บทที่ 3
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บและรักษาสายพันธุ์

เลี้ยงเส้นใยของเห็ดฟางที่นำมาทดลอง จำนวน 3 สายพันธุ์ ในหลอดอาหารแข็งเอียงพีดีเอ สูตร 1 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2°ซ.) เป็นเวลา 5-7 วัน และรักษาสายพันธุ์ดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ. โดยทำการถ่ายเชื้อลงในหลอดใหม่อาหารแข็งเอียง สูตร 1 ทุก ๆ 2 สัปดาห์

2. การเตรียมเส้นใยในอาหารเหลว

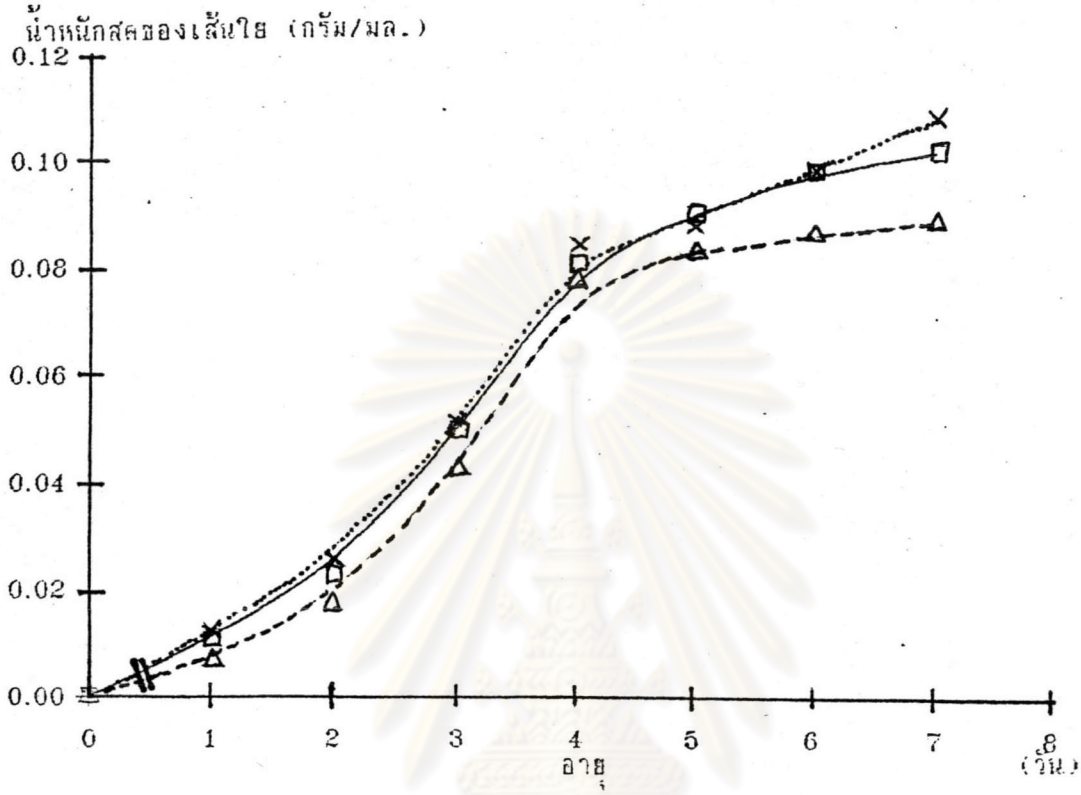
เลี้ยงเส้นใยเห็ดฟางจากเชื้อบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์ ในอาหารเหลวพีดีบี สูตร 2 ปริมาตร 50 มล. บรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเส้นใยสำหรับนำไปใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

2.1 อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม

จากผลการทดลองแสดงในกราฟที่ 1 พบว่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. สายพันธุ์ TA มีการเจริญสูงกว่าสายพันธุ์ TH และ WG ตามลำดับ ผลการเจริญของเส้นใยที่อุณหภูมิ 30°ซ. ในกราฟที่ 2 พบว่าสายพันธุ์ TH มีน้ำหนักสดตั้งแต่วันที่ 1-3 ของการเลี้ยงประมาณ 0.020-0.075 กรัม/มล. ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำหนักสดของสายพันธุ์ TA และ WG หลังจากวันที่ 4 น้ำหนักสดของสายพันธุ์ TH และ TA มีค่าประมาณ 0.17-0.19 กรัม/มล. จนถึงวันที่ 7

จากกราฟที่ 3 พบว่าสายพันธุ์ TH มีน้ำหนักสดของเส้นใยตั้งแต่วันที่ 1-3 ประมาณ 0.02-0.15 กรัม/มล. สำหรับวันที่ 4-7 พบว่าน้ำหนักสดของสายพันธุ์ TH และ TA มีค่าใกล้เคียงกัน ประมาณ 0.21-0.23 กรัม/มล. ซึ่งมากกว่าน้ำหนักสดของสายพันธุ์ WG ประมาณ 0.03 กรัม/มล.

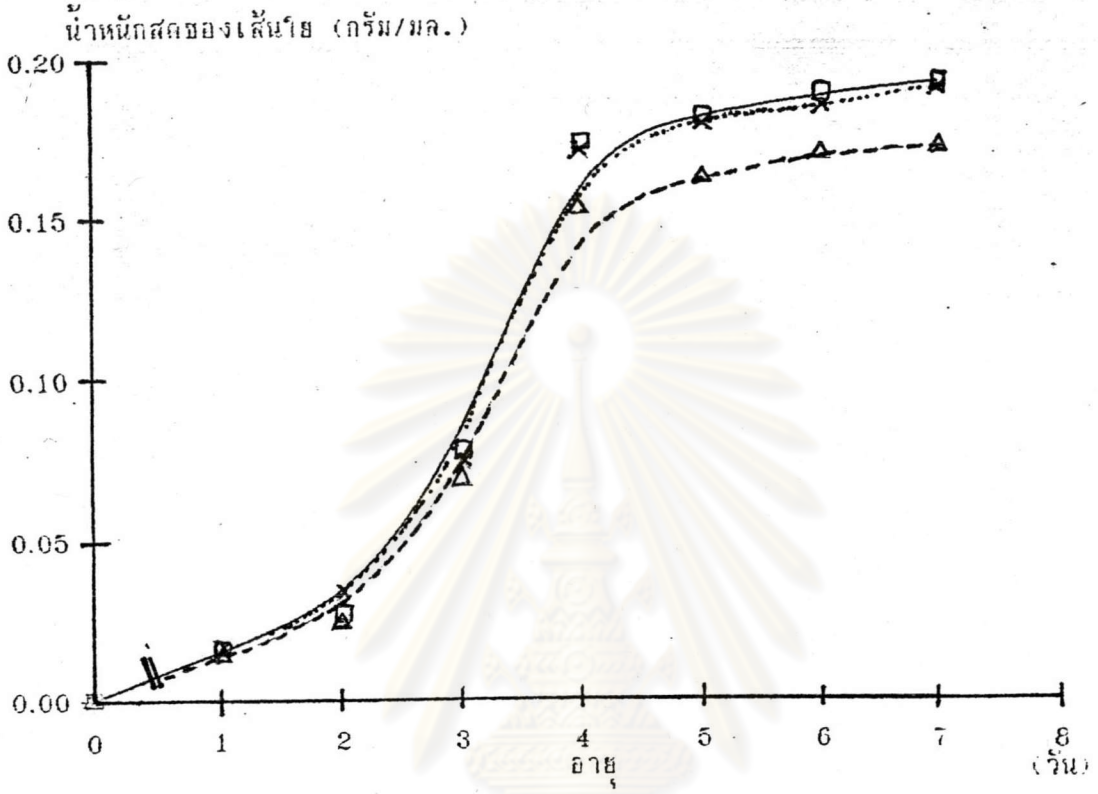
จากกราฟที่ 4 พบว่าที่อุณหภูมิ 35°ซ. เส้นใยทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน โดยพบว่า ในวันที่ 1-3 น้ำหนักสดของเส้นใยทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่า



กราฟที่ 1 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวพีดีบี สูตร 2 เลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25° ซ.

□—□ สายพันธุ์ TH
x---x สายพันธุ์ TA
△- -△ สายพันธุ์ WG

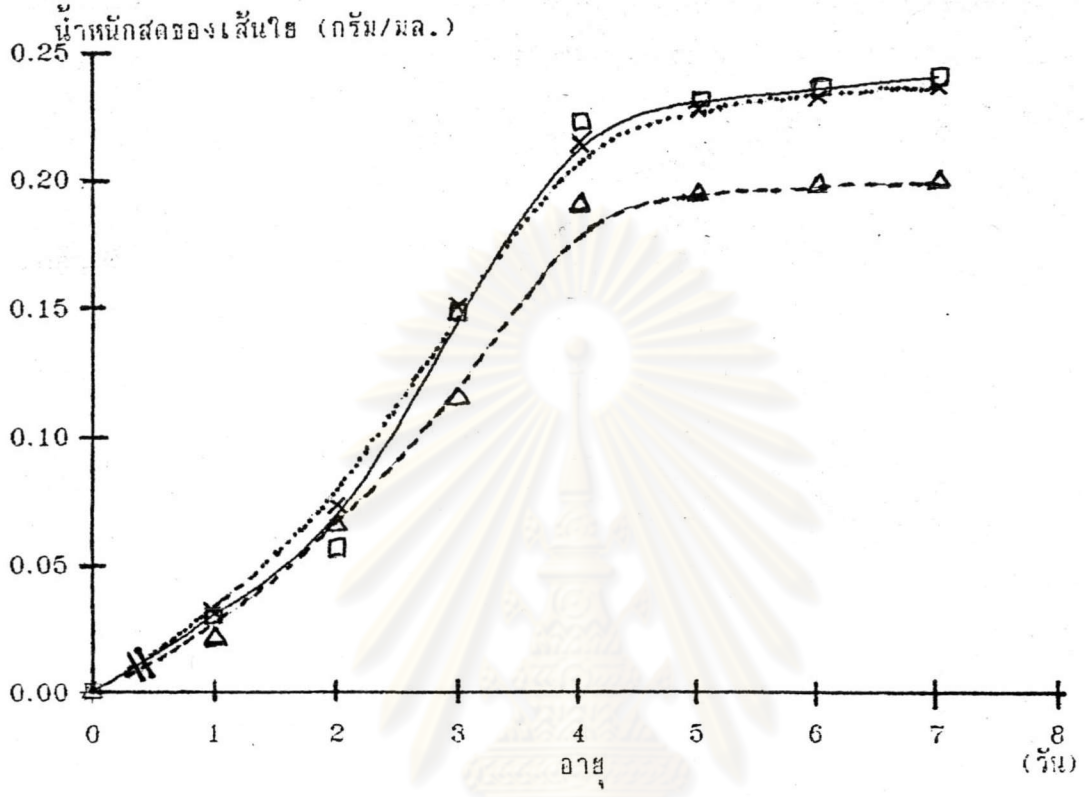
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 2 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวซีดีบี สูตร 2 เลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30° ซ.

□—□ สายพันธุ์ TH
x---x สายพันธุ์ TA
△- -△ สายพันธุ์ WG

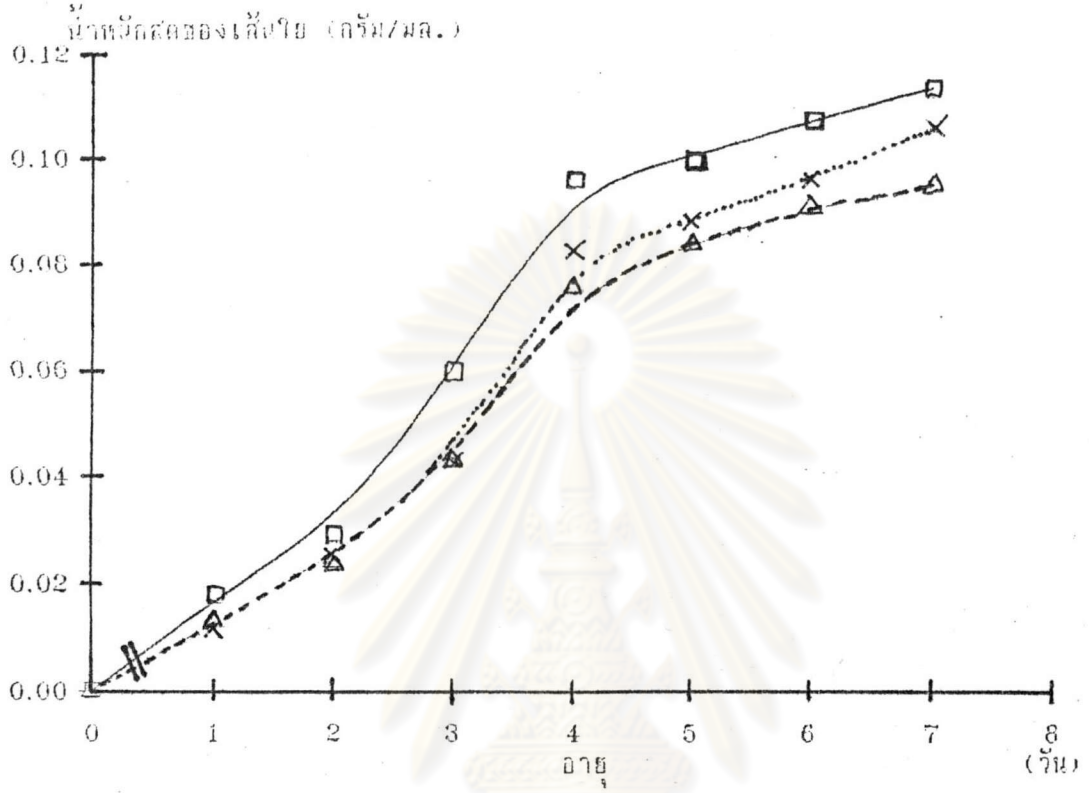
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 3 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวพีดีบี สูตร 2 เลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30±2° ซ.)

□—□ สายพันธุ์ TH
x- -x สายพันธุ์ TA
Δ- -Δ สายพันธุ์ WG

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 4 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวพีดีบี สูตร 2 เลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35° ซ.

□—□ สายพันธุ์ TH
x---x สายพันธุ์ TA
Δ- -Δ สายพันธุ์ WG

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประมาณ 0.01-0.05 กรัม/มล. และในวันที่ 4-7 สายพันธุ์ TH เจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์ TA และ WG โดยเส้นใยของสายพันธุ์ TH มีน้ำหนักสดประมาณ 0.09-0.11 กรัม/มล.

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของเส้นใยเห็ดฟางทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 วัน พบว่าเส้นใยเห็ดฟางทั้ง 3 สายพันธุ์ มีน้ำหนักสดประมาณ 0.20 กรัม/มล. เมื่อเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที น้ำหนักสดของเส้นใยที่ได้จากการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องมีน้ำหนักมากที่สุด เมื่อเทียบกับเส้นใยที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 25°ซ. 30°ซ. และ 35°ซ. เป็นเวลา 4 วัน

ในการทดลองต่อไปได้เลี้ยงเส้นใยเห็ดฟางแต่ละสายพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตร 2 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน เพื่อให้ได้เส้นใยประมาณ 0.20 กรัม/มล. สำหรับนำมาใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์

2.2 <u>สภาวะที่ทำให้เส้นใยกระจายตัว</u>

ผลการทดลองการกระจายตัวของเส้นใยเห็ดฟางในอาหารเหลว ได้ใช้ขดลวด ลูกแก้ว และในสภาพที่มีทั้งขดลวดและลูกแก้วบรรจุอยู่ เพื่อใช้เป็นอุปกรณ์ในการกระจายตัว เลี้ยงเส้นใยอายุ 4 วัน อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ได้ผลดังตารางที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i17333826x

ตารางที่ 1 แสดงสภาวะที่ทำให้เส้นใยเห็ดฟางกระจายตัวได้ดี เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 2 ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

สายพันธุ์	ขวดที่	ชุดควบคุม	ชนิดของอุปกรณ์ที่ช่วยในการกระจายตัวของเส้นใย		
			ขดลวด	ลูกแก้ว	ขดลวดและลูกแก้ว
TH	1	0	+2	+3	+2
	2	0	+1	+3	+1
	3	0	+1	+3	+1
TA	1	0	+2	+3	+2
	2	0	+2	+3	0
	3	0	+2	+2	0
WG	1	0	+1	+2	0
	2	0	0	+2	0
	3	0	0	+1	+2

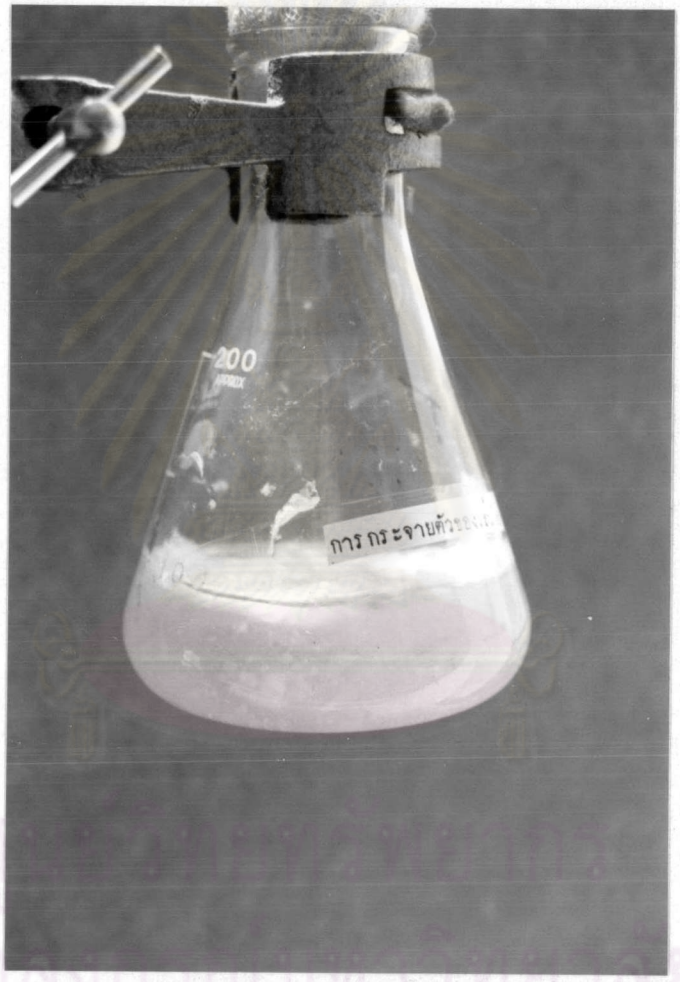
0 : ไม่มีการกระจายตัวหรือเส้นใยเกาะติดเป็นก้อน +2 : การกระจายตัวดี

+1 : การกระจายตัวพอใช้ +3 : การกระจายตัวดีมาก

จากตารางที่ 1 พบว่า เส้นใยของเห็ดฟางในอาหารเหลวพีดีบีที่ไม่ได้เติมลูกแก้วและ/หรือขดลวดลงไป ในชุดควบคุมจะเจริญติดกันเป็นก้อน เมื่อทดลองใช้ขดลวดและลูกแก้วเป็นอุปกรณ์ช่วยในการกระจายตัวของเส้นใย จะเห็นความแตกต่างของการกระจายตัวของเส้นใย

ขดลวดและลูกแก้วมีส่วนช่วยทำให้เส้นใยเกิดการแตกหักเป็นช่วงสั้น ๆ ไม่เกาะกันเป็นก้อน การใช้ขดลวด เส้นใยจะเกาะและจับอยู่ตามขดลวด ซึ่งเป็นผลทำให้การกระจายตัวของเส้นใยไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อใช้ลูกแก้วกับขดลวดรวมกัน ไม่ทำให้เกิดการแตกตัวมากขึ้น ชิ้นส่วนของเส้นใยยังไปจับอยู่ตามขดลวดเหมือนเดิม สำหรับชุดที่เติมลูกแก้วลงไป พบว่าเส้น

ใยกระจายตัวดี ลูกแก้วช่วยทำให้เส้นใยกระจายตัวเป็นช่วงสั้น ๆ ไม่เกาะเป็นก้อน ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการกระจายตัวของเส้นใย เลี้ยงในอาหารเหลวพีดีบี ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

3. การเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใย

3.1 อายุ

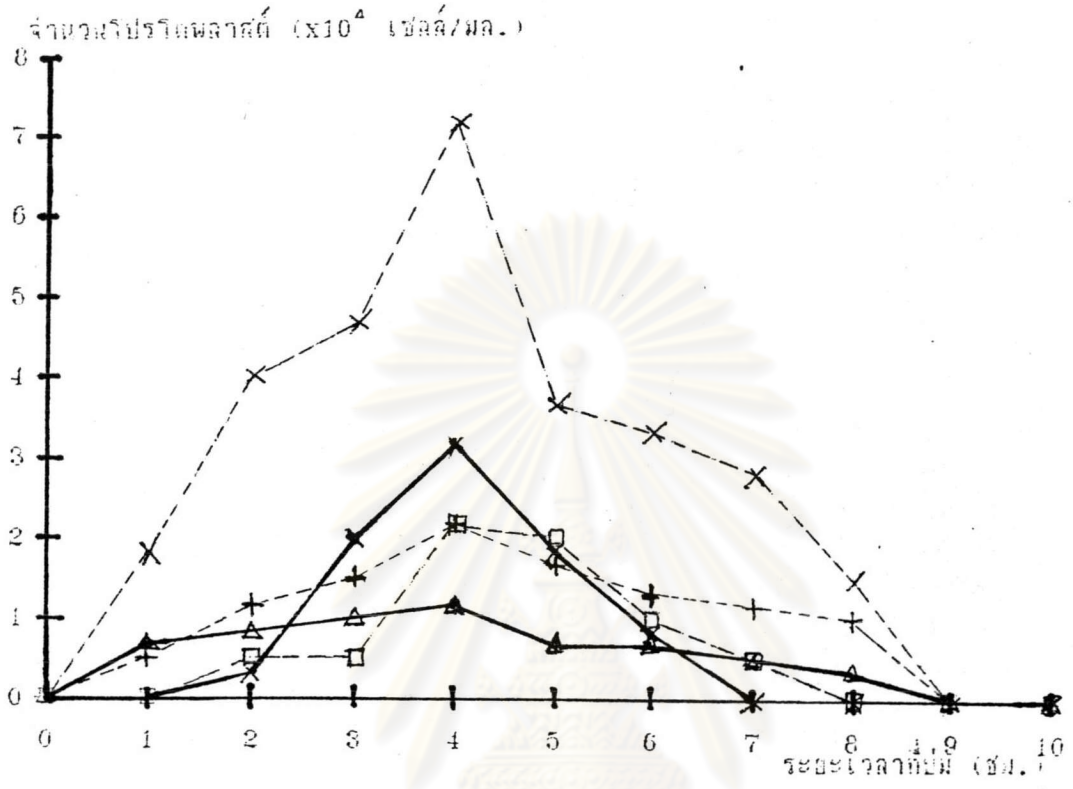
ผลการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ โดยเตรียมจากเส้นใยที่มีอายุแตกต่างกัน 2 4 6 8 และ 10 วัน โดยใช้เอนไซม์ไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. ผสมกับเซลลูเลส 2% ต่อ 50 มล. เป็นเอนไซม์ย่อยสลายบ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 10 ชม. ปรากฏผลดังในกราฟที่ 5 6 และ 7

จากกราฟที่ 5 จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TH เมื่ออายุ 2 วัน มีจำนวนประมาณ 0.30-1.10x10^4 เซลล์/มล. โดยพบว่าจะเกิดจำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด เมื่อบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลา 4 ชม. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยอายุ 4 วัน มีจำนวน 7.17x10^4 เซลล์/มล. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยอายุ 6 วัน และ 8 วัน เมื่อบ่มเส้นใยเป็นเวลา 4 ชม. มีจำนวนประมาณ 2.10x10^4 เซลล์/มล. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยอายุ 10 วัน เมื่อบ่มเส้นใยเป็นเวลา 4 ชม. มีจำนวนประมาณ 3.10x10^4 เซลล์ และตรวจไม่พบโปรโตพลาสต์ เมื่อบ่มเส้นใยอายุ 4 วัน เป็นเวลา 7 ชม. Toyomasu และคณะ (1986) รายงานว่าสามารถเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ด Pleurotus ได้ โดยใช้เส้นใยที่มีอายุ 2-3 วัน และบ่มเส้นใยเป็นเวลา 4 ชม.

จากกราฟที่ 6 พบว่า จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TA อายุ 4 วัน มีจำนวนมากที่สุด เมื่อบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลา 4 ชม. โดยพบโปรโตพลาสต์ประมาณ 8.5x10^4 เซลล์/มล.

จากกราฟที่ 7 พบว่า จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ WG อายุ 4 วัน มีจำนวนมากที่สุดประมาณ 8.5x10^4 เซลล์/มล. เมื่อบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลา 4 ชม. เท่ากับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TA อายุ 4 วัน เมื่อบ่มเส้นใยในสภาวะเดียวกัน

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เส้นใยเห็ดฟางอายุ 4 วัน เหมาะสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์ Yamada และคณะ (1983) ได้รายงานว่า สามารถบ่มเส้นใยของเห็ด Pleurotus ostreatus อายุ 2-3 วัน ด้วยเอนไซม์โนโวไซม์ โดยทำให้เกิดโปรโตพลาสต์มากที่สุด และยังรายงานเพิ่มเติมว่า เส้นใยที่มีอายุ 7-8 วัน และเส้นใยอายุ 20-24 วัน จะทำให้เกิดโปรโตพลาสต์จำนวนน้อย



กราฟที่ 5 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ TH เมื่ออายุ 2 4 6 8 และ 10 วัน.30° ซ.

△——△ 2 วัน

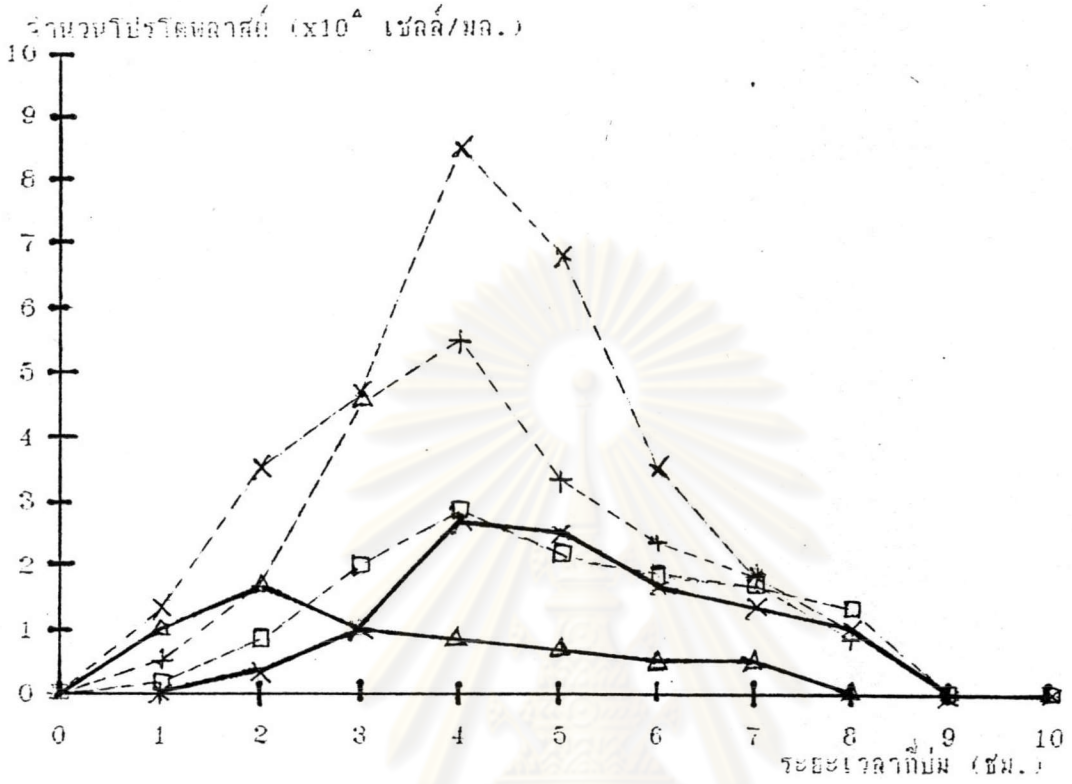
X- -X 4 วัน

+---+ 6 วัน

□- -□ 8 วัน

X——X 10 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 6 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ TA เมื่ออายุ 2 4 6 8 และ 10 วัน 30° ซ.

△——△ 2 วัน

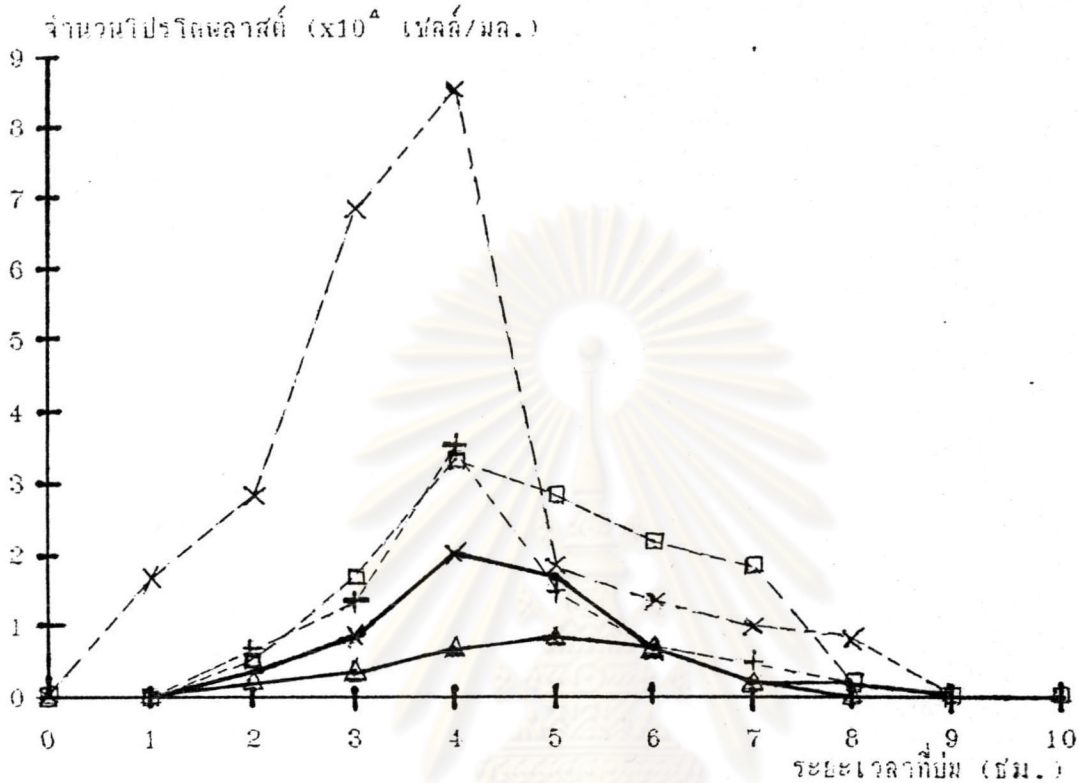
X- -X 4 วัน

+---+ 6 วัน

□- -□ 8 วัน

X——X 10 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 7 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ WG เมื่ออายุ 2 4 6 8 และ 10 วัน 30° ซ.

△——△ 2 วัน

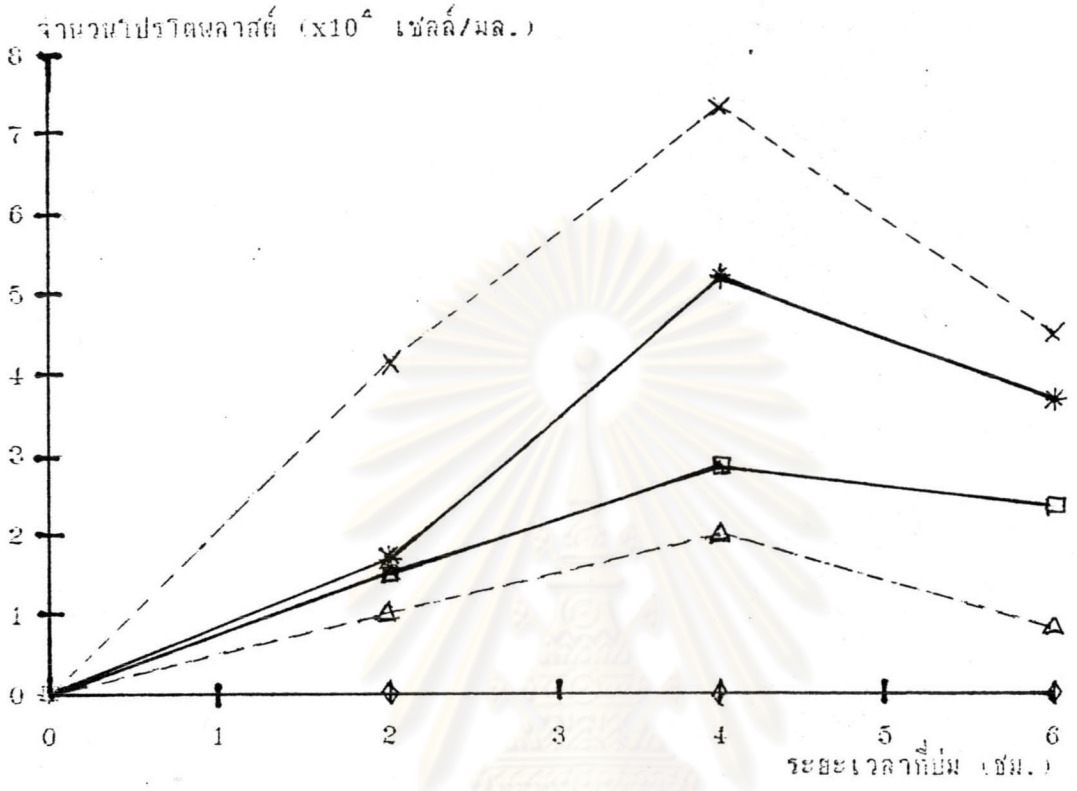
x- -x 4 วัน

+---+ 6 วัน

□- -□ 8 วัน

x——x 10 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 8 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ TH อายุ 4 วัน เมื่อบ่มด้วยเอนไซม์ไซโมไลเอสและเซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 25 30 35 40 และ 45° ซ.

□—□ 25° ซ.

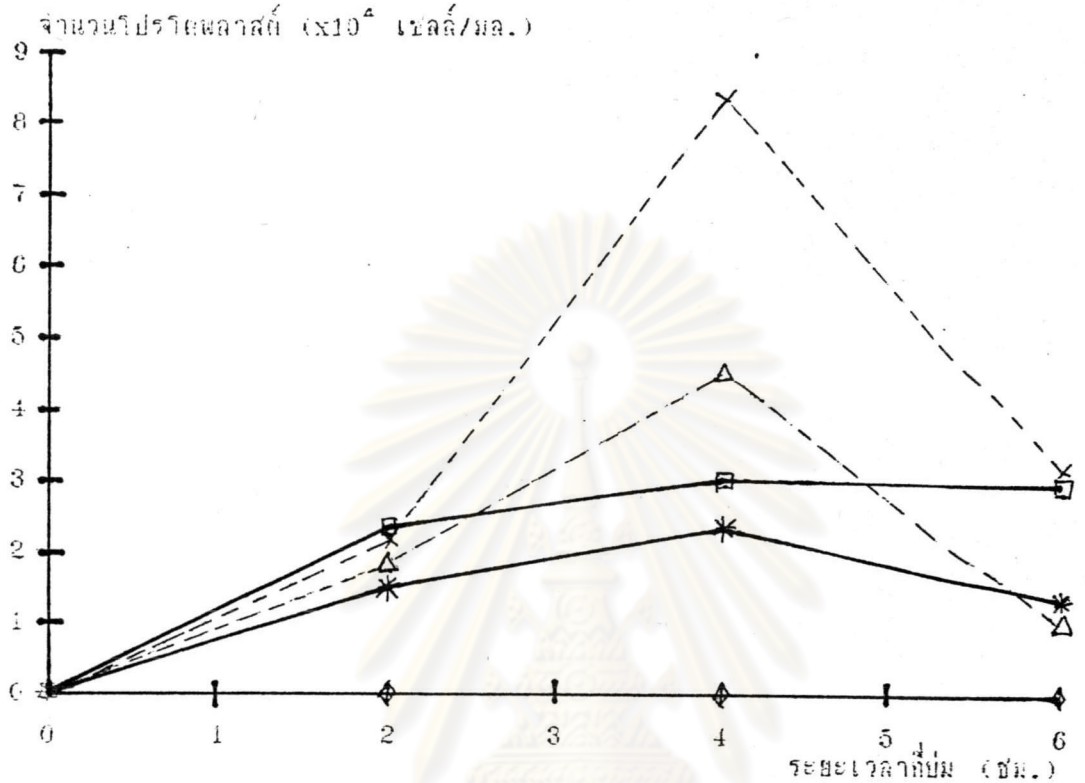
X---X 30° ซ.

Δ- -Δ 35° ซ.

— 40° ซ.

◇—◇ 45° ซ.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 9 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ TA อายุ 4 วัน เมื่อบ่มด้วยเอนไซม์ไบโอไลเอสและเซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 25 30 35 40 และ 45° ซ.

□—□ 25° ซ.

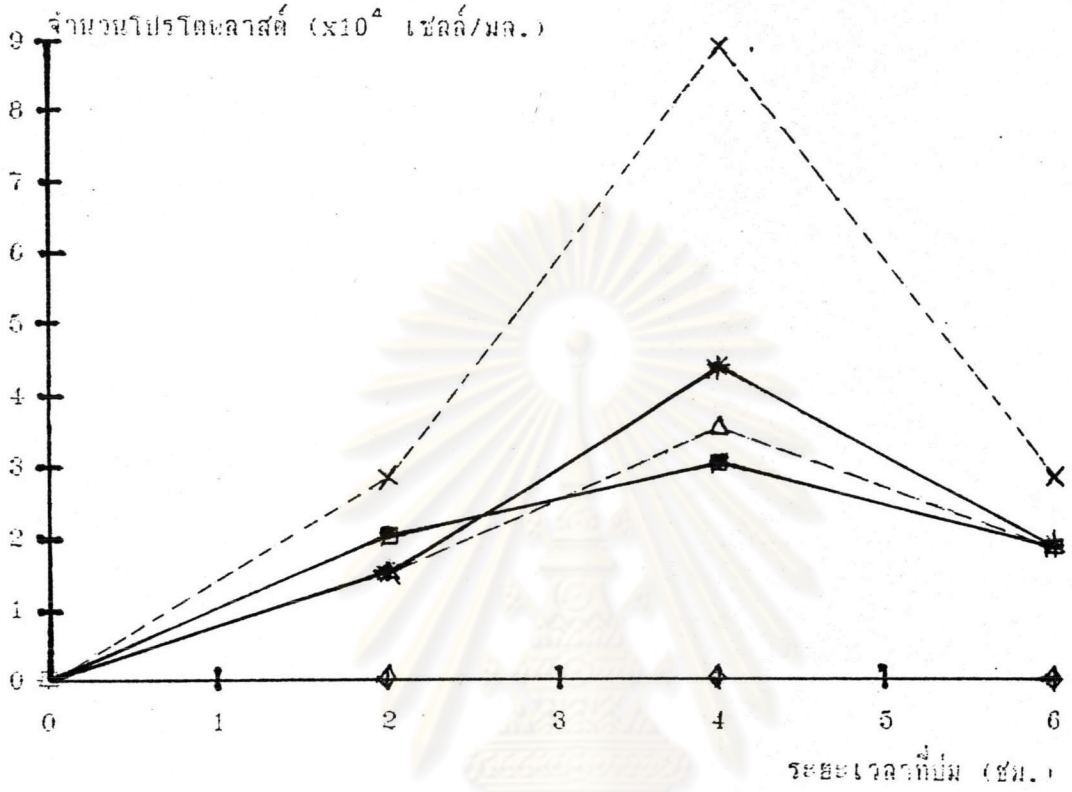
X---X 30° ซ.

Δ- -Δ 35° ซ.

— 40° ซ.

◇—◇ 45° ซ.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 10 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ KG อายุ 4 วัน เมื่อบ่มด้วยเอนไซม์ไซริมไลเย์สและเซลลูเลส ที่อุณหภูมิ 25 30 35 40 และ 45° ซ.

□—□ 25° ซ.

x---x 30° ซ.

Δ- -Δ 35° ซ.

+——+ 40° ซ.

◇—◇ 45° ซ.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 อุณหภูมิ

ทดลองเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้บ่มต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ จากเส้นใยเห็ดฟางทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่ออายุ 4 วัน โดยบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 30 35 40 และ 45°ซ. ด้วยสารละลายเอนไซม์ไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. และเซลลูเลส 2% ต่อ 50 มล. เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชม. ปรากฏผลในกราฟที่ 8 9 และ 10

จากกราฟที่ 8 พบว่า เมื่อบ่มเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TH อายุ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 ชม. จะเกิดโปรโตพลาสต์ ประมาณ 7.30×10^4 เซลล์/มล. ซึ่งจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นที่สภาวะดังกล่าวมีจำนวนมากกว่าจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มที่อุณหภูมิอื่น ๆ โดยใช้เส้นใยอายุ 4 วัน และบ่มเส้นใยนาน 4 ชม. เท่ากัน

จากกราฟที่ 9 เมื่อบ่มเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TA ที่อุณหภูมิ 30°ซ. จะเกิดโปรโตพลาสต์มากที่สุด ประมาณ 8.30×10^4 เซลล์/มล. เมื่อใช้เส้นใยอายุ 4 วัน และบ่มเส้นใยนาน 4 ชม. อุณหภูมิที่ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์รองลงมาคือที่ 35 25 และ 40°ซ. ตามลำดับ โดยใช้เส้นใยอายุ 4 วัน และบ่มเส้นใยนาน 4 ชม. จากการทดลองตรวจไม่พบโปรโตพลาสต์ เมื่อบ่มเส้นใยที่อุณหภูมิ 45°ซ.

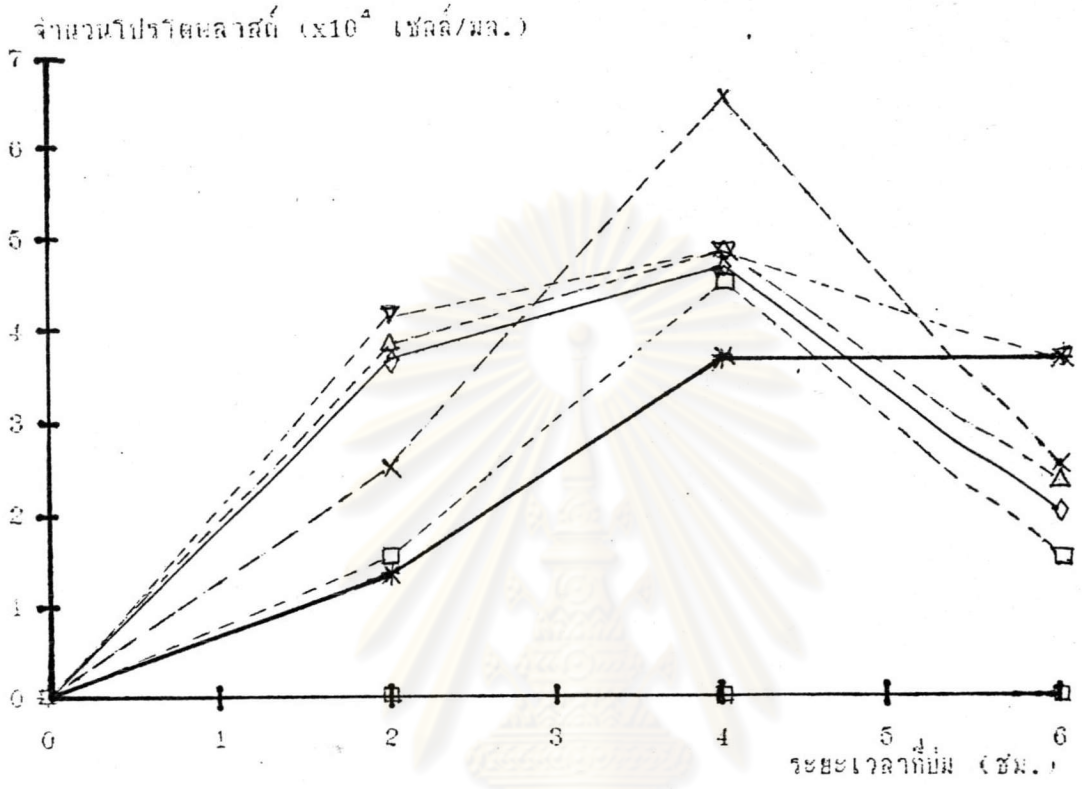
จากกราฟที่ 10 บ่มเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ WG ที่มีอายุ 4 วัน นาน 4 ชม. ที่อุณหภูมิ 30°ซ. พบว่าจะเกิดโปรโตพลาสต์ประมาณ 8.80×10^4 เซลล์/มล. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นมีจำนวนมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิอื่น ๆ โดยบ่มเส้นใยอายุ 4 วัน เป็นเวลา 4 ชม. เท่ากัน

จากการทดลองนี้ แสดงว่าอุณหภูมิ 30°ซ. เหมาะสำหรับบ่มเส้นใยเห็ดฟางอายุ 4 วัน ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยบ่มเส้นใยนาน 4 ชม. และตรวจไม่พบโปรโตพลาสต์เมื่อบ่มเส้นใยที่อุณหภูมิ 45°ซ. คาดว่าที่อุณหภูมิดังกล่าวมีผลทำให้โปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นแตก

3.3 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

3.3.1 ชนิดของเอนไซม์

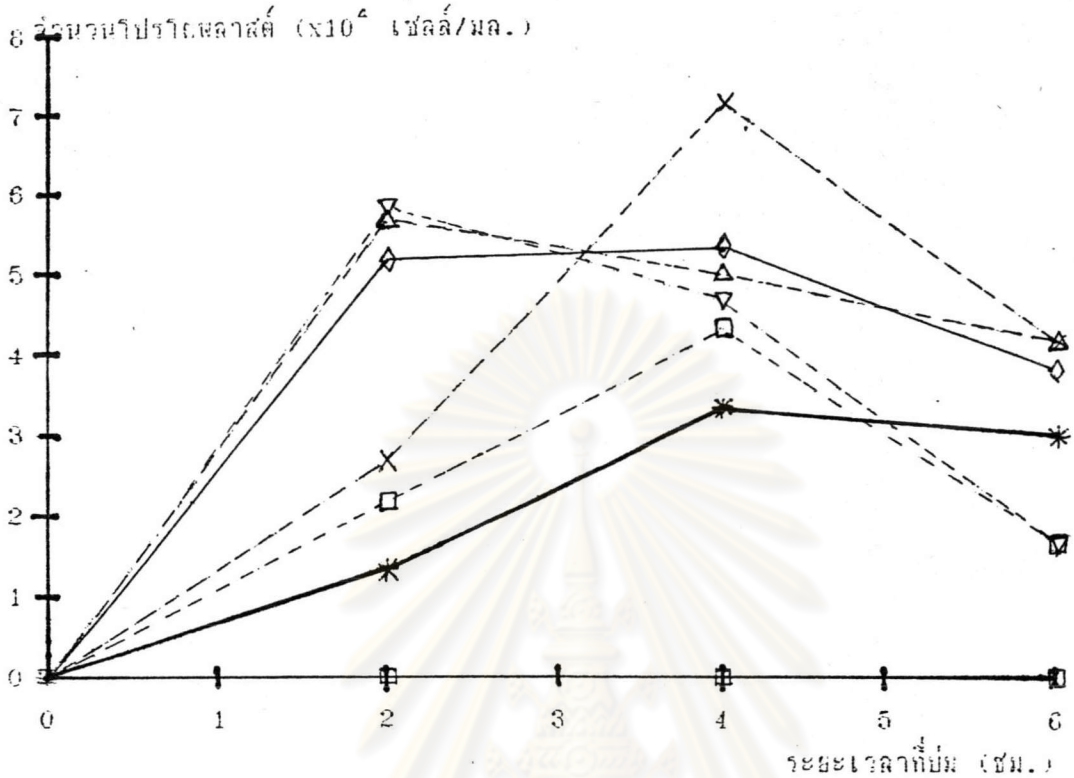
ผลของจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยโดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน 3 ชนิด คือ ไซโมไลเอส เข้มข้น 0.01 0.05 0.10 0.20 0.30 0.40 0.50 มก.ต่อมล. เซลลูเลส 1% 2% ต่อ 50 มล.



กราฟที่ 11 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ TH อายุ 4 วัน โดยใช้สารละลายเอนไซม์ไซโมไลเอสที่เข้มข้น 0.01-0.50 มก./มล. ที่ 30° ซ.

- 0.01 มก./มล.
- 0.05 มก./มล.
- 0.10 มก./มล.
- 0.20 มก./มล.
- 0.30 มก./มล.
- 0.40 มก./มล.
- 0.50 มก./มล.

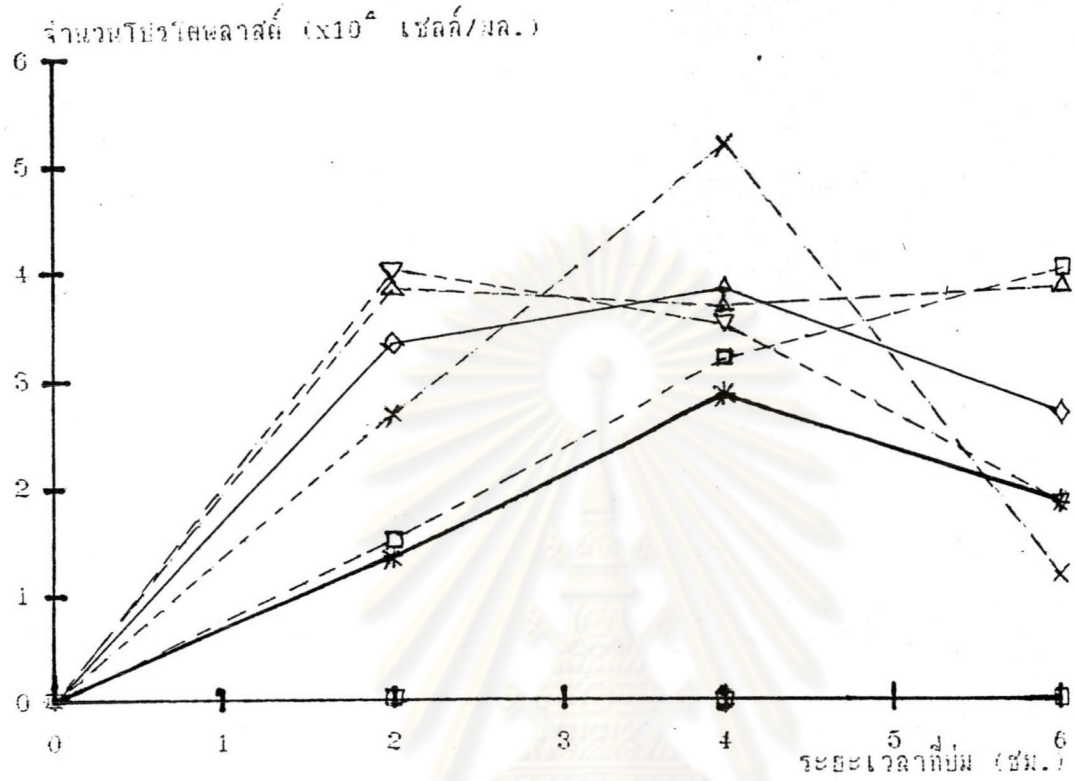
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 12 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ TA อายุ 4 วัน โดยใช้สารละลายเอนไซม์ไซโมไลเอสที่เข้มข้น 0.01-0.50 มก./มล. ที่ 30° ซ.

- 0.01 มก./มล.
- 0.05 มก./มล.
- 0.10 มก./มล.
- 0.20 มก./มล.
- 0.30 มก./มล.
- 0.40 มก./มล.
- 0.50 มก./มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 13 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ KG อายุ 4 วัน โดยใช้สารละลายเอนไซม์ไซริมไลเอสที่เข้มข้น 0.01-0.50 มก./มล. ที่ 30° ซ.

- 0.01 มก./มล.
- 0.05 มก./มล.
- 0.10 มก./มล.
- 0.20 มก./มล.
- 0.30 มก./มล.
- 0.40 มก./มล.
- 0.50 มก./มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของสารละลายเอนไซม์ และโนโวไซม์ 1% 2% ต่อ 50 มล. ของสารละลายเอนไซม์ พบว่า การใช้เซลลูเลส และโนโวไซม์ ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียวไม่สามารถทำให้เกิดโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดฟางทั้ง 3 สายพันธุ์

เมื่อใช้เอนไซม์ไซโมไลเอสเพียงชนิดเดียว สามารถทำให้เกิดโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดฟางทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลปรากฏในกราฟ 11 12 และ 13

จากกราฟที่ 11 ไซโมไลเอสที่ความเข้มข้น 0.20 มก./มล. ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TH ประมาณ $6.5x10^4$ เซลล์/มล. เมื่อบ่มเส้นใยอายุ 4 วัน เป็นเวลา 4 ชม. ที่อุณหภูมิ 30° ซ.

จากกราฟที่ 12 พบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TA ซึ่งบ่มในไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. เป็นเวลา 4 ชม. มีจำนวนประมาณ $7.10x10^4$ เซลล์/มล. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มในไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการบ่มเส้นใยในไซโมไลเอสที่ความเข้มข้นอื่น ในเวลาเท่ากัน

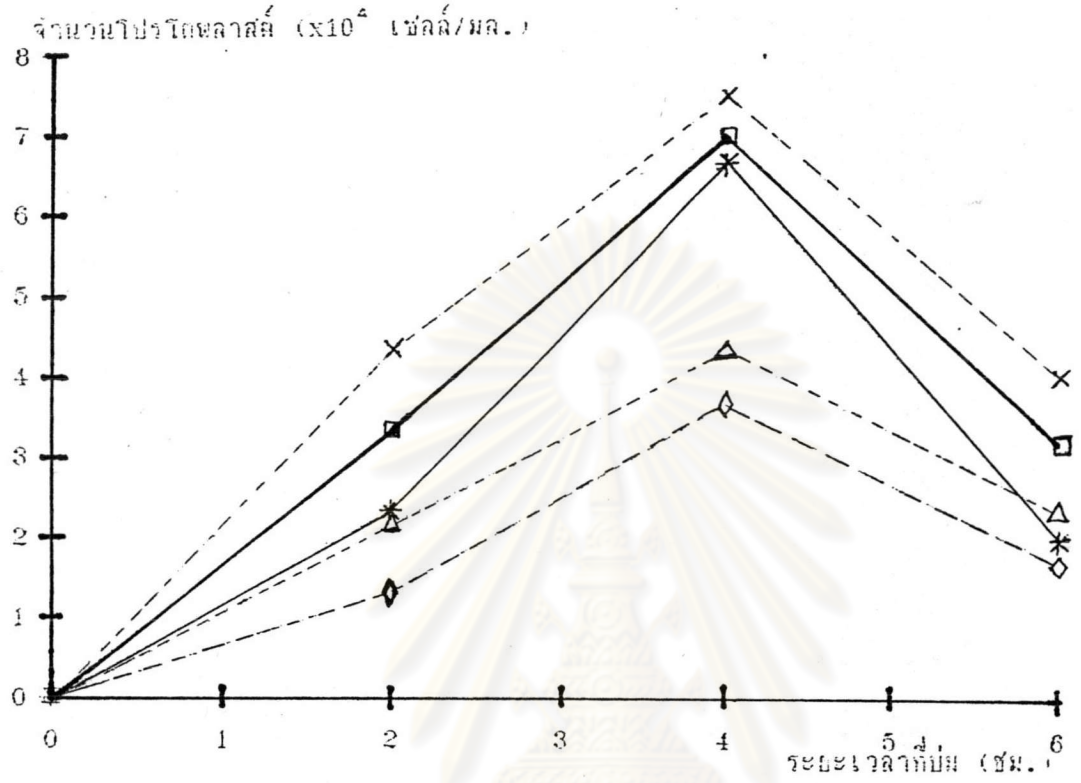
จากกราฟที่ 13 สายพันธุ์ WG พบว่า เมื่อใช้ไซโมไลเอสเข้มข้น 0.05 มก./มล. จะทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ และจะเกิดโปรโตพลาสต์สูงสุด เมื่อบ่มเส้นใยในไซโมไลเอสเข้มข้น 0.20 มก./มล. เป็นเวลา 4 ชม.

จากการทดลองนี้ แสดงว่า ไซโมไลเอสเข้มข้น 0.20 มก./มล. เหมาะสำหรับบ่มเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ โดยทำให้เกิดโปรโตพลาสต์มากที่สุด เมื่อบ่มเส้นใยอายุ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30°ซ. นาน 4 ชม.

3.3.2 <u>เอนไซม์ผสม</u>

ผลของจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายผสมเป็นคู่ระหว่างไซโมไลเอส ความเข้มข้นคงที่ 0.20 มก./มล. กับแปรผันความเข้มข้นของเซลลูเลส 1% และ 2% ต่อ 50 มล. ของสารละลายเอนไซม์ และไซโมไลเอสเข้มข้น 0.20 มก./มล. กับโนโวไซม์ 1% และ 2% ต่อ 50 มล. ของสารละลายเอนไซม์ ปรากฏผลในกราฟ 14 15 และ 16

จากกราฟที่ 14 เมื่อบ่มเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TH อายุ 4 วัน ในเอนไซม์ผสมของไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. กับเซลลูเลส 2% เป็นเวลา 4 ชม. ที่ 30° ซ. พบว่า จะเกิดโปรโตพลาสต์จำนวนมากที่สุด ประมาณ $7.5x10^4$ เซลล์/มล. ซึ่งเกิด



กราฟที่ 14 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ TH อายุ 4 วัน บ่มที่ 30° ซ. เปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ย่อยสลาย

—— ไซโมไลเอส 0.20 มก./มล.

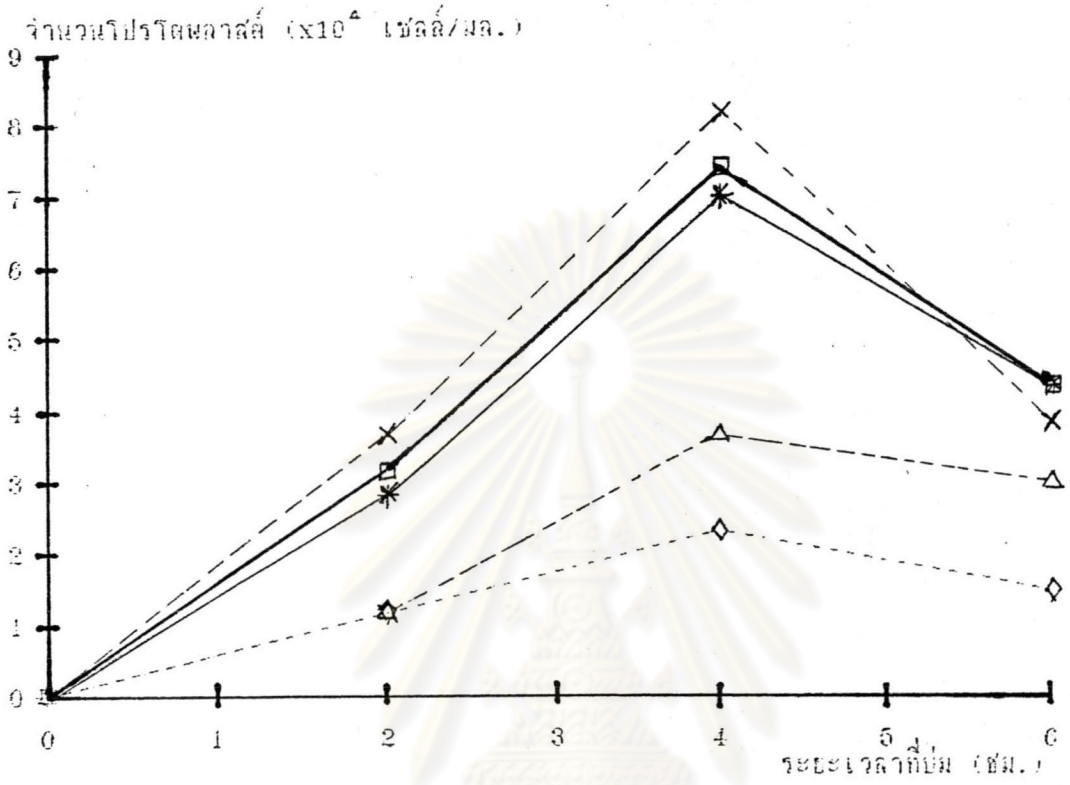
□—□ ไซโมไลเอส+เซลลูเลส 1%

x---x ไซโมไลเอส+เซลลูเลส 2%

◇- -◇ ไซโมไลเอส+ไนโวไซม์ 1%

△---△ ไซโมไลเอส+ไนโวไซม์ 2%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 15 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ TA อายุ 4 วัน บ่มที่ 30° ซ. เปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ย่อยสลาย

+——+ ไซโมไลเอส 0.20 มก./มล.

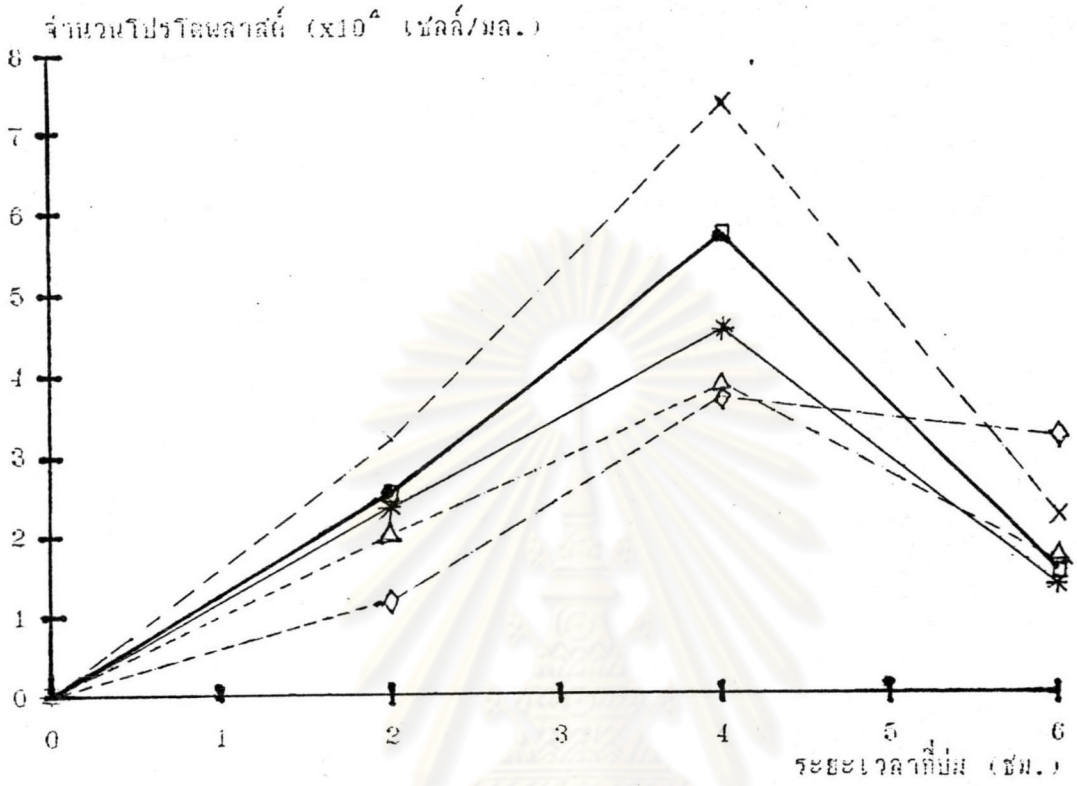
□—□ ไซโมไลเอส+เซลลูเลส 1%

x---x ไซโมไลเอส+เซลลูเลส 2%

◇- -◇ ไซโมไลเอส+ไนโวไซม์ 1%

△---△ ไซโมไลเอส+ไนโวไซม์ 2%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 16 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง สายพันธุ์ WG อายุ 4 วัน บ่มที่ 30° ซ. เปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ย่อยสลาย

+——+ ไซโมไลเอส 0.20 มก./มล.

□—□ ไซโมไลเอส+เซลลูเลส 1%

x---x ไซโมไลเอส+เซลลูเลส 2%

◇- -◇ ไซโมไลเอส+ไมโรไซม์ 1%

△---△ ไซโมไลเอส+ไมโรไซม์ 2%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โปรโตพลาสต์มากกว่าเมื่อบ่มเส้นใยในไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. กับเซลลูเลส 1% เป็นเวลา 4 ชม. ที่ 30°ซ. ประมาณ 5,000 เซลล์/มล. และมากกว่าเมื่อบ่มเส้นใยในไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. นาน 4 ชม. ที่อุณหภูมิเดียวกัน ประมาณ 10,000 เซลล์/มล.

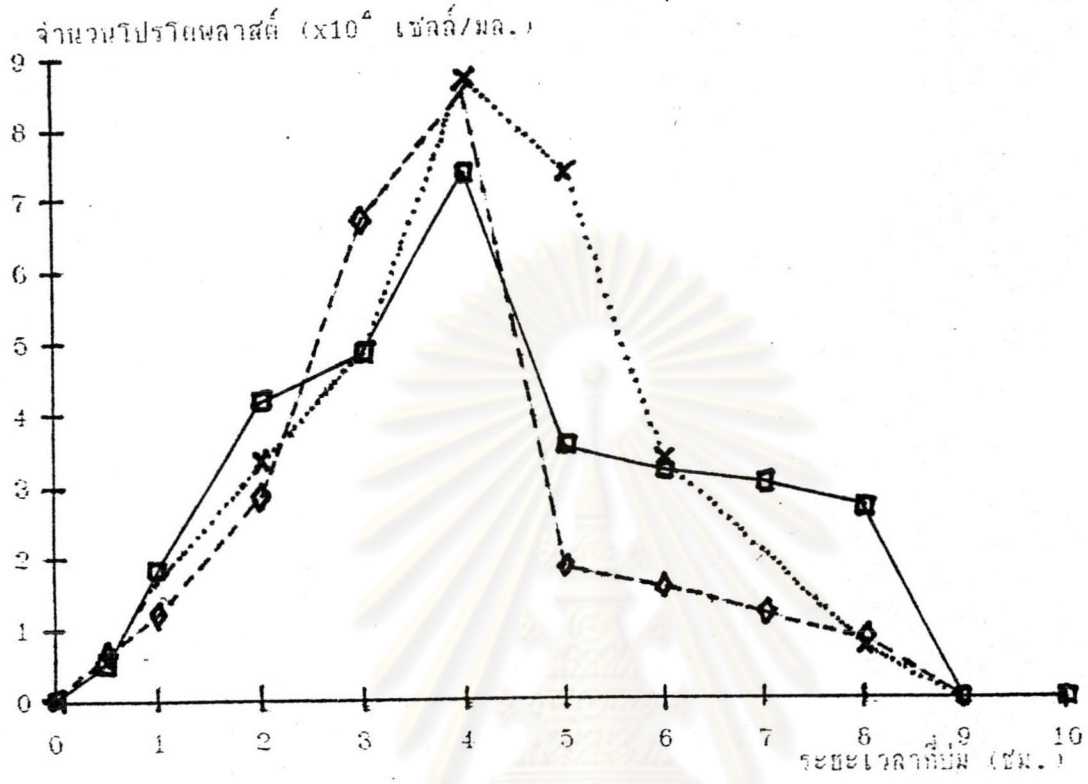
จากกราฟที่ 15 พบว่า เอนไซม์ผสมระหว่างไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. กับเซลลูเลส 2% สามารถทำให้เกิดโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TA จำนวนมากที่สุด เมื่อเวลา 4 ชม. ที่ 30°ซ. ประมาณ 8.10×10^4 เซลล์/มล. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นมีจำนวนมากกว่า เมื่อบ่มเส้นใยในไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. ในเวลา 4 ชม. ที่ 30°ซ. ประมาณ 10,000 เซลล์/มล.

จากกราฟที่ 16 สายพันธุ์ WG เมื่อบ่มเส้นใยในเอนไซม์ผสมของไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. กับโนโวไซม์ 1% และไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. กับโนโวไซม์ 2% ที่ 30°ซ. เป็นเวลา 4 ชม. พบว่าจะเกิดโปรโตพลาสต์จำนวนน้อยกว่าเมื่อบ่มด้วยไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. ประมาณ 8,000 เซลล์/มล. และ 7,000 เซลล์/มล. ตามลำดับ ที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกัน และเมื่อบ่มเส้นใยในเอนไซม์ผสมระหว่างไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. กับเซลลูเลส 2% ที่ 30°ซ. นาน 4 ชม. พบว่าจะเกิดโปรโตพลาสต์ประมาณ 7.3×10^4 เซลล์/มล. โปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นมีจำนวนมากกว่าเมื่อบ่มเส้นใยในไซโมไลเอสเข้มข้น 0.20 มก./มล. ที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกัน ประมาณ 2.8×10^4 เซลล์/มล.

ควรบ่มเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ ด้วยสารละลายเอนไซม์ผสมระหว่างไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. กับเซลลูเลส 2% ที่ 30° ซ. เป็นเวลา 4 ชม. สำหรับชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ผสมที่ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดฟางได้ดีรองลงมาคือ เอนไซม์ผสมระหว่างไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. กับเซลลูเลส 1% ไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. กับโนโวไซม์ 2% และไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. กับโนโวไซม์ 1% ตามลำดับ โดยบ่มนาน 4 ชม.

การผสมเอนไซม์เซลลูเลสลงไป ช่วยทำให้โปรโตพลาสต์เกิดจากเส้นใยเห็ดฟางได้ดีกว่าการใช้ไซโมไลเอสแต่เพียงชนิดเดียว

ในปี ค.ศ. 1985 Hong และ Yeup ได้ทดลองเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดหอม (Lentinus edodes) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และ เบตา-กลูคูโรนิเดส โดยใช้เส้นใยอายุ 3 วัน บ่มเป็นเวลา 4 ชม. ซึ่งสอดคล้องกับผลของเอนไซม์ผสมที่ใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดฟาง คือ สามารถเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดฟางทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดี โดยบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์ผสมของไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. กับเซลลูเลส 2% เป็นเวลา 4 ชม. ที่ 30°ซ.



กราฟที่ 17 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ คือ TH TA และ WG อายุ 4 วัน บ่มที่ 30° ซ. โดยใช้ไซโมไลเอส 20 มก./มล. และ เซลลูเลส 2% เป็นเอนไซม์ย่อยสลาย

□—□ สายพันธุ์ TH

x---x สายพันธุ์ TA

◇- -◇ สายพันธุ์ WG

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 ระยะเวลาที่บ่มเอนไซม์

จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากการบ่มเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ อายุ 4 วัน ด้วยเอนไซม์ไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. และเซลลูเลส 2% ที่ 30°ซ. เป็นเวลาระหว่าง 30 นาที ถึง 48 ชม. ปรากฏผลดังในกราฟที่ 17

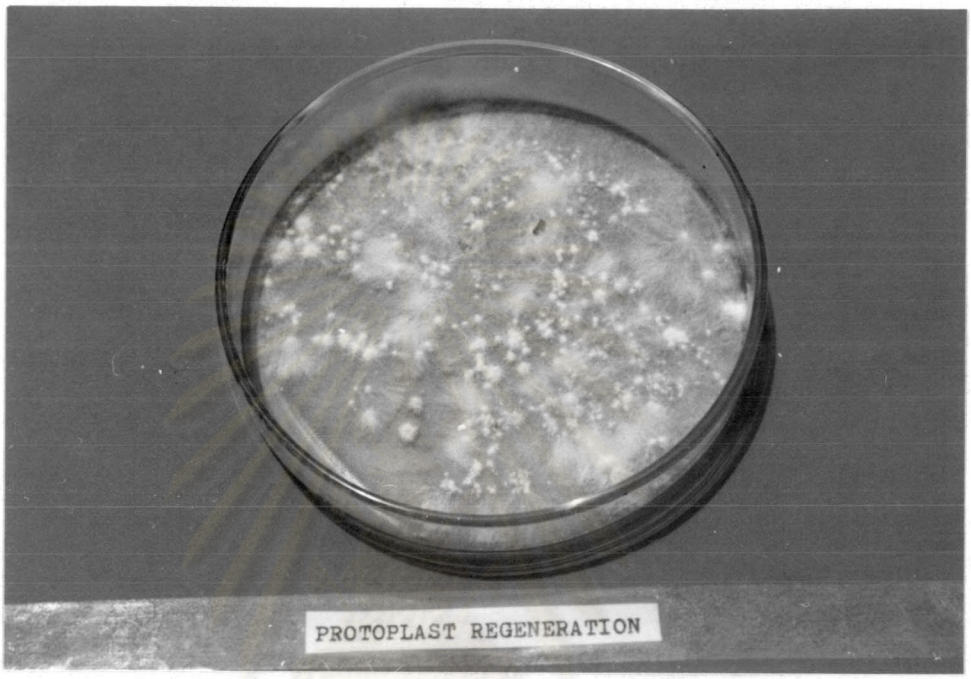
จากกราฟที่ 17 ครึ่งชั่วโมงแรก โปรโตพลาสต์จะเริ่มเกิดจากเส้นใยของเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ ต่อมาจำนวนโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจนถึง 4 ชม. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ จะมีจำนวนสูงสุดคือ สายพันธุ์ TH มีจำนวนโปรโตพลาสต์ 7.30×10^4 เซลล์/มล. สายพันธุ์ TA มีจำนวนโปรโตพลาสต์ 8.60×10^4 เซลล์/มล. และสายพันธุ์ WG มีจำนวนโปรโตพลาสต์ 8.50×10^4 เซลล์/มล. หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 5 พบว่าโปรโตพลาสต์ที่หลุดจากเส้นใยบางเซลล์เริ่มแตกทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่นับได้ลดจำนวนลง สอดคล้องกับรายงานของ Kitamoto และคณะ (1988) ซึ่งรายงานไว้ว่าโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยของ Trichoderma harzianum จะแตกถ้าบ่มไว้นานเกินกว่า 4 ชม. หรือใช้ปริมาณเอนไซม์มากเกินไป จากการทดลองพบว่าตรวจไม่พบโปรโตพลาสต์ที่หลุดจากเส้นใยในสภาพสมบูรณ์ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 แต่ตรวจพบว่ายังมีโปรโตพลาสต์บางส่วนกำลังจะหลุดจากเส้นใย

4. การคืนสภาพของผนังเซลล์

4.1 องค์ประกอบของอาหารสำหรับการสังเคราะห์ผนังเซลล์

จากการเลือกอาหารที่เหมาะสำหรับการกลับคืนสู่สภาพเซลล์ของโปรโตพลาสต์เห็ดฟาง พบว่า สามารถเลี้ยงโปรโตพลาสต์เห็ดฟางแต่ละสายพันธุ์ให้คืนสภาพเซลล์บนอาหารแข็งพีดีบีเอ สูตร 3

โคโลนีที่เจริญบนสูตรอาหารนี้ มีลักษณะเป็นโคโลนีที่กระจายบนอาหารดังรูปที่ 2 ได้ทำการเก็บโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอก่อนที่เส้นใยจะกระจายเข้าหากัน



รูปที่ 2 แสดงโคโลนีของเส้นใยหลังจากการกลับคืนสู่สภาพเซลล์ของโปรโตพลาสต์บนอาหารแข็งสูตร 3 30°ซ. เป็นเวลา 10-16 วัน

4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการคืนสู่สภาพเซลล์ของโปรโตพลาสต์

จากการทดลอง พบว่า โปรโตพลาสต์สามารถเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารแข็งสูตร 3 ชุดที่ไม่เททับผิวหน้าอาหาร ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ. โดยที่โปรโตพลาสต์ของเห็ดฟางแต่ละสายพันธุ์จะมีระยะเวลาในการกลับคืนสู่สภาพปกติ แตกต่างกันคือ โปรโตพลาสต์ของเห็ดฟางสายพันธุ์ TH จะใช้ระยะเวลาในการเจริญเป็นโคโลนีประมาณ 10 วัน ส่วนสายพันธุ์ TA และ WG จะใช้เวลาประมาณ 13 และ 16 วัน ตามลำดับ

4.3 เปอร์เซนต์ของการคืนสู่สภาพเซลล์

คำนวณหาร้อยละของการกลับคืนสู่สภาพปกติของโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟาง แต่ละสายพันธุ์ ที่มีอายุแตกต่างกัน โดยคำนวณจากจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใย และจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เจริญเป็นโคโลนีบนจานอาหารปรากฏผลดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงร้อยละของการกลับคืนสู่สภาพเซลล์ของโปรโตพลาสต์เห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ อายุของเส้นใย 4 วัน

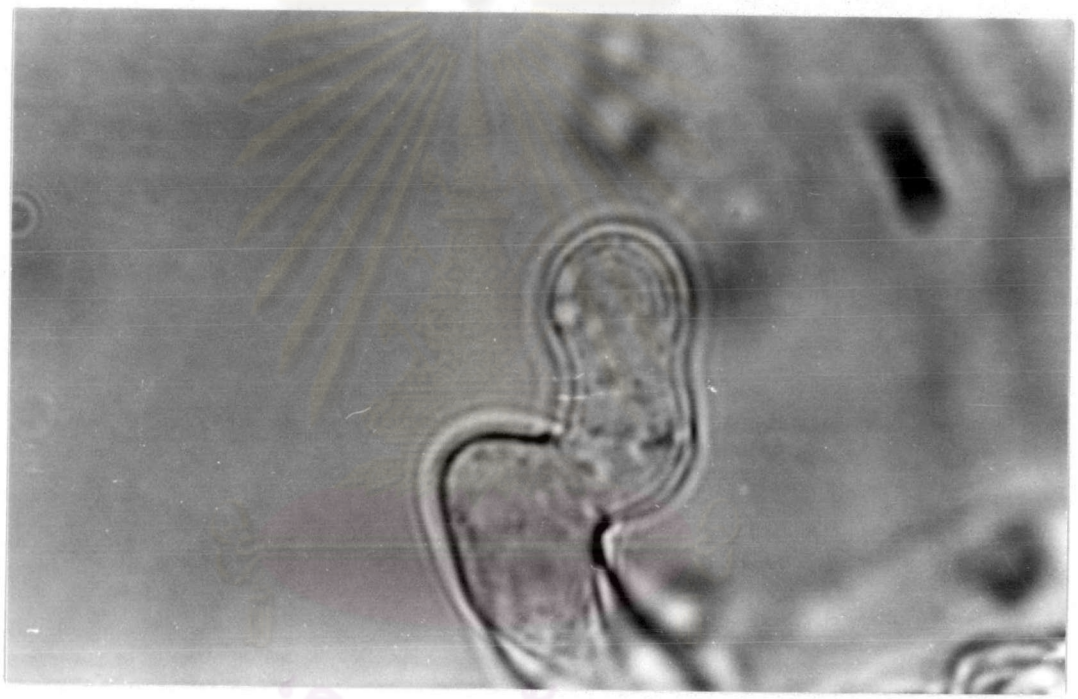
สายพันธุ์	จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใย ($x10^3$ เซลล์/มล.)	จำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานอาหาร	ร้อยละของการคืนสภาพเซลล์ (%)
TH	7.0	217	3.10
TA	8.0	196	2.45
WG	8.0	96	1.20

จากตารางที่ 15 พบว่า โปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TH มีร้อยละของการคืนสภาพเซลล์สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละของการคืนสภาพเซลล์ของสายพันธุ์ TA และ WG คือคิดเป็นร้อยละ 3.10 ขณะที่โปรโตพลาสต์ของสายพันธุ์ TA มีค่าร้อยละของการคืนสภาพเซลล์ รองลงมาคือ คิดเป็นร้อยละ 2.45 โปรโตพลาสต์ของสายพันธุ์ WG มีค่าร้อยละของการคืนสภาพเซลล์น้อยที่สุด คือคิดเป็นร้อยละ 1.20 อาจกล่าวได้ว่าโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้จากเส้นใยเห็ดฟางต่างสายพันธุ์ จะมีร้อยละของการกลับคืนสู่สภาพปกติของโปรโตพลาสต์แตกต่างกัน

Kropp และ Fortin (1986) รายงานว่า สามารถทำให้โปรโตพลาสต์ที่เตรียมจากเห็ด Laccaria bicolor คืนสภาพเซลล์ได้โดยมีร้อยละของการคืนสภาพเซลล์เท่ากับ 4-5

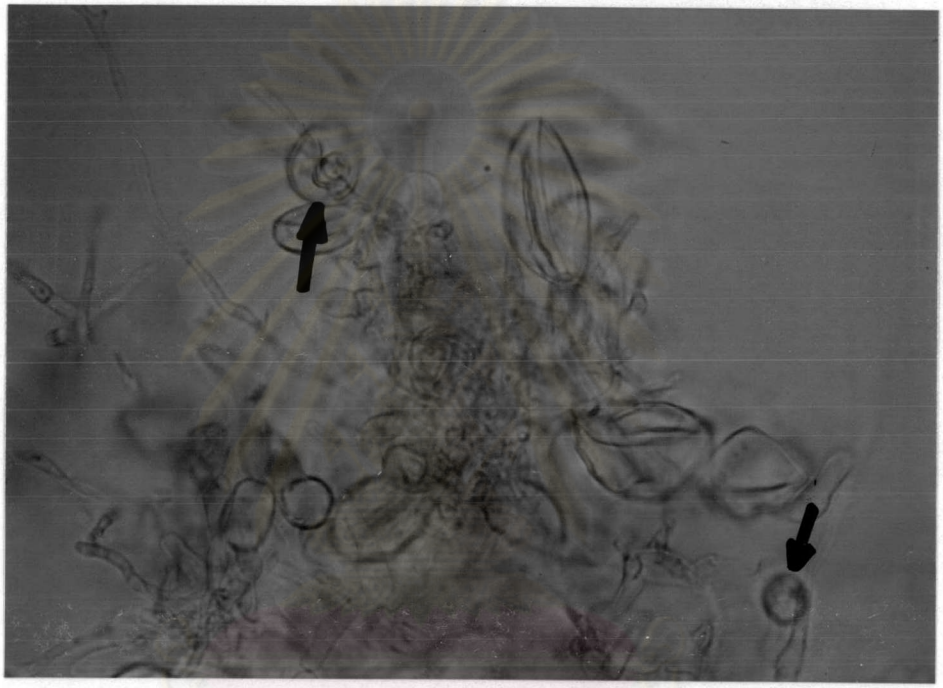
5. การรวมโปรโตพลาสต์

เมื่อทำการบ่มเส้นใยในสารละลายเอนไซม์จนเกิดสภาพโปรโตพลาสต์ และได้นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบดังรูปที่ 3 และ 4 นำโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเห็ดฟางต่างสายพันธุ์มาหลอมรวมกัน



รูปที่ 3 แสดงโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TH กำลังขยาย 400 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 แสดงโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ TA กำลังขยาย 100 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟางแต่ละคู่ด้วยสารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุล 8000 โดยเก็บรวบรวมโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารคืนสภาพเซลล์ได้ทั้งสิ้น 467 โคโลนี พบว่า มีเพียง 104 โคโลนี เท่านั้นที่เจริญเป็นโคโลนีลักษณะปกติ หลังจากถ่ายเชื้อบนหลอดอาหารแข็งเอียง สูตร 1 ประมาณ 2-3 ครั้งติดต่อกันเป็น สายพันธุ์ F (TH-TA) 51 โคโลนี F (TH-WG) 30 โคโลนี และ F (TA-WG) 23 โคโลนี

ทำการทดลองวัดขนาดของเซลล์ของเส้นใยเห็ดฟางที่รวบรวมได้ ตรวจสายพันธุ์ เปรียบเทียบขนาดของเซลล์รวมกับเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ต้นแบบ พบว่ามีเพียง 42 โคโลนี เท่านั้นที่มีขนาดของเซลล์ใหญ่กว่าขนาดเซลล์ของสายพันธุ์ต้นแบบ คิดเป็นร้อยละ 8.99 ของจำนวนโคโลนีที่เกิดจากโปรโตพลาสต์ที่คืนสภาพเซลล์บนจานอาหาร สูตร 3 แยกเป็น F (TH-TA) 18 โคโลนี F (TH-WG) 13 โคโลนี และ F (TA-WG) 11 โคโลนี ซึ่งสอดคล้องกับงานของยุวพิน เลิศวีระวัฒน์ (2529) ได้รายงานว่า ฟิวแสนท์ของยีสต์ Saccharomyces cerevisiae ที่ได้จากการรวมตัวของโปรโตพลาสต์จากยีสต์ 2 สายพันธุ์ มีลักษณะต่างจากสายพันธุ์ต้นแบบคือ มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ต้นแบบ สำหรับในราได้มีผู้ทดลองรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ด Tricholoma matsutake เข้าด้วยกัน พบว่า เซลล์ที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิม (Abe และคณะ, 1982)

6. ตรวจลักษณะของฟิวแสนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

นำฟิวแสนท์จำนวน 42 โคโลนี มาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใย ต่อไป

6.1 สกัดและหาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด

จากการทดลองสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด โดยวิธีของ Schneider (1956) ปรากฏผลดังแสดงในตารางที่ 16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณดีเอนเอทั้งหมดของฟิวแสนท์ 42 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ จากการทำ 5 ซ้ำ

	สายพันธุ์	ปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใย (มก./5 กรัม)
	TH	1.940±0.014
	TA	2.325±0.018
	WG	1.175±0.025
1	F (TH-TA1)*	4.500±0.177
2	F (TH-TA2)*	4.650±0.137
3	F (TH-TA3)*	6.400±0.137
4	F (TH-TA5)	7.900±0.137
5	F (TH-TA7)*	3.700±0.112
6	F (TH-TA9)*	4.300±0.112
7	F (TH-TA15)*	4.800±0.112
8	F (TH-TA17)*	4.250±0.177
9	F (TH-TA21)	4.100±0.137
10	F (TH-TA24)	8.500±0.177
11	F (TH-TA29)*	4.550±0.112
12	F (TH-TA32)*	4.450±0.112
13	F (TH-TA34)	7.300±0.209
14	F (TH-TA36)	8.050±0.112
15	F (TH-TA39)*	6.850±0.137
16	F (TH-TA42)	7.800±0.112

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 (ต่อ)

สายพันธุ์	ปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใย (มก./5 กรัม)
17 F (TH-TA46)*	7.150±0.137
18 F (TH-TA50)	8.200±0.209
19 F (TH-WG1)*	2.700±0.209
20 F (TH-WG2)*	4.450±0.112
21 F (TH-WG4)	6.250±0.177
22 F (TH-WG7)	5.500±0.250
23 F (TH-WG9)*	4.800±0.112
24 F (TH-WG10)	6.050±0.112
25 F (TH-WG12)	7.050±0.112
26 F (TH-WG14)	6.250±0.285
27 F (TH-WG15)*	3.350±0.285
28 F (TH-WG17)*	3.800±0.112
29 F (TH-WG19)*	4.300±0.112
30 F (TH-WG24)*	4.500±0.177
31 F (TH-WG30)*	2.400±0.137
32 F (TA-WG1)	8.200±0.112
33 F (TA-WG5)	7.300±0.112
34 F (TA-WG6)*	5.850±0.064
35 F (TA-WG8)	7.550±0.112
36 F (TA-WG10)	7.750±0.177
37 F (TA-WG11)	7.550±0.112
38 F (TA-WG12)*	3.450±0.112
39 F (TA-WG17)*	4.800±0.112
40 F (TA-WG20)*	3.550±0.209
41 F (TA-WG21)	6.800±0.112
42 F (TA-WG22)	6.200+0.112

* หมายถึง สายพันธุ์ที่คัดไปทดสอบการเกิดตุ่มดอกบนอาหารวุ้นสังเคราะห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 16 พบว่าดีเอนเอของสายพันธุ์ฟิวแสนท์มีปริมาณมากกว่าดีเอนเอของสายพันธุ์ต้นแบบ TH TA และ WG โดยมีปริมาณดีเอนเอใกล้เคียงกับผลรวมของปริมาณดีเอนเอสายพันธุ์ต้นแบบ ประมาณ 2-5 เท่า

จากผลการทดลองหาปริมาณดีเอนเอทั้งหมดภายในเซลล์ ให้ผลสนับสนุนว่าฟิวแสนท์ทั้งหมดที่ได้ควรเป็นฟิวแสนท์ที่เกิดจากการหลอมรวมของเซลล์สายพันธุ์ TH กับ TA TH กับ WG และ TA กับ WG โดยศึกษาจากผลรวมของปริมาณดีเอนเอระหว่างคู่ของทั้ง 3 สายพันธุ์ ตัวอย่างเช่น ผลรวมของปริมาณดีเอนเอระหว่างสายพันธุ์ TH กับ TA มีค่าเท่ากับ 4.265 มก./5 กรัมน้ำหนักสด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณดีเอนเอที่หาได้ในฟิวแสนท์ F (TH-TA1) คือ 4.500 มก./5 กรัมน้ำหนักสด หมายความว่าฟิวแสนท์มีปริมาณดีเอนเอเท่ากับปริมาณดีเอนเอระหว่างคู่ของเซลล์ต้นแบบรวมกัน

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณดีเอนเอทั้งหมดภายในเส้นใยของฟิวแสนท์แต่ละสายพันธุ์กับสายพันธุ์ต้นแบบ คาดว่ามีการรวมกันของโปรโตพลาสต์เกิดขึ้นจริง และมีผลต่อการเพิ่มของปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใยของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ โดยทำให้ฟิวแสนท์แต่ละสายพันธุ์ที่รวบรวมได้มีปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใยแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน

ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ฟิวแสนท์ จำนวน 23 สายพันธุ์ ที่มีการเพิ่มของปริมาณดีเอนเอเป็น 2 เท่า และ 3 เท่าของสายพันธุ์ต้นแบบ คิดเป็น 4n และ 6n ตามลำดับ นำมาทดสอบความสามารถในการเกิดตุ่มดอกต่อไป

6.2 การเกิดตุ่มดอกบนอาหารวุ้นสังเคราะห์

คัดเลือกสายพันธุ์ฟิวแสนท์จำนวน 23 สายพันธุ์ ที่มีการเพิ่มของปริมาณดีเอนเอ เป็น 2 เท่า หรือ 3 เท่า กับสายพันธุ์ต้นแบบทั้ง 3 สายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบการเกิดตุ่มดอก โดยทำการเลี้ยงบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ สูตร 4.1 และ 4.2 (ภาคผนวก ค.1) ปรากฏผลดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 แสดงการเกิดตุ่มดอกของสายพันธุ์ฟิวแสนท์และสายพันธุ์ต้นแบบบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ 2 ชนิด จากการทำ 2 ซ้ำ

	สายพันธุ์	จำนวนตุ่มดอกที่ชิ้นบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ 4.1	ระยะเวลาในการเกิดตุ่มดอก (วัน)	จำนวนตุ่มดอกที่ชิ้นบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ 4.2	ระยะเวลาในการเกิดตุ่มดอก (วัน)
	TH	11	12	6	14
	TA	6	10	3	12
	WG	3	18	3	18
1	F (TH-TA1)	14	12	12	14
2	F (TH-TA2)	14	10	11	12
3	F (TH-TA3)	0	0	0	0
4	F (TH-TA7)	14	10	8	12
5	F (TH-TA9)	8	8	7	9
6	F (TH-TA15)	13	7	6	8
7	F (TH-TA17)*	25	7	21	8
8	F (TH-TA29)	8	10	2	12
9	F (TH-TA32)	6	10	5	12
10	F (TH-TA39)*	19	11	10	13
11	F (TH-TA46)	0	0	0	0
12	F (TH-WG1)	0	0	0	0
13	F (TH-WG2)	12	10	4	12
14	F (TH-WG9)*	17	8	10	12
15	F (TH-WG15)*	19	12	15	14
16	F (TH-WG17)	5	11	4	14
17	F (TH-WG19)	0	0	0	0
18	F (TH-WG24)	0	0	0	0
19	F (TH-WG30)	0	0	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 (ต่อ)

สายพันธุ์	จำนวนตุ่มดอกที่ขึ้นบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ 4.1	ระยะเวลาในการเกิดตุ่มดอก (วัน)	จำนวนตุ่มดอกที่ขึ้นบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ 4.2	ระยะเวลาในการเกิดตุ่มดอก (วัน)
20 F (TA-WG6)*	12	12	16	15
21 F (TA-WG12)	0	0	0	0
22 F (TA-WG17)	7	15	4	17
23 F (TA-WG20)*	16	12	10	14

* หมายถึง สายพันธุ์ที่คัดไปย้อมนิวเคลียสด้วยสีจิมซา

จากตารางที่ 17 พบว่า มีสายพันธุ์ฟิวแสนท์ 7 สายพันธุ์ ไม่สร้างตุ่มดอกบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ F (TH-TA46) F (TH-TA3) F (TH-WG1) F (TH-WG30) F(TH-WG19) F(TH-WG24) และ F (TA-WG12) สายพันธุ์ฟิวแสนท์ 16 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ต้นแบบจำนวน 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างตุ่มดอกบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิด โดยที่อาหารวุ้นสังเคราะห์สูตร 4.1 สามารถชักนำเส้นใยส่วนใหญ่ให้สร้างตุ่มดอกได้ดีกว่าอาหารวุ้นสังเคราะห์ สูตร 4.2 โดยพิจารณาจากจำนวนตุ่มดอกและระยะเวลาในการเกิดตุ่มดอก

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่มีการสร้างตุ่มดอกได้ดีบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ โดยพิจารณาจากการสร้างตุ่มดอกบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ได้ และมีตุ่มดอกเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก เฉพาะกลุ่มของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่มีการเพิ่มของปริมาณดีเอนเอเป็น 4n และ 6n ได้สุ่มคัดเลือกมา 6 สายพันธุ์ คือ F (TH-TA17) F (TH-TA39) F (TH-WG9) F (TH-WG15) F (TA-WG6) และ F (TA-WG20)

นำสายพันธุ์ฟิวแสนท์ดังกล่าว จำนวน 6 สายพันธุ์ มาตรวจสอบจำนวนนิวเคลียสในเส้นใย ขนาดของเส้นใย ลักษณะของแคลมิโดสปอร์ในเส้นใย และการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลว เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ ก่อนนำไปทดลองเพาะให้เกิดดอกในตะกร้าทดลองต่อไป

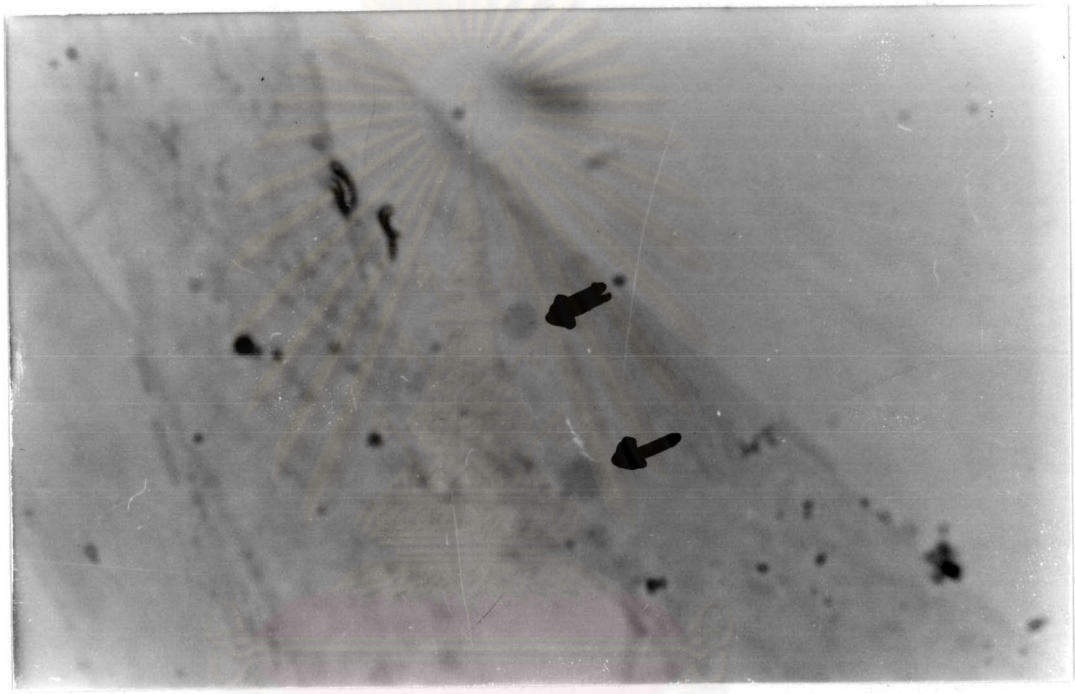
6.3 ตรวจหาจำนวนนิวเคลียสในเส้นใยโดยวิธีการย้อมนิวเคลียสด้วยสีจิมซา

หลังจากทำการย้อมนิวเคลียสในเส้นใยด้วยสีจิมซา แล้วจึงทำการตรวจนับจำนวนนิวเคลียสที่มีอยู่ในเซลล์ภายในเส้นใย เพื่อหาความถี่ของจำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์จากการนับนิวเคลียสภายในเซลล์ของสายพันธุ์ต้นแบบ และสายพันธุ์ฟิวแสนท์ ปรากฏผลดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงความถี่ของเซลล์ที่มีจำนวนนิวเคลียสจาก 0-7 นิวเคลียสต่อเซลล์ภายในเส้นใยของสายพันธุ์ต้นแบบ และสายพันธุ์ฟิวแสนท์ ย้อมเซลล์โดยวิธีจิมซา

สายพันธุ์	ชุดของโครโมโซม	ความถี่ของจำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์ภายในเส้นใย								จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับ (เซลล์)
		จำนวนนิวเคลียส								
		ตรวจไม่พบ	1	2	3	4	5	6	7	
TH	n+n	22	36	32	7	3	0	0	0	100
TA	n+n	26	26	30	12	6	0	0	0	100
WG	n+n	42	33	20	4	0	1	0	0	100
F (TH-TA17)	2n+2n	18	12	38	14	13	5	0	0	100
F (TH-TA39)	3n+3n	22	18	23	7	18	9	3	0	100
F (TH-WG15)	2n+2n	21	8	43	22	4	2	0	0	100
F (TH-WG9)	3n+3n	27	4	11	14	9	24	8	3	100
F (TA-WG20)	2n+2n	23	13	42	17	4	1	0	0	100
F (TA-WG6)	3n+3n	23	4	7	20	12	27	7	0	100

จากตารางที่ 18 พบว่าสายพันธุ์ TH มีความถี่ของจำนวนนิวเคลียส 1 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์สูงสุด เท่ากับ 36 ความถี่ที่พบนิวเคลียสรองลงมาคือ พบ 2 นิวเคลียสต่อเซลล์ จำนวน 32 เซลล์ ไม่พบนิวเคลียส จำนวน 22 เซลล์ พบ 3 นิวเคลียสต่อเซลล์ จำนวน 7 เซลล์ และพบ 4 นิวเคลียสต่อเซลล์ จำนวน 3 เซลล์



รูปที่ 5 แสดงนิวเคลียสในเส้นใยของสายพันธุ์ F (TH-TA17) ย้อมติดสีจิมซา กำลังขยาย 1000 เท่า

สายพันธุ์ TA ตรวจพบว่ามี 2 นิวเคลียสต่อเซลล์รวมทั้งสิ้นจำนวน 30 เซลล์ ซึ่งเป็นความถี่สูงสุดที่ตรวจพบ ตรวจไม่พบนิวเคลียส จำนวน 26 เซลล์ พบ 1 นิวเคลียสต่อเซลล์ จำนวน 26 เซลล์ รองลงมาคือ ตรวจพบ 3 นิวเคลียส และ 4 นิวเคลียสต่อเซลล์ตามลำดับ

สายพันธุ์ WG ตรวจไม่พบนิวเคลียส รวมทั้งสิ้นจำนวน 42 เซลล์ นับเป็นความถี่สูงสุดที่ตรวจพบ ความถี่ที่ตรวจพบนิวเคลียสคือ พบ 1 นิวเคลียสต่อเซลล์ จำนวน 33 เซลล์ พบ 2 นิวเคลียสต่อเซลล์ จำนวน 20 เซลล์ พบ 3 นิวเคลียสต่อเซลล์ จำนวน 4 เซลล์ พบ 5 นิวเคลียสต่อเซลล์ เพียง 1 เซลล์ เท่านั้น

สายพันธุ์ที่มีปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใยคิดเป็น 2n+2n คือ F (TH-TA17) F (TH-WG15) และ F (TA-WG20) พบว่ามี 3 นิวเคลียสต่อเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 14

22 และ 17 ตามลำดับ ความถี่ของจำนวนเซลล์ที่พบ 3 นิวเคลียสในสายพันธุ์ฟิวแสนท์มีค่าสูงกว่าความถี่ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจพบ 3 นิวเคลียสในสายพันธุ์ต้นแบบประมาณ 10 เซลล์ เมื่อพิจารณาความถี่ของจำนวนเซลล์ที่พบ 4 นิวเคลียสในสายพันธุ์ F (TH-TA17) พบว่ามี 4 นิวเคลียสต่อเซลล์ เท่ากับ 13 เซลล์ ซึ่งสูงกว่าความถี่ของจำนวนเซลล์ที่ตรวจพบ 4 นิวเคลียสในสายพันธุ์ TH และ TA ประมาณ 7-10 เซลล์ ความถี่ของจำนวนเซลล์ที่พบ 4 นิวเคลียสในสายพันธุ์ F (TH-WG15) และ F (TA-WG20) เท่ากับ 4 ในขณะที่ตรวจสายพันธุ์ WG ไม่พบเซลล์ที่มี 4 นิวเคลียส จากข้อมูล อาจกล่าวได้ว่าการรวมตัวของโปรโตพลาสต์ส่งผลให้ความถี่ของจำนวนนิวเคลียสที่ตรวจพบในสายพันธุ์ฟิวแสนท์มีค่าสูงกว่า ความถี่ของจำนวนนิวเคลียสที่ตรวจพบในสายพันธุ์ต้นแบบที่มีจำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์เท่ากัน

สายพันธุ์ที่มีปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใยคิดเป็น 3n+3n คือ F (TH-TA39) F (TH-WG9) และ F (TA-WG6) ตรวจพบว่ามีจำนวนนิวเคลียสภายในเซลล์ 6 นิวเคลียสต่อเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 3 8 และ 7 ตามลำดับ ในขณะที่ตรวจสายพันธุ์ TH TA และ WG ไม่พบเซลล์ที่มี 6 นิวเคลียส

จากการย้อมดูนิวเคลียสภายในเส้นใยด้วยสีจิมซา สามารถยืนยันได้ว่านิวเคลียสภายในเซลล์ของสายพันธุ์ต้นแบบ มีสภาพเป็นแบบหลายนิวเคลียสในหนึ่งเซลล์ (multinucleate) ความถี่ของจำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์ภายในเส้นใยของสายพันธุ์ต้นแบบและสายพันธุ์ฟิวแสนท์มีความแตกต่างกัน จากการตรวจพบนิวเคลียส 5 6 หรือ 7 นิวเคลียสต่อเซลล์ในเส้นใยของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ อาจจะเป็นสิ่งที่ใช้ยืนยันได้ว่ามีการหลอมรวมของโปรโตพลาสต์ระหว่างเซลล์คู่ผสมเกิดขึ้นจริง

6.4 ขนาดของเส้นใยและลักษณะของแคลมิโดสปอร์ในเส้นใย

วัดขนาดเซลล์ของเส้นใยฟิวแสนท์ 6 สายพันธุ์ คือ F (TH-TA17) F (TH-TA39) F (TH-WG9) F (TH-WG15) F (TA-WG6) และ F (TA-WG20) โดยใช้ไมโครมิเตอร์วัด ปรากฏผลดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงขนาดเซลล์ของสายพันธุ์ฟิวแสนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

สายพันธุ์	ขนาด (ไมโครเมตร)	
	กว้าง	ยาว
TH	3.500±1.257	12.750±2.131
TA	3.625±1.276	11.250±2.365
WG	3.000±1.026	10.875±1.223
F (TH-TA17)	9.250±1.175	20.625±3.429
F (TH-TA39)	9.250±1.428	21.125±3.845
F (TH-WG9)	9.000±1.257	22.750±1.795
F (TH-WG15)	9.125±1.223	18.875±4.013
F (TA-WG6)	8.875±2.218	21.750±3.451
F (TA-WG20)	8.375±1.677	21.375±2.625

จากตารางที่ 19 พบว่า เซลล์ของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ทั้ง 6 สายพันธุ์ มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ของเส้นใยสายพันธุ์ต้นแบบ โดยเซลล์ผสม F (TH-TA17) มีขนาดประมาณ 9.250x20.625 ไมโครเมตร เปรียบเทียบเซลล์ในเส้นใยของสายพันธุ์ TH มีขนาดประมาณ 3.500x12.750 ไมโครเมตร และเซลล์ในเส้นใยของสายพันธุ์ TA มีขนาดประมาณ 3.625x11.250 ไมโครเมตร จากผลดังกล่าวสอดคล้องกับที่ Abe และคณะ (1982) รายงานว่าเซลล์ผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์จะมีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ต้นแบบ

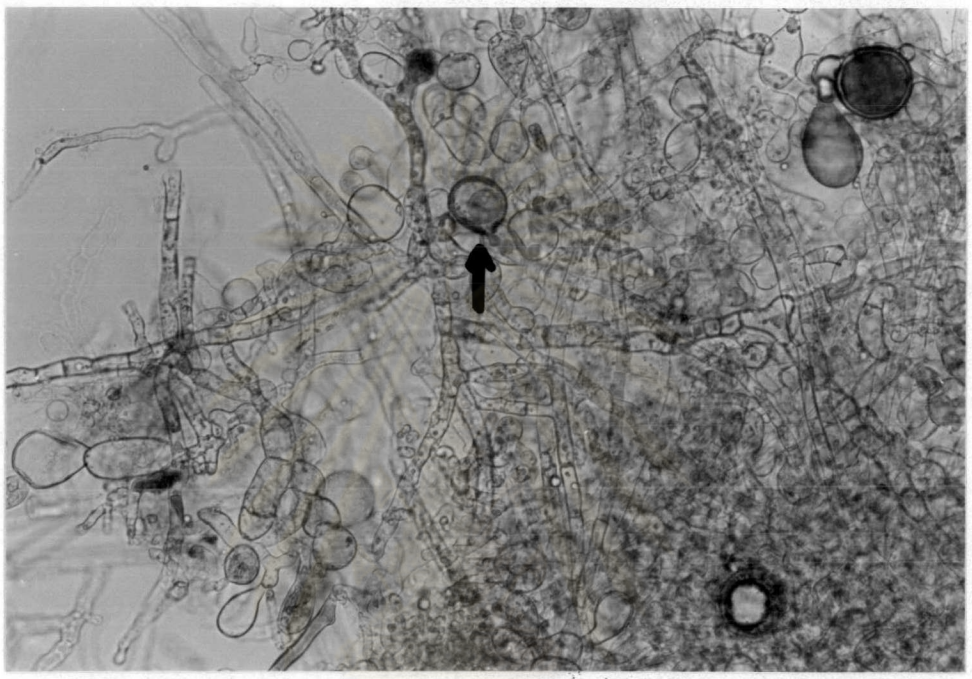
ตรวจหาตำแหน่งของแคลมิโดสปอร์ในเส้นใยและระยะเวลาของการเกิดแคลมิโดสปอร์บนอาหารวุ้นสูตร 1 ปรากฏผลในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงตำแหน่งของแคลมิโดสปอร์ในเส้นใย และระยะเวลาของการเกิดแคลมิโดสปอร์บนอาหารวุ้นสูตร 1 เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ฟิวแสนท์กับสายพันธุ์ต้นแบบ

สายพันธุ์	ตำแหน่งของแคลมิโดสปอร์บนเส้นใยที่ตรวจพบ	ระยะเวลาในการเกิดแคลมิโดสปอร์ (วัน)
TH	ระหว่างเส้นใย	23
TA	ปลายเส้นใย ระหว่างเส้นใย	25
WG	ระหว่างเส้นใย	28
F (TH-TA17)	ปลายเส้นใย ระหว่างเส้นใย	17
F (TH-TA39)	ตรวจไม่พบ (ในระยะเวลา 30 วัน)	0
F (TH-WG9)	ระหว่างเส้นใย	16
F (TH-WG15)	ปลายเส้นใย	14
F (TA-WG6)	ปลายเส้นใย	15
F (TA-WG20)	ปลายเส้นใย	14

จากตารางที่ 20 พบว่า ตำแหน่งของแคลมิโดสปอร์ในเส้นใยมี 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ปลายเส้นใยและระหว่างเส้นใย โดยระยะเวลาในการเกิดแคลมิโดสปอร์บนอาหารวุ้นสูตร 1 ของแต่ละสายพันธุ์ จะไม่เท่ากัน ใช้เวลาประมาณ 14-28 วัน จากการตรวจสอบ ไม่พบแคลมิโดสปอร์เกิดขึ้นในเส้นใยของสายพันธุ์ F (TH-TA39) เมื่อเลี้ยงเส้นใยบนอาหารวุ้นเป็นเวลา 30 วัน

แคลมิโดสปอร์ที่ตรวจพบมีสีน้ำตาลเข้ม ดังแสดงในรูปที่ 6 การเกิดแคลมิโดสปอร์ในเส้นใยของสายพันธุ์ฟิวแสนท์จะใช้เวลาน้อยกว่าการเกิดแคลมิโดสปอร์ในเส้นใยของสายพันธุ์ต้นแบบ แคลมิโดสปอร์ที่เกิดขึ้นในเชื้อราชนิดอื่น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปกติที่มีการเก็บรักษาอาหารไว้ยามขาดแคลน มักเกิดในสภาพที่แห้ง การสะสมอาหารจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจนผนังของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงนั้นมีความหนาและแข็งขึ้นในที่สุด (Deacon, 1980) โดยที่แคลมิโดสปอร์สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหันได้เป็นอย่างดี (Talbot, 1978)

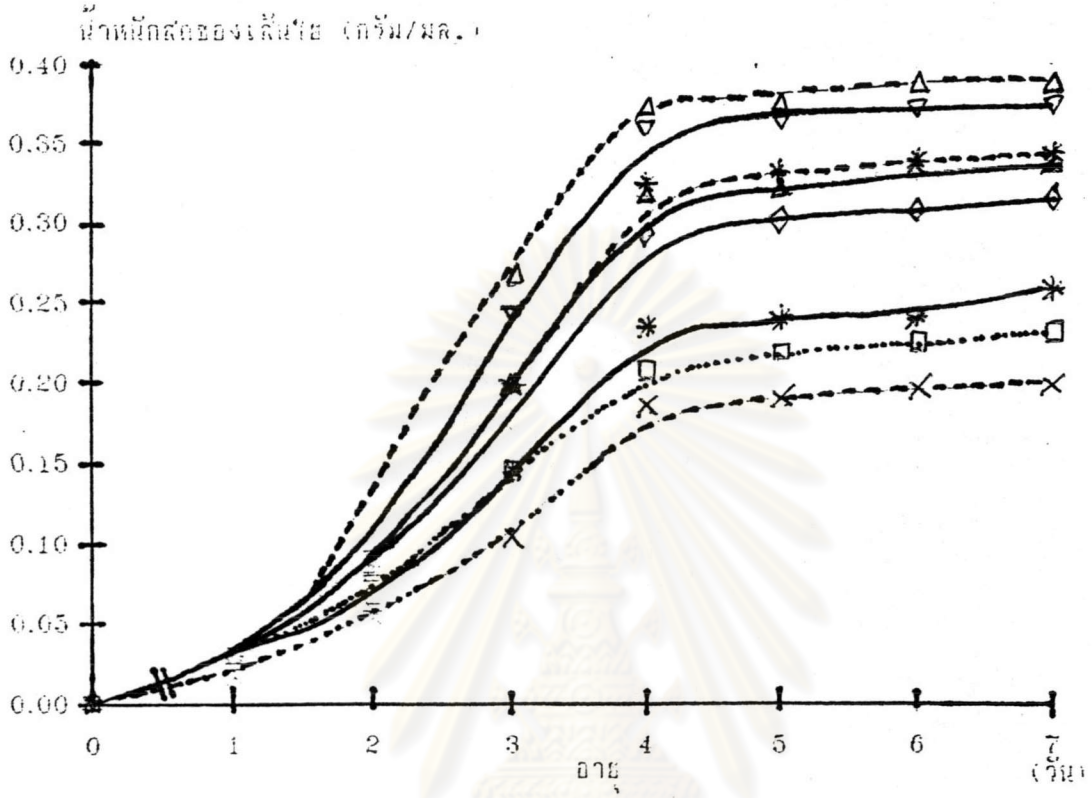


รูปที่ 6 แสดงแคลมิโดสปอร์ในเส้นใย

6.5 <u>การเจริญเติบโตของเส้นใยก่อนการเพาะ</u>

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ คือ F(TH-TA17) F (TH-TA39) F(TH-WG9) F (TH-WG15) F (TA-WG6) และ F (TA-WG20) กับสายพันธุ์ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ โดยชั่งหาน้ำหนักสด ปรากฏผลดังแสดงในกราฟที่ 19

จากกราฟที่ 19 พบว่า สายพันธุ์ฟิวแสนท์ทั้ง 6 สายพันธุ์ มีการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลวดีพีบี สูตร 2 ดีกว่า สายพันธุ์ต้นแบบ โดยมีลำดับการเจริญเติบโตของเส้นใย ดังนี้คือ F (TA-WG6) F (TA-WG20) F (TH-WG15) F (TH-TA39) F (TH-WG9) F (TH-TA17) TH TA และ WG ตามลำดับ โดยพบว่า สายพันธุ์ F (TA-WG6) มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุด



กราฟที่ 19 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดฟางต้นแบบ 3 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ผิวแสง์ 6 สายพันธุ์ (ก่อนเพาะ) ในอาหารเหลวพีดีบี สูตร 2 ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30±2° ซ.)

—— สายพันธุ์ TH
□--□ สายพันธุ์ TA
x- -x สายพันธุ์ WG
◇——◇ สายพันธุ์ F (TH-TA 17)
△——△ สายพันธุ์ F (TH-TA 39)
+---+ สายพันธุ์ F (TH-WG 15)
- - สายพันธุ์ F (TH-WG 9)
v——v สายพันธุ์ F (TA-WG 20)
△---△ สายพันธุ์ F (TA-WG 6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. สัณฐานวิทยาของดอกเห็ดฟางที่เกิดจากสายพันธุ์ฟิวแสนท์

7.1 การวางแผนการปลูก

จากการวางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized complete block design) ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มทดลองได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นสายพันธุ์ต้นแบบ ได้แก่ สายพันธุ์ TH TA WG กลุ่มสายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่มีปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใยเพิ่มขึ้น 2 เท่า ได้แก่ สายพันธุ์ F (TH-TA17) F (TH-WG15) F (TA-WG20) และกลุ่มสายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่มีปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใยเพิ่มขึ้น 3 เท่า ได้แก่ สายพันธุ์ F (TH-TA39) F (TH-WG9) F (TA-WG6)

7.2 ขนาดและรูปร่างดอก

เปรียบเทียบลักษณะและสีของดอกเห็ดระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบ และสายพันธุ์ฟิวแสนท์ โดยพิจารณาจากสีของหมวกเห็ด (Pilius) และรูปร่างของดอกเห็ดในระยะดอกบานและดอกแย้ม ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงสีหมวกเห็ดของสายพันธุ์ฟิวแสนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

สายพันธุ์	สีหมวกเห็ด
TH	ขาวตรงกลางหมวกเป็นสีเทา
TA	น้ำตาลแก่
WG	(ขาวตรงกลางหมวกมีสีเทาอ่อน)*
F (TH-TA17)	สีน้ำตาลแก่เมื่ออ่อน กลายเป็นสีน้ำตาลอ่อนเมื่อแก่
F (TH-TA39)	ดำและน้ำตาลอ่อน
F (TH-WG9)	น้ำตาลอ่อน เวลาบานกลายเป็นสีขาว
F (TH-WG15)	ขาว ตรงกลางหมวกเป็นสีเทา
F (TA-WG6)	ดำ เวลาบานกลายเป็นสีขาวตรงกลางหมวกเป็นสีเทาหรือสีน้ำตาล
F (TA-WG20)	น้ำตาลอ่อน ตรงกลางหมวกเป็นสีขาว

* ข้อมูลจากกรมวิชาการเกษตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 21 พบว่าดอกเห็ดของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ มีสีหมวก และรูปร่างแตกต่างไปจากดอกเห็ดของสายพันธุ์ต้นแบบ การที่สีหมวกเห็ดของสายพันธุ์ฟิวแสนท์มีความแตกต่างกัน น่าจะเป็นสิ่งที่ยืนยันได้อีกประการหนึ่งว่ามีการรวมของโปรโตพลาสต์เกิดขึ้นจริง จึงทำให้เกิดความแตกต่างกันของสีหมวกในสายพันธุ์ฟิวแสนท์

เมื่อได้ดอกเห็ดมา ได้วัดความยาวของก้าน (stipe) วัดความกว้างของหมวกเห็ด (Pilius) และวัดเส้นรอบวงของก้านเห็ดของดอกเห็ดสายพันธุ์ฟิวแสนท์ และสายพันธุ์ต้นแบบ ปรากฏผลดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 แสดงความยาวของก้านดอก เส้นผ่าศูนย์กลางของก้าน และความกว้างของหมวกเห็ดของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ จำนวน 10 ดอก ต่อสายพันธุ์

สายพันธุ์	ความยาวของก้านดอก (ซม.)	เส้นผ่าศูนย์กลางของก้านดอก (ซม.)	ความกว้างของหมวกเห็ด (ซม.)
TH	4.010±0.677	0.640±0.143	3.490±0.553
TA	4.210±0.656	0.880±0.114	3.780±0.940
WG	-	ไม่ออกดอก	-
F (TH-TA17)	4.920±2.032	0.390±0.088	5.760±0.648
F (TH-TA39)	7.320±0.974	0.480±0.079	4.050±0.924
F (TH-WG9)	4.850±1.292	0.400±0.067	4.180±1.187
F (TH-WG15)	5.130±1.430	0.600±0.183	4.020±1.219
F (TA-WG6)	3.900±0.668	0.500±0.094	3.500±1.562
F (TA-WG20)	3.930±0.892	0.560±0.217	4.340±0.504

จากตารางที่ 22 พบว่าดอกเห็ดสายพันธุ์ฟิวแสนท์ 4 สายพันธุ์ คือ F (TH-TA17) F (TH-TA39) F (TH-WG 15) และ F (TH-WG 9) มีความยาวของก้านดอกโดยเฉลี่ยสูงกว่าดอกเห็ดสายพันธุ์ TH และ TA ก้านของสายพันธุ์ต้นแบบ TH และ TA มีเส้นผ่าศูนย์กลางยาวกว่าสายพันธุ์ลูกผสม เมื่อเปรียบเทียบความกว้างของหมวกเห็ดระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบ และสายพันธุ์ฟิวแสนท์ พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกัน คือกว้างประมาณ 3-5 ซม.

7.3 จำนวนดอก

นับจำนวนดอกเห็ดทุกดอกที่ออกตั้งแต่วันที่เริ่มออกดอกเป็นเวลา 1 เดือน นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ข.1) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยเรียงลำดับจำนวนดอกโดยเฉลี่ยจากมากไปหาน้อย (Least significance difference) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ได้แสดงไว้ในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 แสดงจำนวนดอกทั้งหมดที่ออกดอกภายในระยะเวลา 1 เดือน

สายพันธุ์	จำนวนดอก (ดอก)
F (TA-WG6)	71.0
F (TH-WG9)	67.0
F (TH-TA17)	57.5
F (TH-TA39)	57.0
F (TH-WG15)	45.0
TA	37.0
F (TA-WG20)	35.5
TH	26.0
WG	0.0

$LSD_{0.05}$ = 19.28

$LSD_{0.01}$ = 28.06

C.V. = 19.01%

จากตารางที่ 23 พบว่าสายพันธุ์ F (TA-WG6) เป็นสายพันธุ์ลูกผสมที่ให้จำนวนดอกมากที่สุด โดยเฉลี่ยรวมทั้งสิ้น 71 ดอกต่อตะกร้า ภายในระยะเวลา 1 เดือน เมื่อลองเปรียบเทียบจำนวนดอกระหว่างสายพันธุ์ TA กับสายพันธุ์ลูกผสม F (TA-WG6) พบว่าสายพันธุ์ลูกผสม F (TA-WG6) ให้ผลผลิต 71 ดอก และสายพันธุ์ TA ออก 37 ดอก สายพันธุ์ทั้งสองให้ผลผลิตที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยที่สายพันธุ์ลูกผสม F (TA-WG6) ให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์ TA ประมาณ 34 ดอก

นำข้อมูลที่ได้จากตารางที่ 23 มาจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มสายพันธุ์ต้นแบบ กลุ่มสายพันธุ์ลูกผสมที่มีปริมาณดีเอนเอเพิ่มขึ้นสองเท่า และกลุ่มสายพันธุ์ลูกผสมที่มีปริมาณดีเอนเอเพิ่มขึ้นสามเท่า แสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 แสดงจำนวนดอกทั้งหมด แบ่งกลุ่มตามปริมาณดีเอนเอทั้งหมด

จำนวนนิวเคลียสที่คาดว่าจะเป็น	สายพันธุ์	จำนวนดอก (ดอก)
1 3n+3n	F (TA-WG6)	71.0
	F (TH-WG9)	67.0
	F (TH-TA39)	57.0
2 2n+2n	F (TH-TA17)	57.5
	F (TH-WG15)	45.0
	F (TA-WG20)	35.5
3 n+n	TA	37.0
	TH	26.0
	WG	0.0

จากตารางที่ 24 พบว่ากลุ่มสายพันธุ์ลูกผสมที่มีปริมาณดีเอนเอเพิ่มขึ้นสามเท่า ให้ผลผลิตสูงกว่ากลุ่มสายพันธุ์ลูกผสมที่มีปริมาณดีเอนเอเพิ่มขึ้นสองเท่า และกลุ่มสายพันธุ์ต้นแบบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดอกเห็ดสายพันธุ์ต้นแบบและสายพันธุ์ลูกผสมออกดอกเป็นช่วง เป็นผลให้ความถี่ของการออกดอกของแต่ละสายพันธุ์ในระยะเวลาสี่สัปดาห์มีความแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 แสดงความถี่ของการออกดอกของแต่ละสายพันธุ์ ระยะเวลา 4 สัปดาห์

สายพันธุ์	ความถี่ของการออกดอก (ดอก/วัน)			
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4
TH	4.50	1.75	0.13	0.43
TA	3.75	4.38	0.63	0.57
WG	0.00	0.00	0.00	0.00
F (TH-TA17)	5.63	2.88	1.38	2.71
F (TH-TA39)	4.88	4.50	1.88	3.43
F (TH-WG9)	6.00	6.13	2.50	2.43
F (TH-WG15)	1.13	4.75	3.25	2.43
F (TA-WG6)	5.50	6.63	3.00	3.00
F (TA-WG20)	4.63	1.88	1.38	1.14

จากตารางที่ 25 พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 สายพันธุ์ต้นแบบ TH และ TA จะออกดอกประมาณ 1-4 ดอกต่อวัน การออกดอกจะลดลงในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 สายพันธุ์ WG ไม่ออกดอกตลอดการทดลอง

การออกดอกในกลุ่มสายพันธุ์ฟิวแสนท์ พบว่าสายพันธุ์ฟิวแสนท์ทุกสายพันธุ์จะออกดอกทุกสัปดาห์ โดยมีความถี่ของการออกดอกอยู่ในช่วงระหว่าง 1-6 ดอกต่อวัน

ในสัปดาห์ที่ 2 สายพันธุ์ F (TH-WG9) F (TH-WG15) และ F (TA-WG6) มีความถี่ของการออกดอกเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์แรก ในสัปดาห์ที่ 3 สายพันธุ์ฟิวแสนท์ทุกสายพันธุ์มีความถี่ของการออกดอกลดลงจากสัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 4 สายพันธุ์ F (TH-WG9) F (TA-WG6) และ F (TA-WG20) มีความถี่ของการออกดอกใกล้เคียงกับสัปดาห์ที่ 3 สายพันธุ์ F (TH-TA17) และ F (TH-TA39) มีความถี่ของการออกดอกเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 3 ส่วนสายพันธุ์ F (TH-WG15) มีความถี่ของการออกดอกลดลงจากสัปดาห์ที่ 3

สายพันธุ์ฟิวแสนท์ส่วนใหญ่มีความถี่ของการออกดอกสูงกว่าสายพันธุ์ต้นแบบ ตลอดเวลา 1 เดือน จากการทดลอง พบว่า เห็ดจะออกดอกเป็นช่วง หลังจากนั้นจะเว้นว่างจากการออกดอกระยะหนึ่ง แล้วจึงเริ่มออกดอกใหม่

7.4 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด

นำดอกเห็ดที่สมบูรณ์ของแต่ละสายพันธุ์มาชั่งหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง คำนวณหาค่าเฉลี่ย นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ข.2 และ ข.3) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย (Least significance difference) โดยเรียงลำดับน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยจากมากไปหาน้อย ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% ปรากฏดังในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 แสดงน้ำหนักสดเฉลี่ยและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเห็ดสายพันธุ์ฟิวแสนท์ 6 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ ระยะเวลา 1 เดือน

สายพันธุ์	น้ำหนักเฉลี่ย	
	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (กรัม)
F (TA-WG6)	473.02	138.80
F (TH-WG9)	414.13	134.69
F (TH-TA17)	391.38	128.05
F (TH-TA39)	367.60	123.31
F (TA-WG20)	268.43	97.58
F (TH-WG15)	258.50	86.02
TA	177.65	58.81
TH	129.59	47.32
WG	0.00	0.00
$LSD_{0.05}$	= 141.80	= 54.10
$LSD_{0.01}$	= 206.30	= 78.71
C.V.	= 39.67%	= 25.92%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 26 พบว่า สายพันธุ์ฟิวแสนท์มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงกว่าสายพันธุ์ต้นแบบ สายพันธุ์ F (TA-WG6) มีน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงที่สุด ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% รองลงมาคือ F (TH-WG9) F (TH-TA17) F (TH-TA39) F (TA-WG20) F (TH-WG15) TA TH และ WG

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งระหว่างคู่พบว่า สายพันธุ์ F (TA-WG6) มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 473.02 กรัม สายพันธุ์ F (TA-WG20) มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 268.43 กรัม สายพันธุ์ F (TA-WG6) มีน้ำหนักสดมากกว่าสายพันธุ์ F (TA-WG20) 204.59 กรัม หมายความว่า สายพันธุ์ F (TA-WG6) มีน้ำหนักสดมากกว่าสายพันธุ์ F (TA-WG20) โดยมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

สายพันธุ์ F (TA-WG6) มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 138.80 กรัม สายพันธุ์ F (TA-WG20) มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 97.58 กรัม น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของสายพันธุ์ F (TA-WG6) มีค่าสูงกว่าน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของสายพันธุ์ F (TA-WG20) 41.22 กรัม ถือว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

น้ำหนักสดเฉลี่ยของสายพันธุ์ F (TH-WG9) เท่ากับ 414.13 กรัม สายพันธุ์ F (TH-WG15) มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 258.50 กรัม แสดงว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยของสายพันธุ์ F (TH-WG9) มีค่าสูงกว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยของสายพันธุ์ F (TH-WG15) 155.63 กรัม มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สายพันธุ์ F (TH-WG9) มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 134.69 กรัม สายพันธุ์ F (TH-WG9) มีน้ำหนักแห้งสูงกว่าสายพันธุ์ F (TH-WG15) 48.67 กรัม ถือว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.

น้ำหนักสดเฉลี่ยของสายพันธุ์ F (TH-TA17) เท่ากับ 391.38 กรัม มีค่าสูงกว่าน้ำหนักสดของสายพันธุ์ F (TH-TA39) 23.78 กรัม ถือว่าน้ำหนักสดของทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

น้ำหนักแห้งของสายพันธุ์ F (TH-TA17) เท่ากับ 128.05 กรัม สายพันธุ์ F (TH-TA39) มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 123.31 กรัม น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของสายพันธุ์ F (TH-TA17) มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์ F (TH-TA39) 4.74 กรัม ถือว่าน้ำหนักแห้งของทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากตารางที่ 26 ได้นำค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของดอกเห็ด มาคำนวณหาน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด โดยคิดเป็นน้ำหนักต่อดอก เทียบจากจำนวนดอกเฉลี่ยของแต่ละสายพันธุ์ ปรากฏผลดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดแต่ละสายพันธุ์ โดยคิดเป็นน้ำหนักต่อดอก (กรัม/ดอก)

สายพันธุ์	น้ำหนัก (กรัม/ดอก)	
	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง
TH	4.98	1.82
TA	4.80	1.59
WG	0.00	0.00
F (TH-TA17)	6.81	2.23
F (TH-TA39)	6.45	2.16
F (TH-WG9)	6.18	3.03
F (TH-WG15)	5.74	1.91
F (TA-WG6)	6.66	1.95
F (TA-WG20)	7.56	2.75

จากตารางที่ 27 พบว่า น้ำหนักสดของดอกเห็ดเมื่อคิดเป็นน้ำหนักต่อดอก ในกลุ่มสายพันธุ์ฟิวแสนท์ มีค่าสูงกว่ากลุ่มสายพันธุ์ต้นแบบ ประมาณ 1.0-3.0 กรัม

เมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดต่อดอกระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ฟิวแสนท์กับสายพันธุ์ต้นแบบ พบว่าน้ำหนักแห้งต่อดอกของสายพันธุ์ F (TH-WG15) และ F (TA-WG6) มีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักแห้งต่อดอกของสายพันธุ์ต้นแบบ น้ำหนักแห้งต่อดอกของสายพันธุ์ F (TH-TA17) F (TH-TA39) F (TH-WG9) และ F (TA-WG20) มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์ต้นแบบประมาณ 1.0-2.0 กรัม

สายพันธุ์ F (TA-WG6) เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือ ออกดอกประมาณ 71 ดอกต่อตะกร้า ในระยะเวลา 1 เดือน (ตารางที่ 24) โดยมีน้ำหนักสดประมาณ 473.02 กรัมต่อตะกร้า (ตารางที่ 26) แต่สายพันธุ์ฟิวแสนท์ดังกล่าวมีค่าน้ำหนักสดของดอกเห็ด เมื่อคิดเป็นน้ำหนักต่อดอกเท่ากับ 6.66 กรัม (ตารางที่ 27) ในขณะที่สายพันธุ์ F (TA-WG20) ออกดอกเพียง 35 ดอกต่อตะกร้า (ตารางที่ 24) มีน้ำหนักสดประมาณ 268.43 กรัมต่อตะกร้า (ตารางที่ 26) คิดเป็นน้ำหนักต่อดอกเท่ากับ 7.56 กรัม (ตารางที่ 27)

หมายความว่า ดอกเห็ดที่ได้จากสายพันธุ์ F (TA-WG6) ให้น้ำหนักสดของดอกเห็ดต่อดอกน้อยกว่าดอกเห็ดของสายพันธุ์ F (TA-WG20) แต่ให้ผลผลิตรวมสูงกว่า

เมื่อพิจารณาน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด พบว่าน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดต่อดอกที่ได้จากสายพันธุ์ F (TA-WG20) มีค่าน้ำหนักแห้งต่อดอกสูงกว่าสายพันธุ์ F (TA-WG6) ประมาณ 0.80 กรัม แสดงว่า เส้นใยภายในดอกเห็ดของสายพันธุ์ F (TA-WG20) อัดกันอยู่อย่างหนาแน่นมากกว่าเส้นใยภายในดอกเห็ดของสายพันธุ์ F (TA-WG6)

จากการทดสอบทางสถิติ (ภาคผนวก ช.1 ช.2 และ ช.3) พบว่า สายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่ทดลองเพาะให้ผลผลิตในแง่ของจำนวนดอก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งสูงกว่าสายพันธุ์ต้นแบบ โดยที่จำนวนดอกและน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% น้ำหนักสดของดอกเห็ดแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตภายในกลุ่มสายพันธุ์ฟิวแสนท์ พบว่า สายพันธุ์ F (TA-WG6) ให้ผลผลิตสูงสุด และมีความถี่ของการออกดอกมากที่สุด ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

7.5 <u>ระยะเวลาของการเจริญของดอก</u>

ระยะเวลาที่นับตั้งแต่เริ่มเพาะเห็ดจนถึงวันที่ดอกเห็ดบาน แบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะเวลาตั้งแต่ลงมือปลูกเห็ดในตะกร้าจนเกิดตุ่มดอก ขนาด 5 มม. ระยะเวลาที่ตุ่มดอกเจริญเป็นดอกตูม สูง 3 ซม. และระยะเวลาที่ดอกตูม สูง 3 ซม. เจริญจนบานเต็มที่ ดังแสดงในตารางที่ 28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 28 แสดงระยะเวลาของการเจริญของดอกเห็ดก่อนบาน

สายพันธุ์	ระยะเวลา (วัน)			
	เริ่มปลูกจนเกิดตุ่มดอกขนาด 5 มม.	ตุ่มดอกพัฒนาเป็นดอกตูมสูง 3 ซม.	ดอกบาน	รวม
TH	10	4	2	16
TA	11	3	2	16
WG	ไม่ออกดอก	-	-	-
F (TH-TA17)	7	5	2	14
F (TH-TA39)	7	7	2	16
F (TH-WG9)	6	6	2	14
F (TH-WG15)	6	12	2	20
F (TA-WG6)	9	3	2	14
F (TA-WG20)	8	4	2	14

จากตารางที่ 28 แสดงให้เห็นว่า ดอกเห็ดแต่ละสายพันธุ์มีระยะเวลาของการเกิดดอกแตกต่างกัน สายพันธุ์ F (TH-TA17) F (TH-TA39) F (TH-WG9) และ F (TH-WG15) มีช่วงระยะเวลาตั้งแต่เริ่มปลูกจนเกิดตุ่มดอกขนาด 5 มม. เร็วกว่าสายพันธุ์ต้นแบบประมาณ 3-5 วัน สายพันธุ์ F (TA-WG6) และ F (TA-WG20) ใช้ระยะเวลาในการเกิดตุ่มดอกใกล้เคียงกับสายพันธุ์ต้นแบบ เป็นไปได้ว่าการที่เซลล์ของเส้นใยสายพันธุ์ฟิวแสนท์มีปริมาณดีเอนเอเพิ่มขึ้น อาจจะมีผลต่อกลไกของการเกิดตุ่มดอก โดยทำให้เส้นใยมารวมตัวกันเป็นตุ่มดอกได้รวดเร็วขึ้น ตุ่มดอกบางตุ่มจะมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นดอกตูมสูง 3 ซม. สายพันธุ์ F (TH-TA17) F (TH-TA39) F (TA-WG9) และ F (TH-WG15) ใช้เวลาในการพัฒนาจากตุ่มดอกขนาด 5 มม. เป็นดอกตูมสูง 3 ซม. นานกว่าสายพันธุ์ต้นแบบประมาณ 1-8 วัน ในขณะที่สายพันธุ์ F (TA-WG6) และ F (TA-WG20) ใช้เวลาในการพัฒนาใกล้เคียงกับสายพันธุ์ต้นแบบ ประมาณ 3-4 วัน ดอกเห็ดทุกสายพันธุ์จะใช้เวลาในการพัฒนาจากดอกตูมสูง 3 ซม. เป็นดอกบาน ประมาณ 2 วัน

จากการทดลอง พบว่า สายพันธุ์ F (TH-TA17) F (TH-WG9) F (TA-WG6) และ F (TA-WG20) ใช้ระยะเวลาในการเจริญของดอกน้อยกว่าสายพันธุ์ต้นแบบประมาณ 2 วัน

7.6 <u>สกัดและหาปริมาณดีเอนเอของเส้นใยที่ได้จากดอกของสายพันธุ์ฟิวแสนท์และสายพันธุ์ต้นแบบ</u>

นำเส้นใยที่แยกจากดอกเห็ดซึ่งได้จากการเพาะในตะกร้าทดลองมาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด สายพันธุ์ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ฟิวแสนท์ 6 สายพันธุ์ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 29

ตารางที่ 29 แสดงปริมาณดีเอนเอในเส้นใยก่อนเกิดดอกและหลังเกิดดอกของสายพันธุ์เห็ดฟาง 9 สายพันธุ์ เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์ฟิวแสนท์ 6 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใย (มก./5 กรัม)	
	ก่อนเกิดดอก	หลังเกิดดอก
TH	1.940±0.014	1.895±0.021
TA	2.325±0.018	2.305±0.112
WG	1.175±0.025	-
F (TH-TA17)	4.250±0.177	4.350±0.137
F (TH-WG15)	3.350±0.285	3.250±0.177
F (TA-WG20)	3.550±0.209	3.450±0.209
F (TH-TA39)	6.850±0.137	6.900±0.137
F (TH-WG9)	4.800±0.112	4.700±0.274
F (TA-WG6)	5.850±0.064	5.850±0.137

จากผลการทดลองตามตารางที่ 29 ได้ใช้ปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใยที่วิเคราะห์ได้เป็นหลักในการแปรผล โดยอาศัยรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดที่เกิดขึ้น โดยมีสมมติฐานว่า เมื่อมีการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟางสายพันธุ์ต้นแบบเข้าด้วยกัน ย่อมทำให้ได้สายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่มีปริมาณดีเอนเอทั้งหมดภายในเส้นใยเพิ่มขึ้น เท่ากับปริมาณดีเอนเอของสายพันธุ์ต้นแบบคู่ผสมรวมกัน (ยุวพิน เลิศวีระวัฒน์, 2529)

ผลการทดลองจากตารางที่ 29 สามารถยืนยันได้ว่าสมมติฐานดังกล่าวเป็นความจริงคือ ปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใยของสายพันธุ์ฟิวแสนท์มีจำนวนเพิ่มขึ้น ทั้งก่อนนำมาเพาะให้เกิดดอก และหลังจากแยกเส้นใยจากดอก โดยที่สายพันธุ์ฟิวแสนท์มีผลรวมของปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใยเท่ากับปริมาณดีเอนเอของสายพันธุ์ต้นแบบคู่ที่นำมาหลอมรวมกัน

เนื่องจากนิวเคลียสที่กระจายตัวอยู่ในโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟาง ไม่มีการมารวมตัวกันจนถึงระยะก่อนการเกิดไมโอซิส ระยะเดียวเท่านั้นที่นิวเคลียสจะมารวมตัวกันภายในเบสิเดียม (basidium) เป็น 1 นิวเคลียส (Esser และ Kuenen, 1967) จากข้อมูลดังกล่าวจึงกำหนดให้จีโนไทพ์ของสายพันธุ์ต้นแบบเป็นแบบ n+n และกำหนดจีโนไทพ์ให้มีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ TH มีจีโนไทพ์เป็นแบบ n+n สายพันธุ์ TA มีจีโนไทพ์เป็นแบบ $n_{\circ}+n_{\circ}$ และสายพันธุ์ WG มีจีโนไทพ์เป็นแบบ $n'+n'$ ตามลำดับ

จากการรวมโปรโตพลาสต์ของสายพันธุ์ต้นแบบเข้าด้วยกัน ทำให้ได้สายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่มีปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใยแตกต่างกัน และคัดเลือกมา 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ควรจะมีการรวมของโปรโตพลาสต์จากสายพันธุ์ต้นแบบคู่ผสม ฝ่ายละ 1 เซลล์ ได้แก่ สายพันธุ์ F (TH-TA17) F (TH-WG15) F (TA-WG20) และกลุ่มที่ควรจะมีการรวมของโปรโตพลาสต์จากสายพันธุ์ต้นแบบคู่ผสม 1 เซลล์ต่อ 2 เซลล์ ได้แก่ สายพันธุ์ F (TH-TA39) F (TH-WG9) F (TA-WG6) ดังแสดงในตารางที่ 29

<u>สัณฐานวิทยาของดอก</u>

เมื่อทดลองเพาะสายพันธุ์ฟิวแสนท์ 6 สายพันธุ์ ในตะกร้าทดลองพบว่าสายพันธุ์ลูกผสมที่คัดมาทุกสายพันธุ์สามารถออกดอกได้ โดยแต่ละดอกของสายพันธุ์มีรูปร่างและสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน คือ

1. <u>สายพันธุ์ F (TH-TA17)</u> (รูปที่ 9 และ 10) ควรมีจีโนไทพ์ที่กำหนดให้ตามปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในเส้นใยเป็นแบบ $(n+n)+(n_{\circ}+n_{\circ})$ พบว่าเมื่ออายุอ่อนหมวกเห็ดมีสีดำ และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนเมื่อดอกเห็ดมีอายุมากขึ้น รูปร่างของดอกเห็ด

สายพันธุ์นี้คล้ายดอกเห็ดสายพันธุ์ TA ในระยะดอกบาน หมวกเห็ดมีจุกตรงกลาง เป็นไปได้ว่าลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้รับจากสายพันธุ์ TA แสดงลักษณะจีโนไทฟ์ ได้ชัดเจนกว่า ลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้จากสายพันธุ์ TH รูปร่างและลักษณะของดอกเห็ดจึงคล้ายสายพันธุ์ TA

2. สายพันธุ์ F (TH-TA39) (รูปที่ 11 และ 12) จีโนไทฟ์ควรจะเป็นแบบ $(n+n) + (n_o+n_o) + (n_o+n_o)$ พบว่าหมวกเห็ดของสายพันธุ์นี้มีสีดำและน้ำตาลอ่อน จากค่าปริมาณดีเอนเอที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 6.900±0.137 มก./5 กรัม ของเส้นใยสด แสดงว่าสายพันธุ์นี้ควรได้ลักษณะทางพันธุกรรมจากสายพันธุ์ TA มา 2 ชุด ลักษณะและรูปร่างของดอกที่ปรากฏจึงคล้ายสายพันธุ์ TA มาก ความแตกต่างที่เห็นชัด คือ สีของดอกที่ปรากฏจางกว่าสายพันธุ์ TA

3. สายพันธุ์ F (TH-WG15) (รูปที่ 13) ควรมีจีโนไทฟ์เป็นแบบ $(n+n)+(n'+n')$ สีหมวกของดอกเห็ดสายพันธุ์นี้เป็นสีขาว ตรงกลางหมวกเป็นสีเทา สายพันธุ์นี้น่าจะได้รับลักษณะทางพันธุกรรมจากสายพันธุ์ TH ทั้ง 2 ชุด เพราะสายพันธุ์ WG ควรมีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายกับสายพันธุ์ TH แต่สูญเสียลักษณะทางพันธุกรรมบางอย่างไปจากการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ปริมาณดีเอนเอในเส้นใยของสายพันธุ์ฟิวแสนท์เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ต้นแบบ 2 เท่า รูปร่างลักษณะของดอกเห็ดที่ได้คล้ายกับดอกเห็ดสายพันธุ์ TH

4. สายพันธุ์ F (TH-WG9) (รูปที่ 14 และ 15) จีโนไทฟ์ควรจะเป็นแบบ $(n+n) + (n+n) + (n'+n')$ พบว่าหมวกเห็ดมีสีน้ำตาลอ่อน เวลาบานสีหมวกจะกลายเป็นสีขาว จากแบบแผนของจีโนไทฟ์อาจบอกได้ว่า สายพันธุ์ฟิวแสนท์นี้น่าจะได้รับลักษณะทางพันธุกรรมจากสายพันธุ์ TH 3 ชุด เนื่องจากปริมาณดีเอนเอในเส้นใยมีค่าเท่ากับ 4.700±0.274 มก./5 กรัม ของเส้นใยสด เป็นผลให้ดอกเห็ดมีรูปร่างและลักษณะคล้ายกับดอกเห็ดของสายพันธุ์ TH โดยที่หมวกเห็ดมีสีขาวมากขึ้น และสีเทาตรงกลางหมวกบางดอกหายไป แต่บางดอกตรวจพบว่ายังมีสีเทาอยู่กลางหมวก สีเจือจางกว่าสายพันธุ์ต้นแบบ

5. สายพันธุ์ F (TA-WG20) (รูปที่ 16) จีโนไทฟ์ควรเป็นแบบ $(n_o+n_o) + (n'+n')$ พบว่าดอกเห็ดมีสีน้ำตาลอ่อน ตรงกลางหมวกเป็นสีขาว WG เป็นสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ เมื่อนำโปรโตพลาสต์ของสายพันธุ์ TA และ WG มาหลอมรวมกัน ทำให้ดอกเห็ดที่ได้มีลักษณะแตกต่างไปจากดอกเห็ดที่เป็นผลมาจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสายพันธุ์ TA และ TH รูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์นี้มีส่วนคล้ายดอกเห็ดสายพันธุ์ TH

6. <u>สายพันธุ์ F (TA-WG6)</u> (รูปที่ 17 และ18) ควรมีจีโนไทพ์เป็นแบบ (n_o+n_o) + (n_o+n_o) + ($n'+n'$) พบว่าหมวกของดอกเห็ดสายพันธุ์นี้มีสีดำ เวลาที่ดอกบานจะกลายเป็นสีขาว ตรงกลางหมวกเป็นสีเทาหรือสีน้ำตาล รูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์นี้มีส่วนคล้ายดอกเห็ดสายพันธุ์ TH สายพันธุ์ F (TA-WG6) เกิดจากการรวมของโปรโตพลาสต์ระหว่างสายพันธุ์ TA จำนวน 2 เซลล์ กับสายพันธุ์ WG จำนวน 1 เซลล์

ลักษณะของดอกเห็ดสายพันธุ์ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ฟิวแสนท์ 6 สายพันธุ์ แสดงในรูปที่ 7-18

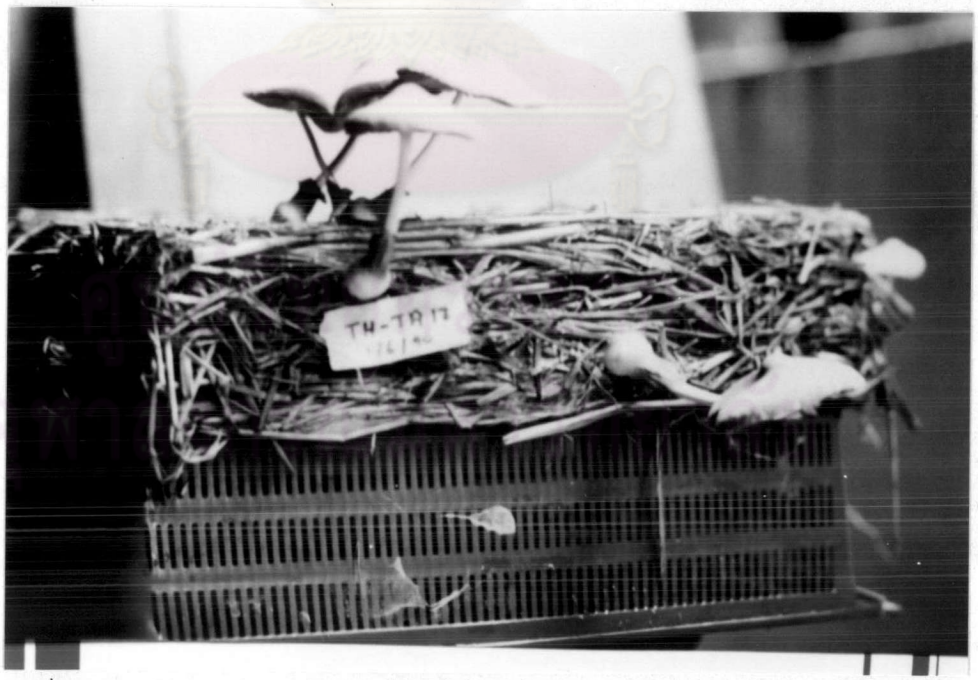
รูปที่ 7 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ TH กำหนดให้จีโนไทพ์เป็นแบบ n+n

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ TA กำหนดให้จีโนไทพ์เป็นแบบ $n_{o}+n_{o}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

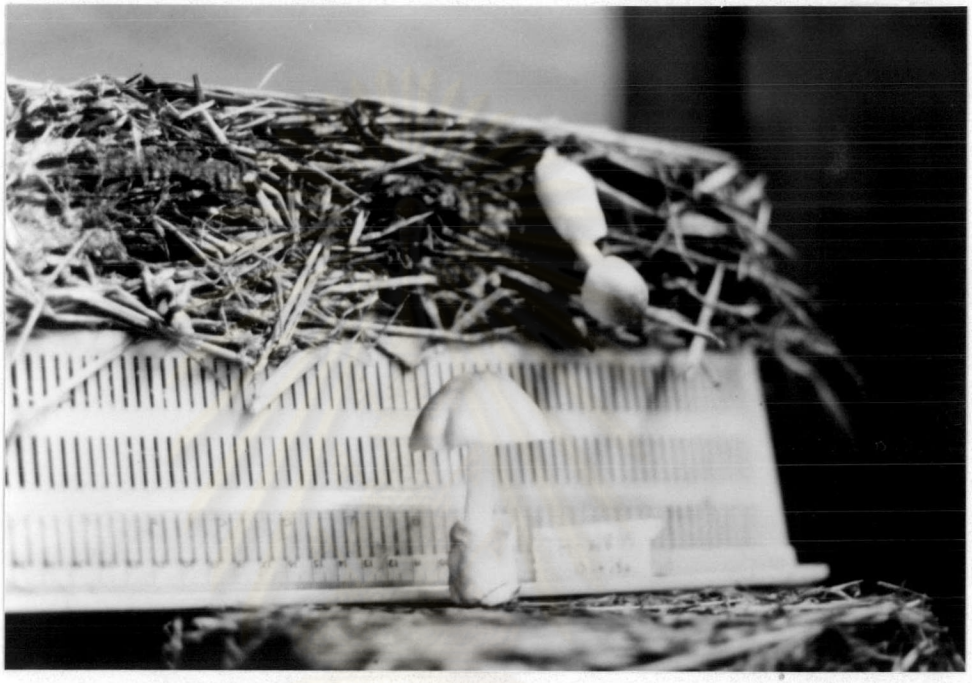
รูปที่ 9 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ F (TH-TA17) ระยะดอกแย้ม กำหนดให้จีโนไทพ์เป็นแบบ (n+n) + (n_o+n_o)



รูปที่ 10 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ F (TH-TA17) ระยะดอกบาน กำหนดให้จีโนไทพ์เป็นแบบ (n+n) + (n_o+n_o)

รูปที่ 11 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ F (TH-TA39) ระยะดอกตูม กำหนดให้จีโนไทฟ์เป็นแบบ (n+n) + (n_o+n_o) + (n_o+n_o)

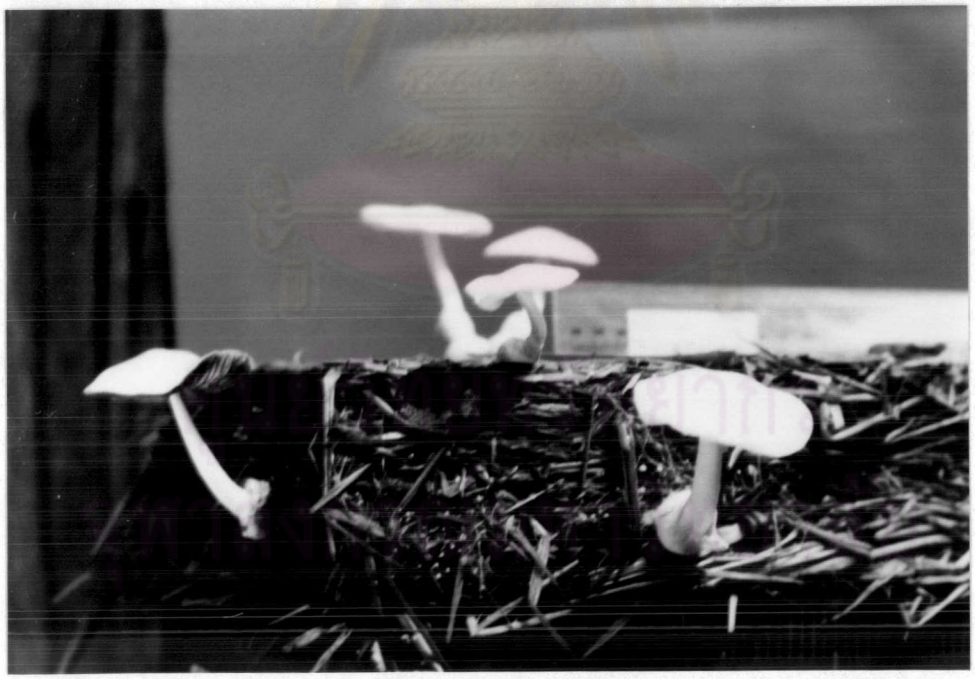
รูปที่ 12 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ F (TH-TA39) ระยะดอกบาน กำหนดให้จีโนไทฟ์เป็นแบบ (n+n) + (n_o+n_o) + (n_o+n_o)



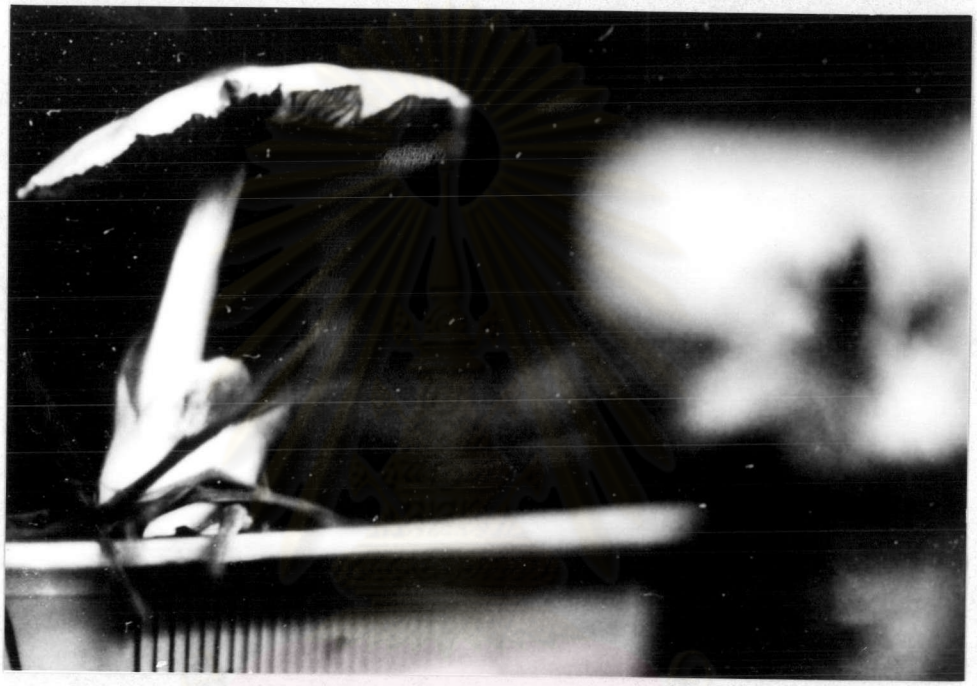
รูปที่ 13 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ F (TH-WG15) ระยะดอกแย้มและบาน กำหนดให้จีโนไทฟ์เป็นแบบ (n+n) + (n´+n´)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ F (TH-WG9) ระยะดอกตูม
กำหนดให้จีโนไทฟ์เป็นแบบ (n+n) + (n+n) + (n´+n´)



รูปที่ 15 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ F (TH-WG9) ระยะดอกบาน
กำหนดให้จีโนไทฟ์เป็นแบบ (n+n) + (n+n) + (n´+n´)



รูปที่ 16 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ F (TA-WG20) ระยะดอกบาน กำหนดให้จีโนไทฟ์เป็นแบบ $(n_{o}+n_{o}) + (n'+n')$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 17 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ F (TA-WG6) ระยะดอกแย้ม
กำหนดให้จีโนไทฟ์เป็นแบบ $(n_{\circ}+n_{\circ}) + (n_{\circ}+n_{\circ}) + (n'+n')$

รูปที่ 18 แสดงรูปร่างของดอกเห็ดสายพันธุ์ F (TA-WG6) ระยะดอกบาน
กำหนดให้จีโนไทฟ์เป็นแบบ $(n_{\circ}+n_{\circ}) + (n_{\circ}+n_{\circ}) + (n'+n')$

7.7 <u>ขนาดของเส้นใย การเกิดแคลมิโดสปอร์ในเส้นใยหลังการเพาะ และขนาดของเบลิดิโอสปอร์</u>

จากการวัดขนาดเซลล์ของเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่แยกจากดอกเห็ด เปรียบเทียบกับขนาดของเส้นใยสายพันธุ์ต้นแบบ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยวัดด้วยออคคูลาร์-ไมโครมิเตอร์ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 30

ตารางที่ 30 แสดงขนาดเซลล์ของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่แยกจากดอกเห็ด เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

สายพันธุ์	ขนาด (ไมโครเมตร)	
	กว้าง	ยาว
TH	3.571±1.268	12.375±2.064
TA	3.750±1.282	11.750±2.578
WG	-	-
F (TH-TA17)	9.000±1.257	20.000±3.804
F (TH-TA39)	8.500±1.885	21.875±3.128
F (TH-WG9)	8.750±1.283	22.375±2.064
F (TH-WG15)	8.500±1.701	18.750±3.582
F (TA-WG6)	8.750±1.902	21.875±3.429
F (TA-WG20)	8.250±2.161	21.875±2.795

เปรียบเทียบผลที่ได้จากตารางที่ 30 กับผลจากตารางที่ 19 ซึ่งเป็นขนาดของเซลล์ก่อนเพาะ พบว่าทุกค่ามีความใกล้เคียงกัน โดยที่เซลล์ของเส้นใยของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่แยกจากดอก (Basidiocarp) ที่เกิดจากการเพาะมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ของเส้นใยของสายพันธุ์ต้นแบบ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับก่อนเพาะ

ศึกษาการเกิดแคลมิโดสปอร์และระยะเวลาของการเกิดในเส้นใยของสายพันธุ์ฟิวแสนท์หลังการเพาะ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 31

ตารางที่ 31 แสดงตำแหน่งของแคลมิโดสปอร์ในเส้นใยที่แยกจากดอกเห็ด และระยะเวลาของการเกิดแคลมิโดสปอร์ บนอาหารวุ้นสูตร 1 เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ฟิวแสนท์กับสายพันธุ์ต้นแบบ ระยะเวลา 30 วัน

สายพันธุ์	ตำแหน่งของแคลมิโดสปอร์บนเส้นใยที่ตรวจพบ	ระยะเวลาในการเกิดแคลมิโดสปอร์ (วัน)
TH	ระหว่างเส้นใย	21
TA	ปลายเส้นใย ระหว่างเส้นใย	22
WG	ไม่ออกดอก	-
F (TH-TA17)	ปลายเส้นใย ระหว่างเส้นใย	15
F (TH-TA39)	ตรวจไม่พบ (ในระยะเวลา 30 วัน)	0
F (TH-WG9)	ระหว่างเส้นใย	15
F (TH-WG15)	ปลายเส้นใย	13
F (TA-WG6)	ปลายเส้นใย	13
F (TA-WG20)	ปลายเส้นใย	12

จากตารางที่ 31 พบว่า ตำแหน่งของแคลมิโดสปอร์ในเส้นใยมี 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ปลายเส้นใย และระหว่างเส้นใย ระยะเวลาในการเกิดแคลมิโดสปอร์บนอาหารวุ้นสูตร 1 ของแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน การเกิดแคลมิโดสปอร์ในเส้นใยของสายพันธุ์ฟิวแสนท์จะเกิดในช่วงเวลาน้อยกว่าการเกิดแคลมิโดสปอร์ในเส้นใยของสายพันธุ์ต้นแบบประมาณ 6-16 วัน เมื่อเปรียบเทียบผลจากตารางที่ 31 กับตารางที่ 20 พบว่า ระยะเวลาในการเกิดแคลมิโดสปอร์ของเส้นใยที่แยกจากดอกเห็ดจะเร็วกว่าระยะเวลาในการเกิดแคลมิโดสปอร์ของเส้นใยก่อนเพาะ ประมาณ 1-2 วัน เหตุที่เป็นเช่นนี้ อาจจะเป็นเพราะว่าเส้นใยที่แยกจากดอกสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงได้ดีและเร็วกว่าเส้นใยก่อนเพาะ ทำให้ระยะเวลาในการเกิดแคลมิโดสปอร์สั้นลงกว่าเดิม 1-2 วัน

ศึกษาขนาดของเบสิดิโอสปอร์ที่เชี่ยได้จากครีบดอกเห็ดแต่ละสายพันธุ์มีขนาดดังแสดงในตารางที่ 32

ตารางที่ 32 แสดงขนาดของเบสิดิโอสปอร์ (Basidiospore) ที่ได้จากครีบดอก (Lamella) ของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

สายพันธุ์	ขนาด (ไมโครเมตร)	
	ความกว้าง	ความยาว
TH	1.18±0.64	3.25±1.58
TA	2.19±0.90	3.53±2.66
WG	ไม่ออกดอก	-
F (TH-TA17)	3.38±1.41	3.60±1.50
F (TH-TA39)	3.25±1.69	3.86±1.62
F (TH-WG9)	3.19±1.60	3.60±1.25
F (TH-WG15)	3.25±2.70	3.38±1.75
F (TA-WG6)	3.50±1.60	3.84±2.34
F (TA-WG20)	3.25±1.54	4.28±2.27

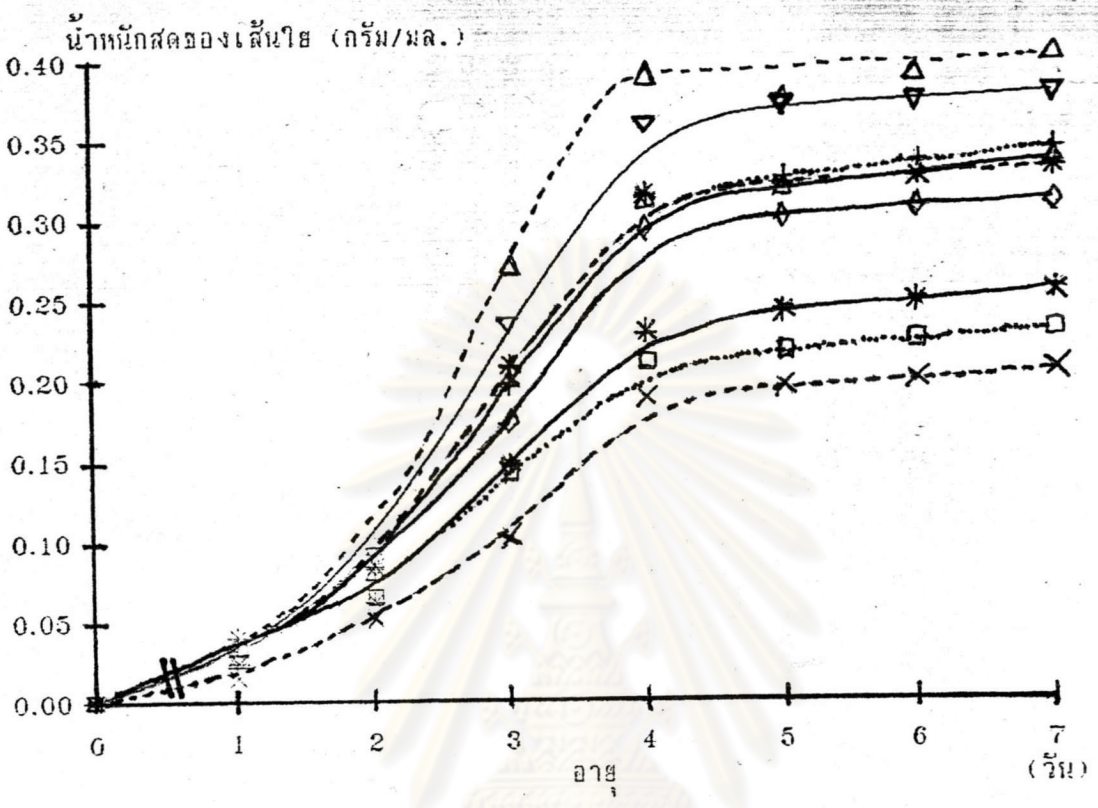
จากตารางที่ 32 พบว่า เบสิดิโอสปอร์ที่ได้จากครีบดอกเห็ดฟางสายพันธุ์ต้นแบบมีขนาดประมาณ 1.18-2.19x3.25-3.53 ไมโครเมตร เมื่อพิจารณาสายพันธุ์ฟิวแสนท์ พบว่า ขนาดเบสิดิโอสปอร์ของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ใกล้เคียงกับขนาดเบสิดิโอสปอร์ของสายพันธุ์ต้นแบบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.8 การเจริญเติบโตของเส้นใยหลังการเพาะ

เปรียบเทียบผลการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ 6 สายพันธุ์ คือ F (TH-TA17) F (TH-TA39) F (TH-WG9) F (TH-WG15) F (TA-WG6) และ F (TA-WG20) กับสายพันธุ์ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ ที่แยกจากดอกเห็ด โดยชั่งหาน้ำหนักสด ได้ผลดังแสดงในกราฟที่ 20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กราฟที่ 20 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดฟางต้นแบบ 3 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ผิวแสนท์ 6 สายพันธุ์ (หลังเพาะ) ในอาหารเหลวพีดีบี สูตร 2 ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30±2° ซ.)

—— สายพันธุ์ TH
□---□ สายพันธุ์ TA
x- -x สายพันธุ์ WG
◇——◇ สายพันธุ์ F (TH-TA 17)
△——△ สายพันธุ์ F (TH-TA 39)
+---+ สายพันธุ์ F (TH-WG 15)
- - สายพันธุ์ F (TH-WG 9)
▽——▽ สายพันธุ์ F (TA-WG 20)
△---△ สายพันธุ์ F (TA-WG 6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากกราฟที่ 20 พบว่า การเจริญเติบโตของเส้นใยหลังการเพาะมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกับผลการเจริญของเส้นใยก่อนการเพาะ ดังแสดงในกราฟที่ 19 ในวันที่ 1 ถึง 2 การเจริญของเส้นใยเป็นไปอย่างช้า ๆ การเจริญของเส้นใยจะเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 2 ถึง 4 หลังจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนเกือบเป็นเส้นตรง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย