บทที่ 1

บทนำ

เห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) เป็นเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติ ได้มีการเพาะเลี้ยงสายใยเห็ดนี้ได้ แต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้ออกดอกในห้องปฏิบัติการได้ ในธรรมชาติเห็ดโคนส่วนใหญ่ จะออกดอกระหว่างเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม เห็ดโคนเป็นเห็ดที่มีกลิ่นหอมรสอร่อยและมีราคาแพง (ดีพร้อม,2519) Heim (1977) ได้รายงานไว้ว่าเห็ดโคนมีความสัมพันธ์อย่างแน่นแฟ้นกับปลวก (Termite) เมื่อเห็ดโคนยังอ่อนหมวกดอก (Pileus) จะมีสีน้ำตาลจนเกือบดำ ปลายยอดหมวก (Perforate) ของดอกเห็ดแหลม ก้านดอก (Stripe) จะยาวและมีส่วนที่ยาวลงในดินบางชนิดติดกับรังปลวก บางชนิดจะมีเยื่อเป็นครีบรอบก้านดอก เรียกว่า แอนนูลัส (Annulus) สปอร์ของเห็ดโคนมีสีขาว น้ำตาลอ่อน ขนาดประมาณ 6.5-7 x3.7 ไมครอน เห็ดโคนเกิดในประเทศแถบร้อน ในประเทศอัฟริกากลางเช่น ไนจีเรีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่นประเทศไทย และเอเชียกลางเช่น อินเดียเป็นต้น (Chang and Quimio, 1989)

เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) เป็นเห็ดที่ขึ้นง่ายในที่มีสารอินทรีย์พวกเซลลูโลส ปลูกได้เป็นการค้า เห็ดฟางมีชื่ออีกอย่างหนึ่งว่า Paddy straw mushroom พบในหลายประเทศ เช่น ประเทศจีน เกาหลี ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย สิงคโปร์ มาเลเซีย ไทย พม่า และอินเดีย เห็ดชนิดนี้ยังพบได้ในทวีปแอฟริกา เช่น มาดากัสกา ไนจีเรีย (Chang and Hays,1978) เห็ดฟางเมื่อเริ่มเกิดสายใยจะเจริญอยู่ในอาหารที่ใช้เพาะ แล้วต่อมาจะกลายเป็นตุ่มดอก (Fruiting primordia) ซึ่งจะค่อยๆเจริญเป็นดอกเห็ด (Fruiting body) และส่วนที่ห่อหุ้มคลุมดอกอ่อนอยู่ที่ฐานดอกเห็ดเรียก วอลวา (Volva) หมวกเห็ดกางออกมีขนาดประมาณ 5-6ซม. เนื้อหมวกเห็ดหนาพอสมควร เป็นสีเทาอ่อนหรือเทาแก่ ขอบหมวกเรียบด้านล่างของหมวก มีครีบบางๆแผ่เป็นวงรัศมี รอบลำต้น เมื่อเห็ดมีอายุมากขึ้นหมวกเห็ดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ก้านหมวกเห็ดมีสีขาว ผิวเรียบและเนื้อภายในละเอียดแน่น (อนงค์,2530) สปอร์ของเห็ดฟางสีน้ำตาลแก่ บางชนิดมีสีน้ำตาลแกมแดง มีรูปร่างกลมรีขนาดกว้าง 5.4 ไมครอน ยาว 7.3 ไมครอน (Chang and Quimio,1989)

โปรโตพลาสต์ (Protoplast) เป็นเซลล์ไร้ผนังเซลล์ ที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้ศึกษาลักษณะพื้นฐานของเซลล์ และเพื่อประโยชน์ในด้านการปรับปรุงสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่นแบคทีเรีย (Schaeffer et al.,1976) ยีสต์(Fujii et al.,1988) รา(Ushijima et al.,1990) และพืช (Kao and Michayluk,1974) โดยการนำไปใช้ในการรวมโปรโตพลาสต์ (Protoplast Fusion) หรือทรานฟอรเมชั่น (Transformation) การเตรียมเซลล์ให้เป็นโปรโตพลาสต์ปกติใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้คือ ไลติกเอนไซม์ (Lytic enzyme) ปัจจัยในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของราได้แก่ ชนิดของไลติก เอนไซม์ ออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ จุลินทรีย์ (Peberdy,1985)

ไลติกเอนไซม์ (Lytic enzyme) เป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติในการย่อยสลายผนังเซลล์ ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย สารประกอบโพลีแซคคาไรด์ เอนไซม์ที่นำมาใช้ได้มาจาก จุลินทรีย์เช่น ไซโมไลเอส เตรียมจากแบคทีเรีย *Arthrobacter luteus* เป็นเอนไซม์ที่เหมาะสำหรับใช้เตรียมโปรโตพลาสต์จากยีสต์ โนโวไซม์ 234 เตรียมจากเชื้อรา *Trichoderma viride* เป็นเอนไซม์ที่เหมาะสำหรับรา หลายกลุ่ม เช่น Ascomycetes และ Basidiomycetes หรือ เอนไซม์จากสิ่งมีชีวิต เช่น เบตา-กลูคูโรนิเดส จากน้ำย่อยของหอยทาก *Helix pomatia* (Peberdy,1979) Kitamoto et al.(1988)ได้ใช้เอนไซม์จาก*Trichoderma harzianum* เตรียมโปรโตพลาสต์ของราหลายชนิดจากสายใย เช่น รากลุ่ม Zygomycotina Ascomycotina และ Basidiomycotina จะเกิดโปรโตพลาสต์สูงกว่าราชนิดอื่นๆ คือได้สูงถึง $1x10^7$ เซลล์/มล. ภายใน3 ชม. Santiago(1982) ได้เตรียมโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* โดยใช้สารละลายของเอนไซม์ซึ่งได้จาก *Trichoderma harrianum* พบว่าในชม.ที่ 4 ของการบ่มสายใยเห็ดใน 0.6 โมลาร์แมกนีเซียมซัลเฟต พีเอช 5.8 ที่อุณหภูมิ 28° ซ. จะได้โปรโตพลาสต์ $4.33x10^6$ เซลล์/มล. ในปี คศ.1985 Wakabayashi et al. ได้นำโปรโตพลาสต์ของ *Plurotus cornucopiae* มาบ่มต่อในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส 'ONOZUKA' RS พบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของโปรโตพลาสต์มีขนาดเพิ่มขึ้นจาก 4.3 ไมโครเมตร เป็น 31 ไมโครเมตร เมื่อบ่มนาน 6ชม. ที่ 27° ซ.

ออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ (Osmotic stabilizer) เป็นสารที่ป้องกันและควบคุมการผ่านเข้าออกของของเหลวภายในเซลล์ มิให้โปรโตพลาสต์แตก ออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ที่นิยมได้แก่ สารละลายน้ำตาลหรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น ซูโครส ซอร์บิทอล แมนนิทอล หรือ สารละลายเกลืออนินทรีย์บางชนิดเช่น โปแตสเซี่ยมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ (Peberdy and Ferenczy ,1985) Vries and Wessels (1972) ได้เปรียบเทียบออสโมติกสเตไลท์เซอร์ชนิดต่างๆ ซึ่งมีค่าออสโมติกโพแทนเชียน (Osmotic potential) เท่ากับ -15.8± 0.2 atm

ในการเกิดและคงตัวของโปรโตพลาสต์ *Schizophyllum commune* พบว่าโปแตสเซี่ยมคลอไรด์จะเหมาะสมที่สุด ในปี คศ. 1982 Santiago เตรียมโปรโตพลาสต์จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ทำการเปรียบเทียบชนิด และความเข้มข้นที่เหมาะสมของออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์บางชนิด พบว่า แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ เป็นออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ที่เหมาะสมที่สุด

จุลินทรีย์ที่นำมาเตรียมโปรโตพลาสต์มีความสำคัญ พบว่าอยู่ในช่วงต้นและช่วงกลางของระยะทวีคูณ (Exponential phase) จะเหมาะแก่การทำโปรโตพลาสต์ การเตรียมสายใยก่อนการทำโปรโตพลาสต์โดยการเติมสารบางชนิดเช่น Thiol compound จะทำให้ได้โปรโตพลาสต์สูงขึ้น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ พบว่าการใช้อาหารสมบูรณ์ (Complex medium) (Peberdy et al.,1976) ในปี คศ.1989 Barrett et al. ทำการเตรียมโปรโตพลาสต์จากราพวก Ectomycorrhizal บางชนิด โดยเปรียบเทียบอายุเชื้อ 2 4 6 และ 10 วัน ต่อการทำโปรโตพลาสต์ พบว่า *Laccaria laccata* s449, *L. bicolor* s447, *Hebeloma circinans* BR 63-10 และ *Pisolithus tinctorius* 285 อายุ 2วัน เหมาะสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์ แต่ *L. laccata* s444, *H. cylindrosporum* BR70-60, *Cenacaccum geophilum* 155 และ *Suillus luteus* VT1616 จะเกิดโปรโตพลาสต์สูงสุดเมื่อใช้เซลล์อายุ6วัน Dooijew et al (1973) มีการเติมสารประเภท Thiols เช่น Dithiothreitol β-Mercaptoethanol และCysteamine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทำให้เกิดcomplex ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า จะเกิดโปรโตพลาสต์ได้เพิ่มขึ้น

การรวมโปรโตพลาสต์ (Protoplast Fusion)ของเซลล์ชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกัน เป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้จำนวนชุดโครโมโซมภายในเซลล์จุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็นชุด โดยการนำโปรโตพลาสต์มาหลอมรวมตามที่ต้องการ โดยไม่อาศัยรวมแบบมีเพศหรือยีนควบคุมเพศ (mating type genes) เนื่องจากการรวมกันของโปรโตพลาสต์ มีผลในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของเซลล์ จะเกิดเซลล์ลูกผสมใหม่ ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเป็นชุดหรือหลายชุด ในหนึ่งนิวเคลียสหรือเพิ่มจำนวนนิวเคลียสมากกว่าเดิมเป็นเท่าตามจำนวนเซลล์ที่มารวมกัน (Peberdy et al ., 1976)

การรวมโปรโตพลาสต์สามารถเกิดขึ้นได้โดยธรรมชาติหรือใช้สารเคมี อาจใช้แรงปั่นเหวี่ยงช่วย โดยมีการทดลองในสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์แล้ว (Auxotroph mutant) ของ *Geotrichum sp.* พบว่าความถี่ของการเกิดการรวมกันประมาณ 10^{-6} (Ferenczy et al., 1974) ในการรวมโปรโตพลาสต์อาจเกิดได้โดยการใช้กระแสไฟฟ้า เครื่องมือที่ใช้เรียกว่า

Zimmermann cell fusion system (Zimmermann and Schenrich,1981) หรืออาจใช้สารเคมีชักนำการรวมกันได้เช่น โพลีเอธีลีนไกลคอล (Polyethylene glycol,PEG)เป็นสารที่มีสูตรโมเลกุลคือ $CH_2OH-(CH_2-O-CH_2)_n-CH_2OH$ มีน้ำหนักโมเลกุลหลายขนาดเช่น 4000 6000 8000 เป็นต้น ความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมในการรวมของโปรโตพลาสต์ คือ 30% แต่ถ้าความเข้มข้นของ PEG สูงหรือต่ำกว่านี้ความถี่ของการรวมโปรโตพลาสต์จะลดลง (Peberdy,1979) ในปีคศ.1976 Fernczy ได้นำโปรโตพลาสต์ของ auxotroph mutants ของ *Aspergillus nidulan* มารวมกันโดยใช้ PEG พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ PEG คือ 25% น้ำหนักโมเลกุล 4000 หรือ 6000 และต้องเติมแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10-100 ไมโครโมลาร์ลงไปด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรวมของโปรโตพลาสต์ Anne and Peberdy (1976) ทำการรวมโปรโตพลาสต์ของ auxotroph mutants ในกลุ่มของ *Penicillium chrysogenum* , *P. patulum* , *P. roquefortii* , *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *Cephalosporium acremonium* ทั้งที่เป็นการรวมกันในชนิดเดียวกัน (Intraspecific fusion) และต่างชนิดกัน (Interspecific fusion) โดยใช้สารละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 6000 พบว่าความถี่ของการรวมโปรโตพลาสต์ของ *P. chrysogenum* lys^- pro^-/arg^- และ leu^- met^-/thr^- เป็น 0.7 % และความถี่ของการรวมโปรโตพลาสต์ *P. chrysogenum* lys^- pro^-/arg^- และ *P. notatum* cys^- เป็น 0.18%

การรวมโปรโตพลาสต์อาจแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม โดยยึดหลักการจัดแบ่งดังนี้คือ

1. Intraspecific fusion เป็นการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อที่อยู่ในชนิด (species) เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์(strain) หรือต่างเพศ (mating type) เซลล์ลูกผสมที่เกิดโดยวิธีนี้มักมีความเสถียรของสายพันธุ์สูง เนื่องจากเซลล์ของสายพันธุ์ต้นแบบ มีความแตกต่างในทางสายพันธุ์เช่น ในรา *Penicillium chrysogenum* (Anne and Peberdy , 1976) *Aspergillus niger* (Anne and Peberdy, 1976 ; Das et al., 1989) *Cephalosporium acremonium* (Anne and Peberdy,1976) และยีสต์ *Candida* sp. N-16 (Fujii et al.,1988)

2. Interspecific fusion เป็นการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อต่างชนิดกัน มีการรายงานของการรวมโปรโตพลาสต์ของรา และเห็ดในสกุลเดียวกัน (genus) แต่ต่างชนิดกัน ดังนี้ รา *Aspergillus nidulan* กับ *A. rugulosus* (Kevei and Peberdy, 1977) *A. awamori var kawachi* กับ *A. oryzae* (Ogawa et al.,1988) *A. oryzae* กับ *A. sojae* (Ushijima et al., 1990) และเห็ด *Plurotus ostreatus* กับ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

P. columbinas (Toyomasu and Mori,1988)

3. Intergeneric fusion เป็นการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อต่างสกุล (genus) ได้มีรายงานการรวมของเชื้อรา ยีสต์ และพืช ดังต่อไปนี้คือ ในพืช *Vicia hajastana* และ *Pisum sativam* (Kao and Mihayluk,1974) ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* กับ *Zygosaccharomyces fumentati* (Pina et al.,1986) และเชื้อรา *Monascus anka* กับ *Aspergillus oryzae* (Kiyohara et al.,1990)

การคืนกลับเป็นเซลล์ปกติของโปรโตพลาสต์ (Regeneration) มีความสำคัญต่อการเกิดเซลล์ใหม่ โปรโตพลาสต์ไม่สามารถคืนกลับเป็นปกติได้ทุกเซลล์ ความสามารถในการคืนกลับเป็นเซลล์ปกติของโปรโตพลาสต์ได้ มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบในอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ สำหรับชักนำการสร้างผนังเซลล์ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมองค์ประกอบในอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ให้สมบูรณ์ ควรมีแหล่งของคาร์บอน ไนโตรเจน เป็นต้น (Peberdy et al.,1976) Kawabara et al., (1989) นำโปรโตพลาสต์ของ *Robillarda* Y-20 เลี้ยงให้เจริญเป็นเซลล์ปกติ พบว่าถ้าใช้ 0.6 โมลาร์ ซูโครสผสมในอาหารแข็ง ความถี่ของการคืนกลับเป็นเซลล์ปกติ เท่ากับ 0.14 % วีรวัฒน์และสุมาลี (2534) พบว่าการคืนกลับเป็นเซลล์ปกติของโปรโตพลาสต์เห็ดฟางจะเกิดได้ดีบนอาหารแข็ง ถ้าเพิ่มวุ้นเป็น 3 %

การคัดเลือกฟิวแสนท์ (Fusant) ที่เกิดจากการรวมของโปรโตพลาสต์ เนื่องจากการรวมเป็นแบบสุ่ม (random) การคัดเลือกฟิวแสนท์มีความสำคัญอาจทำได้หลายวิธีดังนี้เช่น การหาปริมาณดีเอนเอทั้งหมดเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ การทำ Segregation analysis การศึกษารูปแบบของไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme pattern) ที่เคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้า การแยกโครโมโซมด้วย Pulse-field gradient gel electrophoresis (สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพ , 2536) การศึกษารูปแบบของชิ้นส่วนของดีเอนเอ ที่ตัดด้วยเรสติกชั่นเอนไซม์ (Restriction enzyme) และการทำดีเอนเอ-ดีเอนเอไฮบริไดท์เซชั่น (DNA-DNA hybridization) ตรวจสอบด้วยดีเอนเอโพรบ (DNA probe) (จำรูญศรีและสุมาลี, 2538)

การหาปริมาณดีเอนเอ ทำได้โดยการวัดการดูดกลืนแสงอุตราไวโอเลตที่ 260 นาโนเมตร ค่า $A_{260\ nm} = 1$ หมายถึงดีเอนเอมีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ศิริพร,2531) หรือโดยการนำมาทำปฏิกิริยากับไดเฟนนิลลามีน (Diphenylamine) วัดปริมาณสีที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร(Burton,1956)

การทำ Segregation analysis จุลินทรีย์ที่นำมาหลอมรวมโปรโตพลาสต์จะต้องเป็นสายพันธุ์ mutant ที่มีตำหนิ (marker) ต่อยาปฏิชีวนะ หรือต้องการอาหารจำเพาะเช่นกรดอะมิโนหรือ วิตามินสำหรับการเจริญเติบโต เพื่อติดตามตัวฟิวแสนท์จึงต้องมีการเติม

สารอาหาร ที่จำเพาะเหล่านั้นลงไปในอาหารเลี้ยงจำกัด (Minimal medium) จุลินทรีย์จึงสามารถเจริญได้ปกติ การทำให้จุลินทรีย์กลายพันธุ์ (Mutation) อาจทำได้โดยใช้สารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เช่น แสงอุลตราไวโอเลตหรือสารเคมี (สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพ,2536)

การแยกโปรตีนโดยเจลอิเลคโตรโฟรีสิส คือโปรตีนที่มีประจุจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม การเคลื่อนที่ของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับ ขนาดรูปร่างและประจุสุทธิของโปรตีนในระบบอิเลคโตรโฟรีสิสสำหรับแยกโปรตีนในสภาพธรรมชาติเหมาะสำหรับใช้แยกหรือจำแนกโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกัน (Hames and Rickwood,1990)

ในปี คศ. 1979 Prillinger and Mobitoris ได้ทำการทดลองแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า แล้วติดตามเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase) และแลคเคส(laccase) ของ *Plurotus ostreatus* และ Dikaryotic hybrid ของลูกผสม พบว่า แถบเอนไซม์ laccase ของฟิวแสนท์ ที่มีแถบแสดงที่แสดงในสายพันธุ์พ่อแม่ Pina et al.(1986) ได้ทำการรวมโปรโตพลาสต์ของยีสต์ต่างสายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Zygosaccharomyces fermentati* พบว่าความถี่ของการเกิดฟิวแสนท์ ประมาณ $2x10^{-7}$ ซึ่งมีลักษณะของทั้งสายพันธุ์พ่อและแม่ เช่นความต้านทานต่อไซโคลเอกซามีน หรือคอปเปอร์ซัลเฟต และสามารถใช้ได้ทั้ง เซลโลไบโอส หรือกรดแลกติก เป็นแหล่งคาร์บอน ในปี คศ. 1986 Toyomasu et al. ทำการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ด *Plurotus* แบบ Interspecific fusionของ *P. ostreatus* กับ *P. salmoneo-straminens* และเปรียบเทียบรูปแบบของไอโซเอนไซม์ของฟิวแสนท์ กับสายพันธุ์พ่อแม่ พบว่า กรดฟอสฟาร์เทส (Acid phosphatase) ไม่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบฟิวแสนท์ได้ แถบของไอโซเอนไซม์ ของฟิวแสนท์ จะแสดงแถบที่พบได้ในสายพันธุ์พ่อแม่ หรือทั้งสายพันธุ์พ่อแม่ มีรายงานการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดPlurotus ในปีต่อมา 1987 โดยToyomasu and Mori ฟิวแสนท์ จาก *P. ostreatus* lqu-14A กับ *P. columbinus* 4f-1A และ *P. columbinus* 4f-1A กับ *P. sajor-caju* 35-11A นำฟิวแสนท์จากการรวมโปรโตพลาสต์ของแต่ละคู่ ย้อมนิวเคลียสด้วยโปรพิเดียมไอโอดีน (propidium iodide) พบว่านิวเคลียสจะเป็น uninucleate และรูปแบบของไอโซเอนไซม์ของฟิวแสนท์ พบแถบของเอนไซม์เอสเทอร์เรส (Esterase) ซัคซิเนทดีไฮโดจิเนส(Succinate dehydrogenase) ของฟิวแสนท์ตรงกันกับ สายพันธุ์ต้นแบบ ยกเว้นแถบของเอนไซม์กรดฟอสพาเทส (Acid phosphatase) ที่ต่างไปจากสายพันธุ์ต้นแบบ Ogawa et al.(1988) ได้ทำการรวมโปรโตพลาสต์ของ *Aspergillus awamori var kawachi* และ *A. orygae* ด้วยPEG 35 % พบว่า ฟิวแสนท์ที่ใช้ d-camphor จะเกิดสปอร์ที่มีความคงตัว และมีจำนวนมาก แต่การผลิตอะไมเลสและกรดซิตริก จะมีระดับเดียวกับสายพันธุ์

ต้นแบบ ซึ่งคาดว่าอาจเป็น heterozygous diploid ในปีเดียวกัน Fujii et al.ได้นำ auxotroph mutants ของ *Candida sp.* N-16 มารวมโปรโตพลาสต์ พบว่า ฟิวแสนท์ที่เกิดจะเป็น uninucleate ปริมาณดีเอนเอ จะเป็น 2เท่าของสายพันธุ์พ่อแม่ แต่อัตราการเจริญของเซลล์จะต่ำกว่าสายพันธุ์ปกติ ปฏิกิริยาของ แอลกอฮอล์เอนไซม์ (alcohol enzyme) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต จะสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ Kiyohara et al.(1990) ทำการรวมโปรโตพลาสต์แบบ Intergeneric Fusion ระหว่าง *Monascus anka* กับ *Aspergillus oryzae* และทำการคัดเลือกฟิวแสนท์ที่เกิดขึ้นบน Minimal medium พบว่าปริมาณดีเอนเอ จะสูงเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ของพ่อแม่ ผลผลิตเช่น อะไมเลส (Amylase) โปรติเอส (Protease) และกรดโคจิ (Kojic acid) ของฟิวแสนท์จะมีปริมาณเพียงครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่

งานวิจัยนี้ที่มุ่งจะศึกษาการเตรียมโปรโตพลาสต์ โดยใช้เอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์บางชนิด และหาภาวะเหมาะสมที่จะทำให้เกิดโปรโตพลาสต์เป็นจำนวนมากของสายพันธุ์เห็ดโคน *Termitomyces sp.* เมื่อนำมาหลอมรวมกับเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ให้เกิดฟิวแสนท์ (Fusants) สายพันธุ์ใหม่ และติดตามความสัมพันธ์ของลักษณะโคโลนีของฟิวแสนท์ที่เกิดบนอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ กับปริมาณดีเอนเอทั้งหมด ของโคโลนีสายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่เกิดขึ้นและดูรูปแบบโปรตีนของฟิวแสนท์บนเจลอิเลคโตรโฟริสิส

<u>ประโยชน์ที่จะได้รับ</u>

1. ได้ทราบภาวะที่เหมาะสม และชนิดของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ของสายใยเห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) มากสุด

2. ได้ฟิวแสนท์สายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดโคน กับเห็ดฟาง ซึ่งเป็นเทคนิคอย่างหนึ่งในการสร้างสายพันธุ์ใหม่โดยไม่ใช้การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

3. สามารถคัดกรองลูกผสม (Screening) โดยสังเกตุลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารชักนำการสร้างผนังเซลล์ (Regenerating medium) เพื่อเป็นการประหยัดเวลา และลดขั้นตอนในการทำวิจัยลง