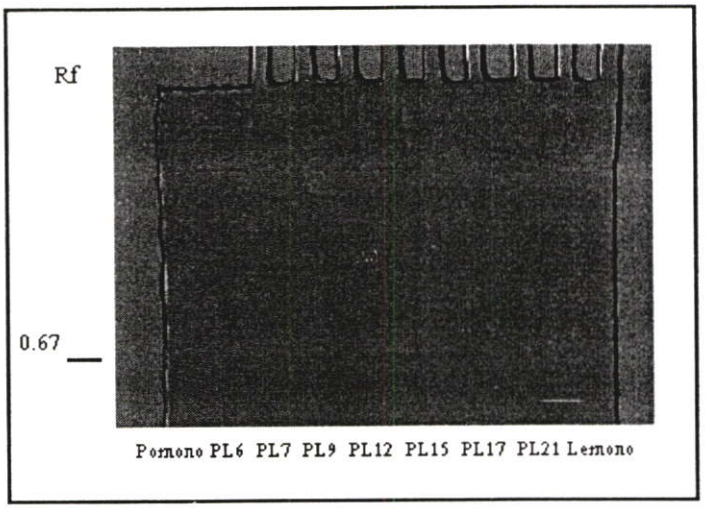
แถบไอโซไซม์	Pomono	PL6	PL7	PL9	PL12	PL15	PL17	PL21	Lemono
แถบที่ 1	0.25	0.25	0.25	0.2	0.25	0.25	0.25	0.25	0.2
แถบที่ 2	0.28	0.28	0.28	0.25	0.28	0.28	0.28	0.28	0.25
แถบที่ 3	0.45	-	0.54	0.28	0.45	-	-	0.45	0.28
แถบที่ 4	-	-	-	0.54	-	-	-	-	0.54

ตารางที่ 4.6 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ malate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249 F266 และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์ พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)

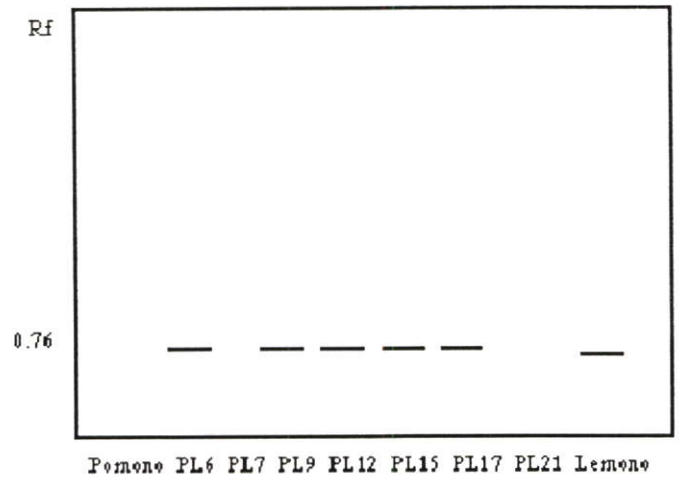
แถบไอโซไซม์	Pomono	F42	F220	F249	F266	F342	Ledi	Podi	Lemono
แถบที่ 1	0.2	0.14	0.14	0.14	0.14	0.28	0.14	0.2	0.14
แถบที่ 2	0.37	0.2	0.2	0.28	0.28	0.37	0.28	0.37	0.28
แถบที่ 3	0.51	0.28	0.28	0.37	0.37	0.57	0.57	0.51	0.57
แถบที่ 4	-	0.37	0.37	0.51	0.51	-	-	-	-
แถบที่ 5	-	0.57	0.57	0.57	0.57	-	-	-	-

4.5.3 การศึกษารูปแบบเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)

จากการศึกษาไอโซไซม์ G6PD พบว่าไซโมแกรมที่ได้ จากการศึกษาไอโซไซม์ G6PD ในเห็ดลูกผสม PL6, PL9, PL12, PL15 และ PL17 (ภาพที่ 4.27) มีไซโมแกรมที่ได้ตรงกับเห็ดหอมโมโนคาริออน โดยมีแถบที่มีตำแหน่งตรงกัน 1 แถบ ซึ่งค่า Rf คือ 0.76 และให้แถบสีที่จางมาก และไม่พบรูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดนางรมโมโนคาริออน และเห็ดลูกผสม F42, F220, F249, F266 และ F342 (ภาพที่ 4.29) การที่ไม่มีแถบไอโซไซม์ของเห็ดนางรมโมโนคาริออน ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ และเห็ดนางรมโมโนคาริออนกับเห็ดลูกผสมได้



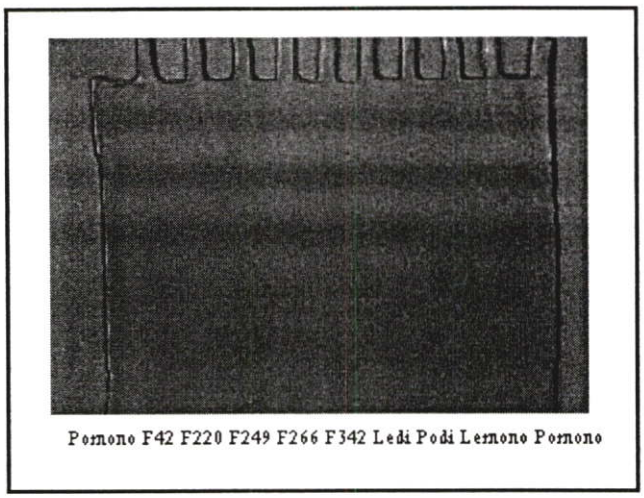
ภาพที่ 4.27 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9 , PL12, PL15, PL17 และ PL 21และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือสายพันธุ์พ่อแม่ คือ เห็ด หอมโมโนคาริ ออน (Lemono) และ เห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)



ภาพที่ 4.28 ไดอะแกรมแสดงลักษณะที่ได้จากเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9 ,PL12, PL15, PL17 และ PL 21และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือสายพันธุ์ พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริ ออน (Lemono) และ เห็ดนางรมโมโนคาริ ออน (Pomono)

ตารางที่ 4.7 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenese ของเห็ดลูกผสม PL6 PL7, PL9 , PL12, PL15, PL17 และ PL 21และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือสายพันธุ์ พ่อแม่ คือ เห็ด หอมโมโนคาริ ออน (Lemono) และ เห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)

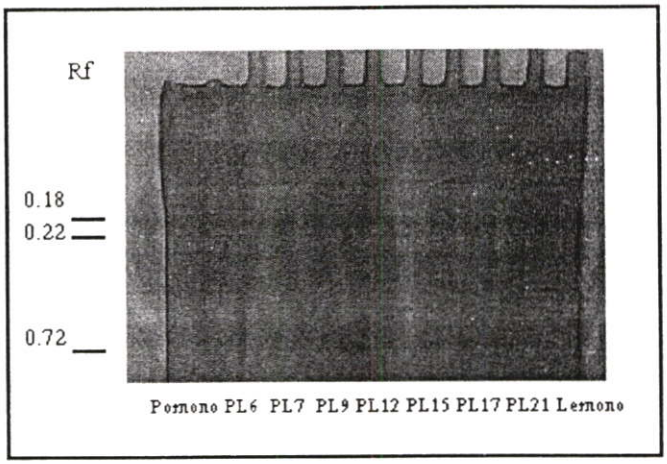
แถบไอโซไซม์	Pomono	PL6	PL7	PL9	PL12	PL15	PL17	PL21	Lemono
แถบที่ 1	-	0.76	-	0.76	0.76	0.76	0.76	-	0.76



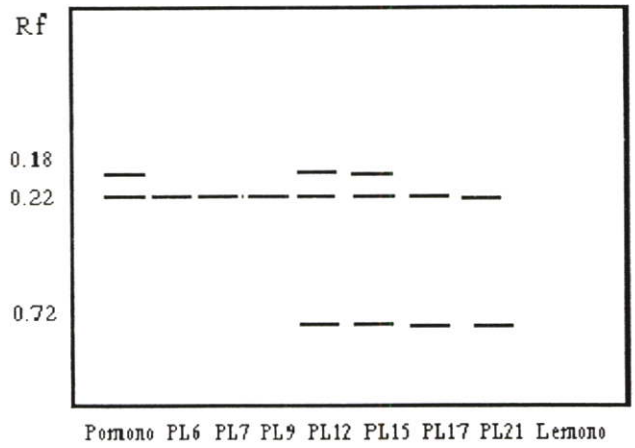
ภาพที่ 4.29 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249 , F266 และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์ พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)

4.5.4 การศึกษารูปแบบเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase (PGD)

จากการศึกษารูปแบบเอนไซม์ PGD พบว่า ไซโมแกรมที่ได้ให้แถบสีที่จางมาก (ภาพที่4.30 และภาพที่ 4.32) และไม่พบรูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดหอมโมโนคาริออน แต่พบแถบสีในเห็ดนางรมโมโนคาริออนและเห็ดลูกผสม สายพันธุ์ PL12, PL15, PL17, และ PL21 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางรมโมโนคาริออนและเห็ดลูกผสมได้ซึ่งค่า Rf ของเห็ดนางรมและเห็ดลูกผสมแสดงในตารางที่ 4.18 แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่าง ระหว่างเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่และเห็ดหอมโมโนคาริออนกับเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ F42, F220, F249 , F26 และ F342



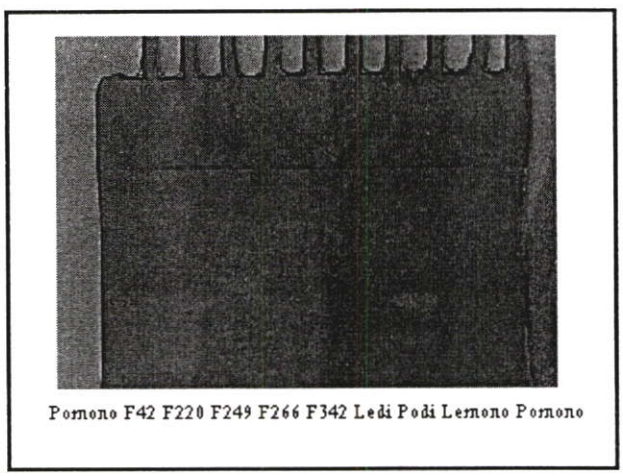
ภาพที่ 4.30 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL 21และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือสายพันธุ์ พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริ ออน (Lemono) และ เห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)



ภาพที่ 4.31 ไดอะแกรมแสดงลักษณะที่ได้จากเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL 21และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือสายพันธุ์ พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริ ออน (Lemono) และ เห็ดนางรมโมโนคาริ ออน (Pomono)

ตารางที่ 4.8 แสดงค่า Rf ของไอโซไซม์ phosphogluconate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และ PL 21และเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ คือสายพันธุ์ พ่อแม่ คือ เห็ดหอมโมโนคาริ ออน (Lemono) และ เห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)

แถบไอโซไซม์	Le	Po	PL6	PL7	PL9	PL12	PL15	PL17	PL21
แถบที่ 1	-	0.18	0.22	0.22	0.22	0.18	0.18	0.22	0.22
แถบที่ 2	-	0.22	-	-	-	0.22	0.22	0.72	0.72
แถบที่ 3	-	-	-	-	-	0.72	0.72	-	-



ภาพที่ 4.32 ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase ของเห็ดลูกผสม F42, F220, F249 , F266 และ F342 และเห็ดหอมไดคาริออน (Ledi) เห็ดนางรมไดคาริออน (Podi) และเห็ดสายพันธุ์ พ่อแม่ คือเห็ดหอมโมโนคาริออน (Lemono) และเห็ดนางรมโมโนคาริออน (Pomono)

4.5.5 การศึกษารูปแบบเอนไซม์ laccase

จากการศึกษาไอโซไซม์ laccase พบว่าไม่ปรากฏแถบสีของไอโซไซม์ ทั้งในเห็ดหอม เห็ดนางรม และเห็ดลูกผสมในทุกสายพันธุ์

4.6 ผลการวิเคราะห์ไซโมแกรม

จากการศึกษาไอโซไซม์และการวิเคราะห์ไซโมแกรมของเห็ดหอมโมโนคาริออน เห็ดนางรมโมโนคาริออนที่เป็นเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ในการรวมโพรโตพลาสต์ และเห็ดสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า รูปแบบไอโซไซม์ ของ esterase และ malate dehydrogenase สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดลูกผสม [จำนวน 6 สายพันธุ์ (จาก 7 สายพันธุ์) คือ PL6, PL7, PL9, PL12, PL15 และ PL17 และลูกผสม (จากจรัสรัช ,2544) ทุกสายพันธุ์คือ F42, F220, F249, F266 และ F342] กับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ได้ สำหรับไอโซไซม์อีก 3 ตัวที่เหลือไม่สามารถให้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้ กล่าวคือ phosphogluconate dehydrogenase จะปรากฏแถบเฉพาะในเห็ดนางรม และลูกผสมเมื่อทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ในลูกผสมที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ แต่ไม่ปรากฏแถบใดๆทั้งในเห็ดนางรมและเห็ดหอมเมื่อทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ในเห็ดลูกผสมของจรัสรัช (2544) ส่วนเอนไซม์ glucose-6-phophate dehydrogenase ปรากฏแถบในเห็ดหอมและลูกผสมของการศึกษาลูกผสมในการทดลองครั้งนี้ แต่ไม่ปรากฏแถบใดๆในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ในลูกผสมของจรัสรัช (2544) สำหรับเอนไซม์ laccase ไม่ปรากฏแถบใดๆในทุกสายพันธุ์ของการศึกษาในครั้งนี้

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมในการศึกษาครั้งนี้ ใช้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโตพลาสต์ และการรวมโพรโตพลาสต์โดยอาศัยงานวิจัยของ ประภัสสร (2540) และจรัสรัช (2544) กล่างคือใช้ออสโมติกสเตบิไลเซอร์ที่ประกอบด้วย แมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมล ที่ pH 5.5 สำหรับเห็ดหอมและ pH 5.0 สำหรับเห็ดนางรม ซึ่งทำให้ได้โพรโตพลาสต์ จำนวน 6.6 X 10^6 โพรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร และ 2.6 X 10^7 โพรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรและมีขนาดของโพรโต พลาสต์เป็น 0.46 และ 0.23 ไมโครเมตรตามลำดับ

เมื่อนำโพรโตพลาสต์ที่ได้มารวมกันโดยใช้ โพลีเอทธิลีนไกลคอล 6000 ความเข้มข้น 40% และทำให้โพรโตพลาสต์เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่ และทำการคัดเลือกโพรโตพลาสต์ ได้จำนวน 63 โคโลนี แต่เมื่อทำการตรวจสอบเพื่อหาลูกผสมพบว่ามีจำนวน 7 สายพันธุ์ที่พบ clamp connection คือ PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17, และ PL21 และเมื่อทำการวัดการเจริญของเส้นใยของโคโลนีลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่า เห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL6, PL7, และ PL9 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผสมสายพันธุ์ PL12 และ PL15 เจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส เห็ดสายพันธุ์ PL17 เจริญได้ดีที่ช่วง 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส ส่วนลูกผสมสายพันธุ์ PL21 เจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเห็ดหอมเจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 25 องศาเซลเซียส และเห็ดนางรมเจริญได้ดีที่ ช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองนี้จึงแสดงว่าลูกผสมที่ได้สามารถเจริญอยู่ในช่วงอุณหภูมิเดียวกันกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ โดยเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL6, PL7, PL9 และ PL21 มีลักษณะการเจริญที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับเห็ดหอม ส่วนเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL12, PL15 และ PL17 มีลักษณะการเจริญที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับเห็ดนางรม

ผลการทดสอบการเกิดดอก พบว่าเห็ดลูกผสม PL6, PL9, PL12 และ PL15 สามารถเพาะให้เกิดดอกได้ในก้อนขี้เลื่อยเพาะเห็ดสำเร็จรูปแต่พบว่าลูกผสมที่เจริญได้มีลักษณะของดอกเห็ดที่คล้ายกับเห็ดนางรมมากกว่าเห็ดหอม ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ คือลูกผสมเหล่านี้มีแถบไซโมแกรมตรงกับของเห็ดนางรมทุกแถบแต่ตรงกับของเห็ดหอมเพียงบางแถบ

ผลการตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ esterase สามารถพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่และลูกผสมทั้งที่ได้จากการทดลองนี้ และจากการทดลองของจรัสรัช (2544)

ผลจากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ malate dehydrogenase สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมในเห็ดสายพันธุ์ PL7, PL9 และ PL12 โดยพบแถบไซโมแกรมบางแถบที่เหมือนกับของสายพันธุ์พ่อแม่ และสามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสม 5 สายพันธุ์ของจรัสรัชได้ เนื่องจากพบแถบไซโมแกรมบางแถบที่เหมือนกับของสายพันธุ์พ่อแม่

ผลจากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase พบว่าเห็ดลูกผสมทั้งหมดที่ได้จากการทดลองนี้ มีแถบไซโมแกรมที่ได้ตรงกับเห็ดหอม แต่ไม่พบแถบไซโมแกรมของเห็ดนางรมและทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดลูกผสมและเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ได้

ผลการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ phosphogluconate dehydrogenase พบว่า เห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL12, PL15, PL17 และ PL21 มีแถบของไซโมแกรมบางแถบที่เหมือนกับเห็ดนางรม แต่ไม่พบแถบไซโมแกรมของเห็ดหอมจึง ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดลูกผสมและเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ได้

จากผลการทดสอบความเป็นลูกผสมโดยศึกษารูปแบบไอโซไซม์สรุปได้ว่า เห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL6, PL7, PL9, PL12, PL15, PL17 และลูกผสมสายพันธุ์ F42, F220, F249, F266 และ F342 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรม เนื่องจากตรวจพบแถบไซโมแกรมบางแถบที่ตรงกับสายพันธุ์พ่อแม่ ส่วนเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL21 มีแถบไซโมแกรมที่ตรงกับเห็ดนางรมเพียงอย่างเดียวแต่มีการเจริญได้ที่อุณหภูมิเดียวกับเห็ดหอม

สำหรับข้อเสนอแนะและวิจารณ์มีดังต่อไปนี้

1. ควรมีการวัดขนาดเส้นใยของสายพันธุ์พ่อแม่เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ลูกผสม
2. ควรมีการเปรียบเทียบความแตกต่างของสีสปอร์พิมพ์ของเห็ดสายพันธุ์ลูกผสมกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่
3. การตรวจสอบการเกิดดอกของลูกผสม ควรเลี้ยงในอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเส้นใยลูกผสม
4. ในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อให้ได้แถบไซโมแกรมที่ชัดเจน อาจเพิ่มปริมาณของสารตัวอย่าง หรือ sample buffer เพื่อให้ได้แถบสีที่ชัดเจนขึ้น
5. ค่า Rf ที่ได้จากการอ่านอาจมีค่าที่แตกต่างกันได้ในเห็ดสายพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากตัวอย่างอยู่บนเจลคนละแผ่นกัน
6. เพื่อให้ได้ความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างเห็ดลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่ อาจใช้เทคนิคทางด้าน DNA ช่วยในการตรวจสอบ

บรรณานุกรม

กลุ่มบัณฑิตก้าวหน้า. 2538. **การเพาะเห็ดในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ.

ขนิษฐา พรเจริญโรจน์. **การปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยวิธีการผสมพันธุ์**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

คณาจารย์คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2534. **สารานุกรมวิทยาศาสตร์เล่ม 1.** กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จรัชรัส มั่นถาวร. 2544. **การสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) โดยการรวมโพรโตพลาสต์**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชัชฎาพร อินทำมา. 2538. **การศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาและไอโซไซม์ของเห็ดโคน** วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ฐิติพร อำพนพิบูลย์. 2544. **แบบแผนไอโซไซม์ของเห็ดฟาง** หัวข้อปฏิบัติ สาขาพฤษศาสตร์ ภาควิชา พันธุศาสตร์สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ .

เทพบุตร ดีรักษาพร และคณะ. 2540. **การศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อทดสอบความเป็น พ่อ แม่ ลูก ระหว่างลูกผสมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว** โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตร์บัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธนพันธุ์ เมธาพิทักษ์กุล. 2537. **เพาะเห็ดสารพัดชนิด**. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์เจริญกิจ.

ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539. **การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสรีรวิทยา และผลผลิตของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดนางรมสีทอง**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประภัสสร โชคสวนทรัพย์. 2540. **การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ ลักษณะทางสันฐานวิทยา และผลิตผลของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดนารมสีเทา**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พวงเพชร พูนทรัพย์. 2003. **งานวิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ**. (Online). Available : http://www.rdi.gop.or.th/htmls/mushroom1.html.

พิมพ์กานต์ อร่ามพงษ์พันธุ์. 2540. **การเพาะเห็ดหอมจากก้อนขี้เลื่อย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร**. กองเกษตรสัมพันธ์.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกล็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. **หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ**. โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลฐานอาเซี่ยน.

สมศักดิ์ วรรณศิริ และคณะ. 2529. **เพาะเห็ดนางรมนางฟ้า**. กรุงเทพฯ โรงพิมม์มิตรสยาม.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536. **โปรโตพลาสต์ฟิวชันของจุลินทรีย์.** กรุงเทพฯ.

สุภาภรณ์ จาริยวัฒน์. 2541. **การใช้เทคนิคโพรโตพลาสต์และการศึกษาความแตกต่างของไอโซไซม์จากเส้นใยโมโนคารีออน.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มังกร เทวสิงห์. 2540. **การแยกและการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม.** วิทยานิพนธ์เกษตรศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

สุมาลี พิชญางกูร (โตสุนทร). 2541. **เห็ดโคนและเห็ดลูกผสมฟิวแซนท์.** กรุงเทพฯ . โรงพิมพ์อาคารสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2538. **เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส.** คณะสัตว์แพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

Alexopoulos, C.J.and Mims, C.W. 1979. Introduction Mycology. 3th editions. New York.Jonh Willey & Sons.

Chang ST. 1991. Mushroom biology and mushroom production Mushroom. **J. Trop.** 11:45-52.

Chang ST. 1996. Mushroom research and development-equality and mutual benefit. *In* **Royse DJ(ed) Mushroom biology and mushroom products.** Pennsyivania State Unibersity Press, Pittsburgh, pp 1-10.

Chang ST. 1999. **Global impact of edible and medicinal mushroom on human welfare in the 21 st century: non-green revolution. J. Med. Mushroom.** 1:1-7.

Eguchi,F.et.al. 1993. Production of new spicies of edible mushroom by protoplasts fusion method. II. Analysis of the mycelia and basidiospores of a fusants between *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe cylindracea*. **Journal of the Japan Wood-Research-Society.** 39(7) : 825-830.

Fumio Iguchi and Mayato Higaki. 1995. Production of New Species of Edible Mushrooms by Protoplast Fusion Method. **Mokuzai Gakkaishi.** Vol.41 No 3, PP 342-348.

Giardina P, Aurlia V, Cannio R, Marzullo L, Amoresano A, Siciliano R, Pucci P, Sannia G. 1996. The gene protein and glycan structure of laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Eur. J Biochem.** 235:508-515.

Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cebbamo S, sanria G. 1999.

Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus* . **J. Biochem.** J 341:655-663.

Gurbachan S. Miglani. 1998. **Dictionary of plant genetics and molecular biology.** New York : The Haworth Press, Inc.

Hilber O. 1997. **The genus Pleurotus (Fr.) Kummer**. Erschienenim Selbstuerlah.

Jong Zhao and Shu-Ting Chang. 1993. Monokaryotization by protoplasting heterothallic species of edible mushroom . **World Journal of Mocrobiology and Biotechnology**. 9: 538-543 .

J. Zhao and S.T. Chang. 1996. Intergeneric hybirdization between *Pleurotus osteratus* and *Schizophyllum commune* by PEG-induced protoplast fusion. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 12:573-578.

Karacsonyi S, Kuniak L .1994. Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus* isolation and strusture of pleuran; an alkali-insoluble beta-D-glucan. **Carbohydr Polym.** 24:107-111.

Kaufmen, Perter B. et.al. 1995. **Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine.** Florida : CRC Press.

Liang,Z.et.al. 2001. Polarized protoplast fusion between *Pleurotus sajor-caju* and *Schizophyllum commune*. **Mycosytema**. 20(1) : 111-115.

Liang,Z.et.al. 1999. Study of polarized protoplast fusion between *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus cystidiosus*. **Mycosytema.** 18(4) : 440-444.

Masami Abe, Hironori Umetsu , Takao Nakai and Denkichi Sasage. 1982. Regenration and Fusion of Mycelia Protoplasts of *Tricholoma matsutake.* **Agric.Biol .Chem.** 46(7).1955-1982.

Matsumoto,M.et.al. 1997. Polyethylene glycol centrifugal fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju.* **Journal of the JapanWood Research Society**. 43(2) : 215-219.

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

Miles PG, Chang ST. 1997. **Mushroom biology corcise basics and current developments**. World Scientific, Singapore.

Palmieri G,Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A,Sannia G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **J. Bio. Chem.** 272:31301-31307.

R. Cohen.L. Persdy. Y. Hadar. 2002. Biotechrological applications and potential of wood-deqrading mushroom of the genus Pleurotus. :**Appl. Microb. Biotech.** 58:582-594.

Soden DM, Dobson ADW. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor caju*. **Microbiol**. 147:1755-1763.

S.O. Yanagi and I. Takabe. 1984. An efficient method for the isolation of mycelial protoplasts from *Coprinus macrorhizus* and other basidiomycetes. **Appl. Microb. Biotech.** 19:58-60.

S.O. Yanagi,M Monma, T Kawasumi, A. Hino, M. Kito and I.Takebe.1985. Condition for Isolation of and Colony Formation by Mycelial Protoplasst of Coprinus macrorhizus. **Agric Biol. Chem**. 49(1),171-179.

Takao kiguchi and Sonoe O.Yanagi 1985. Intraspecific heterokaryon and fruit body formation in *Coprinus macrorhizus* by protoplast fuaion of auxotrophic mutants. **Appl. Microb. Biotech.** 22:121-127.

Tetsuo Toyomasu,Takuo matsumoto and Kan-ichi Mori 1986 Interspecific Protoplast Fusion between *pleurotus ostreatus* and *pleurotus salmoneo-stramimeus*. **A gric. Biol. Chem.** 50(1):223-225.

Tokumitsu Okamura , Tomomi Takeno , Mizuho Dohi , Izumi Yasumasa , Tokiko Hayashi , Mashiho Toyoda , Hiroko Noda , Shoko Fukada , Naboru Horie and Masahiro Ohsugi. 2000. Development of Mushroom from Thrombosis Prevention by Protoplast Fusion. **J. of Bioscience and Bioengineering** Vol 89 No.5 ; 474 – 478.

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

Toyomasu, T& Mori,KI 1989. Characteristics of the fusion products obtained by intra- and interspecific protoplast fusion between *Pleurotus species*. **Mushroom Science.** 12:151-159.

Wasser SP, Weis AL.1999b. General description of the most importain medicinal higher Basidiomycetes mushroom of the genus Pleurotus. **Appl. Microb. Biotech.** 58:582-594.

Yokono-T. 2000. Karyotype analysis of interspecific fusants of basidiomycetes by pulsed-filed gel electorphoresis. **J. of Wood Science.** 46: 480-484.

Yukitaka Fukumasa-Nakai, Teruyuki Matsumoto and Mitsuo Komatsu 1994 Dedikaryotization of the Shiitake mushroom. *Lentinula edodes* by the protoplast regeneration method. **J. Gen. Appl. Microbiol.**,40,551-562 .

Zhang,C.et.al. 1995. Protoplast fusion of *Lentinus edodes* and indentification of its fusant. **Microbiology-Beiling**. 22(2) : 67-71.

Zhu-Bao Cheng. et.al. 1995. Studies on isozymes of *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus ostreatus* and their fusant strains. **Hereditas-Beijing**. 17:(4), 37-39.

ภาคผนวก ก
อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

อาหารเอ็มวายจี (malt yeast extract)

ประกอบด้วย	malt extract	4.0 กรัม
	yeast extract	1.0 กรัม
	Glucose	1.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร บรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่

เตรียมโดยนำอาหารพีดีบี ละลายในออสโมติค สเตบิไลเซอร์แล้วเติมวุ้นให้เป็น 3 % สำหรับอาหารที่ใช้เททับผิวหน้าทำได้โดยนำอาหารชนิดเดิมมาเติมวุ้นให้มีความเข้มข้น 0.5 % จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (จรัชรัส มั่นถาวร, 2544)

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

ส่วนประกอบของ MM มีดังนี้

glucose	20	กรัม
$(NH_4)_2HPO_4$	1.5	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$Mg_2SO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
Thiamine.HCl	0.12	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมบัฟเฟอร์และสารเคมี

ตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาไอโซไซม์ (ฐิติพร อำพนพิบูลย์, 2544)

ชนิดของเอนไซม์	สารละลายสีย้อมเอนไซม์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
Esterase(EST)	Phosphate buffer 0.1 M pH 6.0	100
	Fast blue BB salt	0.15
	Alpha napthyl acetate	3
Malate dehydrogenase (MHD)	Tris-HCl 0.0825 M,pH 9.0	40
	PMS 0.00326 M	1.3
	NAD 0.003 M	5.3
	$MgCl_2 6H_2O$	0.3
	MTT 0.0096 M	2.5
	DL-malice acid (sodium salt)	60.0
Laccase	O-Tolidine 0.1 mM ใน โซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ 0.1 M pH 4.5	50

การเตรียมบัฟเฟอร์สำหรับการทำโพรโตพลาสต์ (ประภัสสร โชคสวนทรัพย์, 2540)

โซเดียมมาลีท บัฟเฟอร์ (โพรโตพลาสต์บัฟเฟอร์) 0.05 โมล ประกอบด้วย

1. สารละลาย ก : สารละลายโซเดียมมาลีท 0.2 โมล

โดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ผสมกับกรดมาลิอิก 19.6 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. สารละลาย ข: สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมล

โดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ในการปรับค่า pH ของบัฟเฟอร์ให้ใช้สารละลาย ก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ข ปริมาตร X มิลลิลิตร (ปรับจนได้ค่า pH ที่ต้องการ) แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 200 มิลลิลิตร

การเตรียมออสโมติคสเตบิไลเซอร์

แมกเนเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.6 โมลาร์

โดยละลายแมกเนเซียมซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต 147.84 กรัม ในสารละลายโพรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ 1,000 มิลลิลิตร

สารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอน (PEG) 6000 ความเข้มข้น 40%

เตรียมโดยละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 6000 ปริมาณ 20 กรัม ในน้ำร้อน 30 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 45 มิลลิลิตร แล้วเติม แคลเซียมคลอไรด์ 500 มิลลิโมล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL6 ที่อุณหภูมิต่างๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CM	Between Groups	34.520	3	11.507	3384.340	.000
	Within Groups	2.720E-02	8	3.400E-03		
	Total	34.547	11			

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25	30	20	35
ค่าเฉลี่ย	4.2	3.9	3.5	0
	a	b	c	d

หมายถึง PL6 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการเจริญที่อุณหภูมิ 20° C, 25° C, 30 ° C และ35°C

CM

Duncan[a]

		Subset for alpha = .05			
TEM	N	1	2	3	4
4.00	3	.0000			
1.00	3		3.5133		
3.00	3			3.9067	
2.00	3				4.2067
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
20	3.51c
25	4.2a
30	3.9b
35	0d

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL7 ที่อุณหภูมิต่างๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CM	Between Groups	45.087	3	15.029	4223.628	.000
	Within Groups	2.847E-02	8	3.558E-03		
	Total	45.116	11			

การตรวจสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25	30	20	35
ค่าเฉลี่ย	4.69	4.45	4.24	0
	a	b	c	d

หมายถึง PL7 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของการเจริญที่อุณหภูมิ 20° C, 25° C, 30 ° C และ 35° C

CM

Duncan[a]

		Subset for alpha = .05			
TEM	N	1	2	3	4
4.00	3	.0000			
1.00	3		4.2400		
3.00	3			4.4500	
2.00	3				4.6933
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
20	4.24c
25	4.69a
30	4.45b
35	0d

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL9 ที่อุณหภูมิต่างๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CM	Between Groups	32.425	3	10.808	4839.582	.000
	Within Groups	1.787E-02	8	2.233E-03		
	Total	32.443	11			

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25	30	20	35
ค่าเฉลี่ย	4.15	3.58	3.54	0
	a	b	b	c

หมายถึง PL9ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C, 30° C และ 35° C ในขณะที่อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C, 30° C ไม่แตกต่างกันและที่ 35° Cก็มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C, 25° C และ 30° C

CM

Duncan[a]

		Subset for alpha = .05		
TEM	N	1	2	3
4.00	3	.0000		
1.00	3		3.5400	
3.00	3		3.5800	
2.00	3			4.1467
Sig.		1.000	.330	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
20	3.54b
25	4.15a
30	3.58b
35	0c

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการเจริญของเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL12 ที่อุณหภูมิต่างๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CM	Between Groups	35.787	3	11.929	858.715	.000
	Within Groups	.111	8	1.389E-02		
	Total	35.898	11			

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25	30	20	35
ค่าเฉลี่ย	4.22	4.07	3.54	0
	a	a	b	c

หมายถึง PL12 ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C และ 35° C และในขณะที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C และ 30° C ไม่แตกต่างกันและที่ 35° C ก็มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C, 25° C และ 30° C

CM

Duncan[a]

		Subset for alpha = .05		
TEM	N	1	2	3
4.00	3	.0000		
1.00	3		3.5433	
3.00	3			4.0733
2.00	3			4.2200
Sig.		1.000	1.000	.166

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
20	3.54b
25	4.07a
30	4.22a
35	0c

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการเจริญของเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL15 ที่อุณหภูมิต่างๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CM	Between Groups	34.935	3	11.645	2117.246	.000
	Within Groups	4.400E-02	8	5.500E-03		
	Total	34.979	11			

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25	30	20	35
ค่าเฉลี่ย	4.15	4.02	3.53	0
	a	a	b	c

หมายถึง PL15 ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C และ 35° C และในขณะที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C และ 30° C ไม่แตกต่างกันและที่ 35° C ก็มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C, 25° C และ 30° C

CM

Duncan[a]

		Subset for alpha = .05		
TEM	N	1	2	3
4.00	3	.0000		
1.00	3		3.5367	
3.00	3			4.0233
2.00	3			4.1533
Sig.		1.000	1.000	.064

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
20	3.54b
25	4.15a
30	4.02a
35	0c

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL17 ที่อุณหภูมิต่างๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CM	Between Groups	54.080	3	18.027	650.982	.000
	Within Groups	.222	8	2.769E-02		
	Total	54.302	11			

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30	25	20	35
ค่าเฉลี่ย	5.09	4.92	4.66	0
	a	b	b	c

หมายถึง PL17 ที่อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่อุณหภูมิ 35° C มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C, 25° C และ 30° C

CM

Duncan[a]

TEM	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
4.00	3	.0000		
1.00	3		4.6600	
2.00	3		4.9233	4.9233
3.00	3			5.0867
Sig.		1.000	.089	.264

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
20	4.66b
25	4.92b
30	5.09a
35	0c

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ PL21 ที่อุณหภูมิต่างๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CM	Between Groups	33.899	3	11.300	1045.453	.000
	Within Groups	8.647E-02	8	1.081E-02		
	Total	33.985	11			

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25	20	30	35
ค่าเฉลี่ย	4.1	3.97	3.45	0
	a	a	b	c

หมายถึง PL21 ที่อุณหภูมิ 20 $^{\circ}$ C และ 25 $^{\circ}$ C ไม่แตกต่างกัน แต่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ อุณหภูมิ 30° C และ 35° C

CM

Duncan[a]

		Subset for alpha = .05		
TEM	N	1	2	3
4.00	3	.0000		
3.00	3		3.4533	
1.00	3			3.9700
2.00	3			4.1000
Sig.		1.000	1.000	.164

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
20	3.97a
25	4.1a
30	3.45b
35	0c

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดหอม ที่อุณหภูมิต่างๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CM	Between Groups	30.112	3	10.037	12.996	.002
	Within Groups	6.179	8	.772		
	Total	36.291	11			

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25	20	30	35
ค่าเฉลี่ย	4.17	2.62	1.04	0
	a	ab	bc	c

หมายถึง เห็ดหอม ที่อุณหภูมิ 20 ° C, 25 ° C และ 30° C ไม่แตกต่างกัน แต่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ อุณหภูมิ 35° C ในขณะที่ 35° C แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ อุณหภูมิ 20 ° C และ 25 ° C

CM

Duncan[a]

		Subset for alpha = .05		
TEM	N	1	2	3
4.00	3	.0000		
3.00	3	1.0367	1.0367	
1.00	3		2.6267	2.6267
2.00	3			4.1733
Sig.		.187	.058	.063

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
20	2.62a
25	4.17a
30	1.04bc
35	0 c

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม ที่อุณหภูมิต่างๆ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CM	Between Groups	31.245	3	10.415	3500.851	.000
	Within Groups	2.380E-02	8	2.975E-03		
	Total	31.269	11			

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	25	20	30	35
ค่าเฉลี่ย	4.01	3.51	3.5	0
	a	b	b	c

หมายถึง เห็ดนางรม ที่อุณหภูมิ ^ , 25 ° C และ 35° C มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ 20° C และ 30° C ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

CM

Duncan[a]

		Subset for alpha = .05		
TEM	N	1	2	3
4.00	3	.0000		
3.00	3		3.5067	
1.00	3		3.5733	
2.00	3			4.0167
Sig.		1.000	.173	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
20	3.57b
25	4.01a
30	3.51 b
35	0c

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

ตารางภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ เห็ดนางรม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GM	Between Groups	.579	13	4.451E-02	1147.611	.000
	Within Groups	1.086E-03	28	3.879E-05		
	Total	.580	41			

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

สายพันธุ์	21	Po	15	7	6	12	9	17	342	266	249	220	Le	42
ค่าเฉลี่ย	0.35	0.32	0.28	0.26	0.25	0.22	0.21	0.1	0.05	0.05	0.03	0.03	0.03	0.02
น้ำหนักเส้นใย	a	b	c	d	d	e	e	f	g	h	i	i	i	j

GM

Duncan[a]

		Subset for alpha = .05									
ST	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10.00	3	500E-02									
2.00	3		667E-02								
11.00	3		767E-02								
12.00	3		433E-02								
13.00	3			967E-02							
14.00	3				533E-02						
8.00	3					.1050					
5.00	3						.2133				
6.00	3						.2193				
3.00	3							.2530			
4.00	3							.2627			
7.00	3								.2750		
1.00	3									.3140	
9.00	3										.3537
Sig.		1.000	.165	1.000	1.000	1.000	.248	.068	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

Multiple range test : DMRT with significance level 0.05

สายพันธุ์	น้ำหนักแห้งของเส้นใยเฉลี่ย (กรัม)
เห็ดหอม	0.32i
เห็ดนางรม	0.03b
PL6	0.25d
PL7	0.26d
PL9	0.21e
PL12	0.22e
PL15	0.28c
PL17	0.1f
PL21	0.35a
PL42	0.02j
F220	0.03i
F249	0.03i
F266	0.05h
F342	0.05g

ประวัติผู้เขียน

นางสาวปาจารีย์ อินทรทองคำ เกิดวันที่ 6 พฤศจิกายน พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2539 แล้วเข้าศึกษาต่อในระดับ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตั้งแต่ปีการศึกษา 2541 จนถึงปีการศึกษา 2545