หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

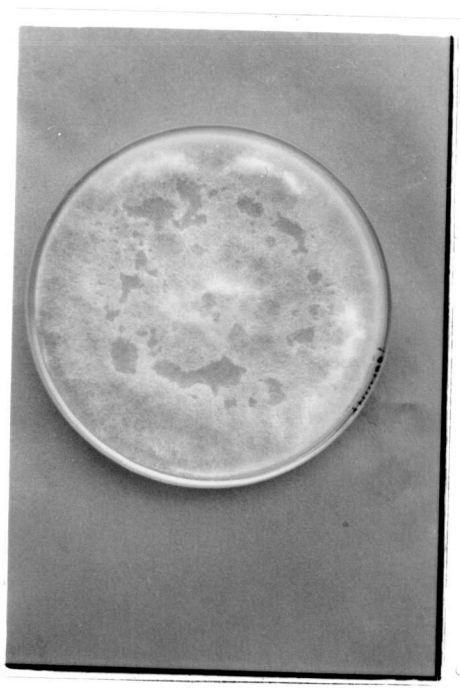
บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สายพันธุ์เห็ดที่ใช้ในการทดลอง และการทำกล้าเชื้อ

เลี้ยงสายใยของเห็ดโคนลักษณะดังรูป 1.1 และเห็ดฟางลักษณะดังรูป 1.2 บนอาหารพีดีเอ ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 ° ซ.) เป็นเวลา 5-7 วัน สายใยจะเจริญเต็มผิวหน้าอาหารแข็ง เตรียมสายใยเหล่านี้ไว้เป็นกล้าเชื้อ

รูปที่ 1.1 แสดงสายใยของเห็ดโคน บนพีดีเอ



รูปที่ 1.2 แสดงสายใยเห็ดฟาง บนพีดีเอ

2. การเตรียมสายใยในอาหารเหลว

2.1 อัตราการเจริญของเห็ดโคนในอาหารเหลว

ผลการเจริญของเห็ดโคนในอาหารเหลวพีดีบี ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2 พบว่าน้ำหนักของสายใยในวันที่ 1 ถึง 4 มีการเพิ่มซึ่งอยู่ในช่วงระยะทวีคูณ (log phase) น้ำหนักสดประมาณ 0.0056-0.007 กรัม/มล. สำหรับวันที่4 น้ำหนักสดของสายใยสูงสุด 0.01 กรัม/มล. และน้ำหนักสดของสายใยช่วงวันที่ 7-9 จะถึงช่วงคงที่(stationary phase)0.0107-0.0109 กรัม/มล. ในการเตรียมโปรโตพลาสต์พบว่า อายุของสายใยที่เหมาะสมคือ การเจริญของเซลล์ในช่วงระยะทวีคูณ จึงเลือกอายุของสายใย 4 วันเตรียมโปรโตพลาสต์ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Peberdy and Ferenczy (1985)

2.2 การเตรียมสายใยเห็ดฟางในอาหารเหลว

ผลจากการเลี้ยงสายใยเห็ดฟางในอาหารเหลวพีดีบี ซึ่งมีการเติมลูกแก้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 ซม.ลงไปด้วย ทำให้การกระจายของสายใยดีขึ้น โดยบ่มบนเครื่องเขย่าอุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 4 วัน พบว่าสายใยกระจายตัวดี ได้น้ำหนักสดประมาณ 0.12 กรัม/มล. ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้น้ำหนักสายใยในวันที่ 4 จะต่ำกว่าผลการทดลองของวิรวัฒน์ และสุมาลี (2534) ในการเลี้ยงสายใยเห็ดฟางที่ภาวะเดียวกัน ซึ่งพบว่าน้ำหนักสดของสายใยในวันที่ 4 จะได้ประมาณ 0.2 กรัม/มล.

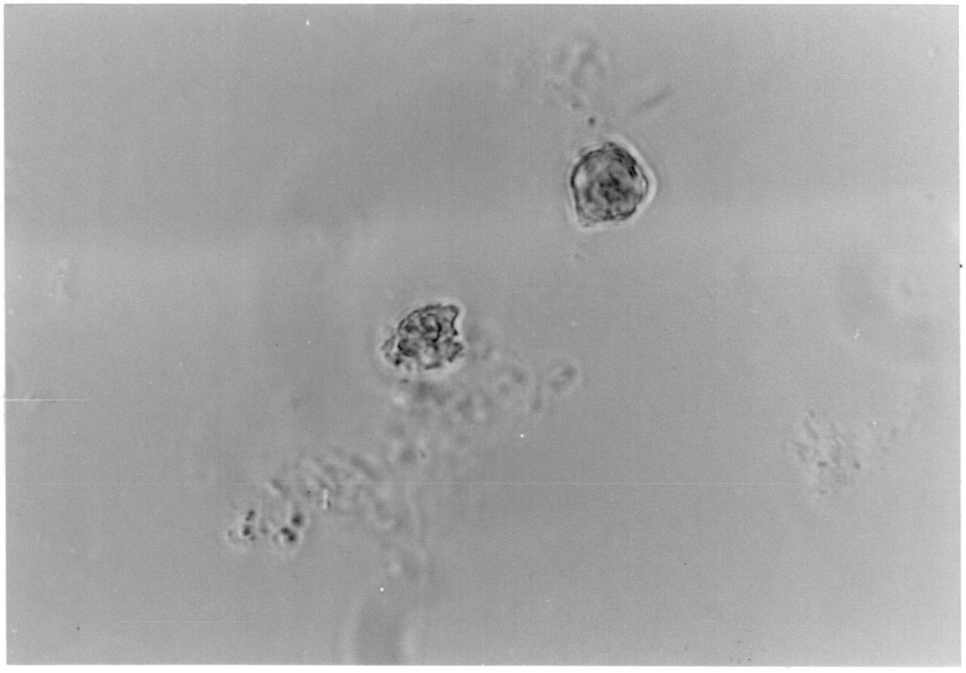
3. การเตรียมโปรโตพลาสต์จากสายใยเห็ดโคน

3.1 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

3.1.1 เอนไซม์ชนิดเดี่ยว

ผลการนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีลักษณะดังรูปที่ 3 เกิดจากการบ่มสายใยกับเอนไซม์

เดี่ยว 4 ชนิดคือ โนโวไซม์ 188 เบตา-กลูคูโรนิเดส ไซโมไลเอส และไลซิงเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีการแปรความเข้มข้น

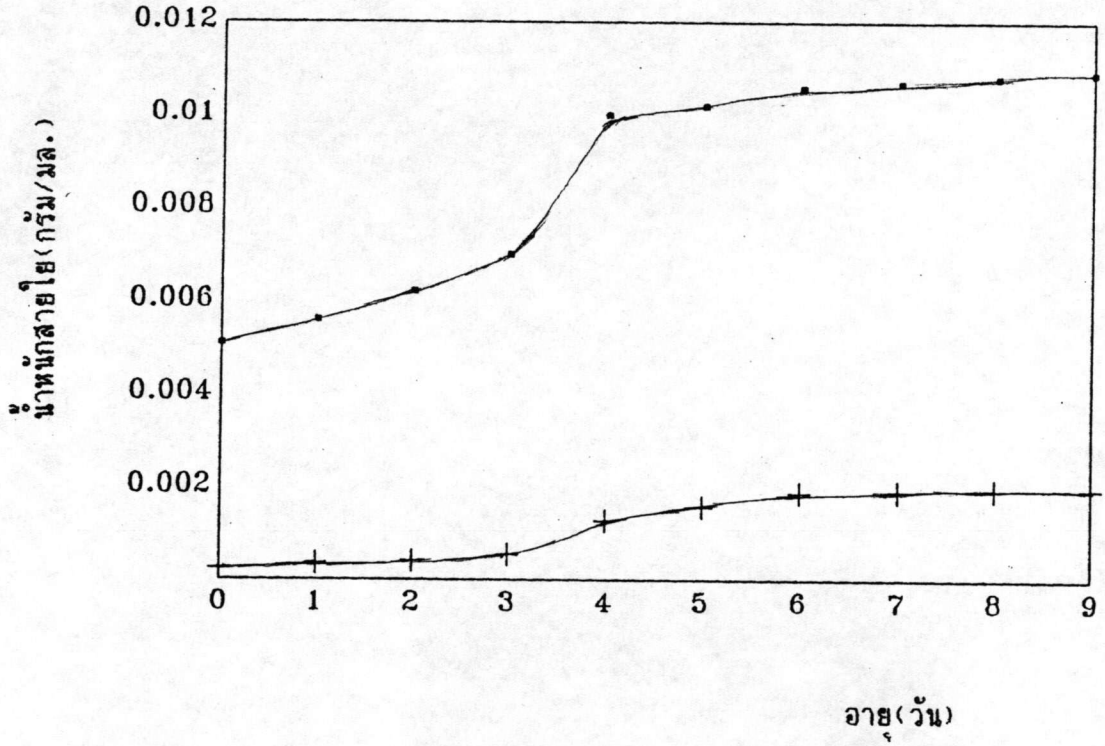


รูปที่3 แสดงโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน กำลังขยาย 400 เท่า

การใช้เอนไซม์โนโวไซม์ 188 แสดงในรูปที่ 4 ผลการนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นในเวลาต่างๆของการบ่ม พบว่าโนโวไซม์ความเข้มข้น 20% บ่มเป็นเวลา 4 ชม.ได้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุดเท่ากับ $7x10^4$ เซลล์/มล. จากสายใยสดน้ำหนัก 500 มก.

การใช้เบตา-กลูคูโรนิเดสในการเตรียมโปรโตพลาสต์โดยแปรความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่5 พบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดได้สูงสุด $3.5x10^4$ เซลล์/มล.โดยใช้สายใยน้ำหนักสด 500 มก.จะเกิดในชั่วโมงที่4 ของการบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ.ที่ความเข้มข้นของเบตา-กลูคูโรนิเดสเท่ากับ 4 มก/มล.

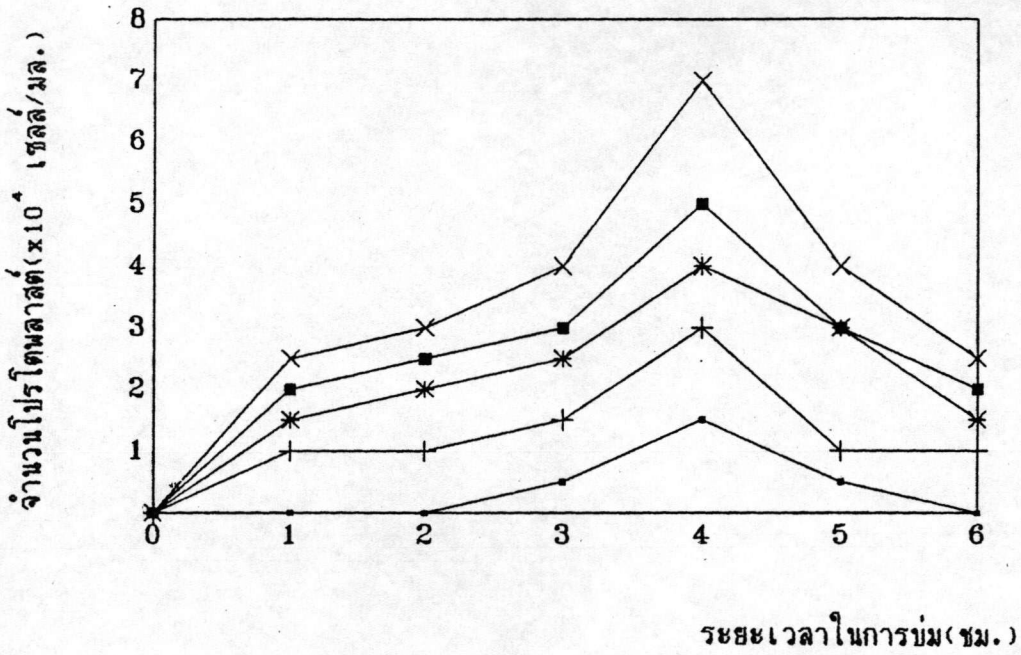
จากรูปที่ 6แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากการใช้เอนไซม์ไซโมไลเอส ซึ่งแปรผันความเข้มข้น 0.2 0.5 1 2 และ 4 บ่มกับสายใยเห็ดโคนที่มีน้ำหนักสด 500 มก. อายุ 4 วัน



รูปที่2 แสดงการเจริญเติบโตของสายใยเห็ดโคนในอาหารพีดีบี อุณหภูมิห้องที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที

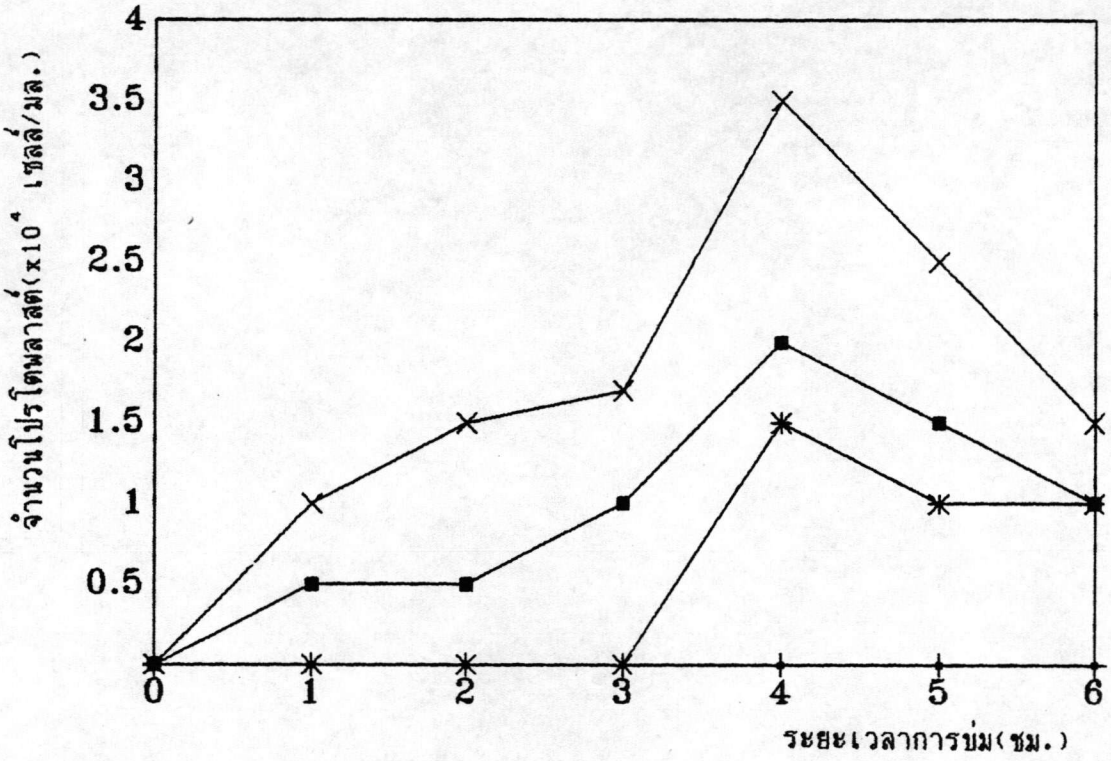
▪ น้ำหนักสด

\+ น้ำหนักแห้ง



รูปที่4 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน โดยใช้เอนไซม์โนโวไซม์ 188 ที่ความเข้มข้น 2.5-20%

2.5%
5.0%
10%
15%
20%



รูปที่5 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้เบตา-กลูคูโรนิเดส ที่ความเข้มข้น 0.2-4 มก/มล.

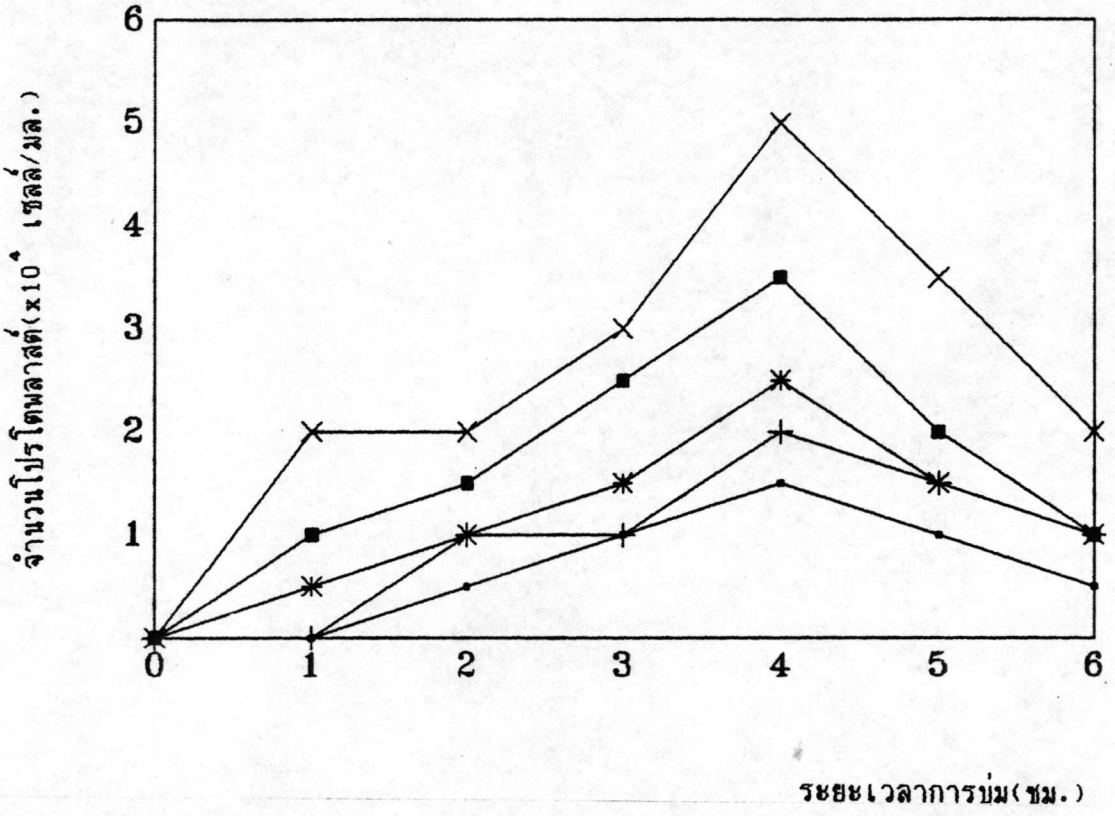
▪ 0.2 มก/มล.

\+ 0.5 มก/มล.

* 1.0 มก/มล.

■ 2.0 มก/มล.

× 4.0 มก/มล.



รูปที่6 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน โดยใช้ไซโมไลเอส ที่ความเข้มข้น 0.2-4 มก/มล.

▪ 0.2 มก/มล.

\+ 0.5 มก/มล.

✳ 1.0 มก/มล.

■ 2.0 มก/มล.

× 4.0 มก/มล.

พบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์เกิดขึ้น $5x10^4$ เซลล์/มล. เป็นจำนวนสูงสุดเกิดในชม.ที่ 4 ของการบ่ม โดยใช้ไซโมไลเอสความเข้มข้น 4 มก/มล. ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของวีรวัฒน์และสุมาลี (2534) ที่เตรียมโปรโตพลาสต์จากสายใยเห็ดฟาง โดยใช้ไซโมไลเอส ความเข้มข้น 0.2 มก/มล. พบว่าเมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชม. จะพบโปรโตพลาสต์สูงสุด 6.5×10^4 เซลล์/มล.

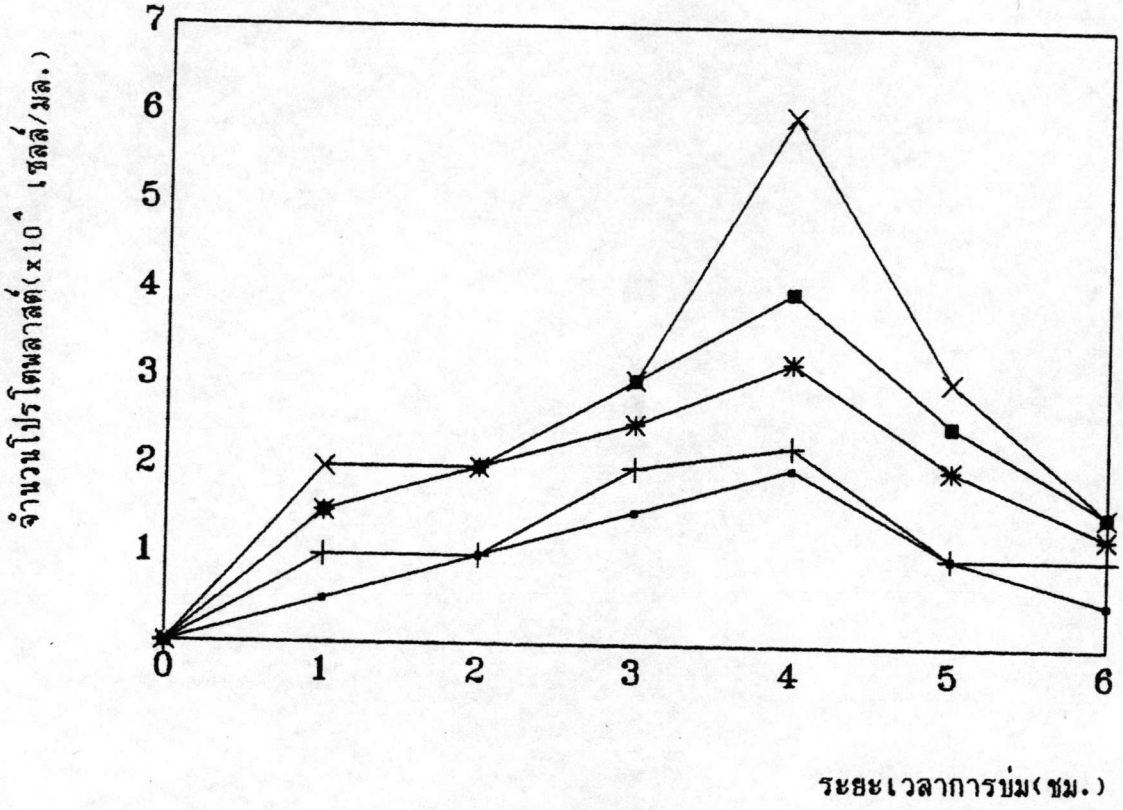
จำนวนโปรโตพลาสต์ ที่เกิดจากการบ่มสายใยเห็ดโคน 500 มก. ด้วยเอนไซม์ไลซิงเอนไซม์ที่แปรความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 0.5 1 2 และ 4 แสดงในรูปที่ 7 พบว่าไลซิงเอนไซม์ที่ ความเข้มข้น 4 มก/มล. ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด $6x10^4$ เซลล์/มล. ในชม.ที่ 4 ของการบ่ม

จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากการใช้เอนไซม์เดี่ยว 4 ชนิด คือ โนโวไซม์ 188 เบตา-กลูคูโรนิเดส ไซโมไลเอส และไลซิงเอนไซม์ พบว่า โนโวไซม์ความเข้มข้น 20 % ให้โปรโตพลาสต์มากสุด $7x10^4$ เซลล์/มล. ดังผลแสดงในรูปที่8

3.1.2 <u>เอนไซม์ผสม</u>

การใช้เอนไซม์ผสมเป็นคู่ระหว่างโนโวไซม์-เซลลูเลส เบตา-กลูคูโรนิเดส-เซลลูเลส ไซโมไลเอส-เซลลูเลส และไลซิงเอนไซม์-เซลลูเลส ได้ผลดังนี้

ผลของการใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง โนโวไซม์ 188 20% กับแปรผันความเข้มข้นของเซลลูเลสที่ 1และ 2 มก/มล. แสดงไว้ในรูปที่ 9 โดยใช้สายใย 500 มก. ที่อุณหภูมิ 30° ซ. พบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์ในชม. 3 ของการบ่มจะได้จำนวนสูงสุด $2.25x10^5$ เซลล์/มล. และเมื่อใช้เอนไซม์ผสมของโนโวไซม์กับเซลลูเลส 2 มก/มล. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นจะมากกว่าจำนวนโปรโตพลาสต์ ที่เกิดจากการใช้เอนไซม์โนโวไซม์เดี่ยวประมาณ $1.85x10^5$ เซลล์/มล. เมื่อบ่มในเวลานานเท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Mukherjee and Sengupta (1988) เกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ชนิดเดี่ยวและชนิดผสมในการเตรียมโปรโตพลาสต์จาก *Termitomyces clypeatus* พบว่าสายใยที่มีน้ำหนักแห้ง 200 มก. ย่อยสลายด้วยสารละลายเอนไซม์ผสมของโนโวไซม์ 234 ความเข้มข้น 10 มก/มล. เซลลูเลส 6 U/มล. และ ไคติเนส 4 U/มล.ที่อุณหภูมิ 30° ซ. เกิดโปรโตพลาสต์ $2.3x10^5$ เซลล์/มล. ในชม.ที่ 3 ของการบ่ม แต่ถ้าใช้สารละลายเอนไซม์โนโวไซม์ 234 ชนิดเดี่ยวบ่มกับสายใยปริมาณเท่ากันภาวะเดียวกัน พบโปรโตพลาสต์เพียง $1x10^5$ เซลล์/มล.



รูปที่7 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน โดยใช้ไลซิ่งเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.2-4 มก/มล.

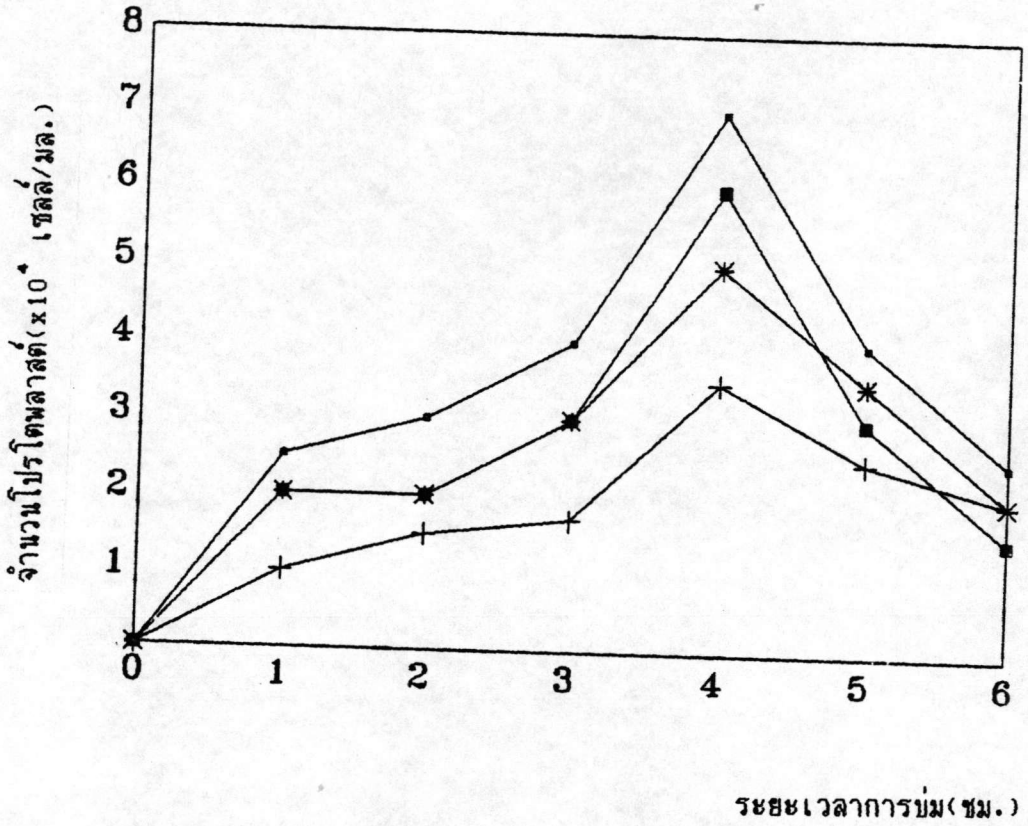
▪ 0.2 มก/มล.

\+ 0.5 มก/มล.

✱ 1.0 มก/มล.

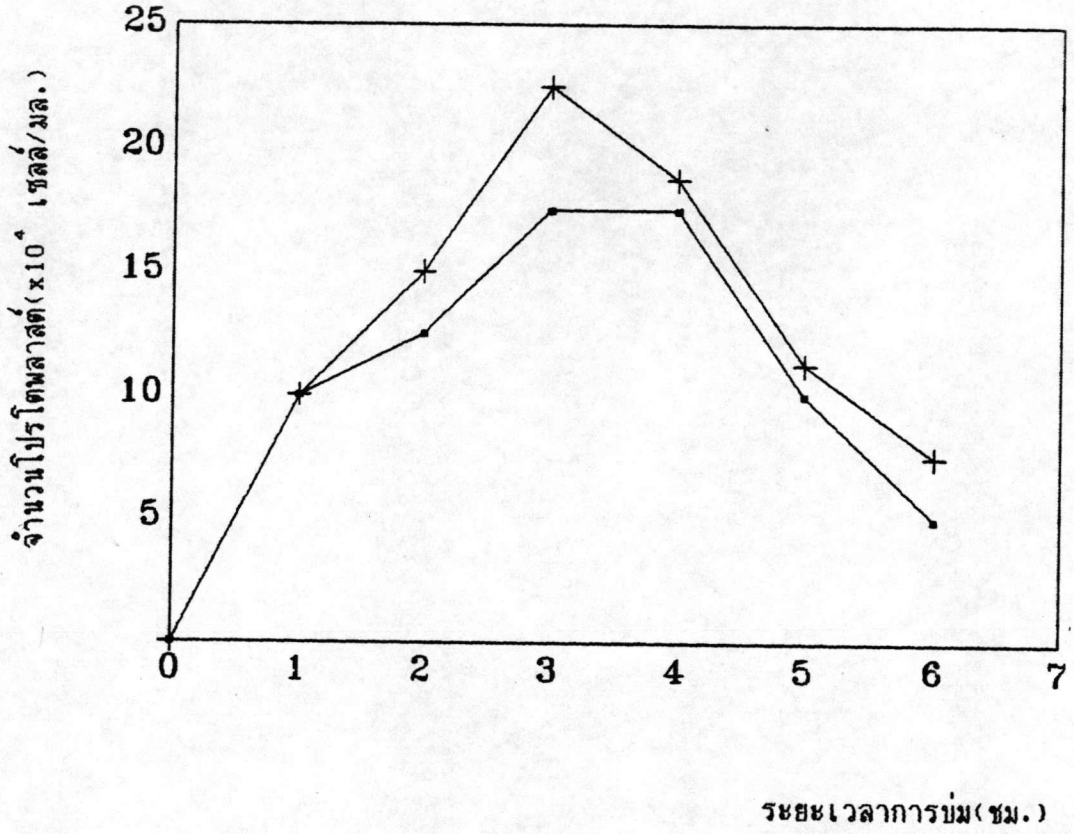
■ 2.0 มก/มล.

× 4.0 มก/มล.



รูปที่8 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน โดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ 4ชนิด

- โนโวไซม์ 20%
+ เบตา-กลูคูโรนิเดส 4 มก/มล.
* ไซโมไลเอส 4 มก/มล.
■ ไลซิงเอนไซม์ 4 มก/มล.



รูปที่9 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์และเซลลูเลส

▪ โนโวไซม์ 20%+เซลลูเลส 1 มก/มล.

\+ โนโวไซม์ 20%+เซลลูเลส 2 มก/มล.

จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากเอนไซม์ผสมระหว่าง เบตา-กลูคูโรนิเดส ความเข้มข้น 4 มก/มล.กับ เซลลูเลสแปรความเข้มข้น 1 และ 2 มก/มล. ปรากฏในรูปที่ 10 พบว่าการใช้เอนไซม์ผสมของ เบตา-กลูคูโรนิเดส 4 มก/มล. และ 2 มก/มล.ของเซลลูเลส บ่มสายใยในชม.ที่ 4 นับจำนวนได้สูงสุด $1.75x10^5$ เซลล์/มล. ต่อสายใย 500 มก. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hashiba and Yamada (1982) ที่พบว่า เซลลูเลส 'ONOZUKA' R-10 20 มก/มล. และเบตา-กลูคูโรนิเดส 0.06 มก/มล. สามารถทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ถึง $3x10^7$ เซลล์/กรัมของสายใย ในชม.ที่ 3 ของการบ่มสายใย *Rhizoctonia solani* ปริมาณ 1 กรัม

จากการทดลองใช้เอนไซม์ผสมของไซโมไลเอส และเซลลูเลสแสดงในรูปที่11 พบว่าเกิดโปรโตพลาสต์มากที่สุด $1.5x10^5$ เซลล์/มล. ที่ความเข้มข้นไซโมไลเอส 4 มก/มล. และเซลลูเลส 2 มก/มล. โปรโตพลาสต์จำนวนนี้มากกว่าการใช้เอนไซม์ไซโมไลเอสชนิดเดียวบ่มสายใยในภาวะเดียวกันซึ่งได้จำนวนโปรโตพลาสต์ ประมาณ $1.0x10^5$ เซลล์/มล.

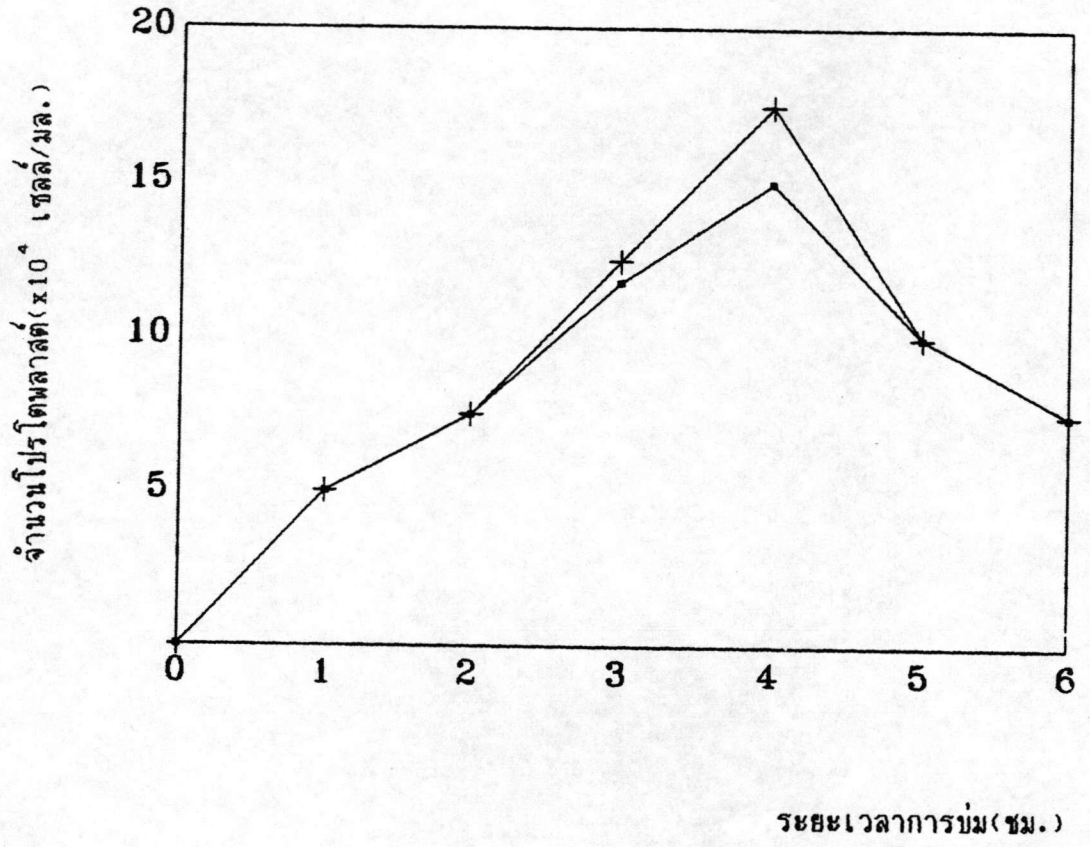
ผลการใช้เอนไซม์ผสมอีกคู่หนึ่งคือ ไลซิงเอนไซม์ 4 มก/มล. และแปรผันเซลลูเลส 1 และ 2 มก/มล. บ่มสายใยเห็ดโคน พบว่าการบ่มสายใยเห็ดโคนด้วยไลซิงเอนไซม์ 4 มก/มล. ผสมกับเซลลูเลส 2 มก/มล. นาน 4 ชม. เกิดโปรโตพลาสต์จำนวนมากสุดประมาณ $1.8x10^5$ เซลล์/มล. แสดงในรูปที่ 12 ซึ่งโปรโตพลาสต์จำนวนนี้มากกว่าจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากการใช้เอนไซม์ไลซิงเอนไซม์ชนิดเดียว 4 มก/มล. บ่มกับสายใยในภาวะเดียวกันประมาณ $1.2x10^5$ เซลล์/มล.

การใช้เอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์ 20% และเซลลูเลส 2 มก/มล.จะให้ผลสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 13 และนำเอนไซม์ผสมนี้มาทำการทดลองต่อไป

3.2 อุณหภูมิ

ผลของการเปรียบเทียบอุณหภูมิ ที่ใช้ในการบ่มต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ของสายใยเห็ดโคนอายุ 4 วัน ในอาหารเหลว น้ำหนัก 500 มก. ในสารละลายเอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์ 20% และเซลลูเลส 2 มก/มล. เป็นเวลา 6 ชม.ที่อุณหภูมิ 22 30 และ 40° ซ. ได้ผลดังนี้

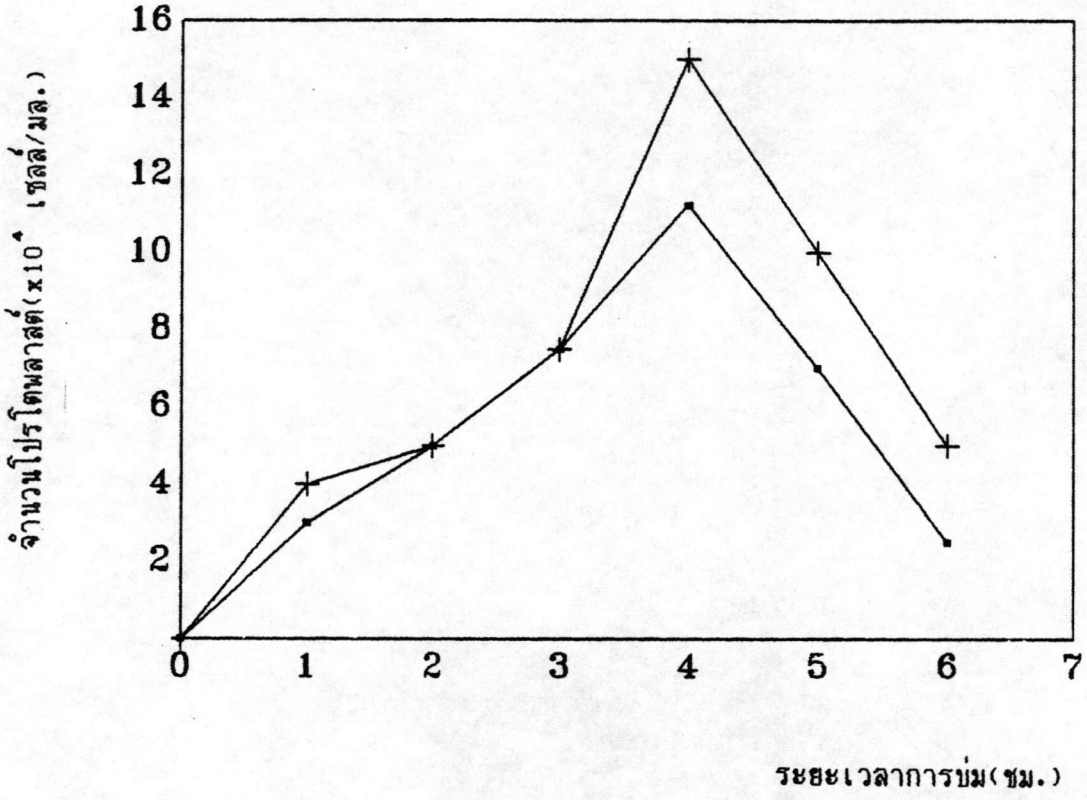
จากรูปที่ 14 ในชม. ที่ 3 ของการบ่ม พบว่าที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. นับจำนวนโปรโตพลาสต์ $2.25x10^5$ เซลล์/มล. ซึ่งมีจำนวนสูงกว่าการบ่มสายใยที่อุณหภูมิ 22 และ 40°ซ.เมื่อใช้ภาวะในการบ่มเดียวกัน



รูปที่10 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเบตา-กลูคูโรนิเดสและเซลลูเลส

▪ เบตา-กลูคูโรนิเดส 4 มก/มล.+เซลลูเลส 1มก/มล.

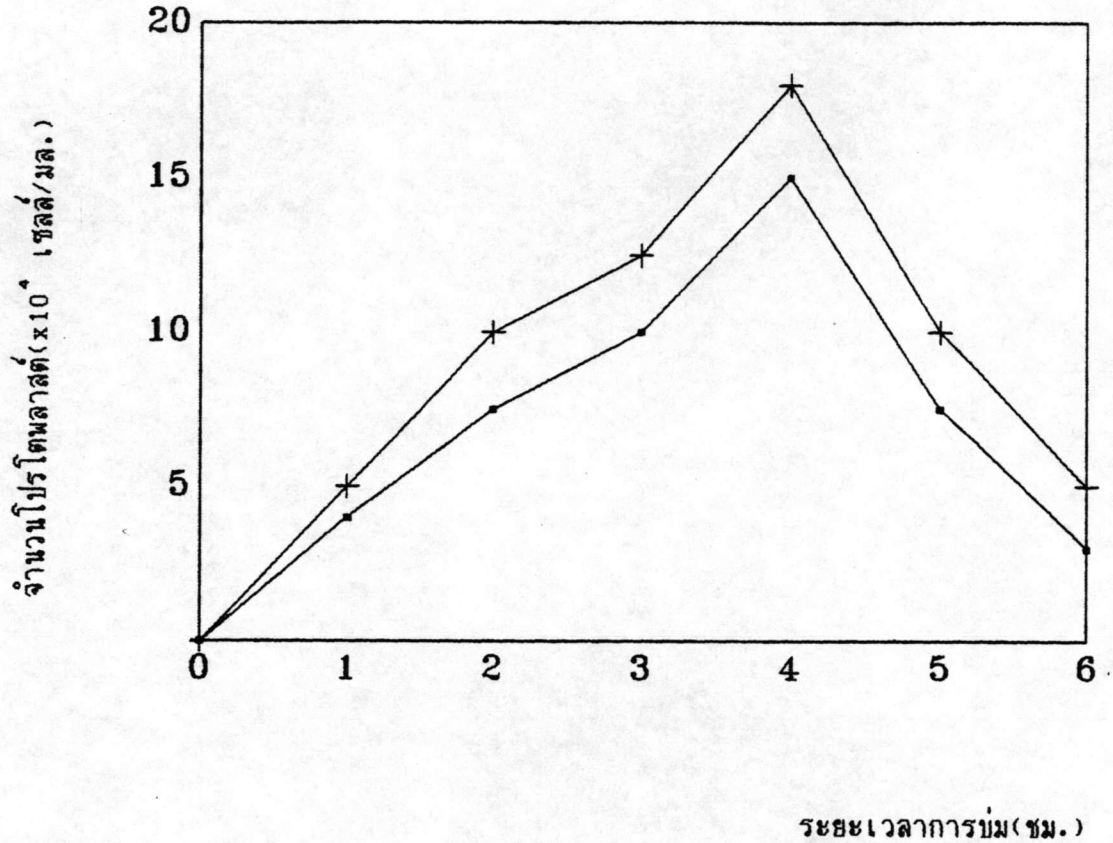
\+ เบตา-กลูคูโรนิเดส 4 มก/มล.+เซลลูเลส 2มก/มล.



รูปที่ 11 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างไซโมไลเอสและเซลลูเลส

▪ ไซโมไลเอส 4 มก/มล.+เซลลูเลส 1 มก/มล.

\+ ไซโมไลเอส 4 มก/มล.+เซลลูเลส 2 มก/มล.

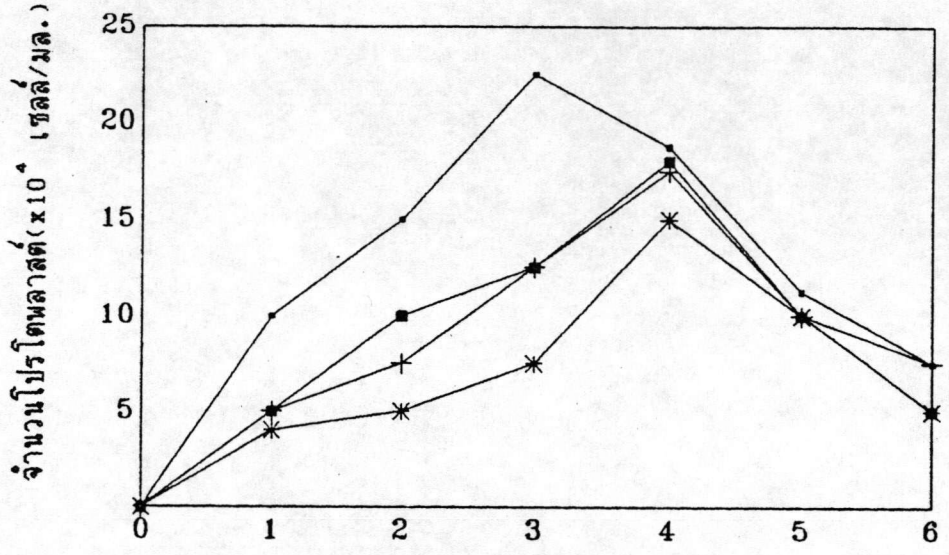


รูปที่12 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างไลซิ่งเอนไซม์และเซลลูเลส

▪ ไลซิงเอนไซม์ 4 มก/มล.+เซลลูเลส 1 มก/มล.

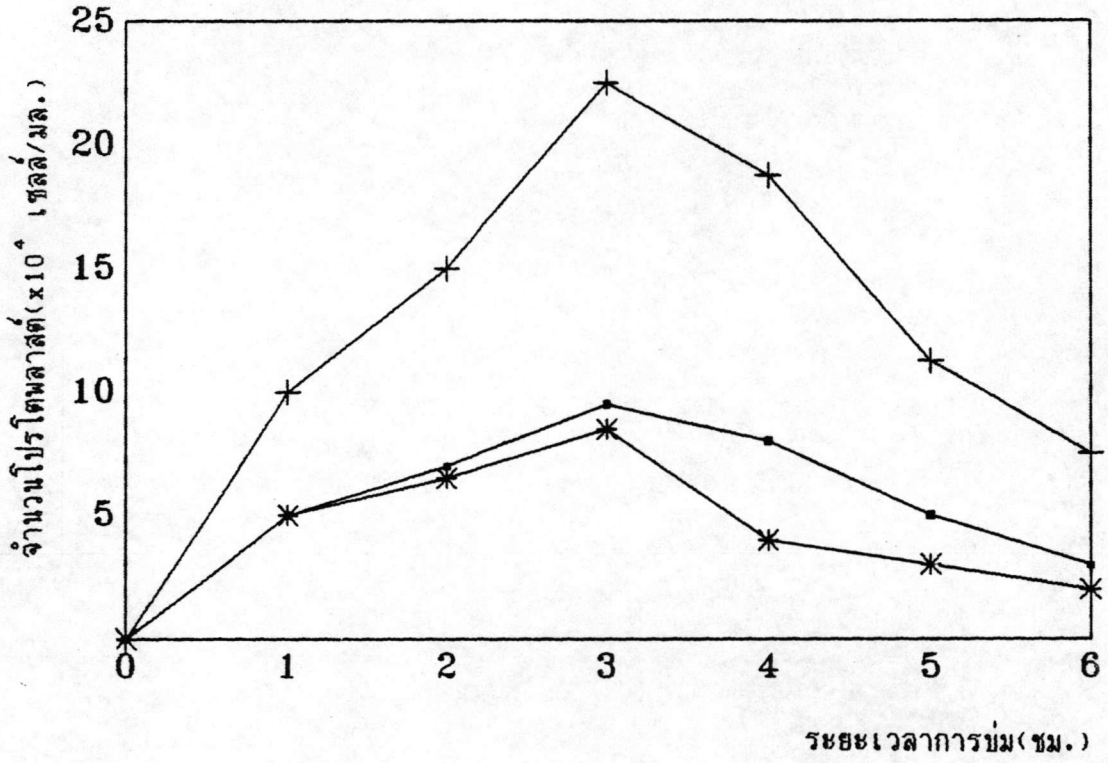
\+ ไลซิงเอนไซม์ 4 มก/มล.+เซลลูเลส 2 มก/มล.

I 18076919



รูปที่13 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน โดยใช้เอนไซม์ผสมชนิดต่างๆ

- ▪ โนโวไซม์ 20%+เซลลูเลส 2 มก/มล.
- \+ เบตา-กลูคูโรนิเดส 4 มก/มล.+เซลลูเลส 2 มก/มล.
- ✱ ไซโมไลเอส 4 มก/มล.+เซลลูเลส 2 มก/มล.
- ■ ไลซิงเอนไซม์ 4 มก/มล.+เซลลูเลส 2 มก/มล.



รูปที่14 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์ 20%และเซลลูเลส 2มก/มล.ที่อุณหภูมิ 22 30 และ 40°ซ.

\- 22 ° ซ.

\+ 30 ° ซ.

* 40 ° ซ.

3.3 ความเป็นกรดด่าง ต่อการเกิดโปรโตพลาสต์

ผลของความเป็นกรด ด่างต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ โดยใช้สารละลายเอนไซม์ผสมของโนโวไซม์ 20 % และเซลลูเลส 2 มก/มล. บ่มสายใยเห็ดโคนน้ำหนัก 500 มก. อายุ 4 วันนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นทุกชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชม. ได้แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ในรูปที่ 15 พบว่าที่ พีเอช 7.5 ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ได้ถึง $2.25x10^5$ เซลล์/มล.

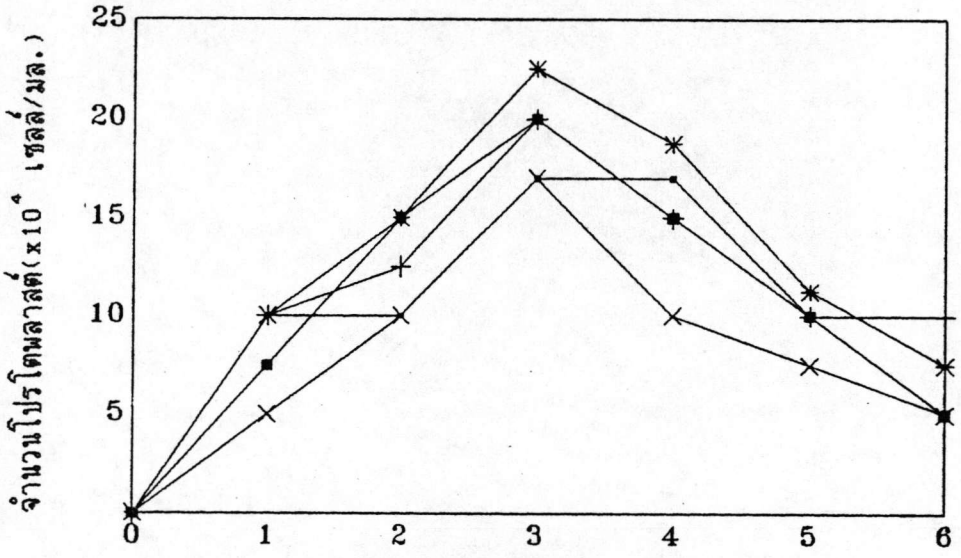
จากรายงานของ Hou and Jong (1985) ได้ทำการแปรผัน พีเอช ของบัฟเฟอร์ในช่วง 4-8 ของสารละลายเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์จาก *Trichoderma harzianum* บ่มกับสายใย 50-100 มก. สารละลายเอนไซม์ 1 มล. พบว่าในชม.ที่ 4 ของการบ่มสายใยที่ 30° ช. ที่พีเอช 6 เกิดโปรโตพลาสต์สูงสุดประมาณ $5x10^6$ เซลล์/มล.

3.4 ออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์

ผลของออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ที่ใช้ 2 ชนิด เปรียบเทียบกันโดยเลือก 0.6 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ (Tseuboi,1985) และ 0.8 โมลาร์ซอร์บิทอล (Peberdy,1980) ต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ ได้แสดงในรูปที่ 16 จำนวนโปรโตพลาสต์จากการใช้โปแตสเซียมคลอไรด์ $2.25x10^5$ เซลล์/มล. จากน้ำหนักเปียกของสายใย 500 มก. จะมากกว่าการใช้ซอร์บิทอล เมื่อบ่มสายใยอายุ 4 วัน นาน 3 ชม.ในเอนไซม์ผสมของโนโวไซม์ 20 % กับเซลลูเลส 2 มก/มล. พีเอช 7.5 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Santigo (1982)ที่เตรียมโปรโตพลาสต์จากสายใยเห็ดฟาง โดยใช้ออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์หลายชนิดที่มีความเข้มข้นต่างๆละลายในเอนไซม์ที่สกัดจาก *Trichoderma harrianum* พบว่า 0.6โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ $4x10^6$ เซลล์/มล. และ ในซอร์บิทอล 0.8 โมลาร์ ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ $2.8x10^6$ เซลล์/มล. ซึ่งน้อยกว่าการใช้โปรแตสเซียมคลอไรด์ $1.2x10^6$ เซลล์/มล. เมื่อบ่มนาน 4 ชม. ที่อุณหภูมิ 28° ช.

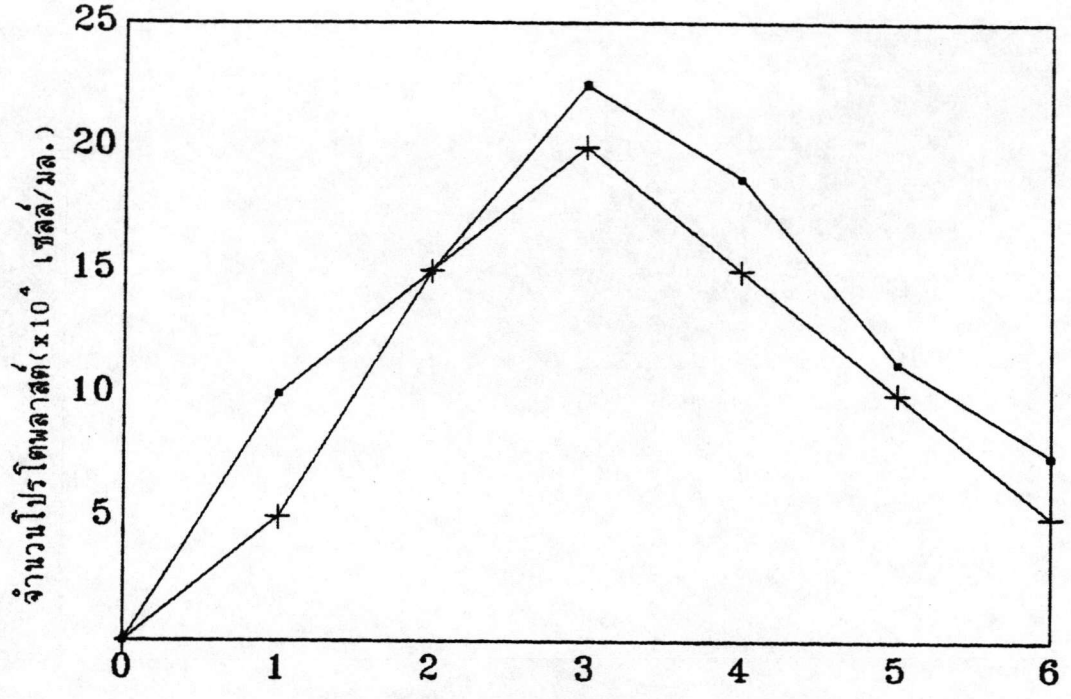
3.5 ระยะเวลาการบ่มสายใยด้วยเอนไซม์

จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจาก การใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองคือ การใช้เอนไซม์ผสมระหว่าง 20 % โนโวไซม์ผสมกับเซลลูเลส 2 มก/มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30° ช.พีเอช



รูปที่15 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์ 20% และเซลลูเลส 2 มก/มล. ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. โดยแปรพีเอชช่วง 7-8

- พีเอช 7.0
- พีเอช 7.25
- พีเอช 7.5
- พีเอช 7.75
- พีเอช 8.0



รูปที่16 เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากการใช้ออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ 2 ชนิดผสมในเอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์ 20%และเซลลูเลส 2 มก/มล.บ่มสายใยเห็ดโคนที่อุณหภูมิ 30°ซ.

▪ 0.6 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์

\+ 0.8 โมลาร์ซอร์บิทอล

7.5 และใช้ 0.6 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์เป็นออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ บ่มสายใยเห็ดโคนน้ำหนัก 500 มก. อายุ 4 วัน ในเวลาต่างๆคือ 1 2 3 4 5 6 8 และ 10 ชม. แสดงผลในรูปที่ 17 พบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 2.25×10^5 เซลล์/มล. เกิดในชม.ที่ 3 ของการบ่มและหลัง จากนั้นจำนวนโปรโตพลาสต์จะลดลง ในชม.ที่ 10 จะพบโปรโตพลาสต์เพียง 1.5×10^4 เซลล์/มล. ที่เป็นเช่นนี้อาจอธิบายได้ว่าเป็นเพราะโปรโตพลาสต์จะมีการสร้างและปล่อยเอนไซม์ออกมา องค์ประกอบของสารบางตัวในเอนไซม์ มีผลทำให้โปรโตพลาสต์แตกได้ (Kuo and Lampen,1971)

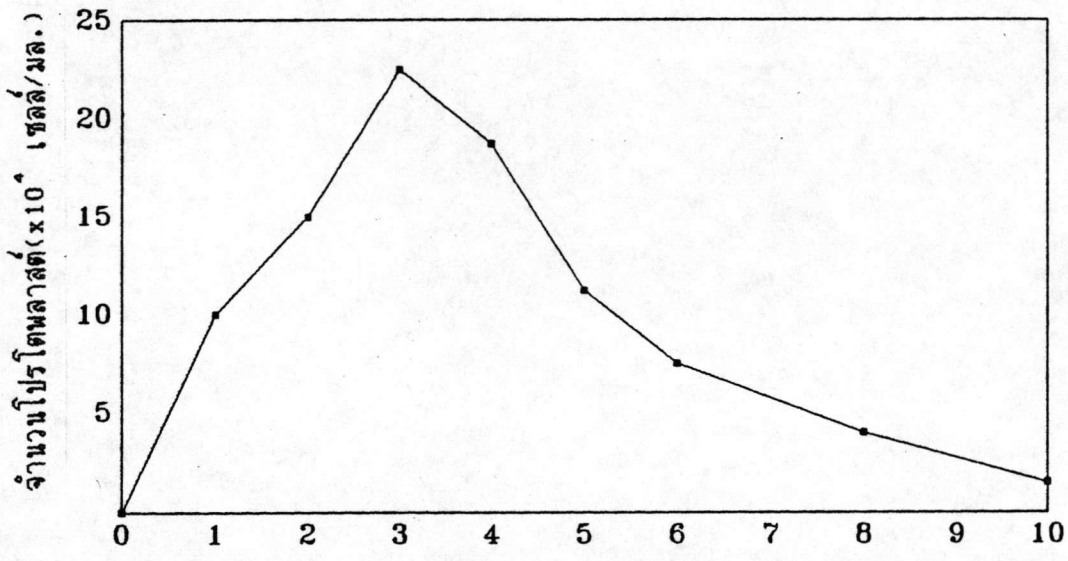
4.การคืนกลับสู่สภาพเซลล์

4.1เปอร์เซ็นต์การคืนกลับเซลล์ของโปรโตพลาสต์เห็ดโคน

เปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับของโปรโตพลาสต์ เป็นเซลล์ปกติโดยสังเกตุจากโคโลนีที่เกิดบนอาหารชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 1

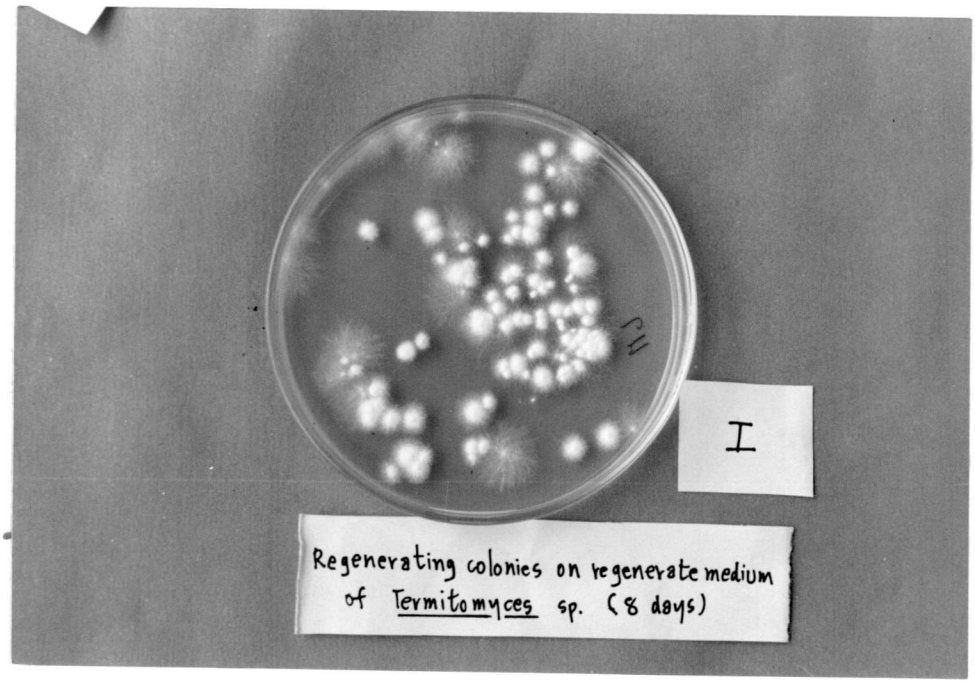
ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์เห็ดโคนบนอาหาร 3ชนิด

ชนิดของอาหาร	ชนิดของออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์	เปอร์เซ็นต์การกลับเป็นเซลล์	ระยะเวลาการกลับเป็นเซลล์(วัน)
สูตร 1 (สูตร3 ภาคผนวก1.1)	1 โมลาร์ซอร์บิทอล	0.53	5
สูตร 2 (สูตร4 ภาคผนวก1.1)	0.5 โมลาร์โปรแตสเซียมคลอไรด์	0.17	5
สูตร 3 (สูตร5 ภาคผนวก1.1)	-	0.4	3

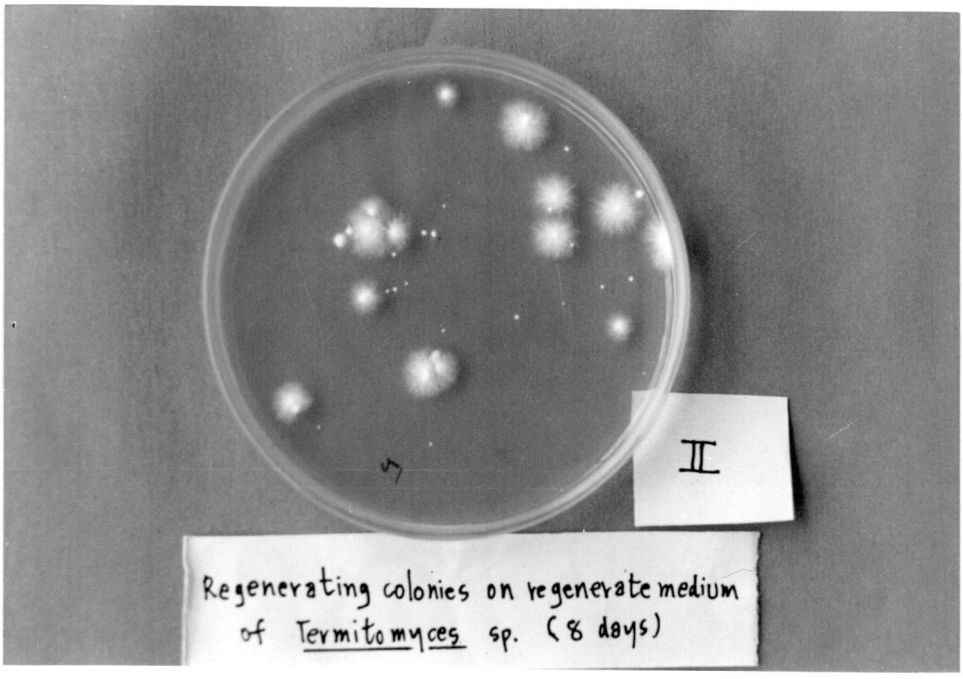


รูปที่17 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นในระยะต่างๆของการบ่มสายใยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์ 20%และเซลลูเลส 2 มก/มล. นีเอช 7.5 และมี 0.6 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์เป็นออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ.

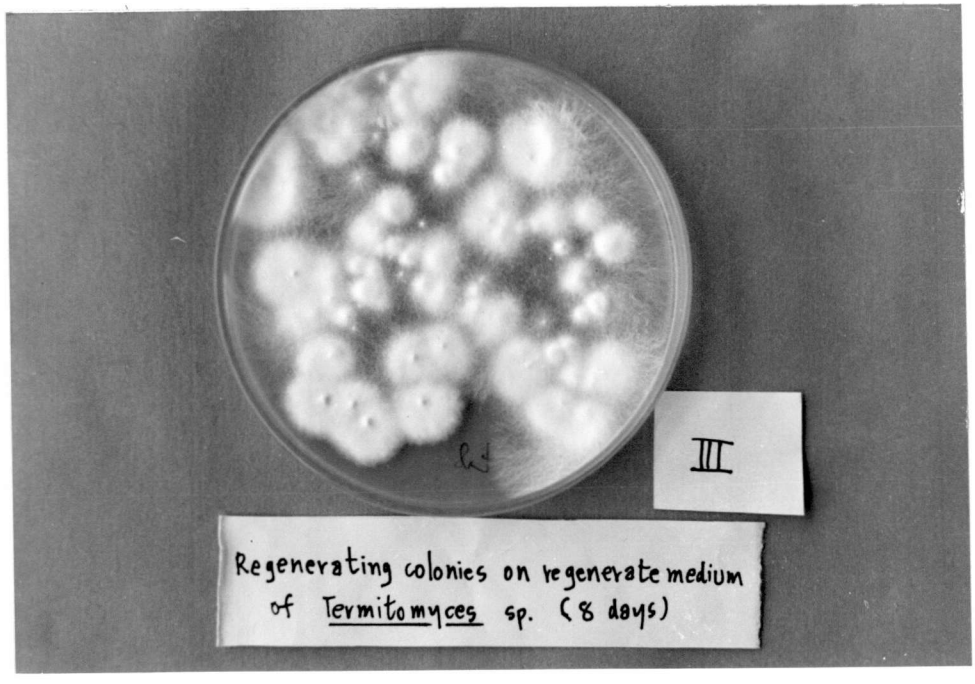
จากตารางที่ 1 พบว่าอาหารแข็งสูตร 1 นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นและคำนวณการคืนกลับเป็นเซลล์ได้ร้อยละ 0.53 (ลักษณะโคโลนีดังรูปที่ 18 ก) รองลงมาคือ อาหารแข็งสูตร 3 การคืนกลับเป็นเซลล์ร้อยละ 0.4 (ลักษณะโคโลนี ดังรูปที่ 18 ค) และอาหารแข็งสูตร 2 การคืนกลับเป็นเซลล์ร้อยละ 0.17 (ลักษณะโคโลนี ดังรูปที่ 18ข) องค์ประกอบของอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ มีผลต่อการคืนกลับเป็นเซลล์ ได้มีรายงานของ Das et al.(1988)ที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้คือ การคืนกลับเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์ *Aspergillus niger* บนอาหารชักนำการสร้างเซลล์ (Regenerating medium) ที่เติมออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ชนิดต่างๆ โดยอาหารที่ใช้ในการคืนกลับของเซลล์ที่เติม 0.6 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ ร้อยละของการคืนกลับเป็นเซลล์จะต่ำกว่า 1%



รูปที่ 18 ก แสดงลักษณะโคโลนีของเซลล์โปรโตพลาสต์เห็ดโคน อายุ 8 วัน บนอาหารแข็ง (Regenerating medium) สูตร 1



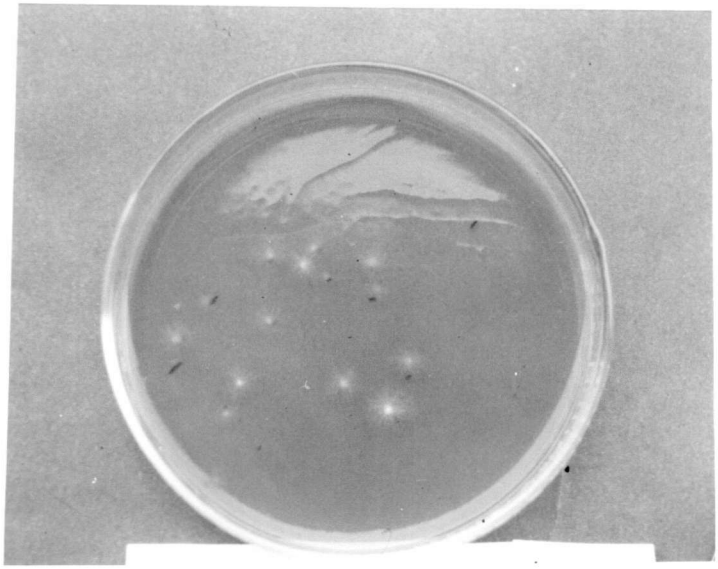
รูปที่ 18ข แสดงลักษณะโคโลนีของเซลล์โปรโตพลาสต์เห็ดโคน อายุ 8 วัน บนอาหารแข็ง สูตร2



รูปที่ 18 ค แสดงลักษณะโคโลนีของเซลล์โปรโตพลาสต์เห็ดโคน อายุ 8 วัน บนอาหารแข็ง สูตร 3

4.2เปอร์เซ็นต์การคืนกลับเป็นเซลล์โปรโตพลาสต์ของเห็ดฟาง

จำนวนโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟางที่เกิดจากการบ่มสายใยเห็ดฟาง 0.12 กรัม/มล. ด้วยเอนไซม์ผสมของไซโมไลเอส 0.2 มก/มล. และเซลลูเลส (Sigma) 2 มก/มล. บ่มเป็นเวลา 4 ชม. ที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. นับจำนวนโปรโตพลาสต์ได้ $2x10^4$ เซลล์/มล. และนำโปรโตพลาสต์มาเลี้ยงให้คืนกลับเป็นเซลล์บนอาหารแข็งสูตร 3 ลักษณะโคโลนี แสดงดังรูปที่ 19 คำนวณเปอร์เซ็นต์การกลับเป็นเซลล์ได้ 0.17 ซึ่งผลการทดลองนี้ได้ผลต่างไปจากงานวิจัยของวีรวัฒน์ และสุมาลี (2534) การเตรียมโปรโตพลาสต์จากสายใยเห็ดฟางอายุ 4 วัน น้ำหนัก 0.2 มก/มล. โดยใช้เอนไซม์ผสมของ 0.2 มก/มล.ของ ไซโมไลเอส และ 2 % เซลลูเลส (Novo)นับจำนวนโปรโตพลาสต์ได้ $7.5x10^4$ เซลล์/มล.การคืนกลับเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์เห็ดฟางบนอาหารแข็งสูตร 3 คิดเป็นร้อยละ 3.1



รูปที่ 19 แสดงลักษณะโคโลนีของเซลล์โปรโตพลาสต์เห็ดฟาง บนอาหารแข็ง สูตร 3

5.การรวมโปรโตพลาสต์

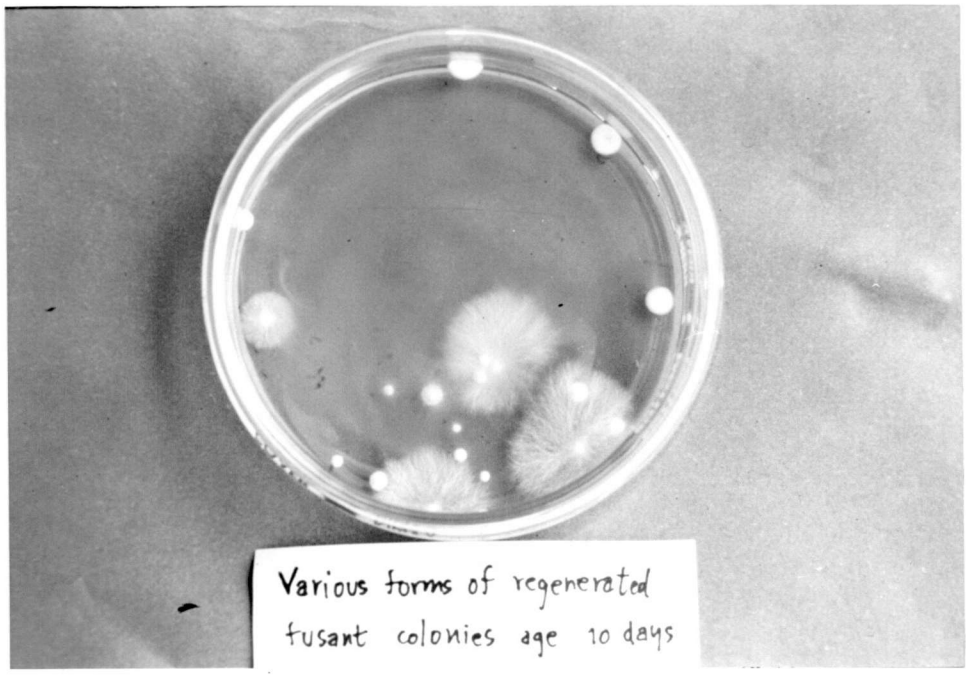
หลังจากการรวมโปรโตพลาสต์ใน PEG แล้วคำนวณการคืนกลับของฟิวแสนท์

5.1 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับเซลล์ของโปรโตพลาสต์

หลังจากรวมใน PEG และเลี้ยงให้โปรโตพลาสต์คืนกลับเป็นเซลล์บนอาหารแข็งสูตรต่างๆ 3 ชนิด ได้นับจำนวนและคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเซลล์ ดังแสดงในตาราง 2

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่รวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ของเห็ดโคนและเห็ดฟางบนอาหารแข็ง 3 ชนิด

อาหารแข็งสูตรต่างๆ	เปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับเป็นเซลล์	ระยะเวลาการคืนกลับเป็นเซลล์ (วัน)
สูตร 1	0.0046	7
สูตร 2	0.0028	7
สูตร 3	0.0033	5



รูปที่ 20 แสดงลักษณะต่างๆของโคโลนีฟิวแสนท์อายุ 10 วัน บนอาหารแข็ง

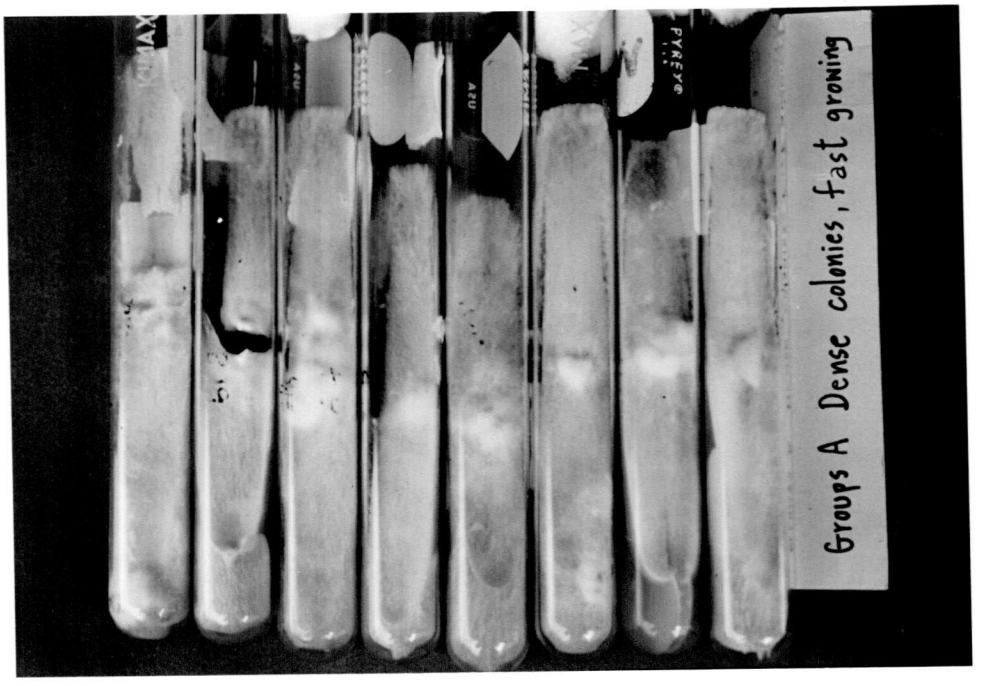
จากรายงานการรวมโปรโตพลาสต์ของราต่างชนิด (Interspecific fusion) ของ Anne (1976) ระหว่างออกโซโทรปมิวแตนท์ของ *Penicillium chrysogenum* ที่มีตำหนิที่ lys$^-$ pro$^-$ / arg$^-$ กับ *P. notatum* cys$^-$ พบว่าการคืนกลับเป็นเซลล์ของฟิวแสนท์ประมาณ 0.18 % ซึ่งพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเป็นเซลล์สูงกว่าการคืนกลับเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์รวมของเห็ดโคนและเห็ดฟาง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ การรวมโปรโตพลาสต์แบบนี้มีความคงตัวกว่าการรวมโปรโตพลาสต์แบบ Intergeneric fusion เนื่องจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ต้นแบบมีน้อยกว่า

6. การตรวจสอบสมบัติของฟิวแสนท์

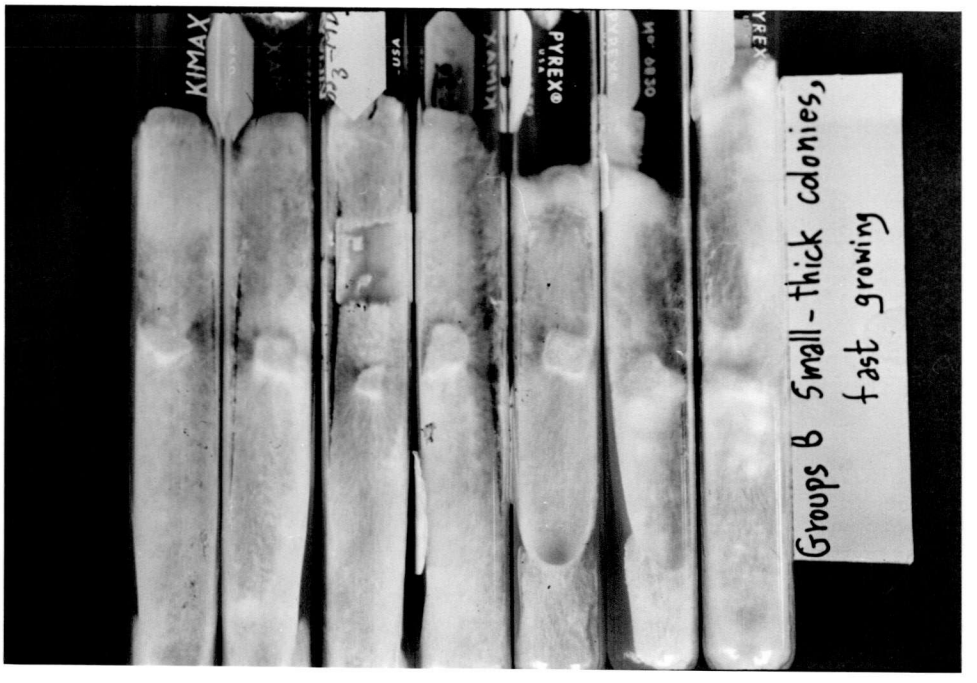
ได้เก็บโคโลนีของฟิวแสนท์อายุ 10 วันซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 20 จำนวน 150 โคโลนี โดยเก็บตามลักษณะดังแสดงในวิธีการทดลอง แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารแข็งพี ดี เอ ปล่อยให้

เจริญในหลอดทดลอง คัดเลือกสายพันธุ์ที่เจริญได้ 52 โคโลนี ลักษณะโคโลนีของนิวแสนท์ในกลุ่มที่ 1 ที่เจริญได้ช้า(B) ดังรูปที่ 21ก และลักษณะโคโลนีที่เจริญปกติ (A) ดังรูปที่ 21ข นิวแสนท์ในกลุ่ม 2 มีลักษณะโคโลนี ดังในรูปที่ 21ค กลุ่ม 3 ลักษณะโคโลนีแสดงในรูปที่ 21ง หาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด เทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

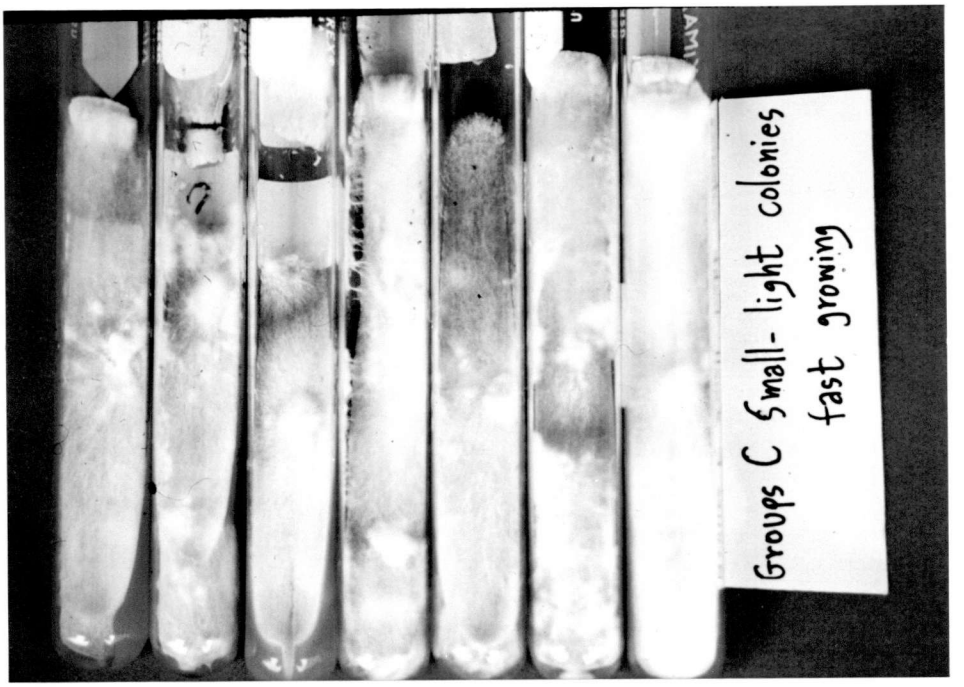
รูปที่ 21ก ลักษณะโคโลนีของนิวแสนท์ในกลุ่มที่ 1 ที่เจริญช้า(B) บนพีดีเอ



รูปที่ 21 ข ลักษณะโคโลนีของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 1 เจริญปกติ (A) บนพีดีเอ



รูปที่ 21 ค ลักษณะโคโลนีของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 2 บนพีดีเอ



รูปที่ 21 ง ลักษณะโคโลนีของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 3 บนนีดีเอ

6.1 <u>การหาปริมาณดีเอนเอทั้งหมดของฟิวแสนท์เทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่</u>

จากฟิวแสนท์ที่เก็บได้จำแนกเป็น 3 กลุ่ม ได้นำแต่ละกลุ่มมาหาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด โดยวิธีการสกัดดีเอนเอได้จาก Schneider (1945,1946) และหาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด (Burton,1956) แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในสายใย (มก/กรัม) ของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 1 2 3 และสายพันธุ์ต้นแบบ

สายพันธุ์ต้นแบบ	ปริมาณดีเอนเอทั้งหมด	ฟิวแสนท์กลุ่ม 1	ปริมาณดีเอนเอทั้งหมด	ฟิวแสนท์กลุ่ม 2	ปริมาณดีเอนเอทั้งหมด	ฟิวแสนท์กลุ่ม 3	ปริมาณดีเอนเอทั้งหมด
V	0.014	a1	0.102	B1	0.025	C1	0.047
T3	0.0305	a2	0.147	B2	0.085	C3	0.052
		a5	0.117	B3	0.08	C6	0.057
		a8	0.086	B4	0.055	C7	0.013
		a10	0.060	B5	0.035	C10	0.037
		a14	0.085	B7	0.057	C12	0.043
		a18	0.075	B8	0.045	C13	0.057
		a21	0.051	B9	0.030	C19	0.039
		A2	0.113	B10	0.067	C30	0.055
		A3	0.09	B11	0.050	C31	0.044
		A4	0.051	B12	0.060	C41	0.035
		A7	0.069	B13	0.075	C42	0.025
		A11	0.053	B14	0.065	C46	0.022
		A12	0.05	B15	0.087	C48	0.025
		A15	0.052	B16	0.058	C49	0.035
		A16	0.067	B17	0.085		
		A20	0.05				
		A27	0.051				
		A28	0.063				
		A29	0.057				
		A30	0.065				

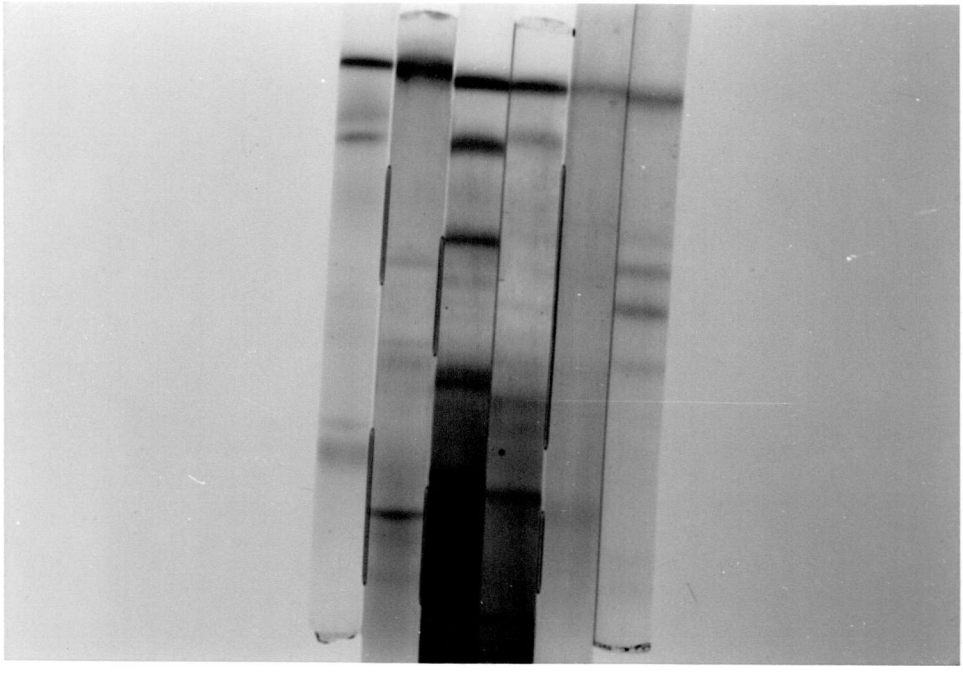
จากตารางที่ 3 ปริมาณดีเอนเอทั้งหมดของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 1 พบว่าค่าดีเอนเอทั้งหมด จะมากกว่าสายพันธุ์ต้นแบบ V T_3 ฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 1 ปริมาณดีเอนเอทั้งหมด บางตัวมีค่าเป็น 2 หรือ 3 เท่าของสายพันธุ์ต้นแบบ คิดเป็น 4n และ 6n ตามลำดับ ฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 2 บางตัวมีค่าดีเอนเอทั้งหมดเป็น 2 เท่าของสายพันธุ์ต้นแบบ และบางตัวมีปริมาณดีเอนเอใกล้เคียงกับสายพันธุ์ต้นแบบ ส่วนฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 3 ปริมาณดีเอนเอทั้งหมดใกล้เคียงกับสายพันธุ์ต้นแบบ(ภาคผนวก 3)

นำผลของปริมาณดีเอนเอแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับมัชฌิมเลขคณิตของฟิวแสนท์ในแต่ละกลุ่ม โดยใช้การแจกแจงแบบStudent-t distribution ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % พบว่าฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % มีค่ามัชฌิมเลขคณิตเป็น 0.073 และ 0.058 ส่วนฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 3 มีค่ามัชฌิมเลขคณิตเป็น 0.038 ซึ่งต่ำกว่าขอบเขตของการยอมรับ(ภาคผนวก 4)

จากรายงานเกี่ยวกับ ปริมาณดีเอนเอทั้งหมดของฟิวแสนท์ ที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟางสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งทำการวิจัยโดยวีรวัฒน์ และสุมาลี (2534) พบว่าฟิวแสนท์จะมีปริมาณดีเอนเอทั้งหมดมากเป็ น 2 -3 เท่าของสายพันธุ์ต้นแบบ พบว่าจะสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัย

6.2การหารูปแบบของโปรตีนด้วยดีสท์เจลอิเลคโตรโฟรีสิส

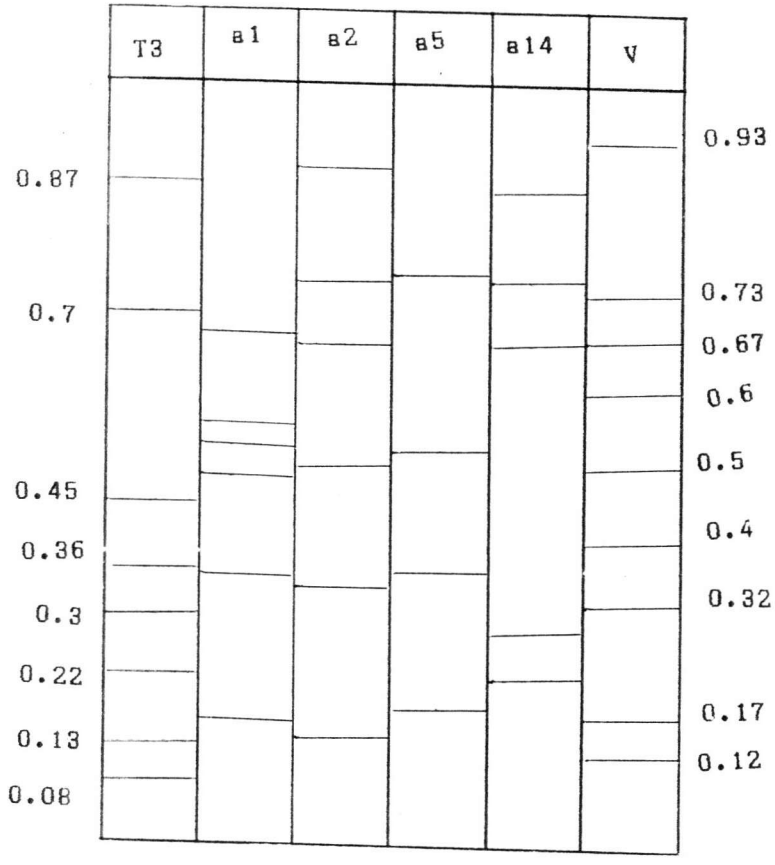
จากการสกัดโปรตีนของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ และหารูปแบบของโปรตีนทั้งหมดด้วยดีสท์เจลอิเลคโตรโฟรีสิสปรากฏดังรูปเหล่านี้คือ รูปที่ 22 และ 22ก แสดงแถบโปรตีนและรูปอธิบายของฟิวแสนท์ในกลุ่ม1 (B) โคโลนีเจริญช้า รูปที่ 23 และ 23ก แสดงแถบโปรตีนและรูปอธิบายของฟิวแสนท์ในกลุ่ม 1 (A) โคโลนีเจริญปกติ รูปที่ 24 และ 24 ก แสดงแถบโปรตีนและรูปอธิบายของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 2 รูปที่ 25 และ 25ก แสดงแถบโปรตีนและรูปอธิบายของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่3



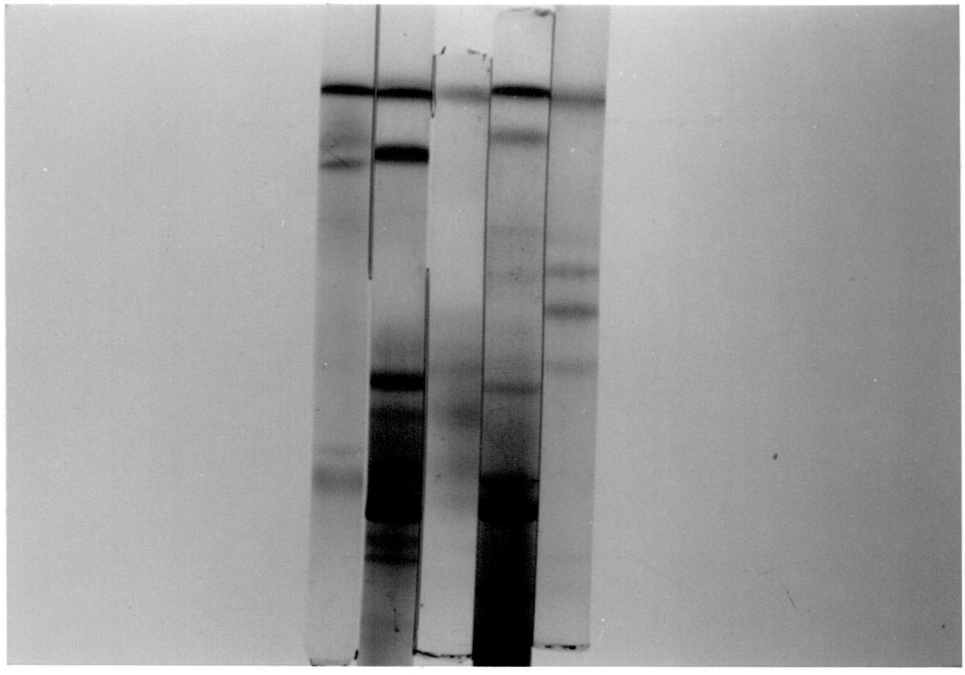
1 2 3 4 5 6

รูปที่22 แสดงแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแท่งเจล ของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 1 (a) เทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

เจลแท่งที่1 โปรตีนของสายพันธุ์ T3
2 โปรตีนของสายพันธุ์ a1
3 โปรตีนของสายพันธุ์ a2
4 โปรตีนของสายพันธุ์ a5
5 โปรตีนของสายพันธุ์ a14
6 โปรตีนของสายพันธุ์ V



รูปที่ 22 ก ภาพอธิบายแถบโปรตีนที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T3 a1 a2 a5 a14 V บนแท่งเจล



1 2 3 4 5

รูปที่ 23 แสดงแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแท่งเจล ของฝิวแสนท์ในกลุ่มที่1 (A) เทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

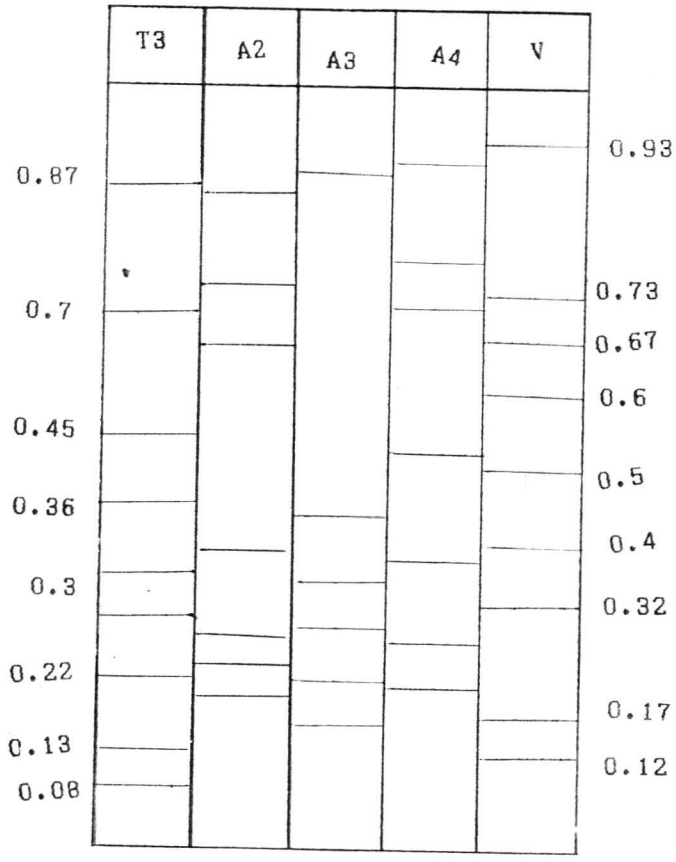
เจลแท่งที่ 1 โปรตีนของ T3

2 โปรตีนของ A2

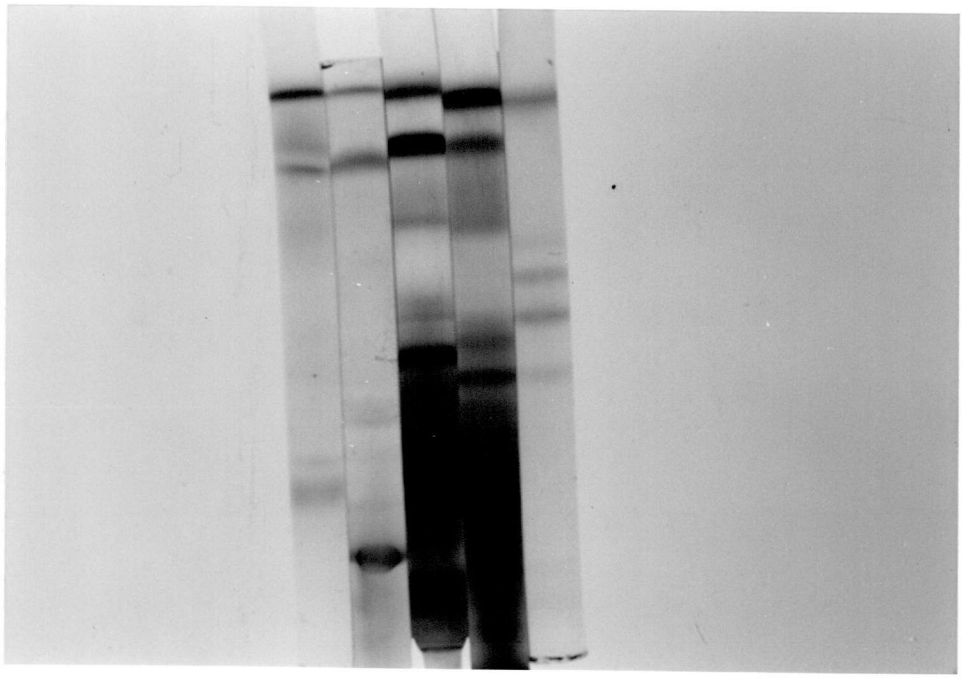
3 โปรตีนของ A3

4 โปรตีนของ A4

5 โปรตีนของ V



รูปที่ 23ก ภาพรวมอธิบายแถบโปรตีนที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T3 A2 A3 A4 V บนแท่งเจล



1 2 3 4 5

รูปที่ 24 แสดงแถบโปรตีนที่เกิดบนแท่งเจลของสายพันธุ์ผิวแสนท์ในกลุ่มที่2 เทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

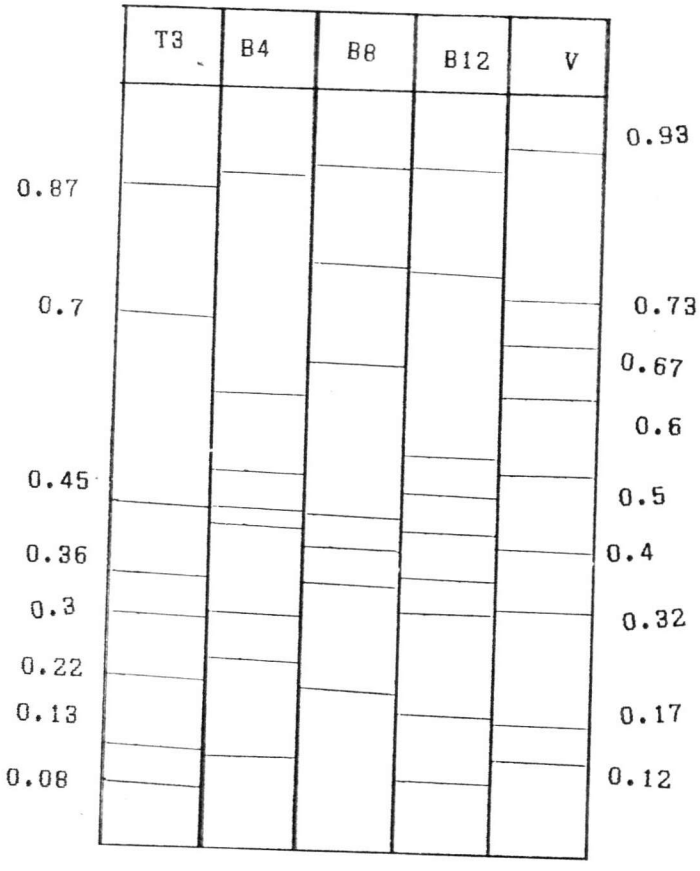
เจลแท่งที่ 1 โปรตีนของ T3

2 โปรตีนของ B4

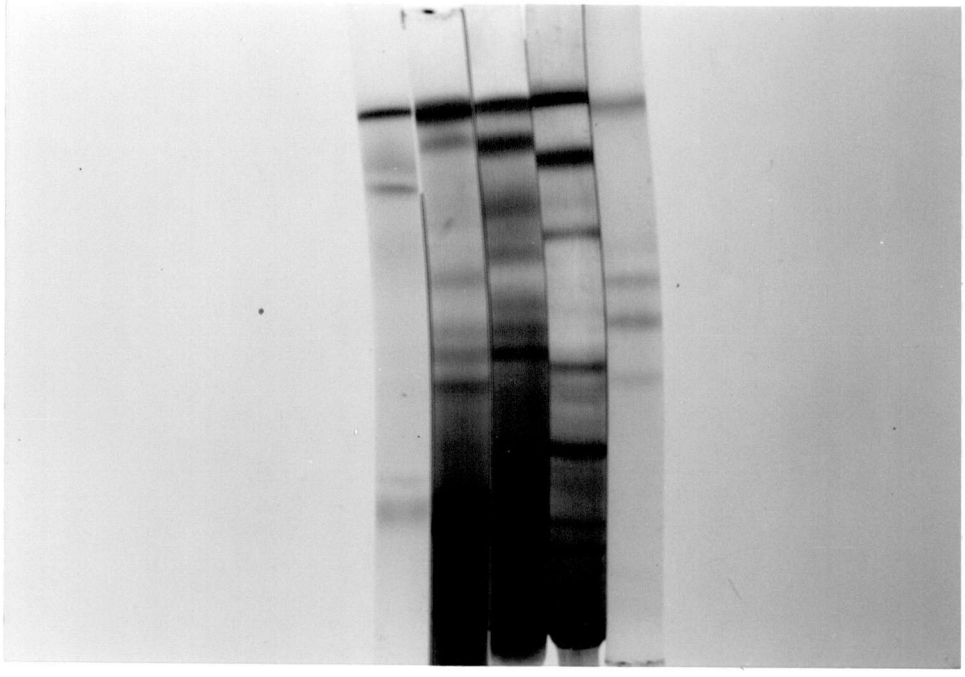
3 โปรตีนของ B8

4 โปรตีนของ B12

5 โปรตีนของ V



รูปที่ 24 ก ภาพรวมอธิบายแถบโปรตีนที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T3 B4 B8 B12 V บนแท่งเจล



1 2 3 4 5

รูปที่ 25 แสดงแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นบนแท่งเจลของสายพันธุ์ผิวแสนท์ในกลุ่ม 3 เทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

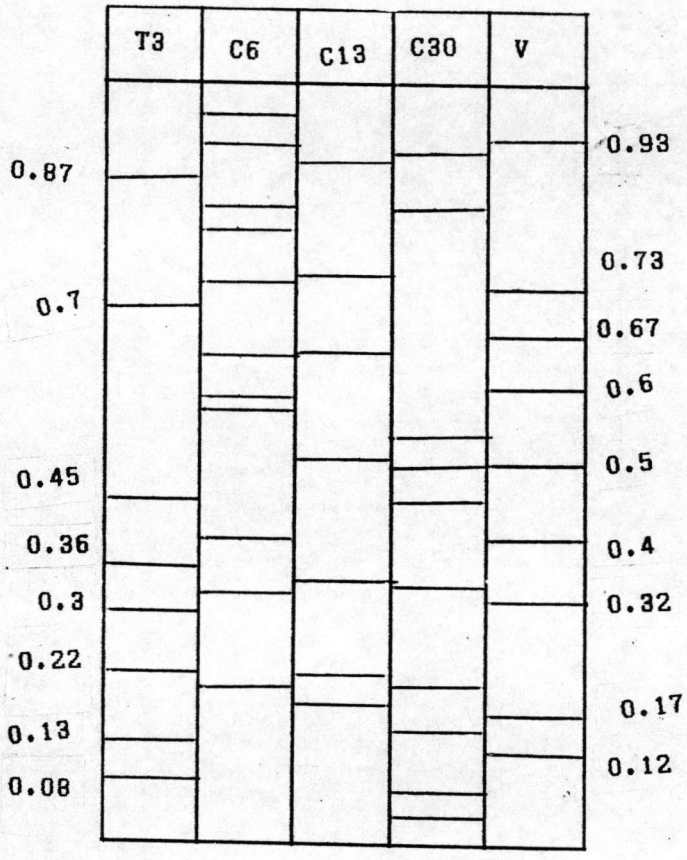
เจลแท่งที่1 โปรตีนของ T3

2 โปรตีนของ C6

3 โปรตีนของ C13

4 โปรตีนของ C30

5 โปรตีนของ V



รูปที่ 25 ก ภาพรวมอธิบายแถบโปรตีนที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T3 C6 C13 C30 V บนแท่งเจล

ตารางที่ 4 แสดงค่า Rf จากแถบโปรตีนของเจลอิเลคโตรโฟริสิส

V	T3	α2	α1	α5	α14	A2	A3	A4	B4	B8	B12	C6	C13	C30
														.04
	.08										.09			.07
.12	.13	.14							.12					.15
.17			.16	.18		.20	.16				.18		.18	
	.22				.22	.24	.22	.21	.25	.21		.2	.22	.21
	.3				.28	.28	.29	.27	.31		.31			
.32												.32		
	.36	.34	.35	.36			.35			.35	.36		.34	.34
.4								.38	.43	.4	.42	.39		
	.45		.48				.44		.45	.44	.47			.45
.5		.5	.52	.52				.52	.5		.52		.5	.5
			.55									.56		.54
.6									.6			.58		
.67		.66	.67		.66	.66				.64		.63	.64	
	.7							.71						
.73		.74		.75	.74	.74						.73	.74	
								.77		.77	.76	.8		
	.87	.89			.86	.86	.89		.89			.83	.89	.84
								.90		.90	.90	.91		.91
.93												.95		

จากตารางที่ 4 และ รูปที่ 22-25 พบว่าสายพันธุ์ต้นแบบทั้ง V และT3 ปรากฏแถบโปรตีนจำนวน 9 และ 8 แถบตามลำดับ ส่วนในลูกผสมกลุ่มต่างๆพบว่า

ฟิวแสนท์ในกลุ่ม 1 คือ a1 a2 a5 a14 A2 A3 A4 พบแถบโปรตีน 6 6 4 5 6 6 และ7 ตามลำดับ ฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 2 คือ B4 B8 B12 พบแถบโปรตีน 8 7 และ 9 ตามลำดับ ส่วนในฟิวแสนท์กลุ่มที่ 3 คือ C6 C13 C30 พบแถบโปรตีน 11 7 และ 10ตามลำดับ

ตำแหน่งแถบของโปรตีนที่ปรากฏในฟิวแสนท์เหล่านี้ พบว่า ส่วนใหญ่มีค่า Rfใกล้เคียงกับสายพันธุ์ต้นแบบ บางแถบมีค่า Rfต่างไปจากสายพันธุ์ต้นแบบคือ a1 ที่ตำแหน่ง 0.55 ฟิวแสนท์กลุ่ม 2 B8 ค่า Rf ที่ตำแหน่ง 0.77 และ 0.9 ส่วนใน B12 Rf ที่ตำแหน่ง 0.76 และ 0.9 ฟิวแสนท์กลุ่มที่3 C6 ค่าRf ในตำแหน่งที่ 0.55 0.8 และ 0.9 C30 ค่า Rf ตำแหน่งที่ 0.04 0.54 0.913

การที่ฟิวแสนท์มีตำแหน่งของโปรตีนต่างจากสายพันธุ์ต้นแบบเป็นเพราะเกิดกระบวนการ Miotic crossing-over ขึ้นในวงชีวิตของสายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ได้มีรายงานการหาแถบของเอนไซม์ แลคเคส (Laccase) ของ *Plurotus ostreatus*โดย Prillinger and Molitoris (1979) เปรียบเทียบระหว่าง *P. ostreatus* 2 สายพันธุ์ และฟิวแสนท์ พบว่าฟิวแสนท์ 6 สายพันธุ์มีแถบเอนไซม์ตำแหน่งเดียวกับสายพันธุ์ต้นแบบ ฟิวแสนท์ 1 ตัวมีแถบที่ตำแหน่งเดียวกับทั้งในสายพันธุ์ต้นแบบทั้ง2 และฟิวแสนท์อีก 1 ตัว จะเห็นมีเพียงแถบบางๆเท่านั้น ซึ่งจากงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับผลการทดลองหาค่า Rf จากตำแหน่งของแถบโปรตีนในเจลอิเลคโตรโฟริสิส