การคัดเลือกเห็ดหมื่นปี *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. สายพันธุ์ลูกผสม
ที่มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์สูง

นางสาวยุพาพรรณ. ระลึก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-3383

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE SELECTION OF LINGZHI MUSHROOM *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. HYBRIDS WITH HIGH POLYSACCHARIDE CONTENT

Miss Yupapun Raluk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany
Faculty of Scince
Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-3383

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกเห็ดหมื่นปี *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst สายพันธุ์ลูกผสมที่มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์สูง
โดย	นางสาวยุพาพรรณ ระลึก
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ปาริชาต ภู่สว่าง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ปาริชาต ภู่สว่าง)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยุพาพรรณ ระลึก : **การคัดเลือกเห็ดหมื่นปี** *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst . **สายพันธุ์ลูกผสมที่มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์สูง** (THE SELECTION OF LINGZHI MUSHROOM *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. HYBRIDS WITH HIGH POLYSACCHARIDE CONTENT) อ.ที่ปรึกษา : รศ.มุกดา คูหิรัญ อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ปาริชาติ ภู่สว่าง, 54 หน้า. ISBN 974-17-3383

การเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst 9 สายพันธุ์ ในอาหาร PDA อาหาร PDB อาหารเมล็ดข้าวฟ่าง และในถุงขี้เลื่อย พบว่าอัตราการเจริญเติบโตโดยเฉลี่ยของเห็ดหมื่นปี สายพันธุ์ MUG001 MUG100 และ MUG101 เจริญเติบโตเร็วตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆมีอัตราการเจริญต่ำกว่าเล็กน้อย

เมื่อนำเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG001 และ MUG100 มาทำ monosporous culture พบว่าสายพันธุ์ MUG001 เกิดสปอร์เดี่ยว 10 โคโลนี และสายพันธุ์ MUG100 เกิดสปอร์เดี่ยว 8 โคโลนี เมื่อผสมระหว่างสปอร์เดี่ยวกับเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์ ได้ลูกผสม 5 สายพันธุ์ เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโต พบว่า ลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตโดยเฉลี่ยใกล้เคียงกับสายพันธุ์พ่อแม่

การสกัดสารพอลิแซกคาไรด์ด้วยน้ำร้อน หาปริมาณสารโดยวิธีฟีนอล–ซัลฟิวริก พบว่าสายพันธุ์ MUG001 MUG003-UV-cv1 MUG101 และ MUG100 มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์เป็น 48.94 33.78 32.73 และ 24.78 มิลลิกรัมต่อเส้นใยแห้ง 1 กรัม ส่วนสายพันธุ์อื่นๆ มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่ำกว่าเล็กน้อย สำหรับลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ H1 H2 H3 H4 และ H5 มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์เป็น 29.12 26.18 19.78 30.64 และ 25.09 มิลลิกรัมต่อเส้นใยแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ

การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีไดฟีนิลลามีนรีเจนต์ และหาอัตราส่วนปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อ ดีเอ็นเอ พบว่า MUG001 MUG003-UV-cv1 MUG 101 และ MUG100 เป็น 9.97 9.79 7.93 และ 7.17 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นๆมีอัตราปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอต่ำกว่าเล็กน้อย และสายพันธุ์ลูกผสมมีสัดส่วนปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ อยู่ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา……พฤกษศาสตร์……..ลายมือชื่อนิสิต……..…
สาขาวิชา……พันธุศาสตร์……..ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา……..……
ปีการศึกษา……2545……..ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม…….

4272371023 Majar GENNETICS

Keywords : *Ganoderma lucidum* POLYSACCHARIDE HYBRIDS

YUPAPUN RALUK : THE SELECTION OF LINGZHI MUSHROOM *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. HYBRIDS WITH HIGH POLYSACCHARIDE CONTENT . THESIS ADVISOR. : ASSOC. PROF. MUKDA KUHIRUN. THESISI CO-ADVISOR : ASSOC. PROF.PARICHART POOSAWANG. 54 pp. ISBN 974-17-3383

The growth rate of Lingzhi mushroom *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst 9 strains grown in PDA media, PDB media, millet media and saw-dust media were determined that the highest growth rate was MUG001 followed by MUG100 and MUG101 by sequence.The others are have growth rate and weight rate lower than that.

Reproduction by monosporous culture determine that MUG001 reproduct 10 spores.While MUG100 reproduct 8 spores.Crosses 9 strains by Buller phenomenon method found compatible di-mon crosses total 5 hybrid strains.While the others incompatible di-mon.The growth rate of 5 hybrid strain are equal to native strain.

The amount of polysaccharides that analyzed by the phenol-sulfuric method determine that MUG001 MUG003-UV-cv1 MUG101 and MUG100 have the most amount of polysaccharides at 1 gram of mycelium dry weight there are 48.94, 33.78, 32.73 and 24.78 mg. at 1 g. of mycelium dry weight sequence.The others have lower than that.While crosses strains H1, H2, H3, H4 and H5 have polysaccharides 29.12, 26.18, 19.78, 30.64 and 25.09 mg. at 1 g. of mycelium dry weight by sequence.

The amount of DNA that extracted by perchloric acid and the amount of DNA were measured by Diphenylamin method. When calculated the ratio between the amount of polysaccharides with the amount of DNA determine that MUG001 MUG101 MUG003-UV-cv1 and MUG100 have 9.97, 9.79, 7.17 and the ratio between the amount of polysaccharides with the amount of DNA.The others have lower than that.While hybrid strains H5 have the ratio between the amount of polysaccharides with the amount of DNA more that native strains it has 7.77 while native have 7.17 and 7.74. The others hybrid strains have ratio equal to native strains.

Department/Program…..Botany……Student's signature……..……..

Field of study……Genetics……Advisor's signature ……...…….……

Academic year ……2002……..……..Co-advisor's signature…….……..……..

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ปัญหาในการวิจัย ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ปาริชาติ ภู่สว่าง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นและความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นและความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นและความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ ที่ไม่อาจเอ่ยนามได้ทั้งหมด สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่มีให้เสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ญ

บทที่

1 บทนำ.....1
2 ตรวจเอกสาร.....4
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....10
4 ผลการทดลอง.....15
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....33
รายการอ้างอิง.....38
ภาคผนวก.....42
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....54

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต รัศมีเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA.....16

2 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงขวดอาหารข้าวฟ่าง.....17

3 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงถุงอาหารขี้เลื่อย.....18

4 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด.....20

5 ปริมาณพอลิแซกคาไรด์ ปริมาณดีเอ็นเอ และอัตราส่วนระหว่างปริมาณ พอลิแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ ของเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์.....21

6 การผสมพันธุ์ระหว่าง monokaryon กับ dinokaryon.....22

7 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญ ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปีระหว่าง สายพันธุ์ลูกผสม H1-H5 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด.....23

8 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต รัศมีเส้นใยของเห็ดหมื่นปีระหว่าง สายพันธุ์ลูกผสม H1-H5 ในอาหารแข็ง PDA.....48

9 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปีระหว่าง สายพันธุ์ลูกผสม H1-H5 ในขวดอาหารข้าวฟ่าง.....48

10 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปีระหว่าง สายพันธุ์ลูกผสม H1-H5 ในถุงอาหารขี้เลื่อย.....49.

11 ปริมาณพอลิแซกคาไรด์ ปริมาณดีเอ็นเอ และอัตราส่วนระหว่าง ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H1-H5 กับสายพันธุ์พ่อแม่.....31

12 อัตราส่วนระหว่างปริมาณพอลิแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H1-H5 49

13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบทางเดียว ค่าเฉลี่ย รัศมีเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง PDA.....45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบทางเดียว ค่าเฉลี่ย
ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในขวดอาหารข้าวฟ่าง.....45

15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบทางเดียว ค่าเฉลี่ย
ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในถุงอาหารขี้เลื่อย 46

16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบทางเดียว ค่าเฉลี่ย
ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอของเส้นใยเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์.....47

17 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต รัศมีเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์
ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA.....50

18 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์
ที่เลี้ยงขวดอาหารข้าวฟ่าง.....51

19 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์
ที่เลี้ยงถุงอาหารขี้เลื่อย 52

20 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB.....53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

1 เห็ดหมื่นปี……5

2 วงชีพของเห็ดหมื่นปี……..6

3 ลักษณะเส้นใยของเห็ดหมื่นปีบางสายพันธุ์ในอาหารแข็ง PDA……15

4 ลักษณะเส้นใยของเห็ดหมื่นปีบางสายพันธุ์ในขวดอาหารข้าวฟ่าง ……..15

5 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของ
เส้นใยเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวPDB……..19

6 ลักษณะ barrage ที่เกิดจากการผสมพันธุ์……22

7 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี
ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H1 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด ……24

8 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี
ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H2 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด ……25

9 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี
ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H3 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด ……26

10 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี
ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H4 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด ……27

11 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี
ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H5 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด ……28

12 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี
ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ ในอาหาร 3 ชนิด ……29

13 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหมื่นปี
ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว PDB ……30

14 กราฟเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอของเห็ดหมื่นปี
ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม 5 สายพันธุ์กับสายพันธุ์พ่อแม่……32

15 กราฟมาตรฐานน้ำแป้งมาตรฐาน โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก……..43

16 กราฟมาตรฐานของสารละลาย คาล์ฟ ไทมัส ดีเอ็นเอ โดยวิธี ไดฟีนิลามีน รีเจนต์……..44

บทที่ 1
บทนำ

เห็ดหมื่นปี มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ganoderma Lucidum* (Fr.) Karst. มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่นนั้นๆ เช่น ชาวจีนเรียก Lingzhi มีความหมายถึงวิญญาณ ชาวญี่ปุ่นเรียก Reishi หรือ Mannentake ซึ่งแปลว่า หมื่นปี ในภาษาอังกฤษเรียกว่า Lacquered Mushroom หรือ Holy Mushroom (สุทธพรรณ ตรีรัตน์, 2531) ส่วนคนไทยรู้จักกันในชื่อ เห็ดหลินจือ เห็ดอมตะ เห็ดจวักงู หรือเห็ดหมื่นปี จากการศึกษาพบว่า สารในเห็ดหมื่นปีมีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ได้แก่ สารจำพวกพอลิแซกคาไรด์ ที่พบคือ β-(1 $\rightarrow$3)-D-glucan มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Sone et al. 1985) Lee และคณะ (1984) พบว่า สารจำพวกพอลิแซกคาไรด์ในเห็ดหมื่นปี มีผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด fibrosarcoma ในหนูทดลอง ปริญญา รัตนะพิมาน (2535) รายงานว่าสารสกัดจากเห็ดหมื่นปีสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งในหนูทดลองได้ นอกจากนี้ยังมีสารประกอบอื่นๆในเห็ดหมื่นปี เช่น กรดแกโนเดอริค (ganoderic acid) เออร์โกสเตอโรล (ergosterol) และอะดีโนซีน (adenosine) เป็นต้น สารประกอบเหล่านี้มีสมบัติในการลดความดันโลหิต ลดไขมันในเลือด ลดระดับน้ำตาลในเลือด กระตุ้นการหมุนเวียนเลือด ลดความหนืดของเลือด ลดการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด เพิ่มภูมิคุ้มกันโรค และขจัดพิษที่มีต่อตับ (สุรพล รักปทุม และชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง, 2539) และมีรายงานว่า เมื่อฉีดสารสกัดเข้มข้นกับหนูทดลองที่อาการผิดปกติทำให้ความดันลดลง (พนิดา ปาลกวงศ์ ณ อยุธยาและคณะ,2531)

เห็ดหมื่นปีที่พบในธรรมชาติสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตอบอุ่น และเขตร้อน เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี ประเทศแถบอเมริกาเหนือ ยุโรป ฯลฯ (Adaskaveg and Gilbertson, 1986) ในประเทศไทย อนงค์ จันทร์ศรีกุลและคณะ (2528) ได้สำรวจพบว่า เห็ดชนิดนี้สามารถขึ้นได้ทั่วประเทศ ดอกเห็ดมักจะขึ้นตามตอไม้ที่ตายแล้ว หรือเป็นพาราสิตของรากพืช บริเวณโคนต้นไม้ เช่น ก้ามปู หางนกยูงฝรั่ง เป็นต้น สุรพล รักปทุม และชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง, (2539) รายงานว่า เห็ดหมื่นปีที่นำมาทดลองปลูกส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศและสายพันธุ์จากญี่ปุ่น สุทธพรรณ ตรีรัตน์ (2531) รายงานว่า หน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด พบดอกเห็ดขึ้นอยู่บริเวณโคนต้นหางนกยูงฝรั่ง (*Delonix regia*) บริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่ง ได้รับการยืนยันจากผู้เชี่ยวชาญเห็ดทั้งประเทศและต่างประเทศว่าเป็นเห็ด *G. lucidum* ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ได้นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในการศึกษาค้นคว้าและวิจัย ต่อไป

เนื่องจากเป็นเห็ดรา การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ที่ดีน่าจะมีการทำโดย 1) คัดเลือกจากดอกเห็ดเพื่อนำเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยง 2) การผสมพันธุ์ (การผสมข้าม) ซึ่งปัญหาได้แก่ การเข้ากันได้หรือไม่ได้ระหว่างพันธุ์ (Raper, 1966) 3) โดยการทำให้เกิดมิวเตชั่น เช่น การใช้สารเคมี รังสี หรือการรวมโปรโตพลาสต์ เพื่อทำให้เกิดมิวเตชั่น มีรายงานเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์เห็ด เช่น วีรวัฒน์ กนกนุเคราะห์ (2534) ได้ทดลองปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยการรวม โปรโตพลาสต์ พบว่า สายพันธุ์ลูกผสมที่ได้ มีขนาดเส้นใยใหญ่ขึ้น และให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำรูญศรี พุ่มเทียน, ปรารถนา ภูมิวุฒิชัยสิงห์ และ สุมาลี พิชญางกูร (2534) พบว่าพันธุ์ลูกผสมจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดโคนและเห็ดฟาง จะให้ผลผลิตของจำนวนดอกเห็ด ขนาดของดอก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด ในปริมาณที่สูงกว่าพันธุ์พ่อแม่ ประภัสสร โชคสวนทรัพย์ (2539) รายงานว่า การผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว จะได้ลูกที่มีลักษณะเหมือนพ่อและแม่ Wang และคณะ (1993) ได้ทดลองผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดสองชนิดคือ *Volvariella valvacea* และ *Volvariella displasia* โดยการรวมโปรโตพลาสต์ ได้ลูกผสมที่มีปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนมากกว่าพันธุ์พ่อแม่ Dhalival, Garcha และ Khanna (1992) ได้ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ *Pleurotus florida* โดยการชักนำให้เกิดมิวเตชัน ด้วย NTG พบว่ามิวแตนท์ที่ได้สามารถให้ผลผลิต laccase สูงขึ้น จากการศึกษาของ Hamlyn และ Ball (1979) โดยศึกษาการรวม *Cephalosporium acremonium* ของ 2 พันธุ์ ระหว่างพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วสร้างสปอร์ได้ และต้องการเมทไธโอนีนกับพันธุ์ที่เจริญเติบโตช้า สร้างสปอร์ไม่ได้แต่สามารถใช้สารอนินทรีย์จากพวกฟอสเฟตได้ ได้ลูกผสมที่มีสมบัติดังนี้ เจริญเติบโตเร็ว สร้าง สปอร์ได้ และสามารถใช้สารอนินทรีย์จากพวกฟอสเฟตได้ ในส่วนของการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณพอลิแซกคาไรด์นั้น จากงานวิจัยของ ชาลินี คงสวัสดิ์ (2542) พบว่าแสงอัลตราไวโอเลตสามารถเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มปริมาณพอลิแซคคาไรด์ในเห็ดหมื่นปีได้ แต่ผลของการเจริญเติบโตของเส้นใยพบว่าเจริญเติบโตได้ช้า แต่ยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการผสมพันธุ์เห็ดหมื่นปี ดังนั้นจึงควรมีการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ลูกผสมที่โตเร็วและมีปริมาณโพลีแซกคาไรด์สูง ซึ่งการศึกษาในเรื่องนี้ น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์ของเห็ดอื่นต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

เพื่อให้ได้สายพันธุ์เห็ดหมื่นปีที่มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์สูง และมีการเจริญเติบโตเร็ว

ขั้นตอนการวิจัย

1. เตรียมหัวเชื้อ
2. คัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหมื่นปีที่เจริญเติบโตเร็ว

3. ศึกษาเปรียบเทียบพอลิแซกคาไรด์ในเห็ดทั้ง 9 พันธุ์

4. ผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วกับเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์

5. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและปริมาณพอลิแซกคาไรด์ ระหว่างเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สายพันธุ์ลูกผสมที่ได้ สามารถเป็นสายพันธุ์ที่จะแนะนำสู่เกษตรกรอันจะเป็นแนวทางเพิ่มรายได้เกษตรกรผู้เพาะเห็ด และใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดอื่นต่อไป

ขอบเขตของการศึกษา

งานวิจัยนี้เป็นการนำพันธุ์เห็ดหมื่นปีที่เจริญเติบโตเร็วผสมกับเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ โดยผสมแบบ Buller phenomenon คัดเลือกเห็ดหมื่นลูกผสมปีที่มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์สูงและเจริญเติบโตเร็ว จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและปริมาณพอลิแซกคาไรด์ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่ โดยหาค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยและวิเคราะห์หาอัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

การจัดจำแนกชนิดของเห็ดหมื่นปี

การจัดจำแนกชนิดของเห็ดหมื่นปี (Alexopoulos และ Mims, 1979) เป็นดังนี้

Kingdom	Mycetea
Division	Amastigomycota
Subdivision	Basidiomycotina
Class	Basidiomycetes
Subclass	Holobasidiomycetidae
Series	Hymenomycetes
Order	Aphyllopharales
Family	Polyporaceae
Genus	*Ganoderma*
Speecies	*Ganoderma lucidum*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหมื่นปี (ปัญญา โพธิฐิรัตน์, 2538)

เห็ดหมื่นปีเป็นพวก Polypore แบ่งเป็น 2 ระยะคือ

1. ระยะเส้นใย มีการเจริญ 3 ระยะ คือ

1.1 เส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) เป็นเส้นใยที่งอกออกมาจาก basidiospore มีโครโมโซมเป็น haploid (n) ในระยะแรกของการงอกจะเป็น multinucleate ต่อมาจะมีผนัง (septum) มากั้นทำให้ได้เส้นใยที่มี 1 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ ซึ่งเรียกว่า homokaryotic mycelium เส้นใยระยะนี้มีสีขาวและไม่พบ clamp connection

1.2 เส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) เกิดจากเส้นใยปฐมภูมิสองเซลล์มาแตะกัน จากนั้นไซโทพลาซึม (cytoplasm) จะรวมกันแต่นิวเคลียสทั้งสองเซลล์ไม่รวมกัน ทำให้แต่ละเซลล์มี 2 นิวเคลียส เรียก ไดคาริออน (dikaryon, n+n) ซึ่งจะพบ clamp connection ในเส้นใยระยะนี้

1.3 เส้นใยตติยภูมิ (tertiary mycelium) เกิดจากเส้นใยระยะทุติยภูมิที่เจริญเต็มที่ และมีการสะสมอาหารมากพอ จึงอัดตัวแน่น เส้นใยเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลรวมเป็นกระจุกหรือ

ขยุ้มรา จากนั้นจะพัฒนากลายเป็นตุ่มยื่นออกมา เรียกว่า sclerotia หรือ primodia ซึ่งจะพัฒนาเป็นดอกเห็ด (basidiocarp) (Raper, 1966)

2. ระยะดอกเห็ด

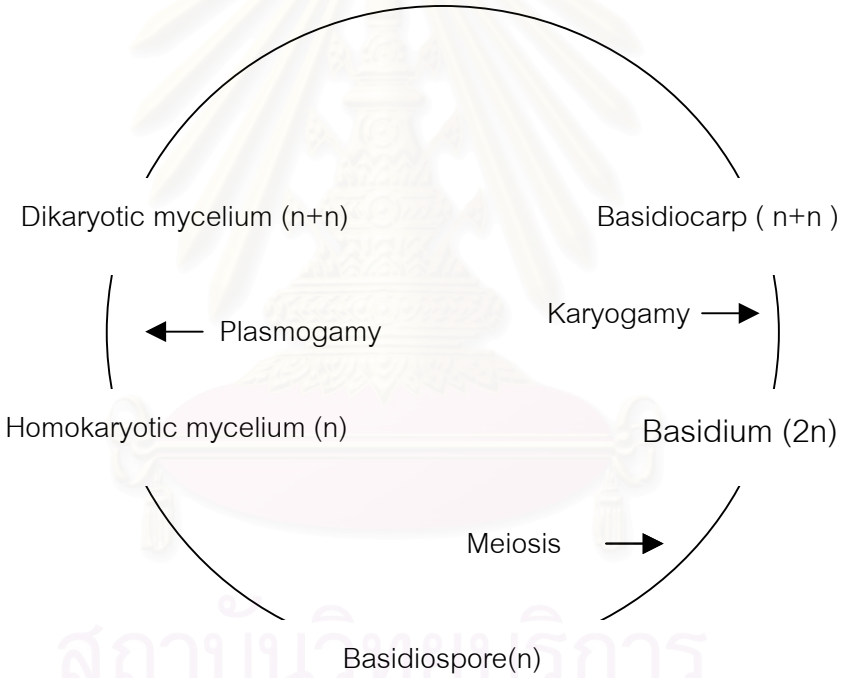
ดอกเห็ดหมื่นปีอาจเกิดเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มๆละ 3-4 ดอก ดอกเห็ดเป็นส่วนที่พัฒนามาจากเส้นใย เริ่มแรกดอกเห็ดที่ออกมาใหม่ๆ จะมีลักษณะเป็นแท่งปลายมนคล้ายนิ้วสีเหลือง ต่อมาส่วนบนของดอกเห็ดจะแผ่คล้ายพัดหรือรูปไต สีของดอกเห็ดขณะที่ยังอ่อนอยู่จะมีสีขาวหรือสีเหลือง กลางหมวกดอก (cap) มีสีน้ำตาล เมื่อเจริญเต็มที่สีของหมวกดอกจะเข้มมากขึ้น ดอกเห็ดหนาประมาณ 0.2 – 1 .0 เซนติเมตร ผิวของหมวกดอกมีรอยย่นและเป็นเงา คล้ายทาด้วยแลคเกอร์ เห็ดหมื่นปีอาจจะมีก้านดอก (stalk) หรือไม่ก็ได้ ก้านดอกอาจจะอยู่กึ่งกลางหรือค่อนไปด้านใดด้านหนึ่งของหมวกเห็ด ส่วนใต้หมวกดอก มีลักษณะเป็นแผ่นสีขาวมีรูเล็กๆสีเหลืองหรือสีขาวจำนวนมาก ไม่มีแลกเกอร์เคลือบจึงนิ่มกว่าบริเวณก้านและหมวกดอก ภายในรูเป็นแหล่งกำเนิดของสปอร์ เมื่อดอกเห็ดเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์และปล่อยออกภายนอก สปอร์มีรสขม มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล รูปร่างรี ปลายด้านหนึ่งตัด มีผนังหนา 2 ชั้น ผนังด้านนอกเรียบ ส่วนผนังด้านในมีลักษณะคล้ายหนาม สปอร์ใช้เป็นลักษณะในการจำแนกชนิดของเห็ดสกุล *Ganoderma* ได้ (สุทธพรรณ ตรีรัตน์, 2531)

รูปที่ 1 เห็ดหมื่นปี (*G. lucidum* (Fr.) Karst.)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเห็ดหมื่นปี

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเห็ดหมื่นปีมี 3 ขั้นตอนคือ 1) Plasmogamy การรวมตัวของโปรโตพลาซึม 2) Karyogamy การรวมกันของนิวเคลียส และ 3) Meiosis การแบ่งนิวเคลียส

ดอกเห็ด (Basidiocarp) มีโครโมโซมเป็น n+n ส่วนที่อยู่ใต้ดอกเห็ดซึ่งเรียกว่าbasidium มีโครโมโซมเป็น 2n ซึ่งแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เพื่อสร้างเป็น basidiospore เส้นใยที่งอกออกมาจาก basidiospore มีโครโมโซมเป็น haploid เรียกเส้นใยระยะนี้ว่า Homokaryotic mycelium ซึ่งมี 1 นิวเคลียสใน 1 เซลล์ เมื่อมีการผสมพันธุ์จะเกิดการรวมไซโทพลาสซึมทำให้ภายใน 1 เซลล์มี 2 นิวเคลียส แต่นิวเคลียสทั้งสองไม่รวมกัน เรียกว่า Dikaryotic mycelium (n+n) เมื่อเส้นใยระยะนี้ได้รับอาหารที่เพียงพอและอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมก็จะเจริญไปเป็นดอกเห็ดต่อไป



รูปที่ 2 วงชีพของเห็ดหมื่นปี (Raper, 1966)

การเข้ากันได้ทางเพศ (compatibility) ในเห็ดรา แบ่งเป็น 2 ประเภทดังนี้ (Raper,1966)

1. homothallic fungi หรือ self – fertility คือเห็ดราที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งสามารถผสมกันได้ภายใน thallus เดียวกัน

2. heterothallic fungi หรือ self – sterility คือเห็ดราที่ไม่สามารถผสมภายใน thallus เดียวกันได้ thallus ที่จะผสมกันได้ ต้องมีนิวเคลียสซึ่งมี mating types ต่างกันมาผสมกัน แบ่งเป็น 2 แบบคือ

2.1 bipolar heterothallic หรือ unifactorial incompatibility เป็นการผสมพันธุ์ที่มียีนคุม mating types 2 ชนิด อยู่บน locus เดียวกัน ทำให้เห็ดราสร้างสปอร์ที่ต่างกัน 2 ชนิดคือ A และ a (ยีน A ประกอบด้วยอัลลีล A และ a)

2.2 tetrapolar heterothallic หรือ bifactorial incompatibility เป็นการผสมพันธุ์ที่มียีนคุม mating types 2 ชนิด อยู่บน locus ต่างกัน ทำให้เห็ดราสร้างสปอร์ที่ต่างกัน 4 ชนิดคือ A_1B_1 A_2B_2 A_1B_2 และ A_2B_1 (ยีน A ประกอบด้วยอัลลีล A_1 และ A_2 ยีน B ประกอบด้วย อัลลีล B_1 และ B_2)

เห็ดหมื่นส่วนใหญ่เป็นพวก heterothallic อาจมี mathing type gene 1 หรือ 2 loci เรียก A และ B ลักษณะที่เป็น tetrapolar heterothallic นั้น ยีน A เกี่ยวข้องในการจับคู่ของนิวเคลียส (nuclear pairing) และการสร้าง clamp connection ส่วนยีน B เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส (nuclear migration) (Chang and Chen, 1986)

โดยปกติการผสมพันธุ์มักใช้เส้นใยพวก homokaryotic culture ซึ่งเป็นเส้นใยที่เกิดจากการงอกของสปอร์เดี่ยว ทำให้เกิดเป็นดอกเห็ด สามารถสร้างสปอร์ได้ สำหรับพวกที่มี Incompatility facter ที่ต่างกัน แต่บางครั้งการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ที่ดีอาจจะเกิดจากการนำเส้นใยที่เป็น dikaryotic มาผสมกับเส้นใยที่เป็น mono หรือ homokaryotic ที่เรียกว่า di-mon mating หรือ Buller phenomenon สำหรับพวกที่เป็น compatible di-mon mating นิวเคลียสของ dikaryon มักจะเคลื่อนที่ไปอยู่ในพวก monokaryon และมีการสร้าง clamp connection เกิดดอกสร้างสปอร์ต่อไป (Steiner,1967)

Papazian (1950) ศึกษาเกี่ยวกับเห็ดแครง (*Schizophyllum commune)* (Fr.) พบว่าเป็นพวก tetrapolar heterothallic ที่สร้าง basidiospore 4 ชนิดเมื่อนำเส้นใยที่มีกำเนิดจากสปอร์ทั้ง 4 ชนิดมาผสมกันทีละคู่ปรากฏว่า เส้นใยที่มียีน A และยีน B ที่ต่างกันเท่านั้นที่สามารถผสมกันได้โดยเกิด dikaryon และ clamp connection แต่ถ้าผสมระหว่างเส้นใยที่ยีน A เหมือนกัน แต่ยีน B ต่างกัน บริเวณที่เส้นใยพบกันมีการเจริญของเส้นใยตามปกติ แต่ไม่ผสมกลมกลืนกัน เรียกลักษณะนี้ว่า ”flat” แต่ถ้าผสมระหว่างเส้นใยที่ยีน B เหมือนกัน แต่ยีน A ต่างกัน บริเวณที่เส้นใยพบกันมีการเจริญของเส้นใยน้อย ทำให้เกิดเป็นลักษณะเป็นร่อง ซึ่งเรียกลักษณะนี้ว่า “barrage”

วสันณ์ เพชรรัตน์ (2522) ได้ผสมเห็ดตีนแรด (*Tricholoma crassun)* (Berk) Sacc. โดยนำเส้นใยที่เจริญจากสปอร์เดี่ยว มาผสมกันทีละคู่ เส้นใยคู่ใดที่เกิดลักษณะ flat และ barrage แสดงให้เห็นการควบคุมโดยยีน A และ ยีน B ทำให้ทราบถึงจีโนไทป์ของเส้นใยว่ามี 4 แบบ ได้แก่ A_1B_1

A_2B_2 A_1B_2 และ A_2B_1 คู่ผสมที่พัฒนาไปเป็นดอกได้เกิดจากการผสมพันธุ์ของเส้นใยชนิด A_1B_1 x A_2B_2 และ A_1B_2 x A_2B_1

จากการศึกษาดังกล่าวจะเป็นแนวทางในการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์โดยตรง(conventional method) ต่อไป

สารพอลิแซกคาไรด์ในเห็ดหมื่นปี

มีรายงานการวิจัยที่ยืนยันว่า ในเห็ดหมื่นปีมีสารพอลิแซกคาไรด์ซึ่งมีสรรพคุณทางยาดังนี้

ชาลินี คงสวัสดิ์ (2542) รายงานว่า สามารถสกัดสารพอลิแซกคาไรด์จากเส้นใยเห็ดหมื่นปีด้วยน้ำร้อนได้ และหาปริมาณพอลิแซกคาไรด์โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารแอนโทรน หาปริมาณ ดีเอ็นเอโดยวิธีฟีนิลลามีนรีเจนต์ พบว่า ในเห็ดหมื่นปีมีสารพอลิแซกคาไรด์ ซึ่งสายพันธุ์ที่เกิดจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตจะมีปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงกว่าสายพันธุ์เดิมคือจากสายพันธุ์เดิม 5.72 เป็น 10.73 และปริมาณพอลิแซกคาไรด์เป็น 21.28 และ 33.78 มิลลิกรัมต่อเส้นใยน้ำหนักแห้ง 1 กรัม คมศิลป์ พลแดง (2541) พบว่า สามารถสกัดสารพอลิแซกคาไรด์จากเห็ดหมื่นปีด้วยน้ำร้อนเช่นเดียวกัน ปริญญา รัตนพิมาน (2535) รายงานว่า ในเห็ดหมื่นปีมีสาร พอลิแซกคาไรด์ 78 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักดอกแห้ง และเมื่อนำสารสกัดมาฉีดให้แก่หนู สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งในหนูได้ Sone และคณะ. (1985) รายงานว่า เห็ดหมื่นปีมีพอลิแซกคาไรด์ หลายชนิด ได้แก่ กาโนเดอแรนส์ (ganoderrans A B และ C) ช่วยลดน้ำตาลในเลือด สารเบต้าดีกลูแคน (Beta – D – glucan) และพอลิแซกคาไรด์อีกหลายตัวมีฤทธิ์ร่วมกันในการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนในเลือด ไขกระดูก และในตับ ลดการอักเสบ กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาว และพบว่าสาร β (1$\rightarrow$3) – D –glucan มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง Miyasaki and Nishijima (1981) รายงานว่า สารสกัดจากดอกเห็ดหมื่นปี เป็นสารพอลิแซกคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ ประกอบด้วย glucose, xylose และ arabinose ในอัตราส่วน 18.8 : 1.5 :1.0 ตามลำดับ มีผลในการยับยั้ง เนื้องอกชนิด Sarcoma 180 ได้ 95.6 - 98.5 เปอร์เซ็นต์ Lee และคณะ (1984) รายงานว่า สารจำพวกพอลิแซกคาไรด์ มีผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด fibrosacroma ในหนูทดลองและปฏิกิริยาในการต่อต้านมะเร็งของสารสกัดที่ได้จากเห็ดหมื่นนั้นเป็นสารจำพวกพอลิแซกคาไรด์ Landecker (1996) รายงานว่า ในการเจริญของเส้นใยเห็ดและราจะสามารถสร้างและปล่อยสาร พอลิแซกคาไรด์ออกมานอกเซลล์ Ito และคณะ (1977) สามารถแยกสารพอลิแซกคาไรด์ได้ 4 ชนิด จากดอกของเห็ดหมื่นปี ซึ่งมีผลในการยับยั้งเนื้องอกชนิด Sarcoma 180 ในหนูทดลองได้

การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี

มีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี เพื่อนำเส้นใยของเห็ดหมื่นปีมา สกัดสารพอลิแซกคาไรด์ ดังต่อไปนี้

วิมลมาศ บุญมี (2541) รายงานว่า จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี ในอาหารสูตร Potato Dextrose Broth (PDB) ที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคส 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะนิ่งและภายใต้สภาวะเขย่า โดยพบว่าเส้นใยจะเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร PDB ที่มีระดับน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิห้อง สิริลักษณ์ ชัยจำรัส (2536) พบว่า เส้นใยเห็ดหมื่นปีที่เลี้ยงในสูตรอาหาร PDB ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน เห็ดหมื่นปีสามารถปล่อยสารพอลิแซกคาไรด์ออกมาในอาหารเลี้ยงเส้นใยได้เมื่อเลี้ยงแบบภาวะเขย่าและไม่เขย่า มานพ แกล้วกล้า (2533) รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีคือ PDA ทีมี pH 4.0 – 5.0 และอุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส เส้นใยเจริญได้ดีในขี้เลื่อยไม้ยางพารา และไม้เบญจพรรณ เมื่อเปรียบเทียบกับขี้เลื่อยไม้ยาง ไม้เหียง ไม้เปา และไม้สัก Buck และคณะ (1968) พบว่า ระดับน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะต่อการสร้างพอลิแซกคาไรด์ที่ปล่อยออกมานอกเซลล์อยู่ที่ระดับหนึ่งเท่านั้น ถึงแม้จะเพิ่มน้ำตาลก็ไม่มีผลต่อการเจริญของเส้นใย อักษรา อภิลักษณชิต (2538) เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ G008 และสายพันธุ์ G 020 ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เส้นใยเจริญเติบโตเร็วกว่าที่ 25 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscopes) Wilover S, Hund, Germany
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) Universal 16 Hettich, Germany
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) NavaSpce 4049 LKB Biochrom England
4. เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (balance) 80A-200M Pprecisa, Switzerland
5. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
6. ตู้อบแห้ง (hot air oven)
7. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow)
8. เครื่องสกัด (soxlet extraction apparatus)
9. เครื่องดูดอากาศ (suction)
10. กระดาษกรองเบอร์ 4 (filter peper)
11. หลอด (centrifuge tube)
12. อ่างน้ำร้อน (water bath)
13. ทิมเบิล (timble)

เคมีภัณฑ์

1. อาหารสูตร PDA (potato dextrose agar) Difco Laboratories, U.S.A.
2. อาหารสูตร PDB (potato dextrose broth) Difco Laboratories, U.S.A.
3. กรดซัลฟิวริก (cone.sulfuric : H_2SO_4) J.T. Baker Chemical, U.S.A.
4. แป้ง (soluble starch BHD.) Sigma Chemical, U.S.A.
5. ดีเอ็นเอ มาตรฐาน (deoxyribonucleic acid from calf thymus) Sigma Chemical, U.S.A.
6. ไดเฟนีลลามีน (diphenylamine) May and Baker Laboratory, England
7. อเซทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) BDH Laboratory Chemicals, England
8. กรดเพอคลอริค (perchloric acid 70%) J.T. Baker Chemical, U.S.A
9. ไดเอธิล อีเธอร์ (diethyl ether) J.T. Baker Chemical, U.S.A.
10. กรดแอซิติก (acetic acid) J.T. Baker Chemical, U.S.A
11. ฟีนอล คริสตัล (phenal crystals)
12. ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

เชื้อเห็ดหมื่นปีที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อเห็ดหมื่นปี จำนวน 9 สายพันธุ์ จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ สายพันธุ์ MUG001 MUG002 MUG003 MUG004 MUG005 MUG006 MUG100 MUG101 และ MUG003 – UV - cv1

วิธีการวิจัย

1. เตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี จำนวน 9 สายพันธุ์ บนอาหาร 2 ประเภทดังนี้

1.1 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

เตรียมอาหารแข็ง PDA (ภาคผนวก ก) ที่ปลอดเชื้อ ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm ปริมาณ 15 ml เมื่อเส้นใยเจริญจนเกือบเต็มจาน คือรัศมีของเส้นใยห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 0.5 cm ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 cm เจาะเส้นใยนำมาวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm และมีปริมาณ PDA 15 ml

1.2 เลี้ยงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง ที่อุณหภูมิห้อง

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 cm เจาะเส้นใยเห็ดหมื่นปีที่เลี้ยงบนอาหารจากข้อ 1.1 นำมาใส่ในขวดเมล็ดข้าวฟ่าง (ภาคผนวก ก) ที่ปลอดเชื้อ เลี้ยงไว้ 7 วัน เพื่อนำไปเป็นหัวเชื้อ

2. คัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหมื่นปีที่เจริญเติบโตเร็ว

ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหาร 4 ประเภทดังนี้

2.1 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมหัวเชื้อเห็ดหมื่นปีที่ระบุในข้อ 1.1 จะได้เส้นใยเป็นรูปกลมขนาดเท่ากับ cock borer นำมาวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวัดรัศมีเส้นใยเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์ทุกวัน เป็นเวลา 8 วันและหาค่าเฉลี่ยในระยะ log phase ทำการทดลอง 5 ซ้ำ เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างรัศมี(เซนติเมตร) กับระยะเวลา (วัน) ทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดทุกสายพันธุ์

2.2 เลี้ยงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่างที่อุณหภูมิห้อง

เตรียมอาหารเมล็ดข้างฟ่าง กรอกใส่ขวด โดยให้ข้าวฟ่างสูงจากก้นขวด 10 cm นำไปทำให้ปลอดเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 1.1 นำมาใส่ในขวดแบนโดยใส่เส้นใยเพียง 1 ชิ้นต่อขวดวางไว้ให้อยู่ตรงกลางขวด จากนั้นวัดความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยวัดจากคอขวดมายังก้นขวด ทุกวัน เป็นเวลา 15 วันและหาค่าเฉลี่ยในระยะ log phase ทำการทดลอง 5 ซ้ำ และเขียนกราฟระหว่างความยาวของเส้นใยกับระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญ และเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดทุกสายพันธุ์

2.3 เลี้ยงในถุงอาหารขี้เลื่อยที่อุณหภูมิห้อง

นำเส้นใยที่เลี้ยงในเมล็ดข้างฟ่างที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 มาเลี้ยงในถุงอาหารขี้เลื่อย (ภาคผนวก ก) ที่ปลอดเชื้อโดยใส่เมล็ดข้างฟ่างที่มีเส้นใยเห็ดประมาณ 30 เมล็ดในถุงอาหารขี้เลื่อย วัดความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยวัดจากคอถุงมายังก้นถุงทุกวัน เป็นเวลา 38 วันและหาค่าเฉลี่ยในระยะ log phase ทำการทดลอง 5 ซ้ำ เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี (เซนติเมตร) กับระยะเวลา (วัน) ที่ใช้ในการเจริญ และเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดทุกสายพันธุ์

2.4 เลี้ยงบนอาหาร PDB ที่อุณหภูมิห้อง

เตรียมอาหารเหลว PDB (ภาคผนวก ก) ใส่ใน flask ซึ่งมีขนาด 250 ml ปริมาณ 100 ml นำไปทำให้ปลอดเชื้อ ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมในข้อ 1.1 นำมาใส่ใน flask ที่บรรจุอาหารเหลว PDB ที่เตรียมไว้แล้ว โดยใส่เส้นใยเพียง 1 ชิ้นต่อ flask ให้เส้นใยลอยบนผิวหน้าของอาหาร PDB เลี้ยงโดยไม่ต้องเขย่า เก็บเส้นใยทุก 2 วันจนครบ 30 วัน เพื่อนำมาหาน้ำหนักแห้ง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ทั้ง 9 สายพันธุ์ และเขียนกราฟระหว่างน้ำหนักแห้งกับระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญ และเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดทุกสายพันธุ์

3. ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณพอลิแซกคาไรด์โดยเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอในเห็ดทั้ง 9 สายพันธุ์

3.1 การหาปริมาณพอลิแซกคาไรด์

3.1.1 การสกัดพอลีแซกคาไรด์ ทำได้โดยเก็บเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ดังที่ระบุในข้อ 1.2 เป็นเวลา 30 วัน ล้างให้สะอาด จากนั้นนำเส้นใยที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนเส้นใยแห้งมีน้ำหนักคงที่ นำเส้นใยที่อบแห้งมาบดให้ละเอียด และชั่งประมาณ 2 กรัม

ใส่ในทิมเบิล (timble) บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน นำไปสกัดด้วยน้ำร้อนปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยเครื่อง soxhlet extraction apparatus ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 8 ชั่วโมง ทำสารละลายที่ได้ให้เข้มข้น โดยระเหยน้ำออกให้เหลือปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตกตะกอนด้วย เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนสารสกัด 1 มิลลิลิตรต่อเอทานอล 6 มิลลิลิตร และทิ้งให้ตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ประมาณ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกตะกอนออกจากสารละลายโดยปั่นที่ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 95% เอทานอล ทำตะกอนให้แห้งด้วย diethyl ether ละลายตะกอนในน้ำกลั่น วัดปริมาตรสารละลาย นำไปวิเคราะห์ปริมาณพอลีแซกคาไรด์โดยวิธีฟีนอล–ซัลฟิวริก (ภาคผนวก ก) ทำ 3 ซ้ำ

3.1.2นำสารสกัดพอลิแซกคาไรด์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองเพื่อให้สารทำปฏิกิริยาทั่วทั้งหลอด เติมสารละลาย 5 % ฟีนอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 เปรียบเทียบผลกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) จดบันทึกผล

3.2 การหาดีเอ็นเอ

3.2.1 เก็บเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงใน 1.2 เป็นเวลา 30 วัน ขูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเส้นใยให้หมดและล้างให้สะอาด บันทึกน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง บดเส้นใยสดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนด้วยเอทานอล95%ต่อน้ำในอัตราส่วน 4 : 1 จำนวน 3 ครั้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลาย diethyl ether ต่อเอทานอล ในอัตราส่วน 1 : 3 จำนวน 3 ครั้ง ด้วยเติมกรดเปอร์คลอริกปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักเส้นใยสด 1 กรัม และนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปั่นแยกส่วนน้ำใสออก โดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส วัดและบันทึกปริมาตรสารละลาย นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหาปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีไดฟีนิลลามีน

3.2.2 นำสารสกัดดีเอ็นเอปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายไดฟีนิลลามีน (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองเพื่อให้สารทำปฏิกิริยาทั่วทั้งหลอด ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

4. การทำ monosporous culture

นำสารละลายสปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ความเข้มข้น 10^8 – 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารแข็ง PDA ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง เขี่ยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเขี่ยเชื้อยีสต์ยาว 3.5 เซนติเมตร จำนวน 5 เส้นบน PDA ที่มีสปอร์บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการงอกทุกๆ 3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เจาะตัดสปอร์เดี่ยวมาเพาะเลี้ยงต่อไป

5. ผสมระหว่างสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วกับสายพันธุ์ที่มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์สูง

นำสปอร์เดี่ยวที่ได้จากข้อ 4 มาผสมกับเส้นใยเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นการผสมแบบ di-mon mating หรือ Buller phenomenon สังเกตการเกิด clamp connection (Steiner,1967)

6. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและปริมาณพอลิแซกคาไรด์ ระหว่างเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อ-แม่

6.1 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่ โดยหาค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารตามวิธีที่ระบุไว้ข้อ 2.1-2.4

6.2 เปรียบเทียบปริมาณพอลิแซกคาไรด์ระหว่างเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่ และวิเคราะห์หาอัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ ตามวิธีที่ระบุไว้ข้อ 3.1-3.2

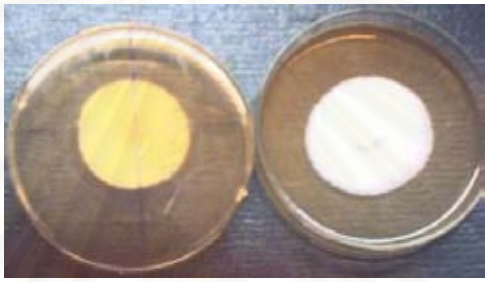
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. เตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงบนอาหาร 2 ประเภทคือ

1.1 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเห็ดหมื่นปี จากการนำเส้นใยเห็ดจาก stock มาเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง PDA ปรากฏว่ามีเส้นใยสีขาวขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ลักษณะของเส้นใยเห็ดหมื่นปีบางสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA

1.2 เลี้ยงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง ที่อุณหภูมิห้อง เลี้ยงเส้นใยบนอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง ที่ปลอดเชื้อเป็นเวลา 7 วัน จะได้เส้นใยสีขาวที่เกาะบนเมล็ดข้าวฟ่าง หลังจากเขย่าขวดก็จะมีเส้นใยเห็ดเกาะกับเมล็ดข้าวฟ่างทั่วทั้งขวด ดังรูปที่ 4

รูปที่ 4 ลักษณะของเส้นใยเห็ดหมื่นปีบางสายพันธุ์ที่เลี้ยงในขวดอาหารข้าวฟ่าง

2. คัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหมื่นปีที่เจริญเติบโตเร็ว

การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหมื่นปีจะเลี้ยงในอาหาร 4 ประเภทคือ

2.1 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง เก็บผลโดยการวัดการเจริญเติบโตของเส้นใยในแนวราบ (linear growth) ค่าเฉลี่ยรัศมีเส้นใยเห็ดหมื่นปีมีค่ามากแสดงว่าเจริญเติบโตเร็ว ผลที่ได้คือ เห็ดทุกสายพันธุ์ มีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นตามตารางที่ 13 (ภาคผนวก ข) ซึ่งสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วที่สุดคือสายพันธุ์ MUG100 รองลงมาคือสายพันธุ์ MUG001 มีค่าเฉลี่ยรัศมีเส้นใยเป็น 2.75 และ 2.64 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตช้าที่สุดคือ MUG002 และ MUG004 มี ค่าเฉลี่ยรัศมีเส้นใยเป็น 2.34 และ 2.21 เซนติเมตร ตามลำดับ แสดงตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต รัศมีเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA

สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยรัศมีเส้นใย (เซนติเมตร)	เส้นใยเดินเต็มจานเลี้ยงเชื้อ(วัน)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
MUG001	2.64	5	1.46
MUG002	2.34	7	1.39
MUG003	2.47	6	1.32
MUG004	2.21	7	1.43
MUG005	2.46	7	1.29
MUG006	2.63	7	1.29
MUG003-UV-cv1	2.62	8	1.35
MUG100	2.75	6	1.37
MUG101	2.61	6	1.33

2.2 เลี้ยงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง ที่อุณหภูมิห้อง

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์ ในอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง โดยวัดการเจริญของเส้นใยในขวดข้าวฟ่างทั้ง 2 ด้าน แล้วหาค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใย เป็นเวลา 15 วัน ผลที่ได้คือ เห็ดทุกสายพันธุ์ มีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงให้เห็นตามตารางที่ 14 (ภาคผนวก ข) สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วที่สุดคือสายพันธุ์ MUG001 รองลงมาคือ

สายพันธุ์ MUG100 มีค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยเป็น 4.98 และ 4.95 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วน สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตช้าที่สุดคือ MUG003-UV-cv1 และ MUG006 มีค่าเฉลี่ยความยาว เส้นใยเป็น 4.65 และ 4.50 เซนติเมตร ตามลำดับ แสดงตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ที่เลี้ยงขวดอาหารข้าวฟ่าง

สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใย (เซนติเมตร)	เส้นใยเดินเต็มขวดข้าวฟ่าง(วัน)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
MUG001	4.98	10	3.54
MUG002	4.91	15	3.46
MUG003	4.73	13	3.49
MUG004	4.79	15	3.52
MUG005	4.70	12	3.38
MUG006	4.50	13	3.46
MUG003-UV-cv1	4.65	14	3.44
MUG100	4.95	12	3.78
MUG101	4.51	11	3.33

2.3 เลี้ยงในอาหารขี้เลื่อย ที่อุณหภูมิห้อง

เลี้ยงเส้นใยในถุงอาหารขี้เลื่อยขนาด 6X9 นิ้ว ซึ่งบรรจุขี้เลื่อยยางพาราประมาณ 500 กรัม เป็นเวลา 30 วัน วัดการเจริญของเส้นใยในถุงขี้เลื่อย โดยวัดที่จุดที่เส้นใยเจริญจากคอถุงลงมา 2 ค่า วัดทุก 2 วันและหาค่าเฉลี่ย ผลที่ได้คือ เห็ดทุกสายพันธุ์ในถุงอาหารขี้เลื่อย มีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นตามตารางที่ 14 (ภาคผนวก ข) สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วที่สุดคือสายพันธุ์ MUG001 รองลงมาคือสายพันธุ์ MUG100 มีค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยเป็น 8.97 และ 8.37 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตช้าที่สุดคือ MUG006 และ MUG004 มีค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยเป็น 7.68 และ 7.04 เซนติเมตร ตามลำดับ แสดงตามตารางที่ 3

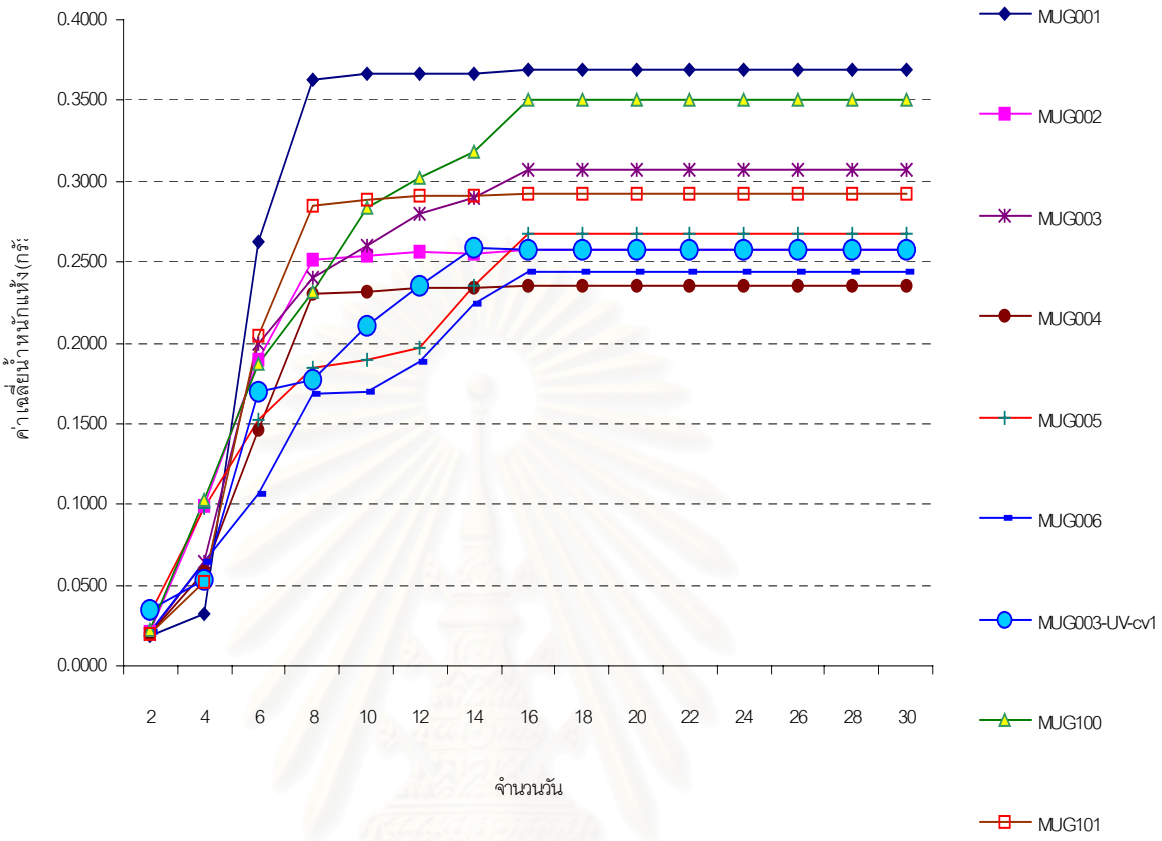
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงถุงอาหารขี้เลื่อย

สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใย (เซนติเมตร)	เส้นใยเดินเต็มถุงขี้เลื่อย(วัน)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
MUG001	8.97	30.00	3.81
MUG002	7.77	34.00	3.74
MUG003	8.20	34.00	3.74
MUG004	7.04	36.00	3.62
MUG005	7.99	34.00	3.78
MUG006	7.68	36.00	3.80
MUG003-UV-cv1	7.69	38.00	3.63
MUG100	8.37	32.00	3.70
MUG101	8.29	34.00	3.77

2.4 เลี้ยงในอาหารเหลว PDB

การเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว PDB ก็เพื่อหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง (dry weight) ซึ่งพบว่าในระยะ stationary phase คือตั้งแต่วันที่ 16 จนถึงวันที่ 30 เห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG001 มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยมากที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์ MUG100 ส่วนสายพันธุ์ที่มีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดคือ MUG006 และ MUG004 ตามลำดับ แสดงให้เห็นตารางที่ 24 (ภาคผนวก ง)

เห็ดหมื่นปีส่วนใหญ่จะมีอัตราการเจริญเติบโตระยะ log phase ในวันที่ 4 ถึงวันที่ 14 และเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 16 ของการเจริญเติบโต ยกเว้นสายพันธุ์ MUG001 และ MUG101 และ MUG100 ที่เข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 10 ของการเจริญเติบโต ตามรูปที่ 5



รูปที่ 5 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวPDB

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วที่คัดเลือกได้

โดยพิจารณาค่าเฉลี่ยจากอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย ในข้อ 2.1 – 2.3 ประกอบกับพิจารณาปริมาณน้ำหนักแห้งในข้อ 2.4 พบว่า สายพันธุ์ที่เจริญเร็วและมีปริมาณน้ำหนักแห้งมากที่สุดได้แก่ MUG001 รองลงมาคือ MUG100 ซึ่งวัดค่าเฉลี่ยรัศมีโคโลนีในอาหารแข็ง PDA เป็น 2.64 และ 2.75 เซนติเมตร ตามลำดับ วัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในขวดอาหารข้าวฟ่าง เป็น 8.97 และ .4.95 เซนติเมตร ตามลำดับ และวัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในถุงอาหารขี้เลื่อย เป็น และ.8.37 เซนติเมตร ตามลำดับ แสดงตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด

สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยรัศมีโคโลนีในอาหารแข็ง PDA (เซนติเมตร)	ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในขวดอาหารข้าวฟ่าง (เซนติเมตร)	ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในถุงอาหารขี้เลื่อย (เซนติเมตร)
MUG001	2.64	4.98	8.97
MUG002	2.34	4.91	7.77
MUG003	2.47	4.73	8.20
MUG004	2.21	4.79	7.04
MUG005	2.46	4.70	7.99
MUG006	2.63	4.50	7.68
MUG003-UV-cv1	2.62	4.65	7.69
MUG100	2.75	4.95	8.37
MUG101	2.61	4.51	8.29

3. ผลการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณพอลิแซกคาไรด์ในเห็ดทั้ง 9 สายพันธุ์

นำเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ โดยวิธีฟีนอล–ซัลฟิวริก วิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีไดฟีนิลามีนรีเจนต์ และเทียบอัตราส่วนระหว่างพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ พบว่า เห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตารางที่ 16 สายพันธุ์ MUG001 มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์มากที่สุด คือ 48.94 มิลลิกรัมต่อ เส้นใยแห้ง 1 กรัม รองลงมาคือ MUG003 UV-cv1 มี 33.78 มิลลิกรัมต่อเส้นใยแห้ง 1 กรัม สายพันธุ์ MUG001 มีปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดคือ 4.91 มิลลิกรัมต่อเส้นใยแห้ง 1 กรัม รองลงมาคือ MUG100 มี 4.13 มิลลิกรัมต่อเส้นใยแห้ง 1 กรัม และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วน

พอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ พบว่าสายพันธุ์ MUG001 สายพันธุ์ MUG003 UV-cv1 มีอัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูง ตามลำดับคืออัตราส่วนเป็น 9.97 และ 9.79 แสดงผลตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณพอลิแซกคาไรด์ ปริมาณดีเอ็นเอ และอัตราส่วนระหว่างปริมาณพอลิแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ ของเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์

สายพันธุ์	ปริมาณพอลิแซกคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อเส้นใยแห้ง 1 กรัม)	ปริมาณ DNA (มิลลิกรัม ต่อเส้นใยแห้ง 1 กรัม)	อัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ
MUG001	48.94	4.91	9.97
MUG003	21.99	3.78	5.82
MUG002	12.44	2.42	5.14
MUG005	12.02	2.57	4.67
MUG006	11.70	2.69	4.35
MUG004	11.20	2.85	3.92
MUG003-UV-cv1	33.78	3.45	9.79
MUG100	32.73	4.13	7.93
MUG101	24.78	3.45	7.17

4. การทำ monosporous culture

จากการศึกษาการงอกของสปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG001 และ สายพันธุ์ MUG100 โดยการนำจานอาหารที่มีสปอร์อาศัยเพศอยู่ เขี่ยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ยาว 3.5 เซนติเมตร จำนวน 5 เส้น บ่มที่อุณหภูมิห้องพบว่า MUG001 มีการงอกของสปอร์10 สปอร์ คิดเป็นประมาณ 10 ใน 10^8 –10^9 สปอร์ กำหนดชื่อเป็น MUG001(1) ถึง MUG001(10) และสายพันธุ์ MUG100 มีการงอกของ สปอร์ 8 สปอร์ คิดเป็นประมาณ 8 ใน 10^8 –10^9 สปอร์ กำหนดชื่อเป็น MUG100(1) ถึง MUG001(8) ตามลำดับ

5. ผสมระหว่างสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วกับสายพันธุ์ที่มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์สูง

นำโคโลนีที่ได้สปอร์เดี่ยว จากข้อ 4 มาผสมกับเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นการผสมแบบ Buller phenomenon .ซึ่งให้ผล 3 ลักษณะคือลักษณะแรกเป็น barrage สามารถสังเกตได้โดยดูที่ด้านล่างของจานเลี้ยงเชื้อ จะเห็นเป็นร่อง เนื่องจากเส้นใยไม่ผสมกลมกลืนกัน ทำให้แห็นความแตกต่างของสายพันธุ์เห็ดทั้งสองได้อย่างชัดเจน ดังรูปที่ 6 ลักษณะที่ 2 เป็น flat คือเป็น

ลักษณะที่เส้นใยเดินปกติ แต่เป็นบริเวณที่มีการเจริญของเส้นใยน้อย ส่วนลักษณะสุดท้ายเป็น compatible คือลักษณะที่เส้นใยเดินปกติและเส้นใยผสมกลมกลืนกัน ตรวจเส้นใยทั้งสองสายพันธุ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แสดงผลการ ผสมพันธุ์แสดง ตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การผสมพันธุ์ระหว่าง monokaryon กับ dikaryon

ผสมสายพันธุ์		ลักษณะลูกผสมที่เกิด		
monokaryon	dikaryon	barrage	flat	Compatible
MUG001(1)	MUG002	/	-	-
MUG001(2)	MUG003	/	-	-
MUG001(3)	MUG004	/	-	-
MUG001(4)	MUG005	/	/	-
MUG001(5)	MUG006	-	/	-
MUG001(6)	MUG003-UV-cv1	-	-	/
MUG001(7)	MUG100	-	-	/
MUG001(8)	MUG101	-	-	/
MUG100(1)	MUG002	/	/	-
MUG100(2)	MUG003	-	/	-
MUG100(3)	MUG004	-	/	-
MUG100(4)	MUG005	-	/	-
MUG100(5)	MUG006	-	/	-
MUG100(6)	MUG003-UV-cv1	-	-	/
MUG100(7)	MUG101	-	-	/

รูปที่ 6 ลักษณะ barrage

6. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและปริมาณพอลิแซกคาไรด์ ระหว่างเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อ-แม่

6.1 ผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่ โดยวัดอัตราการเจริญของเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารแข็ง PDA ในขวดอาหารข้าวฟ่าง และในถุงอาหารขี้เลื่อย แสดงตามตารางที่ 7

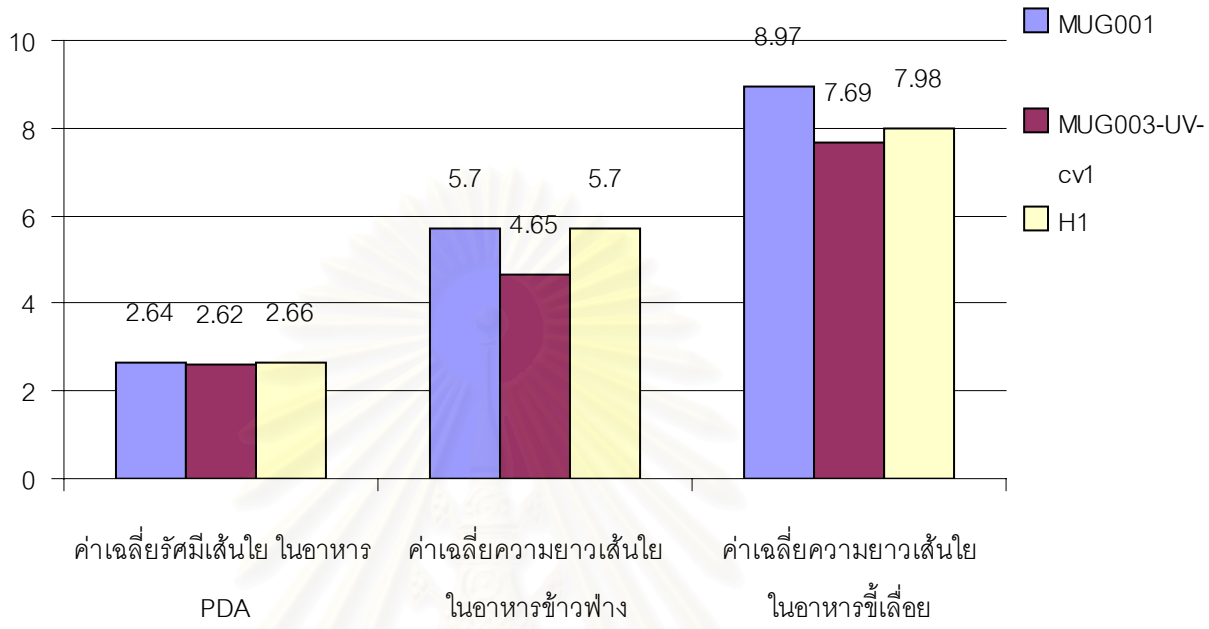
ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญ ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปีระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H1-H5 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด

สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยใน PDA	ค่าเฉลี่ยใน PDB	ค่าเฉลี่ยในถุงขี้เลื่อย	ค่าเฉลี่ยในข้าวฟ่าง
H1	2.67	0.2556	10.48	6.27
MUG001	3.14	0.3243	13.08	6.66
MUG003-UV-cv1	2.65	0.2137	9.77	9.10
H2	2.98	0.3034	12.81	6.03
MUG001	3.14	0.3243	13.08	6.66
MUG100	3.06	0.2832	12.06	5.96
H3	2.69	0.2978	12.51	6.43
MUG001	3.14	0.3243	13.08	6.66
MUG101	2.96	0.2515	11.48	5.98
H4	2.75	0.2766	10.20	5.90
MUG100	3.06	0.2832	12.06	5.96
MUG003-UV-cv1	2.65	0.2137	9.77	9.10
H5	2.82	0.2733	11.55	6.06
MUG100	3.06	0.2832	12.06	5.96
MUG101	2.96	0.2515	11.48	5.98

6.1.1จากผลการศึกษา ค่าเฉลี่ยรัศมีโคโลนีในอาหารแข็ง PDA ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในขวดอาหารข้าวฟ่าง และค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในถุงอาหารขี้เลื่อย พบว่า สายพันธุ์ลูก H1 มีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

H1 มีอัตราการเจริญเติบโตในอาหารแข็ง PDA ใกล้เคียงกับพ่อแม่ แต่อัตราการเจริญเติบโตในข้าวฟ่างและขี้เลื่อยอัตราการเจริญเติบโตอยู่ระหว่างพ่อและแม่ แสดงให้เห็นชัดเจนตามรูปที่ 7

เซนติเมตร



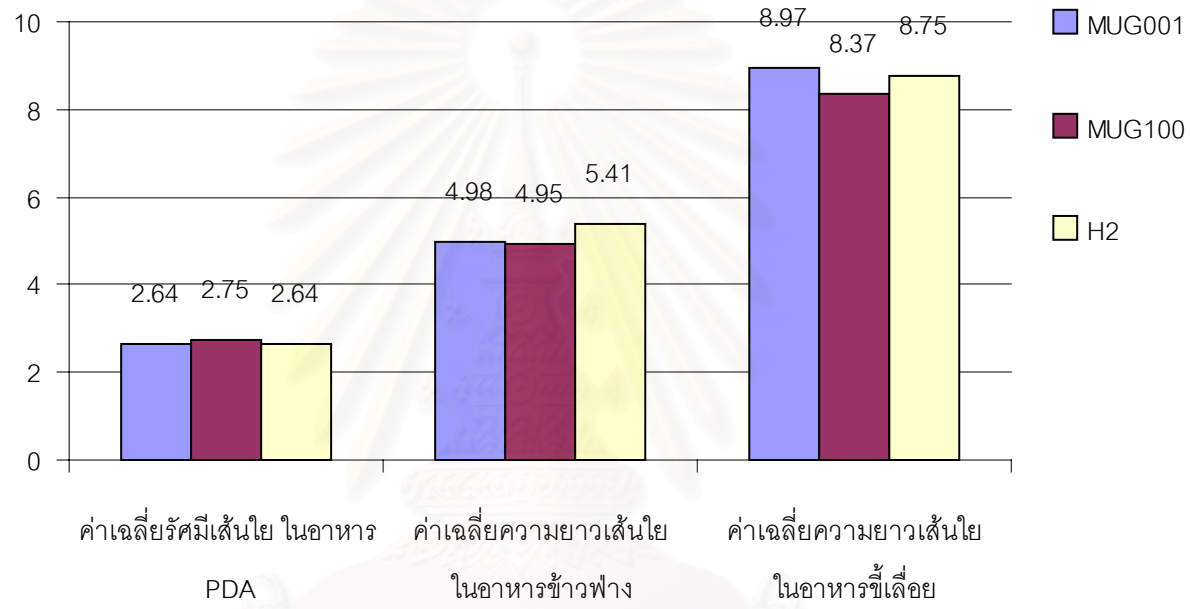
รูปที่ 7 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H1 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.1.2 จากผลการศึกษา ค่าเฉลี่ยรัศมีโคโลนีในอาหารแข็ง PDA ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในขวดอาหารข้าวฟ่าง และค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในถุงอาหารขี้เลื่อย พบว่า สายพันธุ์ลูกผสม H2 มีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

H2 เจริญเติบโตในอาหารแข็ง PDA และขี้เลื่อยได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์พ่อแม่ แต่ในข้าวฟ่างเจริญได้ดีกว่าพ่อแม่ และแสดงให้เห็นชัดเจนตาม รูปที่ 8

เซนติเมตร

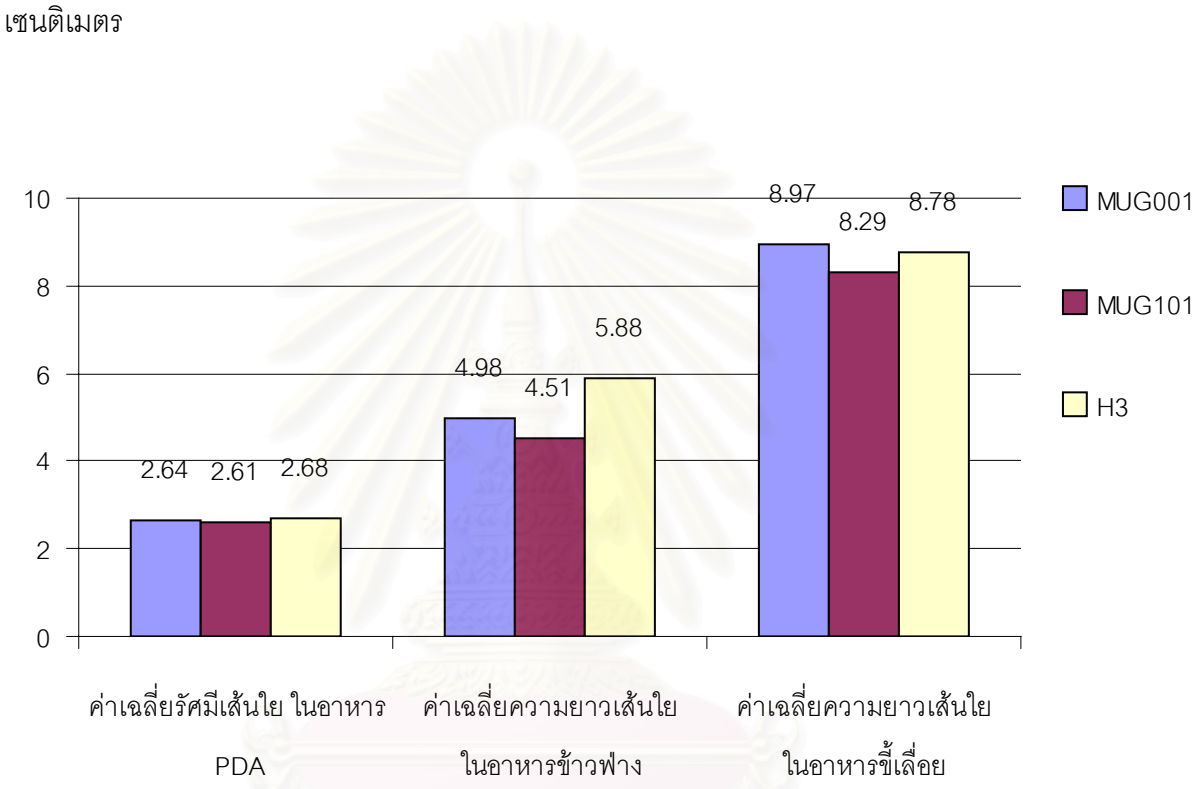


รูปที่ 8 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H2 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.1.3 จากผลการศึกษา ค่าเฉลี่ยรัศมีโคโลนีในอาหารแข็ง PDA ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในขวดอาหารข้าวฟ่าง และค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในถุงอาหารขี้เลื่อย พบว่า สายพันธุ์ลูก H3 มีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

H3 เจริญเติบโตในอาหารแข็ง PDA และขี้เลื่อยได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์พ่อแม่ แต่ในข้าวฟ่างเจริญได้ดีกว่าพ่อแม่ และแสดงให้เห็นชัดเจนตาม รูปที่ 9

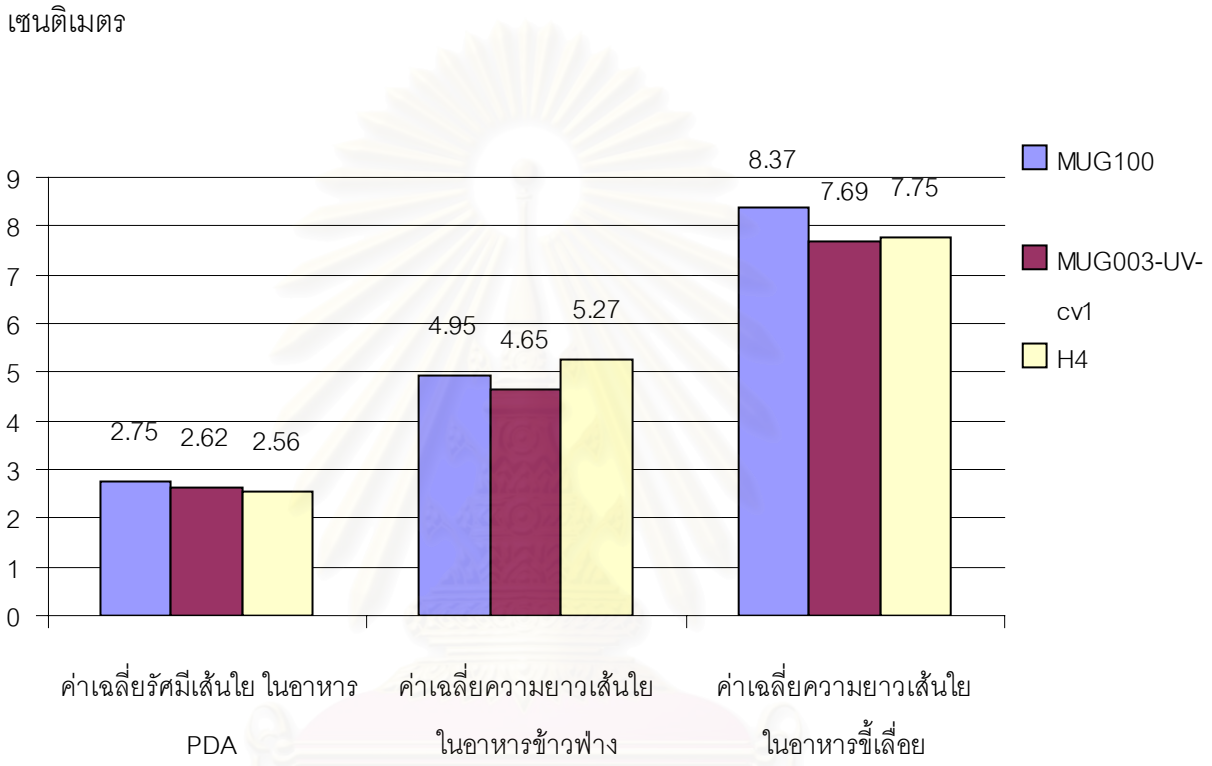


รูปที่ 9 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H3 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

6.1.4 จากผลการศึกษา ค่าเฉลี่ยรัศมีโคโลนีในอาหารแข็ง PDA ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในขวดอาหารข้าวฟ่าง และค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในถุงอาหารขี้เลื่อย พบว่า สายพันธุ์ลูก H4 มีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

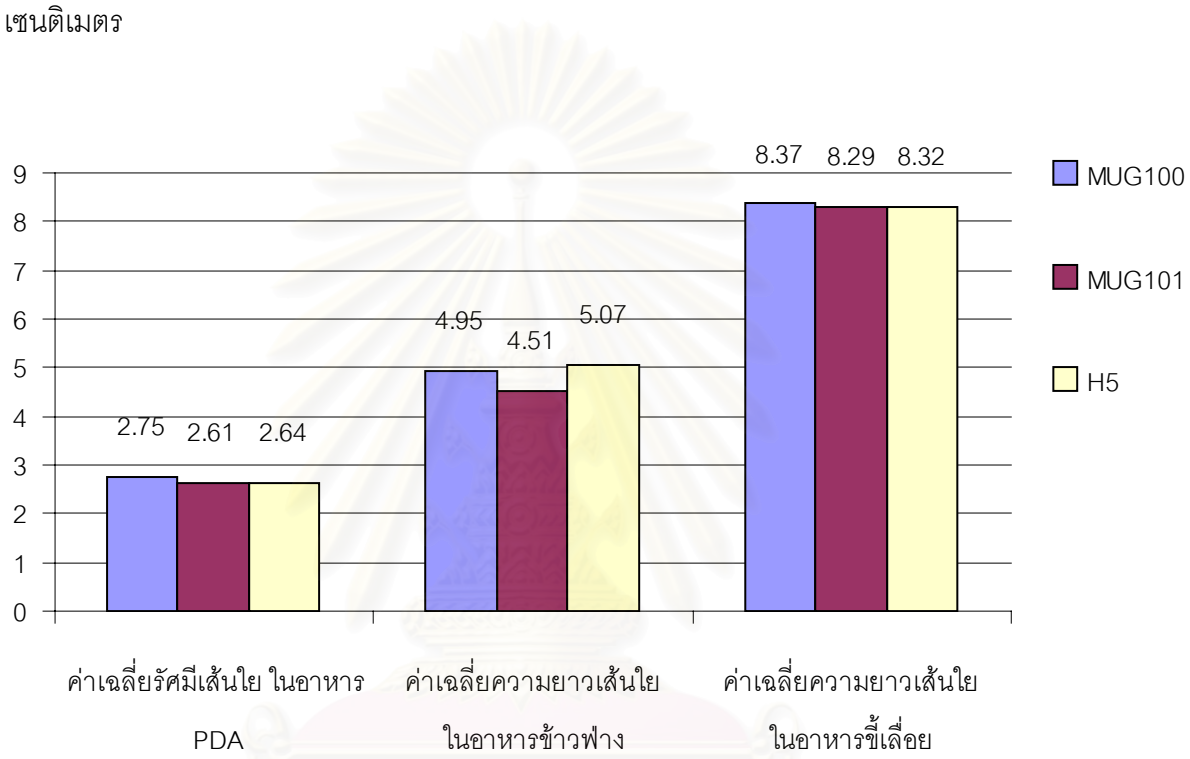
H4 เจริญเติบโตในอาหารแข็ง PDA และขี้เลื่อยได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์พ่อแม่ แต่ในข้าวฟ่างเจริญได้ดีกว่าพ่อแม่ และแสดงให้เห็นชัดเจนตาม รูปที่ 10



รูปที่ 10 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H4 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

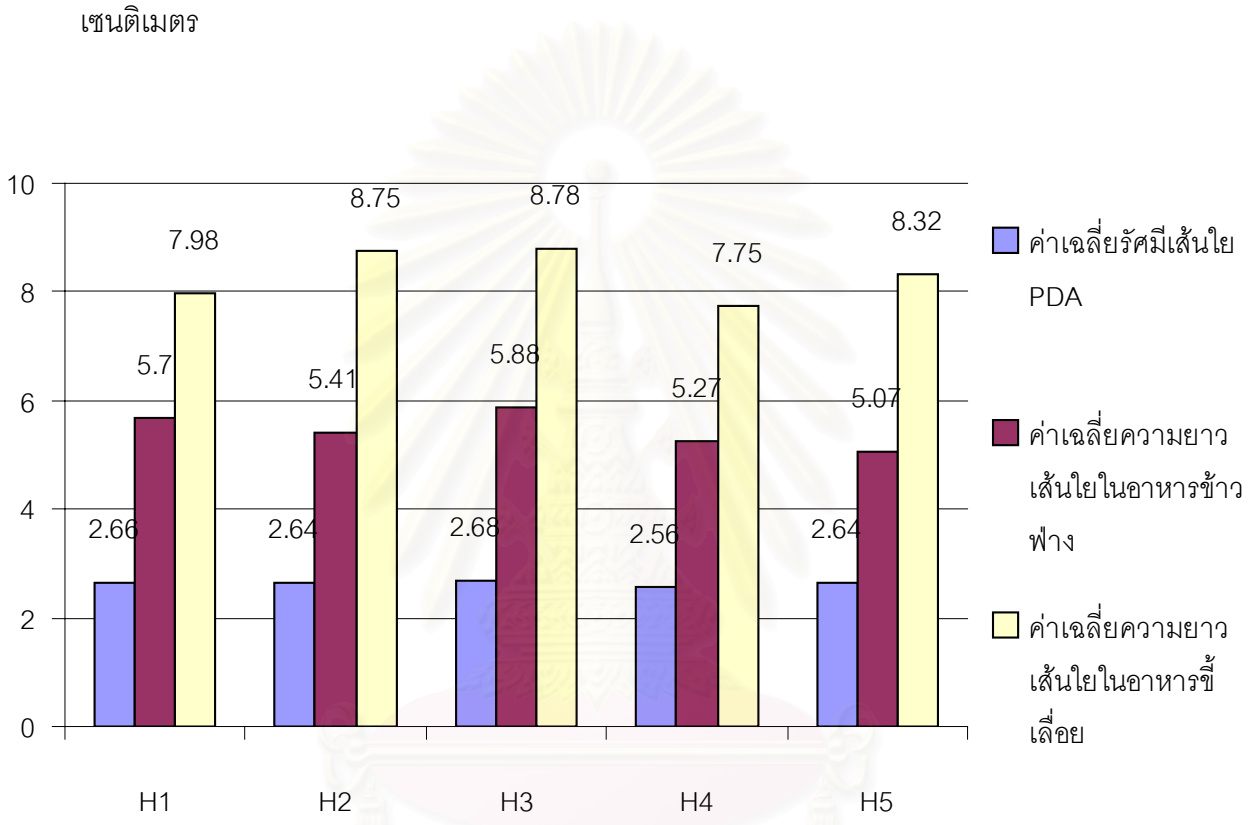
6.1.5 จากผลการศึกษา ค่าเฉลี่ยรัศมีโคโลนีในอาหารแข็ง PDA ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในขวดอาหารข้าวฟ่าง และค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในถุงอาหารขี้เลื่อย พบว่า สายพันธุ์ลูก H5 มีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแสดงให้เห็นชัดเจนตาม รูปที่ 11



รูปที่ 11 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปี ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H5 กับสายพันธุ์พ่อแม่ ในอาหาร 3 ชนิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

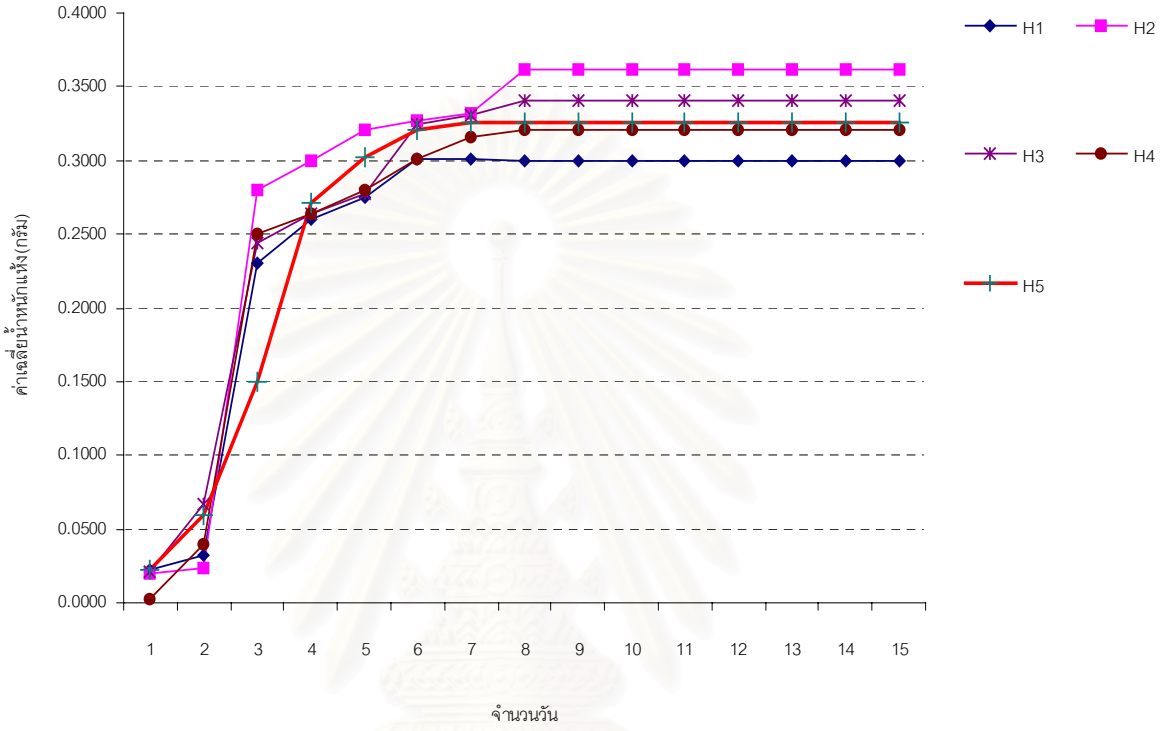
6.1.6 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า ค่าเฉลี่ยรัศมีโคโลนีในอาหารแข็ง PDA ค่าเฉลี่ยรัศมีเส้นใยในขวดอาหารข้าวฟ่าง ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในขวดอาหารข้าวฟ่าง ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในถุงอาหารขี้เลื่อย H3 มีค่าเฉลี่ยสูงสุด ให้เห็นชัดเจนตามรูปที่ 12



รูปที่ 12 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใยเห็ดหมื่นปีระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ ในอาหาร 3 ชนิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.2 ผลการศึกษา อัตราการเจริญเติบโตของเห็ดหมื่นปี H1-H5 พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตระยะ log phase ในวันที่ 4 ถึงวันที่12 และเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 16 ของการเจริญเติบโต เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำหนักแห้งโดยเฉลี่ยในอาหารเหลว PDB ในระยะ stationary phase มีน้ำหนักใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์พ่อแม่ แสดงตามรูปที่ 13



รูปที่ 13 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหมื่นปีระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว PDB

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

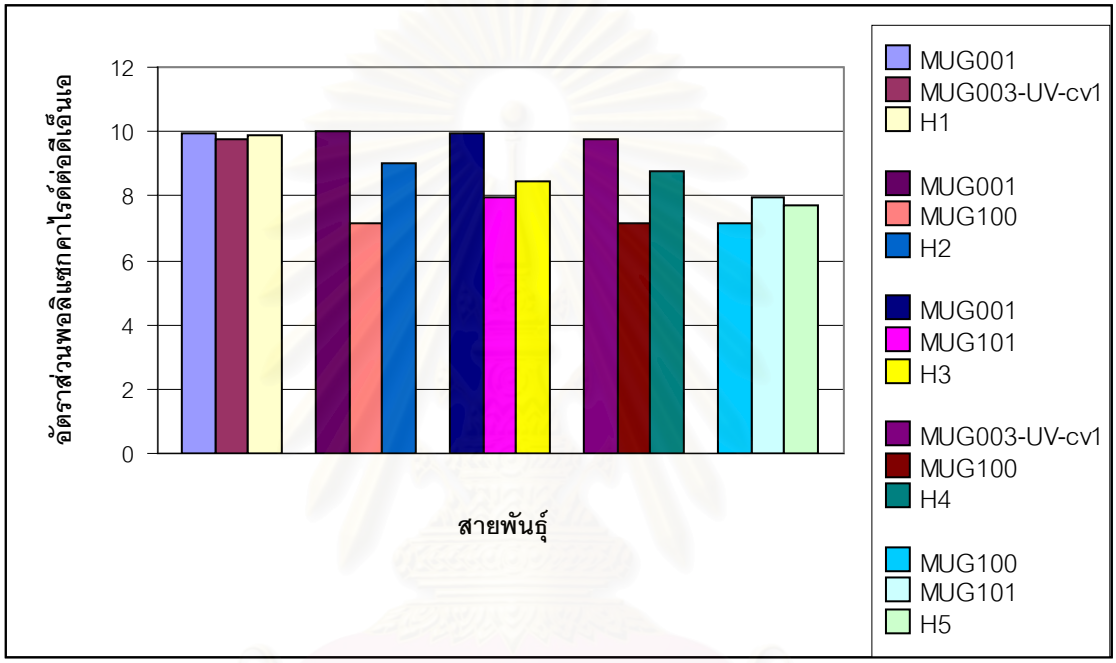
6.3 ผลเปรียบเทียบปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อเส้นใยแห้ง ปริมาณดีเอ็นเอต่อเส้นใยแห้ง และอัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่ ตามตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ปริมาณพอลิแซกคาไรด์ ปริมาณดีเอ็นเอ และอัตราส่วนระหว่างปริมาณพอลิแซคคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม H1-H5 กับสายพันธุ์พ่อแม่

สายพันธุ์	ปริมาณพอลิแซกคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อ เส้นใยแห้ง 1 กรัม)	ดีเอ็นเอต่อพอลิแซกคาไรด์ (มิลลิกรัม ต่อ เส้นใยแห้ง 1 กรัม)	อัตราส่วน พอลิแซคาไรด์ ต่อดีเอ็นเอ
MUG001	48.94	4.91	9.97
MUG003-UV-cv1	33.78	3.45	9.79
H1	29.12	2.95	9.87
MUG001	48.94	4.91	9.98
MUG100	24.78	3.45	7.17
H2	26.18	2.91	8.99
MUG001	48.94	4.91	9.97
MUG101	32.73	4.13	7.93
H3	19.78	2.34	8.44
MUG003-UV-cv1	33.78	3.45	9.79
MUG100	24.78	3.45	7.17
H4	30.64	3.51	8.74
MUG100	24.78	3.45	7.17
MUG101	32.73	4.13	7.93
H5	25.09	3.24	7.74

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พบว่า H1-H5 มีอัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ตารางที่ 16 (ภาคผนวกข) สายพนธุ์ลูกผสม H1 และH5 อัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอใกล้เคียงสายพันธุ์พ่อแม่ และสายพันธุ์ลูกผสม H2-H4 อัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอvอยู่ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม แสดงตามรูปที่ 14



รูปที่ 14 กราฟเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอของเห็ดหมื่นปี ระหว่างสายพันธุ์ลูกผสม5 สายพันธุ์กับสายพันธุ์พ่อแม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกพันธุ์เห็ดหมื่นปีที่เจริญเติบโตเร็ว ในอาหาร 4 ประเภท

1.1 จากการทดลองนี้ เลี้ยงเส้นใยเห็ดทั้ง 9 สายพันธุ์ บนอาหาร 4 ประเภท คืออาหารแข็ง PDA เมล็ดข้าวฟ่าง ขี้เลื่อย และอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิห้อง เห็ดทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเห็ด *G. lucidum* ซึ่งการเจริญของเส้นใยต้องการอุณหภูมิค่อนข้างสูง เช่นเดียวกับเห็ดที่พบในเขตร้อน เช่นเดียวกับ เห็ดนางรม เห็ดฟาง เห็ดหูหนู Adaskaveg และ Gibertson (1986) รายงานว่าเส้นใยเห็ดหมื่นปี เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-34 องศาเซลเซียส

1.2 ขี้เลื่อยที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นขี้เลื่อยจากไม้ยางพารา ซึ่งเห็ดหมื่นปีสามารถเจริญได้ดีกว่าขี้เลื่อยจากไม้ชนิดอื่น ปรีชา กลิ่นเกษร (2530) เพาะเห็ดหมื่นปีด้วยขี้เลื่อยไม้ยางพารา พบว่าเส้นใยจะเจริญเต็มถุงใช้เวลา 28-30 วัน มานพ แกล้วกล้า (2533) พบว่าเส้นใยเห็ดหมื่นปีเจริญได้ในขี้เลื่อยไม้ยางพาราและไม้เบญจพรรณ ดีกว่าขี้เลื่อยไม้ยาง ไม้เหียง ไม้เปา และไม้สัก ซึ่งเห็ดสกุล *Ganoderma* ที่พบในประเทศไทยอาจเพาะเลี้ยงได้บนขี้เลื่อยไม้เนื้อค่อนข้างแข็ง

1.3 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเห็ดหมื่นปี ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง PDA ข้าวฟ่าง และขี้เลื่อย เป็นการวัดขนาด และปริมาณ ของเส้นใย แต่การเลี้ยงในอาหารเหลว PDB จะคำนึงถึงความหนาแน่นของเส้นใย ซึ่งจากอัตราการเจริญเติบโตมีผลต่อความหนาแน่นและน้ำหนักของเส้นใย ดังนั้นสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วจึงมีความหนาแน่นของเส้นใยมาก และมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยมากกว่าสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตช้า

1.4 เห็ดหมื่นปีแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้อาหารได้ต่างกัน เพราะในอาหารแต่ละประเภทมีส่วนประกอบต่างกัน คือในอาหารแข็ง PDA และอาหารเหลว PDB มีน้ำตาล ในข้าวฟ่างมีสารจำพวกแป้ง ส่วนในขี้เลื่อย เป็นสารพวกเซลลูโลสและลิกนิน ดังนั้นเห็ดบางสายพันธุ์อาจเจริญในอาหารแข็ง PDA ได้ดีกว่าในถุงอาหารขี้เลื่อยก็ได้

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วที่สุด ที่ควรเลือกมาทดลองขั้นต่อไป คือสายพันธุ์ MUG001 และ MUG100

2. ศึกษาปริมาณพอลิแซกคาไรด์โดยเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอ

2.1 ปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อหน่วยดีเอ็นเอของเซลล์

เส้นใยของเห็ดหมื่นปีแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีผนังกั้นและแตกกิ่งก้านสาขาออกไปมากมาย และเซลล์แต่ละเซลล์ที่มีผนังกั้นนั้นจะมีขนาดที่ไม่เท่ากันทุกเซลล์ ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซกคาไรด์ถึงแม้จะใช้น้ำหนักของเส้นใยเท่ากัน แต่จำนวนเซลล์ไม่เท่ากัน เพราะฉะนั้นปริมาณพอลิแซกคาไรด์ที่วิเคราะห์ได้มานั้น อาจจะไม่ได้มาจากจำนวนเซลล์ที่เท่ากัน จึงจำเป็นต้องหาปริมาณดีเอ็นเอ และหาอัตราส่วนระหว่างปริมาณพอลิแซกคาไรด์กับปริมาณดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อหน่วยดีเอ็นเอของเซลล์ (ชาลินี คงสวัสดิ์, 2542)

2.2 ปริมาณพอลิแซกคาไรด์

ปริมาณพอลิแซกคาไรด์ในเห็ดหมื่นปี 9 สายพันธุ์ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก พบว่าปริมาณพอลิแซกคาไรด์ของสายพันธุ์ MUG001 มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์มากที่สุด รองลงมาคือ MUG003-UV-cv1 และ MUG100 เป็น 48.94 และ 33.78 มิลลิกรัมต่อเส้นใยแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นอีก 6 สายพันธุ์มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำกว่า 3 สายพันธุ์นี้เล็กน้อย แต่ปริมาณพอลิแซกคาไรด์ที่วัดได้ในการทดลองนี้ ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นพอลิแซกคาไรด์ชนิดใด เพราะการวัดปริมาณพอลิแซกคาไรด์ในการทดลองนี้เป็นการวัดปริมาณพอลิแซกคาไรด์โดยรวม ถ้าต้องการทราบชนิดของพอลิแซกคาไรด์ จะต้องมีการตรวจสอบต่อไป

2.3 ปริมาณดีเอ็นเอ

สำหรับปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดหมื่นปี 9สายพันธุ์ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีฟีนีลามีนรีเจนต์ พบว่าปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ MUG001 มากที่สุด รองลงมาคือ MUG003 และ MUG100 เป็น 4.91 4.13 และ 3.78 มิลลิกรัมต่อเส้นใยแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์อื่นอีก 6 สายพันธุ์มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำกว่า 3 สายพันธุ์นี้เล็กน้อย

2.4 อัตราส่วนปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ

พบว่าอัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG001 สูงสุด รองลงมาคือ MUG003 –UV-cv1 และ MUG101 คือมีอัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ เป็น 9.97 9.79 และ 7.93 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์อื่นอีก 6 สายพันธุ์มีปริมาณดีเอ็นเอต่ำกว่า 3 สายพันธุ์นี้เล็กน้อย

3. การทำ monosporous culture

การเลี้ยงร่วมกับยีสต์ พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* สามารถกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ที่งอกยากของเห็ดบางชนิดได้ ซึ่งเป็นผลมาจากกรดไอโซวาเลริก (isovaleric acid) และกรดไขมันสายยาว (long –chain fatty acid) ที่ปล่อยออกมาจาก *Saccharomyces cerevisiae* ทำให้ สปอร์นั้นเกิดการงอกได้ (Moore – Landecker, 1990) ในการทดลองเลี้ยง สปอร์ของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG001 และ MUG100 บนอาหารแข็งพีดีเอ เขี่ยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเขี่ยเชื้อยีสต์ยาว 3.5 เซนติเมตร จำนวน 5 เส้นบ่มที่อุณหภูมิห้องพบว่าสปอร์แบบอาศัยเพศสามารถงอกได้แต่งอกได้ยากและมีจำนวนน้อยมาก คือสายพันธุ์ MUG001 มีการงอกของสปอร์ 10 โคโลนี คิดเป็นประมาณ 10 ใน 10^8 –10^9 สปอร์ และสายพันธุ์ MUG100 มีการงอกของ สปอร์ 8 สปอร์ คิดเป็นประมาณ 8 ใน 10^8 –10^9 สปอร์ ซึ่งTriratana และ Chaiprasert (1991) รายงานว่า สามารถชักนำให้เกิดการงอกของสปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปีได้ โดยแยกโคโลนีที่เกิดจากการงอกของสปอร์อาศัยเพศได้เพียง 14 โคโลนีเท่านั้น

4. ผสมระหว่างสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วกับเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์

การผสมพันธุ์เป็นแบบ di-mon mating หรือ Buller phenomenon เป็นการนำเอาเส้นใยจาก monosporous cultur มาผสมกับเส้นใยที่เป็น dikaryon culture ทำให้ได้ลูกผสมแบบที่เป็น compatible นั้นแสดงว่ามีปัจจัยทางพันธุกรรม (genetic factors) เป็น A_1B_1 + A_2B_2 สำหรับสายพันธุ์ที่เป็น dikaryon และ A_3B_3 สำหรับสายพันธุ์ที่เป็น monosporous culture จึงได้มาทั้งหมด 5 สายพันธุ์คือ ลูกผสม H1 H2 H3 H4 และ H5 ซึ่งสามารถผสมกันได้ ส่วนอีกสายพันธุ์อาจเป็นพวก semi – compatible มีปัจจัยทางพันธุกรรมเป็น (A_1B_1 + A_2B_2) X A_1B_1ทำได้ลักษณะ culture เป็นแบบ flat ส่วนพวกสุดท้ายได้แก่พวก Incompatible มีปัจจัยทางพันธุกรรมแบบ (A_1B_1 + A_2B_2) X A_1B_2 พวกนี้จะมีลักษณะของ culture เป็นแบบ barrage จะเห็นรอยที่ ผิวหน้าของเส้นใย ดังนั้นจึงเลือกลูกผสมทั้ง 5 คือ H1 H2 H3 H4 และ H5 มาทดสอบต่อไป (Steiner ,1967)

5. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและปริมาณพอลิแซกคาไรด์ ระหว่างเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อ-แม่

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและปริมาณพอลิแซกคาไรด์ ระหว่างเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อ-แม่ แล้ว จะเห็นได้ว่าลูกผสมไม่ได้แสดงลักษณะที่เข้ากลุ่มสายพันธุ์พ่อแม่ดังนั้นลักษณะการเจริญเติบโตน่าจะเป็นลักษณะที่ควบคุมโดย polygenes แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. คัดเลือกพันธุ์เห็ดหมื่นปีที่เจริญเติบโตเร็ว ในอาหาร 4 ประเภท

1.1 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

พบว่าสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วที่สุด จนถึงช้าที่สุด ได้แก่ สายพันธุ์ MUG100 รองลงมาคือสายพันธุ์ MUG001 MUG006 MUG003-UV-cv1 MUG101 MUG003 MUG002 MUG006 และ MUG004 ตามลำดับ

1.2 เลี้ยงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง ที่อุณหภูมิห้อง

การเจริญของเส้นใยที่เจริญเติบโตเร็วที่สุด จนถึงช้าที่สุด ได้แก่ MUG001 รองลงมาคือสายพันธุ์ MUG100 MUG002 MUG003 MUG004 MUG005 MUG003-UV-cv1 MUG101 และ MUG006 ตามลำดับ

1.3 เลี้ยงในอาหารขี้เลื่อย ที่อุณหภูมิห้อง

พบว่าสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วที่สุด จนถึงช้าที่สุด ได้แก่ MUG001 รองลงมาคือสายพันธุ์ MUG100 MU101 MUG003 MUG005 MUG002 MUG003-UV-cv1 MUG006 และ MUG004 ตามลำดับ

1.4 เลี้ยงบนอาหารเหลว PDB

เห็ดหมื่นปีส่วนใหญ่จะมีอัตราการเจริญเติบโตระยะ log phase ในวันที่ 4 ถึงวันที่ 14 และเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 16 ของการเจริญเติบโต

2. ผลการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณพอลิแซกคาไรด์โดยเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอ ในเห็ดหมื่นปีทั้ง 9 สายพันธุ์

สรุปว่า สายพันธุ์เห็ดหมื่นปีที่มีปริมาณพอลีแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอสูงสุด จนถึงต่ำที่สุดได้แก่ สายพันธุ์ MUG001 รองลงมาคือ MUG003-UV-cv1 MUG100 MUG101 MUG003 MUG002 MUG005 MUG006 และ MUG004 ตามลำดับ

3. การทำ monosporous culture

จากการศึกษาการงอกของสปอร์อาศัยเพศของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ MUG001 และ สายพันธุ์ MUG100 พบว่า MUG001 มีการงอกของสปอร์10 สปอร์ คิดเป็นประมาณ 10 ใน 10^8 –10^9 สปอร์ และสายพันธุ์ MUG100 มีการงอกของ สปอร์ 8 สปอร์ คิดเป็นประมาณ 8 ใน 10^8 –10^9 สปอร์

4. ผสมระหว่างสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วกับสายพันธุ์ที่มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์สูง

การผสมพันธุ์แบบ Buller phenomenon ได้สายพันธุ์ลูกผสมที่เป็น compatible 5 สายพันธุ์คือ H1 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG003-UV-cv1 H2 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG100 H3 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG101 H4 ลูกผสมระหว่าง MUG100 กับ MUG003-UV-cv1 และ H5 ลูกผสมระหว่าง MUG100 กับ MUG101

5. เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและปริมาณพอลิแซกคาไรด์ ระหว่างเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อ-แม่

ผลที่ได้ คือได้ลูกผสมสายพันธุ์ H1 เจริญเร็วที่สุด และมีปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอมากสุด ซึ่งเป็นลูกผสมที่มาเกิดพ่อและแม่ที่โตเร็วและมีปริมาณพอลิแซกคาไรด์สูงสุด ส่วนลูกผสม H2-H5 ก็มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นกว่าสายพันธุ์พ่อหรือแม่ที่เจริญช้า และ ยังมีปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอมากว่าพ่อหรือแม่ที่มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอต่ำอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาขั้นต่อไปควรศึกษาเพิ่มเติมด้าน

molecular biology ของสายพันธุ์ลูกผสมและสายพันธุ์พ่อแม่ เช่นใช้วิธี RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism) หรือโดยวิธี RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) เพื่อเป็นการบ่งชี้สายพันธุ์ลูกผสมว่าเกิดจากการร่วมพันธุ์พ่อแม่จริงหรือไม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คมศิลป์ พลแดง. 2541. **การสกัดสารโปลีแซคคาไรด์จากเห็ดหมื่นปี**. วิทยาปฏิบัติปริญญาภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จำรูญศรี พุ่มเทียน, ปรารถนา ภูมิวุฒิชัยสิงห์ และสุมาลี พิชญางกูร. 2534. **ศึกษาผลผลิตของเห็ดจากสายพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์** (*Volvariella volvaceae* **และ** *Termitomyces ssp.*). โครงการวิจัยปริญญาบัณฑิต กรุงเทพ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชาลินี คงสวัสดิ์. 2542. **การชักนำให้เกิดมิวเทชันในเห็ดหมื่นปี** *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **โดยแสงอัลตราไวโอเลท**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประภัสสร โชคสวนทรัพย์. 2539. **การผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหาร ลาดกระบัง.

ปริญญา รัตนะพิมาน. 2535. **การผลิตสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งในเห็ดหมื่นปี** *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปรีชา กลิ่นเกษร. 2530 เห็ดสกุล *Ganoderma* .ในประเทศไทย.**บทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่** 13. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ปัญญา โพธิ์สุติรัตน์. 2538. **เทคโนโลยีการเพาะเห็ด**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

พนิดา ปาลกวงศ์ ณ อยุธยา, ปรีชา กลิ่นเกษร และ พิพัฒน์ เจิดรังษี. 2531. การศึกษาเปรียบเทียบส่วนประกอบในเห็ดสกุล *Ganoderma* ในประเทศไทย. **บทคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่** 14. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และโรงแรมโรยัลออคิต เชอราตัน. กรุงเทพฯ

มานพ แก้วกล้า. 2533. **สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และวัสดุเพาะของเห็ดหมื่นปี** (*Ganoderma lucidum* (W.Curt : Fr) Karst). **บางสายพันธุ์**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วสันต์ เพชรรัตน์. 2522. **การศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการเพาะเห็ดตีนแรด : 11 ลักษณะการสืบพันธุ์ทางเพศของเห็ดตีนแรด**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต กรุงเทพ. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิมลมาศ บุญมี. 2541. **การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือในอาหารเหลว**. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง.

วีรวัฒน์ กนกนุเคราะห์. 2534. **การปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดฟาง (*Volvariella volvaceae*) โดยการรวมโปรโตพลาสต์**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สิริลักษณ์ ชัยจำรัส. 2534. **การทำให้สารบริสุทธ์บางส่วนและลักษณะการออกฤทธ์ต้านมะเร็งของสารโพลิแซคคาร์ไรด์ที่สกัดจากดอกและเส้นใยเห็ดหมื่นปี** . วิทยาปฏิบัติปริญญาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุทธพรรณ ตรีรัตน์. 2531. เห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum*). **วารสารวิทยาศาสตร์** ปีที่42 ฉบับที่ 2: 69-74

สุรพล รักปทุมและชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง. 2539. **เห็ดหลินจือ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ ที.พี. พริ้น

อนงค์ จันทรศรีกุล, ดรุณี รัตนประภา, กัญจนา โป๊ะเงิน, วิรัตน์ ชูกำลัง และประสิทธิ์ ธนากลาง. 2528. เห็ดบางชนิดในสกุล *Ganoderma* และในสกุลใกล้เคียง. **วารสารวิชาการเกษตร**. ฉบับที่ 3 หน้า 119 – 123. กรุงเทพมหานคร.

อักษรา อธิลักษณชิต. 2538. **การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ G008 และ G020 ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส**. วิทยาปฏิบัติปริญญาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Adaskaveg, J.E.,and Gilgertson, R.L. 1986. Cultural Studies and Genetic of Sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G.tsugae* in Relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complex. **Mycologia.** 78 : 694-705.

Alexopoulos, C.J. , C.W. Mims. 1979. **Introductory Mycology.** John Weley and Sons. New York.

Buck, K. W., Chen, A. W., Dickerson, A. G. and Chain, E. B. 1968. Formation and Structure of Extracellular Glucans Produced by *Claviceps* Species. **J. Gen. Microbiol.** 51 : 337-352.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamiltion, J.k., Rebers, p. a. and Smith, F. 1956 Colorimetric Method for Determiation of Sugars and Related Substances. **Anal. Chem.** 28: 350-356.

Chang T.T, and Chen T.1986. Studies on Nuclear Behavior, Mating Type and Heterokaryosis of Several species of *Ganoderma* in Taiwan. **Plant Products Bulletin.** 28 : 231-240

Dhaliwal, R.P.S., Garch,H.S., and Khanna, P.K. 1992. Hagh laccase producing mutant of Pleurotus florida. **World Journal Microbiology** Biotecnology. 8 : 39-41

Hamlyn, P.E., and Ball, C. 1979. Recombination studies with *Cephalosporium acremnium*. In Genetics of industrial microbiology. O.K. Sebek, and A.I. Laskin,eds. Washingtion : **American society of Microbiology.**

Ito, H., Naruse, S. and Shimura, K. 1977. Studies on Antitumor Activity of Basidiomycetes Polysaccharides:VII. Antitumor Effect of Polysaccharide Preparation from *Ganoderma lucidium* on Mouse Sarcroma 180. **Mei. Med. J.** 26 : 147-152.

Burton; K. 1968.Determination of DNA Concentration with Diphenylamine. **Methods In Enzymology.** 12 :163-166

Landecker, E. M. 1996. **Fundamental of the Fungi.** 4th ed. New jersey : Prentice-Hail International.

Lee, S.S., Chen, F.D., Wei,S.C., Liu, Y.H., Chen, C.f.,wei, R.D., Chen, K.Y., and WeiHan P. 1984. In Vivo Antitumor Effect of Crude Extract from the mycelium of *Ganoderma lucidum* . **Journal Chinese Oncol Society.** 5 : 22 – 28.

Moore-Landecker,E.1990. **Fundamentals of the fungi**. 3rd edition. New Jersey : prentice-Hall.

Papazian, R.P. 1950. Physiology of incompatibility factors in *Schizophyllum commune*. **Bot. Gaz.** 112 : 143-163.

Raper, J.R. 1966. **Genetics of sexuality in Higher Fungi.** New York : The Robaild press Company.

Schneider, W.C. 1956. Phosphorus compound in animal tissue. I Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose acid. **Biochem J.** 62 : 315-322.

Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., and Misaki, A. 1985. Structures and Antitumor Activities of the Polysaccharide Isolated from Fruiting Body and the Growing Culture of Mycelium *Ganoderma lucidum* .**Agriculture Biology Chemistry**. 49:2641-2653.

Steiner, E. 1967. **Genetics of Fungi.** NY : Spring Verlag.

Triratana S., and Chaiprasert A. 1991. Sexuality of *Ganoderma lucidum*. **Science and Cultivation of Edible Fungi**. :57-63

Wang, G., Zhang, J., Mizuno, T., Zhuang, C., Ito, H., Mayazumi, H., Okamoto, H., aand Li, J. Lingzhi. 1993. the Fruiting Body of Ganoderma tsuge **Biosci. Biotech. Bioroom.** 57 : 894-900.

Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Kawade, M. 1994. Fravtionation and Antitumor Activity of Polysaccharide from *Grifola frondosa* Mycelium. **Biosci. Biotech. Biochem.** 58(1) : 185-188.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหาร

1.1 สูตรอาหารแข็ง PDA

potato dextrose agar	39 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ต้มเพื่อให้ potato dextrose agar ละลายจนเข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหารเหลว PDB

potato dextrose broth	24 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ต้มเพื่อให้ potato dextrose agar ละลายจนเข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สูตรอาหารข้าวฟ่าง

ข้าวฟ่าง	1	กิโลกรัม
yeast extract	0.5	กรัม
$MgSO_4$ (ดีเกลือ)	1.05	กรัม
Acetic acid	0.05	มิลลิลิตร
ขี้เลื่อยไม้ยาง	1	ถ้วย

ล้างข้าวฟ่าง เอากากออก แช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน นำข้าวฟ่างมานึ่งจนนิ่ม และข้าวฟ่างมีสีแดงผึ่งข้าวฟ่างให้เย็น ผสมกับขี้เลื่อยไม้ยางพารา ละลาย yeast extract ในน้ำ 50 มิลลิลิตร ละลาย $MgSO_4$ ด้วย acetic acid 0.05 มิลลิลิตร เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร คลุกให้เข้ากัน บรรจุใส่ในขวดแบนประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของขวด ปิดสำลีและอลูมิเนียมฟรอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที

1.4 สูตรอาหารขี้เลื่อย

ขี้เลื่อย (ความชื้น 5เปอร์เซ็นต์)	94	% w/w
รำ	5	% w/w
ยิปซั่ม	1	% w/w
ดีเกลือ	0.1	% w/w

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

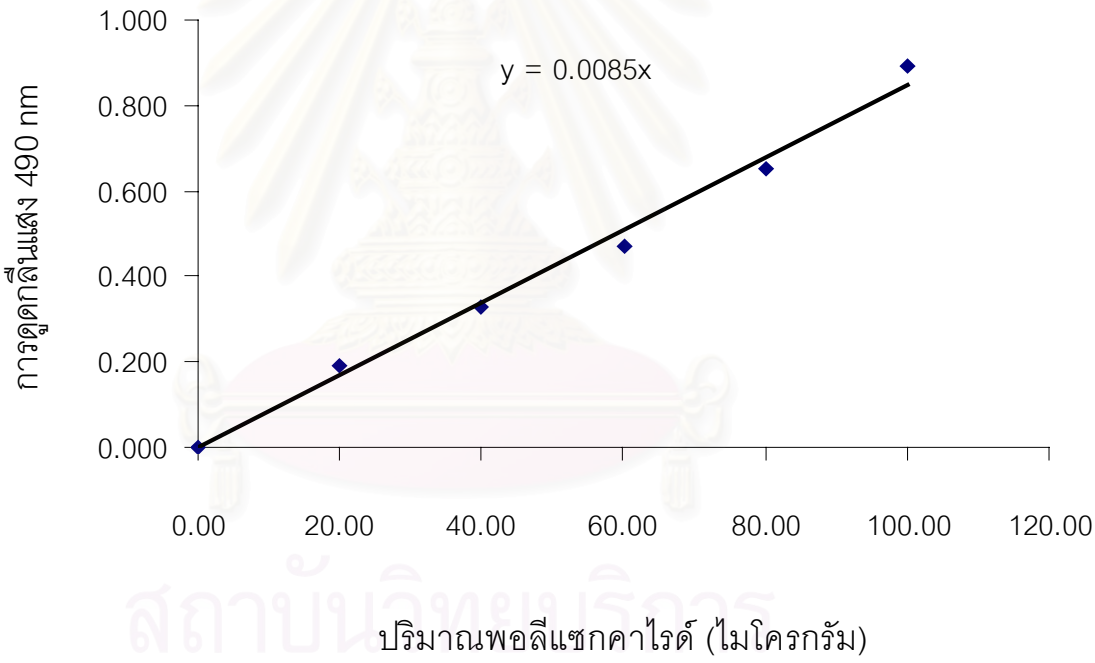
2.การหาพอลีแซกคาไรด์โดยวิธีฟีนอล – ซัลฟูริก (Dubois, 1956)

2.1 การเตรียมสารละลาย

สารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 % (w/v)

2.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ใช้น้ำแป้งเป็นมาตรฐาน โดยเตรียมน้ำแป้งที่มีความเข้มข้น 20 40 60 80 100 µg/µl ตามลำดับ นำ 0.5 มิลลิลิตรมาใส่ในหลอดทดลอง เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้สารทำปฏิกิริยาทั่วหลอด เติมสารละลายฟีนอล 5 % ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์เป็นเวลา 20 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังกราฟที่ 3



รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานน้ำแป้งมาตรฐานโดยวิธีฟีนอล - ซัลฟูริก

3. **การหาปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี** ไดฟีนิลามีน รีเจนต์ (Burton, 1956)

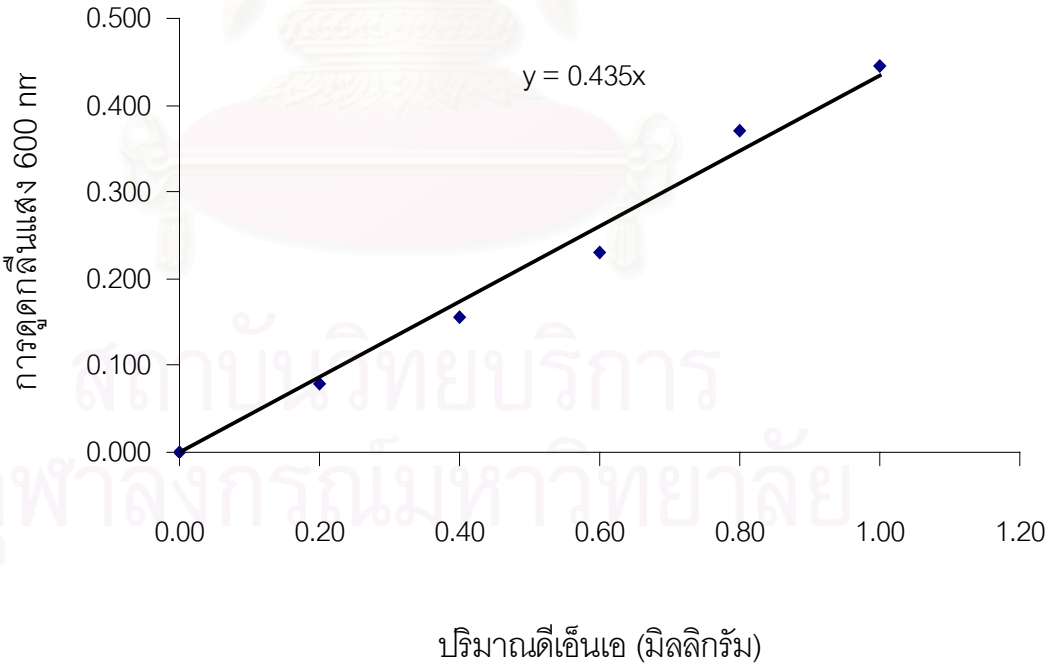
3.1 การเตรียมสารละลาย

ไดฟีนิลลามีน รีเจนต์ (diphenylamine reagent)

ไดฟีนิลามีน	0.3	กรัม
กรดอะซิติก	30	มิลลิลิตร
กรดซัลฟิวริกเข้มข้น	0.75	มิลลิลิตร
0.2% อะเซทาลดีไฮด์	0.3	มิลลิเมตร

3.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำ 1.5 มิลลิลิตรของสารละลายดีเอ็นเอทุกความเข้มข้น มาเติมสารละลายไดเฟนีลามีน 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น วัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานของสารละลาย คาล์ฟ ไทมัส ดีเอ็นเอ โดยวิธีไดฟีนิลามีน รีเจนต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบทางเดียว (ANOVA)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบทางเดียว จะวิเคราะห์ตามค่า Sig ซึ่งกำหนดนัยสำคัญไว้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยถ้าค่า Significant สูงกว่า 0.05 แสดงว่ากลุ่มประชากรที่นำมาเปรียบเทียบไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบทางเดียว ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตรัศมีเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.79	13	0.37	0.21	.0.99
Within Groups	123.08	70	1.76		
Total	127.87	83			

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบทางเดียว ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตความยาวของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34.07	13	2.621	0.204	0.999
Within Groups	2124.96	165	12.879		
Total	2159.03	178			

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบทางเดียว ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในถุงอาหารขี้เลื่อย

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	58.97	13	4.54	0.33	0.999
Within Groups	3117.11	224	13.92		
Total	3176.07	237			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกแบบทางเดียว ค่าเฉลี่ยปริมาณพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	182.15	13	14.01	7115.97	0.00
Within Groups	0.06	28	0		
Total	182.21	41			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะสายพันธุ์ลูกผสม 5 สายพันธุ์

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต รัศมีของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ลูกผสม H1-H5 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA

สายพันธุ์ลูกผสม	ค่าเฉลี่ยรัศมีเส้นใย(เซนติเมตร)	รัศมีเส้นใยเต็มจานเลี้ยงเชื้อ(วัน)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
H1	2.66	8	1.34
H2	2.64	6	1.60
H3	2.68	8	1.16
H4	2.56	7	1.27
H5	2.64	7	1.17

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปีสายพันธุ์ลูกผสม H1-H5 ที่เลี้ยงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่าง

สายพันธุ์ลูกผสม	ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใย (เซนติเมตร)	เส้นใยเดินเต็มขวด (วัน)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
H1	5.70	13	3.64
H2	5.41	13	3.81
H3	5.88	13	3.68
H4	5.27	13	4.00
H5	5.07	12	3.59

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นสายพันธุ์ลูกผสม H1-H5 ที่เลี้ยงในถุงอาหารขี้เลื่อย

สายพันธุ์ลูกผสม	ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใย (เซนติเมตร)	เส้นใยเดินเต็มถุง (วัน)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
H1	7.98	36	3.71
H2	8.75	30	3.79
H3	8.78	32	3.78
H4	7.75	36	3.71
H5	8.32	34	3.67

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ

สายพันธุ์ลูกผสม	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนพอลิแซกคาไรด์ต่อดีเอ็นเอ	จำนวนซ้ำ	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
H1	9.87	3	9.89
H2	8.99	3	9.00
H3	8.44	3	8.46
H4	8.74	3	8.79
H5	7.74	3	7.79

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต รัศมีเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA

สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย รัศมีเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหาร PDA (เซนติเมตร)							
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8
MUG001	0.64	1.67	2.89	3.95	4.00			
MUG002	0.30	1.00	1.70	2.50	3.20	3.70	4.00	
MUG003	0.50	1.53	2.20	3.00	3.60	4.00		
MUG004	0.20	0.80	1.50	2.40	3.00	3.60	4.00	
MUG005	0.60	1.20	1.80	2.70	3.26	3.67	4.00	
MUG006	0.50	1.53	2.20	2.90	3.50	3.80	4.00	
MUG003-UV-cv1	0.30	1.20	2.00	2.80	3.40	3.65	3.84	4.00
MUG100	0.60	1.65	2.80	3.50	3.95	4.00		
MUG101	0.60	1.62	2.36	3.30	3.80	4.00		
H1	0.04	1.52	2.35	2.70	3.25	3.64	3.82	4.00
H2	0.62	0.68	2.79	3.80	3.95	4.00		
H3	0.64	1.48	2.36	2.68	3.10	3.42	3.82	4.00
H4	0.50	1.30	2.40	2.84	3.28	3.64	4.00	
H5	0.61	1.64	2.56	2.87	3.24	3.62	4.00	

หมายเหตุ H1 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG003-UV-cv1 H2 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG100

H3 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG101 H4 ลูกผสมระหว่าง MUG100 กับ MUG003-UV-cv1

H5 ลูกผสมระหว่าง MUG100 กับ MUG101

ตารางที่ 18 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในขวดอาหารข้าวฟ่าง

สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในขวดข้าวฟ่าง (เซนติเมตร)														
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10	วันที่ 11	วันที่ 12	วันที่ 13	วันที่ 14	วันที่ 15
MUG001	0.00	0.58	2.06	3.24	4.36	5.46	6.64	8.20	9.30	10.00					
MUG002	0.00	0.31	0.90	1.60	2.54	3.32	4.00	4.84	5.62	6.34	7.14	7.99	9.26	9.88	10.00
MUG003	0.00	0.14	0.60	1.36	2.20	3.16	4.40	5.30	6.20	7.06	7.95	9.27	10.00		
MUG004	0.00	0.08	0.50	1.20	2.29	2.97	4.23	5.20	5.80	6.15	6.73	7.75	9.26	9.78	10.00
MUG005	0.00	0.67	1.36	2.10	2.88	4.00	5.22	6.10	7.12	8.00	9.02	10.00			
MUG006	0.00	0.13	0.50	1.60	2.26	3.18	4.20	5.18	6.04	7.14	8.00	9.07	10.00		
MUG003-UV-cv1	0.00	0.17	0.50	1.50	2.30	3.32	4.38	5.74	6.40	6.65	7.49	8.30	9.10	10.00	
MUG100	0.00	0.33	0.57	1.87	3.08	4.12	5.72	6.84	8.22	9.00	9.67	10.00			
MUG101	0.00	0.30	1.48	2.42	3.45	4.39	5.32	6.52	7.46	8.35	10.00				
H1	0.00	0.21	1.50	2.35	4.60	5.60	6.20	7.80	8.50	8.71	9.02	9.64	10.00		
H2	0.00	0.16	0.72	1.50	3.60	5.20	5.90	7.50	8.18	8.69	9.32	9.63	10.00		
H3	0.00	0.48	1.56	3.21	4.02	5.35	6.70	7.87	8.67	9.28	9.58	9.75	10.00		
H4	0.00	0.13	0.50	1.50	2.60	4.10	5.40	6.80	8.90	9.08	9.58	9.92	10.00		
H5	0.00	0.39	1.56	2.34	3.44	4.20	5.70	6.80	8.20	8.64	9.65	10.00			

หมายเหตุ H1 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG003-UV-cv1 H2 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG100

H3 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG101 H4 ลูกผสมระหว่าง MUG100 กับ MUG003-UV-cv1

H5 ลูกผสมระหว่าง MUG100 กับ MUG101

ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต ความยาวเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในถุงอาหารขี้เลื่อย

สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในถุงขี้เลื่อย (เซนติเมตร)																		
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วัน 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 14	วันที่ 16	วันที่ 18	วันที่ 20	วันที่ 22	วันที่ 24	วันที่ 26	วันที่ 28	วันที่ 30	วันที่ 32	วันที่ 34	วันที่ 36	วันที่ 38
MUG001	0.00	2.63	5.20	7.28	8.32	8.67	9.53	10.05	10.23	10.87	11.32	12.13	12.57	12.84	13.00				
MUG002	0.00	0.68	3.25	5.33	6.37	6.72	7.58	8.10	8.28	8.92	9.37	10.18	10.62	10.89	11.05	11.95	13		
MUG003	0.00	1.18	3.74	5.82	6.86	7.21	8.08	8.60	8.77	9.41	9.86	10.68	11.11	11.39	11.54	12.45	13		
MUG004	0.00	0.54	2.16	4.24	5.28	5.63	6.49	7.01	7.13	7.66	8.11	8.79	9.16	9.40	9.60	10.25	10.64	13	
MUG005	0.00	0.90	3.47	5.55	6.59	6.93	7.80	8.32	8.49	9.13	9.59	10.40	10.83	11.11	11.27	12.17	13		
MUG006	0.00	0.26	2.83	4.91	5.95	6.30	7.16	7.68	7.86	8.50	8.95	9.76	10.20	10.47	10.63	11.53	11.85	13	
MUG003-UV-cv1	0.00	0.33	2.89	4.97	6.01	6.36	7.23	7.75	7.82	8.23	8.68	9.22	9.53	9.72	9.98	10.37	10.83	11.3	13
MUG100	0.00	1.73	4.30	6.38	7.42	7.77	8.63	9.15	9.33	9.97	10.42	11.23	11.67	11.94	12.10	13.00	13.00		
MUG101	0.00	1.27	3.83	5.91	6.95	7.30	8.16	8.68	8.86	9.50	9.95	10.76	11.20	11.47	11.63	12.53	13.00		
H1	0.00	0.75	3.32	5.40	6.44	6.79	7.65	8.17	8.29	8.82	9.27	9.95	10.32	10.56	10.76	10.95	11.19	13	
H2	0.00	2.39	4.96	7.04	8.08	8.44	9.27	9.81	9.97	10.63	11.08	11.89	12.32	12.60	13				
H3	0.00	2.11	4.68	6.78	7.85	8.18	9.03	9.60	9.76	10.35	10.80	11.61	12.05	12.32	12.48	13			
H4	0.00	0.49	3.05	5.13	6.14	6.55	7.37	7.90	8.03	8.55	9.00	9.67	10.05	10.28	10.49	11.13	11.37	13	
H5	0.00	2.08	3.88	5.98	7.04	7.42	7.33	8.77	8.91	9.55	10.00	10.82	11.30	11.53	11.87	12.55	13		

หมายเหตุ

H1 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG003-UV-cv1 H2 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG100

H3 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG101 H4 ลูกผสมระหว่าง MUG100 กับ MUG003-UV-cv1 H5 ลูกผสมระหว่าง MUG100 กับ MUG101

ตารางที่ 20 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเส้นใยของเห็ดหมื่นปี 14 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB

สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเส้นใยในอาหาร PDB (กรัม)														
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12	วันที่ 14	วันที่ 16	วันที่ 18	วันที่ 20	วันที่ 22	วันที่ 24	วันที่ 26	วันที่ 28	วันที่ 30
MUG001	0.0182	0.0316	0.2624	0.3628	0.3663	0.3668	0.3670	0.3685	0.3887	0.3884	0.3890	0.3887	0.3891	0.3883	0.3887
MUG002	0.0205	0.0985	0.1899	0.2508	0.2538	0.2568	0.2554	0.2571	0.2587	0.2586	0.2587	0.2584	0.2588	0.2583	0.2587
MUG003	0.0202	0.0650	0.1765	0.1965	0.2257	0.2540	0.2812	0.3076	0.3074	0.3076	0.3074	0.3076	0.3075	0.3074	0.3075
MUG004	0.0195	0.0585	0.1463	0.2306	0.2321	0.2336	0.2338	0.2351	0.2374	0.2378	0.2375	0.2376	0.2377	0.2374	0.2375
MUG005	0.0321	0.0977	0.1526	0.1850	0.1898	0.1963	0.2358	0.2675	0.2674	0.2677	0.2675	0.2676	0.2678	0.2674	0.2674
MUG006	0.0210	0.0644	0.1069	0.1689	0.1696	0.1881	0.2242	0.2440	0.2699	0.2701	0.2700	0.2702	0.2701	0.2703	0.2700
MUG003-UV-cv1	0.0352	0.0531	0.1699	0.1774	0.2110	0.2347	0.2584	0.2581	0.2583	0.2582	0.2581	0.2580	0.2585	0.2581	0.2584
MUG100	0.0221	0.1029	0.1866	0.2318	0.2841	0.3016	0.3178	0.3500	0.3502	0.3500	0.3502	0.3501	0.3503	0.3500	0.3502
MUG101	0.0196	0.0525	0.2049	0.2850	0.2891	0.2907	0.2911	0.2923	0.2925	0.2928	0.2924	0.2928	0.2925	0.2927	0.2923
H1	0.0321	0.0322	0.2300	0.2600	0.2620	0.3010	0.3010	0.3000	0.3020	0.3000	0.3021	0.3012	0.3000	0.3100	0.3002
H2	0.0200	0.0231	0.3001	0.3000	0.3204	0.3268	0.3324	0.3614	0.3620	0.3645	0.3652	0.3670	0.3680	0.3692	0.3711
H3	0.0212	0.0665	0.2640	0.2640	0.2780	0.3240	0.3312	0.3410	0.3590	0.3699	0.3699	0.3692	0.3691	0.3701	0.3700
H4	0.0300	0.0101	0.2500	0.2640	0.2960	0.3010	0.3020	0.3210	0.3315	0.3324	0.3331	0.3347	0.3425	0.3501	0.3502
H5	0.02200	0.06000	0.15000	0.30200	0.30200	0.32100	0.32600	0.32600	0.32560	0.32160	0.32160	0.33210	0.33210	0.33210	0.32600

หมายเหตุ H1 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG003-UV-cv1 H2 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG100

H3 ลูกผสมระหว่าง MUG001 กับ MUG101 H4 ลูกผสมระหว่าง MUG100 กับ MUG003-UV-cv1

H5 ลูกผสมระหว่าง MUG100 กับ MUG101

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวยุพาพรรณ ระลึก เกิดเมื่อวันที่ 29 มกราคม พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดศรีสะเกษ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจาก สถาบันราชภัฏนครราชสีมา ปีการศึกษา 2538 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์หมาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2542 โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากบันฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย