การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berg) Sing ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นพอลิพลอยด์ด้วยโคลชิซินโดยการเพาะให้เกิดดอก

นางสาวพัชนี เอื้อรักสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2696-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SELECTION OF COLCHICINE-INDUCED POLYPLOID IN SHIITAKE *Lentinus edodes* (Berk) Sing BY MUSHROOM CULTURE

Miss Pachanee Uaraksakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Botany
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

ISBN 974-14-2696-8

Copyright of Chulalongkorn University

491969

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk) Sing ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นพอลิพลอยด์ด้วยโคลชิซินโดยการเพาะให้เกิดดอก
โดย	นางสาวพัชนี เอื้อรักสกุล
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ยุพิน จินตภากร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พัชนี เอื้อรักสกุล : การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk) Sing ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นพอลิพลอยด์ด้วยโคลชิซินโดยการเพาะให้เกิดดอก (SELECTION OF COLCHICINE-INDUCED POLYPLOID IN SHIITAKE *Lentinus edodes* (Berk) Sing BY MUSHROOM CULTURE) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ, 72 หน้า. ISBN 974-14-2696-8

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์เห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk) Sing ด้วยโคลชิซิน โดยการนำเซลล์เดี่ยวของเห็ดหอมสายพันธุ์ CUL074 มาหยดสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.15%(w/v) ในช่วง 5-70 นาที ก่อนเกิดการแบ่งเซลล์ใหม่ ได้สายพันธุ์ 5M 10M 20M 30M 40M 50M 60M และ 70M ตามลำดับ นำเซลล์เดี่ยวสายพันธุ์ S05 จากการเลี้ยงเส้นใยในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1.5%(w/v) เป็นเวลา 10 วัน และ S07 จากเซลล์เดี่ยวที่หยดสารละลายโคลชิซิน 1.5 %(w/v) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มาทำการทดลองเปรียบเทียบทั้ง 11 สายพันธุ์ พบว่า 40M 50M 60M และ 70 M มีการเจริญเติบโตได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 โดย ผลผลิตดอกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์

จำนวนโครโมโซมจากการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นเหตุให้เชื่อได้ว่า 50M และ 60M อาจเกิดพอลีพลอยด์เนื่องจากสามารถตรวจนับโครโมโซมได้เป็นจำนวนประมาณ 2 เท่าของจำนวนโครโมโซมของสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่มีจำนวนโครโมโซมประมาณ 26-28 แท่ง อย่างไรก็ดีสายพันธุ์ 5M, 30M, 70M และ S07 ถูกพบว่ามีจำนวนโครโมโซมที่มีค่าใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2549

4572409523 : MAJOR BOTANY

KEY WORD: SHIITAKE *(Lentinus edodes* (Berk) Sing)/ POLYPLOID/ COLCHICINE

PACHANEE UARAKSAKUL : SELECTION OF COLCHICINE-INDUCED POLYPLOID IN *Lentinus edodes* (Berk) Sing BY MUSHROOM CULTURE.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MUKDA KUHIRUN, 72 pp.

ISBN 974-14-2696-8

Single cells from mycelia of shiitake (*Lentinus edodes* (Berk) Sing) CUL074 strain were induced by 0.15%(w/v) colchicine during 5-70 minutes cell division. The mutant strains were 5M, 10M, 20M, 30M, 40M, 50M, 60M, 70M, respectively. S05 culture from single cell in 10 days 1.5%(w/v) colchicine and S07 culture from single cell in 2 days 1.5%(w/v) colchicine were tested too. All 11 strains were compared and found that 40M 50M 60M and 70M cultures had better growth than CUL074 culture. Fruiting bodies production had genetic variation and to be useful for strain improvement.

The counting chromosome number under the microscope, to believe that the 50M, and 60M were polyploidy. From chromosome number counting were approximately 2 times of chromosome number of controlled strain, which had 26-28 chromosomes. However, it was found that 5M, 30M, 70M, and S07 cultures had chromosome number as same as the controlled culture.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department	BOTANY	Student's Signature.....
Field of Study	BOTANY	Advisor's Signature.....
Academic Year	2006	

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้แนวทางการวิจัย ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และให้ข้อมูลที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่องานในครั้งนี้ รวมถึงความเมตตาและโอกาสที่ดีมากมายกับข้าพเจ้าด้วยดีสม่ำเสมอตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ และ อาจารย์ ดร.ยุพิน จินตภากร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้วิทยานิพนธ์จนแล้วเสร็จ

กราบขอบพระคุณ ผศ.เตือนใจ โก้สกุล และ รศ.ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล ที่มอบความห่วงใย ความเอื้อเฟื้อ รวมถึงกำลังใจแก่ข้าพเจ้า

ขอบคุณนายคมสัน นันทสุนทร คุณนภา ฉัตรเท นายศจิษฐา ประเสริฐกุล นายปิยพัทธ์ ปิ่นอ่อน นายจักรชัย วรรณศรี ที่ให้คำปรึกษา แนวทางการวิจัย และให้ข้อมูลที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่องานในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวิทยา ธัญญาโภชน์ ในการติดตั้งและซ่อมแซมเครื่องมือและอุปกรณ์มาตลอดหลายปี

ขอบคุณ คุณชัชวาล วงค์ชัย คุณมัลลิกา แก้วดี คุณศิริพร คุ้มแว่น และทุกท่านในห้องปฏิบัติการของ ผศ.ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ ผู้ที่ทั้งให้ เทคนิค มิตรภาพ กำลังกาย กำลังใจ และช่วยเหลือข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา รวมถึงเจ้าหน้าที่ของภาควิชาฯ และพี่ๆนักการฯทุกท่าน

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยบัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สถาบันการศึกษาอันเป็นที่รักยิ่งของข้าพเจ้า

ขอบคุณที่สุดสำหรับครอบครัวเอื้อรักสกุล ครอบครัวโสตารัตน์ และครอบครัวอุดมสินวัฒนา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ญ
บทที่
1 บทนำ.....1
2 การตรวจเอกสาร.....5
3 เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และวิธีการวิจัย.....14
4 ผลการทดลอง.....18
1. การเตรียมเชื้อ.....18
2. การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 และสายพันธุ์เหนี่ยวนำด้วยโคลชิซินในอาหารต่างๆ.....19
3. การเก็บผลผลิตดอกเห็ดหอม.....21
4. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์และโครโมโซม..... 22
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....60
รายการอ้างอิง..... 66
ภาคผนวก..... 69
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....72

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 ˚C)....23
2. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ณ อุณหภูมิ 23 ˚C....24
3. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 ˚C)....25
4. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิ 23 ˚C... 26
5. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในถุงขี้เลื่อย ณ อุณหภูมิ 23 ˚C....27
6. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 ˚C)....29
7. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ณ อุณหภูมิ 23 ˚C 30
8. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิห้อง (30±2˚C)....31
9. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิห้อง 23 ˚C....32
10. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงในถุงขี้เลื่อย ณ อุณหภูมิ 23˚C....33
11. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 ˚C).... 35
12. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ณ อุณหภูมิ 23 ˚C....36
13. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิห้อง (30±2˚C).... 37
14. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิ 23 ˚C.... 38
15. ผลผลิตดอกรุ่นที่ 1 (G1)....39
16. ผลผลิตดอกรุ่นที่ 2 (G2)....40
17. เปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ 2 รุ่น (G1 และ G2) ของแต่ละสายพันธุ์....41
18. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 ˚C).... 44

ตารางที่ หน้า

19. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ณ อุณหภูมิ 23 °C 45
20. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ณ อุณหภูมิ 23 °C 46
21. ลักษณะสัณฐานวิทยา 47
22. จำนวนโครโมโซมในเซลล์เบสิเดียม 50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ หน้า

1. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมที่เลี้ยงในอาหาร PDA 51
2. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมที่เลี้ยงในอาหาร PDB 52
3. ผลผลิตดอก.....53
4. ผลผลิตดอก.....54
5. ผลผลิตดอก.....55
6. ผลผลิตดอก.....56
7. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง.....57
8. การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง.....58
9. โครโมโซมสายพันธุ์ 50M.....59
10. โครโมโซมสายพันธุ์ 60M.....59

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

พืชส่วนใหญ่ในธรรมชาติมักจะเป็นดิพลอยด์ (diploid) คือมีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด หากมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมเกิดขึ้นมักมีผลต่อการแสดงออกทางด้านลักษณะต่างๆ โดยเฉพาะพอลิพลอยด์ (polyploid) ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นหลายชุด จะมีขนาดของเซลล์โตขึ้น แต่ขนาดของพืชทั้งต้นหรือส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชอาจจะโตขึ้นหรือไม่ก็ได้ อาจมีปริมาณสารเคมีสะสมในส่วนต่างๆมากขึ้น หรือมีลักษณะที่ดีขึ้นด้านเศรษฐกิจ เช่น ข้าวไรย์ที่เป็นเตตระพลอยด์ (tetraploid) จะมีเมล็ดขนาดใหญ่และคุณภาพดีขึ้น (Allard, 1960) การพัฒนาวิธีที่จะชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ขึ้นในพืชสามารถทำโดยการใช้สารเคมีหลายชนิด เช่น caffeine (Espino, 1979) และ oryzalin (Van Tuyl, 1992) แต่สารเคมีที่นิยมใช้กันมากคือ สารโคลชิซิน (colchicine)

โคลชิซิน (colchicine) เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ดีในพืชหลายชนิด ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในด้านอื่น สารนี้จะทำให้โครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายในโครโมโซม แต่จะไปยับยั้งการสร้าง spinder fiber ในกระบวนการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสหรือไมโอซิส การแยกตัวของโครมาติดช้าลง ไม่มีการเคลื่อนที่ของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส ทำให้โครโมโซมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (Dermen, 1940., Eigsti และ Dustin, 1955.) โดยสารนี้จะมีผลต่อเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวเท่านั้น จึงมักนิยมใช้สารนี้กับส่วนตา ยอดอ่อน ต้นอ่อน และเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Hagino et al., 1978) การชักนำให้มีการเพิ่มชุดของโครโมโซมเพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ดีทางเศรษฐกิจนั้นส่วนมากมักใช้กับพืชเช่น แตงโมที่เป็นพอลิพลอยด์มีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูงกว่าดิพลอยด์ (ดำรง สินไชย, 2521) เป็นต้น มีรายงานผลการวิจัยการชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ใน *Agaricus bisporus* ด้วยโคลชิซิน 100-1,500 μg/ml เป็นเวลา 10 ชั่วโมงกับ basidiospore โปรโตพลาสต์ และส่วนของเส้นใย พบเพียงการใช้โคลชิซินกับโปรโตพลาสต์เท่านั้นที่มีปริมาณ DNA เพิ่มขึ้นมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่หลายเท่าตัว ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเนื่องจากถูกชักนำด้วยโคลชิซิน (Handa et al., 1997)

Sarangbin และผู้ร่วมงาน (1994) ทดลองชักนำให้เกิด autopolyploid กับ *Aspergillus niger* สายพันธุ์ wu-2223L ด้วยโคลชิซิน พบว่าให้ผลผลิตกรดซิตริกมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ถึง 1.4 เท่า เมื่อให้น้ำแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อนำสายพันธุ์พอลิพลอยด์ มาชักนำกลับเป็น haploid ด้วย benomyl พบว่าประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกกลับมาเท่ากับสายพันธุ์พ่อแม่

เช่นเดิม แสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นเนื่อง จากการเพิ่มชุดโครโมโซม ไม่ใช่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดซิตริกเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยโคลชิซิน

Toyama และ Toyama (1994) พบนิวเคลียสที่มีขนาดเล็กกว่าปกติ เรียกว่า smaller nuclei จากการชักนำให้เกิด autopolyploid ด้วยโคลชิซินกับ *Pleurotus ostreatus* จากกลุ่มเส้นใย

Toyama และ Toyama (1995a) ทดลองชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ ด้วยโคลชิซินกับเส้นใย *Trichoderma reesei* สายพันธุ์ QM 9414 พบว่า ดิพลอยด์ มีการผลิต cellulase เพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่า ของสายพันธุ์เดิม แต่ binucleate conidia ที่เป็น เตตระพลอยด์ ไม่มีการผลิต cellulase เพิ่มขึ้น และเมื่อนำ เตตระพลอยด์ นี้ไปชักนำด้วยโคลชิซิน 0.2%(w/v) อีกครั้งจึงเกิด multi nuclei ที่ผลิต cellulase มากกว่า binucleate เตตระพลอยด์ เดิม และ ดิพลอยด์ แสดงให้เห็นว่า multinucleation technique มีส่วนช่วยให้มีการเพิ่มการผลิต cellulase

Toyama และ Toyama (1995b) ทดลองชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ กับ *T. reesei* ด้วยโคลชิซิน 0.1%(w/v) ทำให้เกิดโครงสร้างคล้าย micronucleus ที่มีส่วนประกอบของ DNA เฉลี่ย 30% ของนิวเคลียสปกติ แสดงให้เห็นว่า nuclei เหล่านี้เป็น aneuploid nuclei ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการถ่ายทอดยีน transformation กลุ่ม DNA ที่มีประโยชน์สู่โปรโตพลาสต์ได้

Toyama และ Toyama (1995c) ทดลองชักนำเส้นใย *Lentinus edodes* (Berk) Sing ด้วยโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.001%(w/v) เป็นเวลา 240 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 °C พบ hyperpolyploid nuclei 89% ของเส้นใยที่ใช้ทดลอง และพบเพิ่มเป็น 96% เมื่อทดสอบด้วยโคลชิซินเข้มข้น 0.01%(w/v) แต่เมื่อใช้โคลชิซินเข้มข้น 0.1%(w/v) กลับพบ smaller nuclei

Toyama และ Toyama (2000) นำเส้นใยเห็ดหอมที่ถูกชักนำให้เป็น autopolyploid ด้วยโคลชิซินเข้มข้น 0.01%(w/v) เป็นเวลา 240 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 °C และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต cellulase ได้มากมาทำการทดสอบความอยู่ตัวของสายพันธุ์เป็นจำนวน 5 รุ่น พบว่าประสิทธิภาพการผลิต cellulase ไม่ลดลง

เห็ดหอมถูกจัดให้เป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญของโลกอันดับ 2 รองจากเห็ดแชมปิญอง ประเทศที่ผลิตเห็ดชนิดนี้ออกจำหน่ายสู่ตลาดมากที่สุดในโลกก็คือ ประเทศญี่ปุ่น สำหรับประเทศไทยเราเพิ่งจะเริ่มทำการผลิตเมื่อไม่กี่ปีมานี้ ซึ่งเห็ดหอมนี้ก็มีอยู่หลายสายพันธุ์ที่เพาะเชื้อขึ้นได้ดีในสภาพแวดล้อมทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนและขึ้นได้ดีในไม้ก่อเท่านั้น แต่ไม้ก่อเป็นพันธุ์ไม้ที่ขึ้นอยู่ตามต้นน้ำลำธารทางกรมป่าไม้จึงได้กำหนดเป็นไม้หวงห้าม ห้ามมิให้ผู้ใดตัดมาใช้เพาะเห็ดหอมและอื่นๆ เพื่ออนุรักษ์ต้นน้ำลำธารดังกล่าวไว้ ทั้งทางภาครัฐบาลและเอกชนจึงได้พยายามหลีกเลี่ยงที่จะส่งเสริมการเพาะเห็ดหอมในขอนไม้ก่อ โดยได้พยายามศึกษา

หาวิธีการเพาะเห็ดหอมในถุงพลาสติก ด้วยการใช้ขี้เลื่อยไม้เนื้ออ่อน (ยางพารา) เป็นวัสดุเพาะ พร้อมทั้งปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดหอมให้สามารถเพาะขึ้นได้ในสภาพแวดล้อมที่ราบลุ่มทั่วไป ซึ่งผลที่ได้ปรากฏว่าได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจ คุ้มค่าพอที่จะทำการเพาะในเชิงการค้าได้

เห็ดหอมเป็นเห็ดที่นิยมบริโภคกันมากเนื่องจากมีกลิ่นหอม รสชาติอร่อย มีคุณค่าทางอาหารดี มีวิตามินหลายชนิด สถาบันมะเร็งแห่งชาติของประเทศญี่ปุ่นทำการวิจัยสกัดสารจากเห็ดหอมและเห็ดอีก 3-4ชนิดพบว่ามีสารที่สามารถต่อต้านเนื้องอกและมะร็ง (สุทธพรรณ ตรีรัตน์, 2523) และมีสารสำคัญ เช่น Eritadenine ที่มีคุณสมบัติลด cholesterol ในเลือด (Saitoh,1974) Lentinan ช่วยต่อต้านเนื้องอกและมะเร็งโดยทำงานเกี่ยวข้องกับ T-cells (Chihara et al.,1969; Espino et al.,1974) Ac2P ช่วยต่อต้านไวรัส (Yamamura และ Cochran, 1974) และMushroom RNA มีคุณสมบัติต่อต้านไวรัสโดยชักนำให้สร้าง interferon (Suzuki et al., 1974) เป็นต้น คุณลักษณะพิเศษที่สำคัญอีกอย่างคือ เห็ดหอมมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวไม่ว่าจะอยู่ในสภาพดอกสดหรือดอกแห้ง เนื่องจากสาร Guanosine-5'-monophosphate (อานนท์ เอื้อตระกูล, 2532) โดยปกติเห็ดหอมเป็นเห็ดที่ชอบอุณหภูมิต่ำ โดยในระยะ vegetative growth เส้นใยจะเจริญดีที่อุณหภูมิ 20°C -25°C ส่วนในระยะออกดอกหรือ fruiting ต้องการอุณหภูมิต่ำลงไปอีก ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ การเพาะเห็ดหอมในประเทศไทยส่วนมากใช้สายพันธุ์ที่นำมาจากต่างประเทศ ซึ่งเดิมอาจมีลักษณะดอกและผลผลิตดี แต่เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่พัฒนามาเพื่อใช้เพาะในสภาพแวดล้อมของต่างประเทศ เมื่อนำมาเพาะในสภาพแวดล้อมของประเทศไทยซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่ต่างไป ก็อาจทำให้เกิดการแปรได้ทั้งในด้านคุณภาพและผลผลิต หน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์เห็ดหอมได้สายพันธุ์ที่มีความทนร้อนเพิ่มขึ้นคือ เห็ดหอมทนร้อนสายพันธุ์ CUL074 เส้นใยสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 26°C-30°C และสามารถออกดอกได้ที่อุณหภูมิ 22°C -26°C (สุทธพรรณ ตรีรัตน์ และคณะ, 2530) แต่ดอกเห็ดมีขนาดเล็ก จึงควรนำมาปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นพอลิพลอยด์ แต่สายพันธุ์ลูกผสมบางคู่ที่ได้จากการผสมเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวนั้นบางครั้งพบว่าไม่สามารถเกิดดอกเห็ดได้ (เป็นหมัน) ถึงแม้เป็น dikaryotic mycelia และมีสภาพการเจริญของเส้นใยในถุงขี้เลื่อยเป็นปกติก็ตาม การทดสอบความสามารถในการเกิดดอกจึงเป็นสิ่งจำเป็นและต้องทำก่อนการคัดเลือกลักษณะอื่น จากนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ซึ่งให้ผลผลิตที่น่าสนใจมาทดสอบความอยู่ตัว (stability) ของเชื้อในด้านการเจริญของเส้นใยเมื่อถ่ายเชื้อ (subculture) ไปเรื่อยๆ ในช่วงเวลาที่ยาวนานขึ้น และทดสอบความอยู่ตัวในด้านการออกดอกซึ่งสามารถเปรียบเทียบผลผลิตของ culture รุ่นหลังกับ culture รุ่นแรก เพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับความแปรปรวนของสายพันธุ์เหล่านี้

คมสัน นันทสุนทร (2545) ทดลองนำเซลล์เดี่ยวของเห็ดหอมสายพันธุ์ CUL074 ที่ตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มาชักนำให้เกิดมิวเทชั่น (mutation) โดยหยดสารละลายโคลชิซิน 1.5%(w/v) พบว่าปริมาณ DNA ลดลงจากเดิม เมื่อเปรียบเทียบวัดการดูดกลืนคลื่นแสงของ DNA (OD_{260nm}) ของเส้นใยเห็ดหอมจึงเป็นเหตุผลให้เชื่อได้ว่าโคลชิซินไม่เพียงแต่มีคุณสมบัติชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ เท่านั้น แต่ยังชักนำให้เกิด aneuploid อีกด้วย

ดังนั้นการนำเส้นใยเห็ดหอมที่เป็นพอลิพลอยด์ เนื่องจากการเหนี่ยวนำด้วยโคลชิซินมาคัดเลือกสายพันธุ์โดยศึกษาการเจริญของระยะเส้นใย ความสามารถในการเกิดดอก ระยะเวลาของการเกิดดอก ลักษณะและคุณภาพผลผลิตดอกเช่น จำนวนและน้ำหนักดอกต่อถุงขี้เลื่อย ขนาดและความสมบูรณ์ของดอก การทดสอบการเป็นพอลิพลอยด์ รวมทั้งการทดสอบความอยู่ตัวของสายพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ที่ดีมีความคงที่ของสายพันธุ์จึงเป็นขั้นตอนหนึ่งในการพัฒนาสายพันธุ์เห็ดหอมให้มีผลผลิตที่ดีขึ้นในทางเศรษฐกิจได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหอมที่เป็นพอลิพลอยด์จากการเหนี่ยวนำด้วยโคลชิซินโดยการเพาะให้เกิดดอก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สายพันธุ์เห็ดหอมที่มีคุณภาพผลผลิตดีขึ้น และเพิ่มทางเลือกหนึ่งของตลาด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

เห็ดหอมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinus edodes* (Berk) Sing หรือ *Lentinula edodes* (Berk) Pegler (Pegler, 1983) และมีชื่อสามัญ (common name) แตกต่างกันตามแต่ละประเทศเช่น ภาษาจีนเรียก เฮียโก (Haeng-Ko) ภาษาเกาหลีเรียก โพโกะ (Pyo-Ko) ภาษาอังกฤษเรียก Black Mushroom ส่วนภาษาญี่ปุ่นถือว่าเห็ดหอมขึ้นอยู่กับไม้จำพวก ไม้โอ๊ค หรือ ไม้ก่อที่เรียกว่า ไม้ชิอิ (Shii) และเรียกเห็ดว่า ทาเกะ (Ta-Ke) จึงเรียกเห็ดหอมว่า Shiitake (อานนท์ เอื้อตระกูล, 2532)

การจัดจำแนกหมวดหมู่ของเห็ดหอม (Pegler, 1983) เป็นดังนี้

Kingdom	Myceta
Division	Amastigomycota
Subdivision	Basidiomycotina
Class	Basidiomtcetes
Subclass	Holobasidiomycetidae II
Order	Agaricales
Family	Tricholomataceae
Genus	*Lentinus*
Species	*Lentinus edodes*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหอม

วงศ์ชีพของเห็ดหอมแบ่งได้เป็น 2 ระยะคือ (ฐิติมา ตันติกาญจน์, 2529)

1. ระยะเส้นใย

เมื่อสปอร์ (spore) ถูกดีดออกจากดอกเห็ดและมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการงอก จะงอกเจริญเป็นเส้นใยระยะที่ 1 (primary mycelium หรือ monokaryotic mucelium) มีนิวเคลียสแบบแฮพลอยด์ (haploid) ไม่มี clamp connection เมื่อเส้นใยระยะที่1 ที่มีนิวเคลียสซึ่งมี incompatibility factor คนละชนิดมาพบกัน จะมีการรวมตัวของไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสจากเซลล์หนึ่งไปรวมอยู่ในอีกเซลล์หนึ่ง กลายเป็นเส้นใยระยะที่ 2 (secondary mycelium หรือ dikaryotic mycelium) มีสภาพเป็น dikaryon (n+n) หรือ heterokaryon มีการสร้าง clamp connection ขึ้นในขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส (mitosis) ทำให้เส้นใยระยะที่ 2 นี้ แบ่งเซลล์ขยายออกไปได้เรื่อยๆ

2. ระยะดอกเห็ด

เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดดอก เส้นใยระยะที่ 2 จะรวมตัวกันเกิดเป็นดอกเห็ด ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆดังนี้

2.1 หมวกดอก (pileus หรือ cap) กว้างประมาณ 5-12 เซนติเมตร มีรูปร่างนูนจนเกือบแบนราบ ผิวแห้ง ส่วนเคลือบผิว (cuticle) มีสีน้ำตาลออกแดง ตั้งแต่แดงอ่อนจนถึงแดงเข้ม ผิวอาจแยกเป็นร่อง เนื้อดอกเห็ดมีสีขาวหรือออกสีน้ำตาลในบริเวณใกล้ๆส่วนเคลือบผิว ดอกที่มีอายุมากจะมีเนื้อเหนียวกว่าดอกที่ยังอ่อนอยู่

2.2 ครีบ (lamellae) เป็นส่วนที่อยู่ใต้หมวกดอก มีสีขาว เมื่อถูกกระทบกระเทือนจนช้ำจะมีจุดสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้น และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อมีอายุมาก ครีบติดกับก้านแบบ adnate จนถึง adnexed ขอบมีลักษณะ serrate จนถึง denticulate ครีบหนาประมาณ 5-7 ไมโครเมตร

2.3 ก้านดอก (stipe หรือ stalk) ยาวประมาณ 3-5 เซนติเมตร เส้รผ่านศูนย์กลางประมาณ 8-13 มิลลิเมตร ขนาดเกือบเท่ากันตลอดความยาวของก้าน หรืออาจขนาดใหญ่กว่าตรงโคนก้าน เนื้อแข็งและเหนียว บริเวณผิวก้านมีเยื่อบางๆคล้ายขนปกคลุม

2.4 ลักษณะของสปอร์ (spore) ภายในเนื้อเยื่อของครีบในดอกเห็ด ซึ่งแต่ละเซลล์ประกอบด้วยสองนิวเคลียส จะมีการรวมกันของนิวเคลียส ได้นิวเคลียสแบบดิพลอยด์ (2n) เฉพาะเซลล์ที่จะมีการเจริญไปเป็น basidium เท่านั้น และเกิดการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส (maiosis) ทันที ได้สี่นิวเคลียส เจริญเป็นสปอร์ ซึ่งเรียกว่า เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ขนาด 5.5-6.5 x 3-3.5 ไมโครเมตร มีรูปร่าง subcylindric nonamyloid ผิวเรียบและมีผนังบาง หนึ่งเบสิเดีย (basidia) มีสี่เบสิดิโอสปอร์

การสร้างสปอร์ และลักษณะสปอร์ของเห็ดหอม (Alexopoulos et al., 1996)

ภายในเนื้อเยื่อของครีบในดอกเห็ดที่บริเวณเนื้อเยื่อส่วน Hymenial tissue ซึ่งแต่ละเซลล์ประกอบด้วยสองนิวเคลียสที่เรียกว่าไดคารีออน (n+n) จะพบว่ามีการรวมกันของนิวเคลียสแล้วกลายสภาพเปลี่ยนเป็นดิพลอยด์ (2n) โดยจะเกิดขึ้นเฉพาะเซลล์ที่จะมีการเจริญไปเป็นเบสิเดียมเท่านั้น การสร้างและพัฒนาเบสิเดียมและเบสิดิโอสปอร์ เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ตรงปลายเริ่มบวมพองออกเพื่อทำหน้าที่เป็นเบสิเดียม และนิวเคลียสทั้งสองของเซลล์ตรงปลายนี้รวมตัวกันเป็นดิพลอยด์ (2n) ซึ่งนิวเคลียสที่เป็นดิพลอยด์นี้ จะแบ่งตัวแบบไมโอซิสทันทีจนได้นิวเคลียสชนิดแฮพลอยด์ (n) จำนวนสี่นิวเคลียส และบนเบสิเดียมนี้เกิดก้านสั้นๆ (sterigma) จำนวนสี่อันขึ้นด้วย โดยนิวเคลียสทั้งสี่จะเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในก้านเหล่านี้ จนในที่สุดเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในเบสิดิโอสปอร์ที่พัฒนาขึ้นตรงปลายก้าน ซึ่งเมื่อเจริญเต็มที่แล้วแต่ละเบสิดิโอสปอร์มีหนึ่งนิวเคลียสเรียกว่าเบสิดิโอสปอร์

(basidiospore) โดยสปอร์ของเห็ดหอมที่เกิดขึ้นโดยทั่วไปจะมีขนาด 5.5-6.5 X 3-3.5 ไมโครเมตร มีรูปร่างรี ผิวเรียบและมีผนังบางและขาวมาก โดยส่วนใหญ่หนึ่งเบสิเดีย (basidia) จะมีสี่เบสิดิโอสปอร์

สปอร์คือ หน่วยของเชื้อราที่หยุดการเจริญเติบโต ไซโทพลาสมจะมีความหนาแน่น ผนังหนาขึ้นและอัตราเมตาบอลิซึมเป็นไปอย่างช้าๆ การงอกของสปอร์เป็นการบ่งชี้ถึง การเริ่มมีปฏิกิริยาตอบสนองของสปอร์ต่อการเกิด thallus ซึ่งมักจะเกิดขึ้นหลังจากช่วงระยะพักตัว การงอกต้องการความเปลี่ยนแปลงในอัตราของกระบวนการเมตาบอลิซึมก่อนเกิดการงอกออกมาให้เห็นของเส้นใยจากสปอร์

การงอกของสปอร์มีกลไกดังนี้

1. สปอร์ได้รับการกระตุ้นจากภายนอก โดยทั่วไปจะเกิดจากปฏิกิริยาที่เรียกว่า rehydration เพราะสปอร์คือส่วนที่ถูก dehydrated มักจะถูกกระตุ้นให้งอกได้จากน้ำหรือความชื้น
2. สปอร์ดูดซับน้ำเข้าไปและเริ่มเกิดการพองตัวขึ้น (swelling) จนมีขนาดประมาณ 1.5 – 3 เท่าของขนาดเดิม หลังจากสปอร์พองตัวขึ้นแล้วก็จะเกิด germination tube โผล่ทะลุผนังสปอร์ออกมา
3. เริ่มมีเส้นใยแทงตัวทะลุออกมาตาม germination tube ในตอนแรกจะเป็นเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียส ต่อมาจึงมีผนังมากั้นทำให้ได้เส้นใยที่มี 1 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์

การแปรผันของจำนวนโครโมโซม (variation in chromosome number) สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย (2546) กล่าวดังนี้

การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมอาจเป็นการเพิ่มขึ้นหรือลดลงเป็นบางแท่ง (aneuploidy) หรือหายไปทั้งชุดโครโมโซม (monoploidy) หรือเพิ่มขึ้นเป็นชุด (euploidy) จากจำนวนดิพลอยด์ปกติ มีผลกระทบต่อฟีโนไทป์ที่แสดงออก

1. Aneuploidy พบได้ในพืชมากกว่าในสัตว์มีแบบต่างๆเช่น

- nullisomy การสูญเสียโครโมโซมแท่งใดๆไปทั้งสองแท่ง จนไม่มีตัวแทนโครโมโซมแท่งนั้นในจีโนม (2n-2)
- monosomy การสูญเสียโครโมโซมไป 1 แท่ง คงเหลือคู่โครโมโซมเพียงแท่งเดียวในจีโนม (2n-1)
- trisomy การที่โครโมโซมเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งแท่งจากที่มีอยู่เดิม 2 แท่ง รวมเป็น 3 แท่ง (2n+1)

- tetrasomy การที่โครโมโซมเพิ่มขึ้นอีก 2 เท่า จากที่มีอยู่เดิม 2 แท่ง รวมเป็น 4 แท่ง (2n+2)

2. Monoploidy ในธรรมชาติมีน้อยมากเนื่องจากการขาดยีนปกติที่จะทำหน้าที่นดนังผลของยีนลีธัลโมโนพลอยด์ จึงมักตายก่อนที่จะตรวจพบ ด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางพืชได้นำหลักการทำ monoploid มาประยุกต์ เช่น การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูแล้วเหนี่ยวนำให้พัฒนาเป็นต้น พืชที่เกิดขึ้นจึงเป็น monoploid และอาจทำการเหนี่ยวนำให้เป็นต้นพืชดิพลอยด์โฮโมไซโกตด้วยสารโคลชิซิน

3. Euploidy จีโนมของสิ่งมีชีวิตที่จำนวนชุดโครโมโซมแฮพลอยด์มากกว่า 3 ขึ้นไปเรียกว่าเกิดพอลิพลอยด์ (polyploid) โดยทั่วไปพืชมีการทนต่อการมีพอลิพลอยด์ได้ดีกว่าสัตว์ และเกิดขึ้น 2 แบบโดยต่างกันอยู่ที่แหล่งที่มาของโครโมโซม

- Autopolyploidy หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนชุดโครโมโซมที่เหมือนกับพ่อแม่ เช่น autotriploid มีโครโมโซมเป็น AAA และ autotetraploid เป็น AAAA เมื่อเทียบกับดิพลอยด์ที่เป็น AA

- Allopolyploidy หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนชุดโครโมโซมต่างจากสปีชีส์ ส่วนมากมักเกิดการเพิ่มจำนวนชุดเป็นสองเท่า ดังนั้นจำนวนโครโมโซมจึงเป็น AABB ในกรณีการเป็น allotetraploid

Autopolyploid เกิดจากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่าในช่วงใดๆของวงชีพ หรืออาจโดยการเหนี่ยวนำด้วยความร้อน ความเย็น หรือสารเคมี เช่น โคลชิซิน โดย tetraploid มักไม่เป็นหมัน (ไม่จำเป็นเสมอไป) เนื่องจากโครโมโซมมีคู่ทำให้ไมโอซิสดำเนินไปได้อย่างปกติ และมักส่งผลให้มีขนาดใหญ่ เช่น ขนาดดอกหรือผลใหญ่ขึ้น จากการขยายขนาดของเซลล์ ไม่ใช่มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งการขยายขนาดและการเป็นหมันของพืชมีคุณค่าทางการค้า เช่น พืช triploid อย่างมันฝรั่ง กล้วย แตงโม และแอบเปิลสำหรับผลิตไวน์ การขยายพันธุ์พืชต้องใช้วิธีการไม่อาศัยเพศ พืชการค้าที่เป็น tetraploid เช่น อัลฟาฟา กาแฟ ถั่วลิสงและแอปเปิลสายพันธุ์แมคอินทอช พืชเหล่านี้ให้ผลขนาดใหญ่และมีการเจริญเติบโตได้ดี

คุณสมบัติโดยทั่วไปของสิ่งมีชีวิตพอลิพลอยด์ (Dnyansagar, 1992)

โดยทั่วไปมักจะเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตพอลิพลอยด์กับสิ่งมีชีวิตดิพลอยด์ตามลักษณะการแสดงออกที่มองเห็น แต่ในความจริงการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมอาจมีผลต่อทั้งการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานและลักษณะทางกายภาพ แต่การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพนั้นตรวจสอบได้ค่อนข้างยาก

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตพอลิพลอยด์โดยทั่วไปเมื่อเทียบกับดิพลอยด์คือ

1. ลำต้นหรือกอหนาแน่น และอวบใหญ่
2. มีใบกว้าง หนา และเขียวเข้มขึ้น
3. ปากใบของพืชมักมีขนาดใหญ่ขึ้น
4. ขนตามลำต้นและใบจะดกและหยาบกว่า
5. ขนาดและความแข็งแรงโดยรวมของต้นเพิ่มขึ้น เช่น Nicotiana
6. ขนาดดอกและส่วนของดอกเพิ่มขึ้น เช่น Chrysanthemum
7. ละอองเกสรตัวผู้มีขนาดใหญ่ขึ้น
8. จำนวนดอกต่อต้นลดลง
9. พืชมักมีขนาดผลใหญ่ขึ้น เช่น แอปเปิ้ล
10. ขนาดเมล็ดมักมีขนาดใหญ่ขึ้น
11. ท่อลำเลียงน้ำ (xylem) ในลำต้นมีขนาดใหญ่
12. นิวเคลียสมีขนาดใหญ่กว่า
13. การเกิดพอลิพลอยด์ มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของสิ่งมีชีวิตด้วย อาจมีความผิดปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ทำให้เป็นหมัน นักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงใช้ประโยชน์ในการสร้างสายพันธุ์พืชไร้เมล็ด เช่น แตงโมพันธุ์ไร้เมล็ด เป็นต้น

ลักษณะทางสรีระวิทยาของสิ่งมีชีวิตพอลิพลอยด์โดยทั่วไปเมื่อเทียบกับดิพลอยด์ ตามที่มีผู้สังเกตพบ คือ

1. อัตราการเจริญเติบโตของพืช autotetraploid ช้ากว่า
2. ออกดอกช้ากว่า
3. ปริมาณ nectaric เพิ่มขึ้นในมะเขือเทศ tetraploids
4. ปริมาณ ascorbic acid เพิ่มขึ้นในมะเขือเทศและกะหล่ำปลี tetraploids
5. ปริมาณ alkaloid โดยรวมเพิ่มขึ้นใน autotetraploids ของ *Rauvolfia serpentine*
6. Na Ca K และ Mg มีเปอร์เซนต์โดยรวมเพิ่มขึ้น แต่คาร์โบไฮเดรต และ S กลับลดลง
7. ข้าวโพด tetraploids พบว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิต มีวิตามินเพิ่มขึ้น ในขณะที่องุ่น tetraploids มีปริมาณ riboflavin และ pantothenic acid ไม่ต่างจากดิพลอยด์
8. osmotic concentration ของเซลล์สูงขึ้น
9. ปริมาณน้ำในเซลล์จะเพิ่มขึ้นตามขนาดของเซลล์ จึงทำให้มีความต้านทานการเป็นน้ำแข็งน้อยกว่า

ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตพอลิพลอยด์เมื่อเทียบกับดิพลอยด์

1. พอลิพลอยด์ คือสิ่งมีชีวิตที่มี allelomorphic genes มากกว่าสอง

2. alloteraploids มีความเสถียรทางพันธุกรรมมากกว่าดิพลอยด์เพราะ การแยกกันอย่างอิสระของโครโมโซมใน autotetraploids มีผลให้ recessive types มีความถี่ในการเกิดน้อยกว่า

3. อัตราการกลายพันธุ์น้อยกว่าดิพลอยด์ตามหลักวิวัฒนาการที่กล่าวว่า สปีชีร์ที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าถูกพิจารณาว่าเป็นสปีชีร์ที่มีวิวัฒนาการสูงกว่า โดยพืชที่มีจำนวนโครโมโซมมากๆถูกสันนิษฐานว่าเกิดจากที่พืชชนิดนั้นเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเอง หรือเกิดจากการผสมกับโครโมโซมของพืชอื่น

การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ (สาริณี ไชยเจริญ, 2538)

นอกจากพอลิพลอยด์จะเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติแล้ว ยังอาจเกิดได้โดยการชักนำให้เกิดโดยมนุษย์กระทำ ได้แก่ การใช้รังสี ความร้อน ความเย็น (environment shock) หรือโดยการใช้สารเคมีบางชนิด เช่น colchicine, ethylmethane-sulphonate (EMS), N-ethyl-N-nitrosourea (NE), N-methyl-N-nitrosoquanidine (NG), benzene paradichlorobenzene, 8-bromonaphthalene, 8-oxyquinoline, 5-agacytidine, nitrogendioxide และยาฆ่าแมลงบางชนิด เช่น lindane แต่สารเคมีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุดคือ colchicine

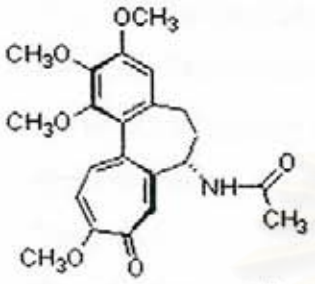
การชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ด้วยโคลชิซิน (colchicine)

โคลชิซิน เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ดีในพืชหลายชนิด หาซื้อง่าย และที่สำคัญคือไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในด้านอื่นๆ โดยที่สารนี้จะทำให้โครโมโซมเพิ่มเป็นสองเท่า โดยภายในโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลง คือจะไปยับยั้งการเจริญของ spindle fiber ในกระบวนการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิสหรือไมโอซิส ทำให้การแยกตัวของโครมาติดช้าลง ไม่มีการเคลื่อนที่ของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส เป็นผลให้โครโมโซมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (Derman,1940, Eigsti , Dustin, and Gay-Winn, 1955) จากที่สารนี้มีผลต่อเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวเท่านั้น จึงนิยมใช้สารนี้กับ ตา ยอดอ่อน ต้นอ่อน และเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Hagino, Murakami-Murofushi, and Ohta, 1978.)

โคลชิซิน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง spindle fiber ในขณะที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวมีผลให้เซลล์หยุดอยู่ที่ระยะเมทาเฟส (Eigsti et al, 1949) ซึ่งทำให้เกิดเป็น autopolyploid nuclei ต่อมา จึงนิยมใช้ในการศึกษาโครโมโซม และใช้ชักนำให้มีการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อได้สายพันธุ์ใหม่ที่อาจมีลักษณะที่ดีทางเศรษกิจ โดยส่วนใหญ่นิยมใช้ในพืชเช่น ทำให้แตงโมพอลิพลอยด์

มีเปอร์เซนต์น้ำตาลสูงขึ้นกว่าดิพลอยด์ หรือกล้วยไม้ tetraploid มีกลีบดอกขนาดใหญ่ บานอยู่ได้นานขึ้น (สาริณี ไชยเจริญ, 2538)

คุณสมบัติของโคลชิซินคือ เป็นสารประเภทอัลคาลอยด์ (alkaloid) มีผลึกเป็นรูปเข็ม ไม่มีสีแต่สีจะเข้มขึ้นเป็นสีเหลืองอ่อนเมื่อถูกแสง มีน้ำหนักโมเลกุล 399.43 จุดหลอมเหลว 155-157 ^{o}C สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{25}NO_6$ สูตรโครงสร้างคือ



โคลชิซิน เป็นด่างอ่อน หรือเป็นกลาง (Husscin and Narsa, 1974) ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับกรดเพื่อให้เกิดเกลือของอัลคาลอยด์ ซึ่งแตกต่างจากอัลคาลอยด์ชนิดอื่น แต่ยังคงถูกจัดเป็นอัลคาลอยด์ เพราะสามารถตกตะกอนกับสารที่ใช้ทดสอบอัลคาลอยด์ (alkaloid reagent) ได้หลายตัว (เอกรินทร์, 2525) ละลายได้ดีในอัลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และในน้ำเย็น ละลายได้น้อยในน้ำอุ่น น้ำร้อน เบนซิน และแทบจะไม่ละลายในอีเทอร์ เป็นสารที่สกัดได้จากส่วนของเมล็ดกับหัวของ autumn crocus (*Colchicum autumnale*. Linn) และใน Colchicum อีกหลายชนิด เช่น *C. luteum*. Baker, *Gloriosa superba* Linn. (Eigsti and Dustin, 1955)

การใช้สารละลายโคลชิซินในเห็ดรา

Toyama, และ Toyama, (1995a) ทดลองชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ด้วยโคลชิซีนกับเส้นใย *Trochoderma reesei*. QM 9414 พบว่าพวก diploid มีการผลิต cellulose เพิ่มขึ้นเกือบเป็น 2 เท่าของสายพันธุ์เดิม แต่ binucleate conidia ที่เป็น tetraploids ไม่มีการผลิต cellulase เพิ่มขึ้นและเมื่อนำ tetraploid นี้ไปชักนำด้วย โคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ จึงเกิด multi nuclei ที่ผลิต cellulose มากกว่า binucleate tetraploidsเดิม และdiploid แสดงให้เห็นว่า multinucleation technique มีส่วนช่วยในการเพิ่มการผลิตcellulase

เห็ดหอมทนร้อนสายพันธุ์ CUL074 จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีข้อดีคือเส้นใยสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 26°C-30°C และสามารถออกดอกได้ที่อุณหภูมิ 22°C -26°C แต่ดอกเห็ดมีขนาดเล็ก จึงควรนำมาปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นพอลิพลอยด์ แต่สายพันธุ์ลูกผสมบางคู่ที่ได้จากการผสมเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวนั้น บางครั้งพบว่าไม่สามารถเกิดดอกเห็ดได้ (เป็นหมัน) ถึงแม้เป็น dikaryotic mycelia และมีสภาพการเจริญของเส้นใยในถุงขี้เลื่อยเป็นปกติก็ตาม การทดสอบความสามารถในการเกิดดอกจึงเป็น

สิ่งจำเป็นและต้องทำก่อนการคัดเลือกลักษณะอื่น จากนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ซึ่งให้ผลผลิตที่น่าสนใจมาทดสอบความอยู่ตัว (stability) ของเชื้อในด้านการเจริญของเส้นใยเมื่อถ่ายเชื้อ (subculture) ไปเรื่อยๆ ในช่วงเวลาที่ยาวนานขึ้น และทดสอบความอยู่ตัวในด้านการออกดอกซึ่งสามารถเปรียบเทียบผลผลิตของ culture รุ่นหลังกับ culture รุ่นแรก เพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับความแปรปรวนของสายพันธุ์เหล่านี้ (สุทธพรรณ ตรีรัตน์ และคณะ, 2530)

คมสัน นันทสุนทร (2545) นำเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ CUL074 จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาทำการศึกษา ดังนี้

1. พฤติกรรมการเจริญบนอาหาร PDA พบว่าการแบ่งเซลล์จะเริ่มขึ้นเมื่อเส้นใยมีความยาวประมาณ 450-700 µm โดยเริ่มสร้าง clamp connection เพื่อเป็นท่อส่งผ่านนิวเคลียส ซึ่งใช้เวลาในการสร้าง clamp connection นับจากเกิดตุ่มเล็กๆพอสังเกตได้ จะงอกยาวมาจรดกับตัวเซลล์ด้านล่าง (นับจากปลายเซลล์) ประมาณ 20 นาที ต่อมาเกิดผนังกั้นระหว่างเซลล์บริเวณ clamp connection เองประมาณ 10 นาที จากนั้นประมาณ 70-90 นาที จะมีการสร้างกิ่งที่บริเวณใต้ clamp connection ที่เกิดใหม่ จนเมื่อกิ่งงอกยาวออกไปประมาณ 110 µm จึงเกิด clamp connection เพื่อแบ่งเซลล์ออกไปจากเส้นใยต่อไป รวมการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งของเส้นใยหลักจะห่างกัน ประมาณ 2 1/2ชั่วโมง ถึง 3 ชั่วโมง

2. การตัดเส้นใยเพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยว ณ ตำแหน่งต่ำกว่า clamp connection แรก นับจากปลายเส้นใยลงมาประมาณ 200 µm นั้น พบว่าเส้นใยที่มีกิ่งยาว 30-100 µm จะมีการสลายตัวของกิ่งนี้หลังตัด ทำให้ได้เซลล์เดี่ยวตามต้องการ โดยสามารถตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวได้ 57 เซลล์ จาก 58 เซลล์ คิดเป็น 98.30 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้พบ 40 เซลล์ที่มีระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ใหม่หลังตัดค่อนข้างคงที่ คือ ใช้เวลา 70 นาที คิดเป็น 70.17 เปอร์เซนต์ของเซลล์เดี่ยวที่ตัดแยกได้

3. เมื่อนำแผ่น PDA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. ที่มีเส้นใยสายพันธุ์ CUL074 เจริญอยู่เต็มมาเลี้ยงในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1.5%(w/v) (15 µg/µl) เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วตัดแยกเส้นใยบางส่วนมาเลี้ยงบน PDA ก่อนตัดแยกเซลล์เดี่ยวนำไปเลี้ยงเพื่อขยายเส้นใยบนอาหาร PDA ได้สายพันธุ์ S05 ที่พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของ DNA น้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมมาก ซึ่งอาจเนื่องจากการใช้สารละลายโคลชิซินที่เข้มข้นและนานเกินไป จนโครโมโซมบางส่วนขาดหายไป หรือเกิด aneuploid ขึ้น

4. เมื่อนำเส้นใยสายพันธุ์ CUL074 มาแยกเซลล์เดี่ยว แล้วหยดสารละลายโคลชิซิน 1.5 %(w/v) (15 µg/µl) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นหยดล้างเซลล์และแช่น้ำกลั่นต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงเพื่อขยายเส้นใยบนอาหาร PDA ได้สายพันธุ์ S07 ที่พบว่าความเข้มข้นของปริมาณ DNA ไม่ต่างไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 มากนัก

5. ผลการนำเส้นใยที่ทดสอบด้วยโคลชิซินนี้ไปทำการเปิดดอกพบว่า ออกดอกยาก มีลักษณะผิดปกติค่อนข้างมาก และไม่สามารถสร้างสปอร์ โดยดอกมีลักษณะแผ่แบนออกด้านข้างเป็นแผ่นใหญ่ หนา หงิกงอ สีซีดจาง มีขนาดไม่แน่นอน และก้านดอกสั้นมาก

6. สรุปว่า เมื่อได้ทดลองนำเซลล์เดี่ยวของเห็ดหอมสายพันธุ์ CUL074 ที่ตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มาชักนำให้เกิดมิวเทชั่น (mutation) โดยหยดสารละลายโคลชิซิน 1.5%(w/v) พบว่าปริมาณ DNA ลดลงจากเดิม เมื่อเปรียบเทียบวัดการดูดกลืนคลื่นแสงของ DNA (OD_{260nm}) ของเส้นใยเห็ดหอมจึงเป็นเหตุผลให้เชื่อได้ว่าโคลชิซินไม่เพียงแต่มีคุณสมบัติชักนำให้เกิด พอลิพลอยด์เท่านั้น แต่ยังชักนำให้เกิด aneuploid อีกด้วย

ขณะที่ Handa และคณะ (1997) ใช้โคลชิซินที่ความเข้มข้นเพียง 0.15 เปอร์เซนต์ทดสอบกับ *Agaricus bisporus* พบว่าทำให้ปริมาณ DNA เพิ่มขึ้นหลายเท่าตัวToyama, และ Toyama, (1994)ใช้โคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ทดสอบกับ *Pleurotus ostreatus* พบ hyper polyploidy multinucleation จำนวนมากเช่นเดียวกับที่ทดสอบกับ *Trichoderma reesei* (Toyama, และ Toyama, 1995a)

ในขณะที่ Toyama, และ Toyama, (1995c) ใช้สารละลายโคลชิซิน 0.01 และ 0.1 เปอร์เซนต์ กับเส้นใย *Lentinus edodes* พบ multinucleate และ small nuclei จำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wakata, และ Sasaki, (1987) กล่าวว่า รังสีและสารเคมีที่รุนแรงหลายชนิดเป็นสาเหตุให้โครงสร้างของโครโมโซมผิดปกติ หากความผิดปกตินี้เกิดขึ้นกับตำแหน่ง kinetochores ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ให้สาย spindle fiber เกาะ หรือการทำให้หน้าที่ของ kinetochores นี้สูญเสียไปจะเรียกชิ้นส่วนเหล่านี้ว่า acentric fragment (AF) ในขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส AF บางส่วนจะถูกกันออกไปจากการแบ่งเซลล์รุ่นต่อมา และอาจสร้าง small extra nuclei ภายใน cytoplasm ในเซลล์ลูกหนึ่งเซลล์ หรือทั้งสองเซลล์ก็ได้ เรียกว่า micronuclei (MN) แต่ในเซลล์ที่แบ่งตัวอย่างช้าๆ หรือไม่แบ่งเซลล์ หรือถูกยับยั้งการแบ่งเซลล์ เมื่อถูกชักนำด้วยสารเคมีหรือรังสีดังกล่าว อาจถูกตีความได้ว่าไม่เกิด MN ซึ่งความจริงอาจมี AF บางส่วนถูกกันออกไปหลังจากเกิดการแบ่งเซลล์ไปหลายรุ่นแล้วยังพบปริมาณความเข้มข้น DNA เพิ่มขึ้นกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเมื่อใช้สารโคลชิซินทดสอบกับเส้นใยเห็ดรา อาจเนื่องมาจากการแบ่งเซลล์นั้นผ่านไปเพียงไม่กี่รุ่น ชิ้นส่วนโครโมโซม AF จึงยังคงอยู่ในนิวเคลียส หรือในไซโตปลาซึม และสามารถสกัดเพื่อตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของ DNA ได้

บทที่ 3
เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และวิธีการวิจัย

เครื่องมือ

1. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) แบบอัดความดัน
2. ตู้อบความร้อน
3. กล้องถ่ายภาพดิจิตอล รุ่น Power Shot A620 Canon
4. กล้องจุลทรรศน์
5. กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscopes) รุ่น Wilover 5 ของบริษัท Hund, Germany
6. เครื่องชั่งดิจิตอลแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น 80 A-200Mของบริษัท Precisa, Switzerland
7. เครื่องชั่ง Triple Beam Balance ของบริษัท Ohaus,USA
8. เทอร์โมมิเตอร์
9. ไม้วัดเวอร์เนีย
10. สายวัดความยาว
11. Vacuum Pump และ Glass filter holder
12. Filter Paper Circlesเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตรของบริษัท Schleicher & Schuell
13. Millipore ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ของบริษัท Sartorius
14. Syringe
15 Desicator
16. micrometer ของบริษัท Nikon, Japan

เคมีภัณฑ์

1. อาหารแข็ง PDA (Potato dextrose agar) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
2. อาหารเหลว PDB (Potato dextrose broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
3. วุ้นผง (agar) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
4. ผงสกัดยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
5. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
6. Colchicine ของบริษัท SIGMA, Germany
7. ข้าวฟ่าง
8. ยิปซั่ม

9. กรดอะซิติก
10. Propionic acid
11 Iron alum
12 แอลกอฮอล์ 100% และ 95%
13 สีย้อมโครโมโซม hematoxylin
14 สีย้อมโครโมโซม orcein

เส้นใยที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อเห็ดหอมสายพันธุ์ CUL074 จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงเส้นใยในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 ^{o}C) เพื่อเป็นเส้นใยเริ่มต้นการทดลอง

วิธีการวิจัย

1. การ เหนี่ยวนำเซลล์เห็ดหอมด้วยโคลชิซิน

1.1 นำเส้นใย CUL074 มาทำการตัดเพื่อแยกเซลล์เดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศ์ที่ตำแหน่งเซลล์ที่สองจากปลายเส้นใยบน PDA (คมสัน นันทสุนทร, 2545) และหยดแต่ละเซลล์เดี่ยวด้วยสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.15%(w/v) (1.5 µg/µl) จำนวน 2 หยด แช่ไว้เป็นระยะเวลาต่างกันคือ 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, และ 70 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยดล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นและแช่น้ำกลั่นต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงเพื่อขยายเส้นใยบนอาหาร PDA และเรียกเส้นใยดังกล่าวว่าสายพันธุ์ 5M, 10M, 20M, 30M, 40M, 50M, 60M, และ 70M (ปิยพัทธ์ ปิ่นอ่อน, 2546) ตามลำดับ

1.2 นำเส้นใยสายพันธุ์ S05 ที่คมสัน นันทสุนทร (2545) ได้เตรียมไว้จากการนำแผ่น PDA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. ที่มีเส้นใยสายพันธุ์ CUL074 เจริญอยู่เต็ม มาเลี้ยงในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1.5% (w/v) (15 µg/µl) เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนตัดแยกเส้นใยบางส่วนมาเลี้ยงบน PDA จากนั้นจึงทำการตัดเพื่อแยกเซลล์เดี่ยวไปเลี้ยงบนอาหาร PDA และเรียกเส้นใยดังกล่าวว่า สายพันธุ์ S05

1.3 ใช้เส้นใยสายพันธุ์ S07 ที่คมสัน นันทสุนทร (2545) ได้เตรียมไว้จากการนำเส้นใยสายพันธุ์ CUL074 มาแยกเซลล์เดี่ยว ก่อนหยดด้วยสารละลายโคลชิซิน 1.5 % (w/v) (15 µg/µl) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยดล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นและแช่น้ำกลั่นต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเลี้ยงเพื่อขยายเส้นใยบนอาหาร PDA และเรียกเส้นใยดังกล่าวว่าสายพันธุ์ S07

1.4 นำเส้นใยทั้ง 11 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ดั้งเดิมCUL074, 5M, 10M, 20M, 30M, 40M, 50M, 60M, 70M, S05, และ S07 มาบ่มเลี้ยงบน PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °C) เพื่อใช้เป็นเส้นใยในการทดลองต่อไป

2. ศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมทั้ง 11 สายพันธุ์ ในอาหารต่างๆ

โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD)

2.1 วัดการเจริญของเส้นใยในอาหาร PDA จนเต็มจานเพาะที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °C) และที่อุณหภูมิ 23 °C โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุก 2 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 จานเพาะ

2.2 วัดการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในสภาพนิ่งที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °C) เก็บเส้นใยทุก 4 วันไปอบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มำมาชั่งเพื่อเปรียบการเจริญจากน้ำหนักแห้งของเส้นใย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวดรูปชมพู่

2.3 วัดการเจริญของของเส้นใยในหลอดอาหารข้าวฟ่างจากปากหลอดถึงก้นหลอด ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °C) และที่อุณหภูมิ 23 °C โดยใช้หลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร บรรจุข้าวฟ่างสูง 10 เซนติเมตร วางแผ่น PDA ที่มีเส้นใยเจริญอยู่เต็มบนผิวอาหาร วัดการเจริญของเส้นใยทุก 2 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 40 หลอด

2.4 วัดการเจริญของเส้นใยในถุงขี้เลื่อยเพาะเห็ด

แยกขยายเส้นใยทั้ง 11 สายพันธุ์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อวุ้น(PDA) ก่อนถ่ายลงข้าวฟ่างรอจนเส้นใยเดินเต็มเพื่อเป็นหัวเชื้อข้าวฟ่าง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อข้าวฟ่างลงถุงขี้เลื่อยเพาะเห็ดขนาดบรรจุ 600 กรัม วัดการเจริญของเส้นใยจากปากถุงถึงก้นถุง ทุกสายพันธุ์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 40 ถุง

3. การเก็บผลผลิตดอก

3.1 นำถุงขี้เลื่อยที่มีเส้นใยเดินเต็มถุงแล้วไปบ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิเพื่อความสมบูรณ์ของเส้นใยเป็นเวลา 4-5 เดือน จึงทำการเปิดดอกเป็นเวลา 2 อาทิตย์

3.2 เก็บผลผลิตดอก(สุทธพรรณ ตรีรัตน์ และคณะ, 2530) เปรียบเทียบสายพันธุ์

4. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมของดอกเปรียบเทียบสายพันธุ์

4.1 สุ่มดอกเห็ดที่อายุ 2 วัน 3 วัน 4 วัน 5 วัน6 วัน และ 7 วัน เพื่อคัดดอกที่เหมาะสมในการนับจำนวนโครโมโซม ซึ่งอยู่ในช่วงการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส เพื่อสร้างเบสิดิโอสปอร์

4.2 นำดอกเห็ดมาทำการ fixation เพื่อหยุดการแบ่งนิวเคลียสโดยใส่ส่วนของ

ดอกเห็ดที่อยู่ใน button stage ลงไปแช่ใน propionic acid ต่อ ethanol บริสุทธิ์ อัตราส่วน 1:2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการย้อมสี

4.3 นำดอกเห็ดที่ผ่านการ fixation แล้วมาล้างด้วยน้ำกลั่น ตัดเนื้อเยื่อส่วนใต้ครีบ hymenial tissue วางลงในหยดสีย้อม aceto-iron-hematoxylin บนแผ่นสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยให้เนื้อเยื่อแตก ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ซับสีย้อมส่วนที่ล้น ก่อนใช้ด้ามเข็มเขี่ยกดเบาๆให้เนื้อเยื่อกระจายและแบน อุ่นแผ่นสไลด์จนสีย้อมเกือบเดือดเพื่อเพิ่มความเข้มของการติดสีของโครโมโซม และเพื่อทำให้ไซโทพลาสซึมใสขึ้น จากนั้นเคลือบปิดขอบกระจกปิดสไลด์ก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

4.4 ศึกษาจำนวนโครโมโซมเปรียบเทียบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1000X และนำภาพถ่ายไปขยายอีก 3X

5. ทดสอบความอยู่ตัว (stability) ของสายพันธุ์โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดหอมที่ได้ในแต่ละรุ่นเพื่อเตรียมเป็นเส้นใยในรุ่นต่อไป ดังนี้

รุ่น G1 คือ เส้นใยที่ได้จากการเตรียมเซลล์เดี่ยวเริ่มต้น

รุ่น G2 คือ เส้นใยที่ได้จากการนำดอกที่ได้จากรุ่น G1 มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

รุ่น G3 คือ เส้นใยที่ได้จากการนำดอกที่ได้จากรุ่น G2 มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ

1.1 จากการนำเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ CUL074 มาทำการตัดแยกเซลล์เดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยตัดเส้นใยที่มีกิ่งยาวตั้งแต่ 30 μm ถึง 100 μm พบว่าเส้นกิ่งได้สลายไปจึงสามารถแยกได้เซลล์เดี่ยวจริง การเหนี่ยวนำเซลล์เดี่ยวด้วยสารละลายโคลชิซิน 0.15%(w/v) ในช่วงเวลา 5-70 นาที ก่อนเกิดการแบ่งเซลล์ใหม่ ทำ 3 ซ้ำ พบว่าได้เซลล์เดี่ยวที่ถูกเหนี่ยวนำและมีชีวิตรอดครบ 3 ซ้ำ เส้นใยเป็นปกติพร้อมสำหรับการทดลองต่อไป

1.2 เส้นใยสายพันธุ์ S05 และ S07 มีการเจริญของเส้นใยเป็นปกติพร้อมสำหรับการทดลองต่อไป

2. การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมทั้ง 11 สายพันธุ์ ในอาหารต่างๆ

เนื่องจากเส้นใยของสายพันธุ์ 20M และ S07 มีความอ่อนแอและมักหยุดเจริญเมื่อเพาะในถุงขี้เลื่อย จนไม่สามารถเก็บผลทางสถิติได้ และขาดเส้นใยในรุ่น 2 (G2) ของทั้ง 2 สายพันธุ์ ในบางการทดลอง อย่างไรก็ดี ได้พยายามทำการเปิดดอกเพื่อผลิตเส้นใยในรุ่น G2 ทำให้มีผลแสดงในบางการทดลอง

เส้นใยโดยรวมของทุกรุ่นมีสีขาวลักษณะใกล้เคียงกัน ยกเว้นG3-CUL074 และ G3-10M ที่มีลักษณะเส้นใยรวมตัวหนาแน่นขึ้น มีสีขาวขุ่นกว่าและเป็นเงา ส่วนG2-S07 กลับมีการเจริญได้เร็วขึ้นกว่าปกติ โดยยังคงลักษณะของเส้นใยเห็ดอยู่ อย่างไรก็ตามยังมิได้นำไปเพาะเปิดดอกจึงไม่สามารถสรุปได้

ทุกสายพันธุ์มีการเจริญที่อุณหภูมิควบคุม 23 °C ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) ยกเว้น G2-S07 ในอาหารข้าวฟ่าง

การเจริญในอาหาร PDA เริ่มจากการนำเส้นใยที่เจริญบนชิ้นวุ้น PDA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม.วางกลางจานเพาะ แล้ววัดโคโลนีจนถึงขอบจานเพาะประมาณ 9 ซม.จึงหยุดวัด

การเจริญในอาหารข้าวฟ่าง เมื่อวางชิ้นวุ้นของเส้นใยบนอาหารข้าวฟ่าง เส้นใยจะค่อยๆฟูบนชิ้นวุ้น จากนั้นจึงแผ่ไปตามผิวหน้าข้าวฟ่าง ก่อนเจริญลงตามแนวดิ่งอย่างสม่ำเสมอ ระยะแรกเส้นใยจะค่อนข้างบาง และกระจายห่าง จากนั้นจึงสานตัวกันหนาแน่นขึ้นครอบคลุมเมล็ดข้าวฟ่าง

การเจริญในถุงขี้เลื่อย เนื่องจากถุงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมาก บางครั้งเส้นใยเจริญลึกเข้าไปแต่ไม่สามารถวัดได้จากด้านข้างถุง จึงเสมือนเส้นใยเจริญไม่สม่ำเสมอ

การเจริญในอาหารเหลว PDB ต้องให้ชิ้นวุ้นเส้นใยลอยนิ่งบนกลางผิวอาหารเหลว จึงจะเจริญได้ปกติ และเมื่อเจริญเต็มผิวหน้าแล้วเส้นใยจะปีนขึ้นขอบขวดเช่นเดียวกับในอาหารแข็ง PDA

อย่างไรก็ตาม หากปล่อยให้เส้นใยเจริญต่อจนเต็มครอบคลุมอาหารที่อุณหภูมิเย็นหรือได้รับการกระตุ้นเย็นในอาหารทุกชนิด พบว่าเกิดการรวมตัวของเส้นใยในลักษณะเดียวกับการสร้างตุ่มดอก โดยเฉพาะในอาหารข้าวฟ่าง ซึ่งเห็ดหอมสามารถเจริญเป็นดอกได้ แต่มีสีเทาออกขาว ไม่พบการสร้างสปอร์แต่อย่างใด เมื่อนำเนื้อเยื่อไป culture พบว่าสามารถเจริญให้เส้นใยได้เช่นเดียวกัน

หลังจากทดลองเพาะเห็ดหอมรุ่น G1 ในถุงขี้เลื่อย เปรียบเทียบ 2 ฤดูกาล สังเกตพบว่าเส้นใยเกือบทั้งหมดไม่สามารถเจริญได้ตามปกติในสภาวะอุณหภูมิห้องในช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน เพราะเป็นฤดูร้อนที่ช่วงกลางวันอบข้าวมีอุณหภูมิประมาณ 32-33 °C มีผลให้เส้นใยทั้งหมดหยุดการเจริญ ในขณะที่อุณหภูมิห้องของช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคมประมาณที่ 28 °C เส้นใยสามารถเจริญได้ปกติ จึงเกิดความแตกต่างอย่างชัดเจนของอุณหภูมิห้องในแต่ละฤดูกาลและการทดลองเพาะในถุงขี้เลื่อยที่มีจำนวนถุงต่อซ้ำมากนั้นจำเป็นต้องใช้พื้นที่ในร่มทดลองมาก ดังนั้นจึงงดการทดลองที่อุณหภูมิห้องนับจากรุ่นนี้เป็นต้นไป

การทดลองที่ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ได้ผลดังนี้

2.1 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) (ตารางที่1) พบว่า 40M มีการเจริญดีที่สุด และดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 รองมาคือ 30M 50M 60M และ70M มีการเจริญไม่ต่างจาก CUL074 ส่วน 5M 10M 20M S05 และ S07 มีการเจริญช้ากว่า CUL074 โดย S05 เจริญช้าที่สุด

2.2 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 23 °C (ตารางที่2) พบว่า 30M และ 40M มีการเจริญดีที่สุดตลอดการทดลอง รองมาคือ 70M ที่ 8 วันแรกมีการเจริญเร็วกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 จากนั้นทั้ง 50M 60M 70M และ CUL074มีการเจริญไม่ต่างกัน ส่วน 5M 10M 20M S05 และ S07 มีการเจริญช้ากว่า CUL074 โดย S05 เจริญช้าที่สุด

2.3 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ในหลอดอาหารข้าวฟ่างที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) (ตารางที่3) พบว่า ทุกสายพันธุ์มีการเจริญใกล้เคียงกับ CUL074 ตลอดการทดลอง ยกเว้น 50M และ 60M ที่เจริญช้ากว่า

2.4 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ในหลอดอาหารข้าวฟ่างที่อุณหภูมิ 23 °C (ตารางที่4) สายพันธุ์ 20M มีการเจริญดีที่สุดตลอดการทดลอง ยกเว้นวันที่ 4 วันที่ 24 และ 28 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกสายพันธุ์ โดย 50M และ S07 เจริญช้ากว่า CUL074 และ S07 เจริญช้าที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์อื่นเจริญไม่ต่างจาก CUL074 จากค่าเฉลี่ยพบว่าทุกสายพันธุ์ใช้เวลาเจริญเต็มหลอดอาหารเกือบเท่ากัน และเร็วกว่าที่อุณหภูมิห้องถึง 12 วัน

2.5 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ในถุงขี้เลื่อยเพาะเห็ด ณ อุณหภูมิ 23 °C (ตารางที่5) พบว่า 30M40M 50M 60M และ 70M เจริญดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 โดย 30M40M 50M และ60M เจริญดีที่สุด สายพันธุ์ที่เจริญช้ากว่า CUL074 คือ S07 S05 10M และ 20M ตามลำดับ โดย S07 เจริญช้าที่สุดอีกเช่นกัน

2.6 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30±2) (ตารางที่6) พบว่าทุกสายพันธุ์มีการเจริญไม่แตกต่างกันทางสถิติในช่วง 6 วันแรกของการทดลอง ในวันที่ 8 พบว่า 30M CUL074 60M 70M 10M 50M และ S05มีการเจริญดีกว่า 5M อย่างมีนัยสำคัญ

2.7 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 23 °C (ตารางที่7) สายพันธุ์ 5M 10M 30M 60M 70M และCUL074เจริญได้ดีที่สุดในช่วงท้ายการทดลองพบว่า S05 เส้นใยมีการเจริญดีขึ้น ส่วนสายพันธุ์ 40M และ 50M มีการเจริญช้ากว่า CUL074

2.8 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ในหลอดอาหารข้าวฟ่างที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) (ตารางที่8) สายพันธุ์ S07 และ 20M มีการเจริญดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ และเจริญเต็มหลอดอาหารก่อนสายพันธุ์อื่นอย่างชัดเจน ส่วนสายพันธุ์อื่นมีการเจริญไม่ต่างกัน

2.9 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ในหลอดอาหารข้าวฟ่างที่อุณหภูมิ 23 °C (ตารางที่9) ตลอดช่วงเวลาที่ทำการทดลอง สายพันธุ์ S07 มีการเจริญดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเจริญเต็มหลอดก่อนสายพันธุ์อื่นอย่างชัดเจน ขณะที่สายพันธุ์อื่นมีการเจริญไม่ต่างกัน และพบว่า S07 เจริญที่อุณหภูมิห้องได้ดีกว่าอุณหภูมิ 23 °C

2.10 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ในถุงขี้เลื่อยเพาะเห็ดที่อุณหภูมิ 23 °C (ตารางที่10) การเจริญมีความต่างกันบ้างใน 4 วันแรกหลังขยายเชื้อข้าวฟ่างลงถุงขี้เลื่อย และช่วงหลังวันที่ 28 ถึงก่อนวันที่ 44 ของการทดลองพบว่าสายพันธุ์อื่นเจริญดีกว่าสายพันธุ์ 30M 50M 70M และ CUL074 หลังจากนั้นไม่พบความแตกต่างอย่างเป็นนัยสำคัญของการเจริญ

2.11 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm2^{\circ}C$) (ตารางที่11) ไม่พบความแตกต่างอย่างเป็นนัยสำคัญของการเจริญ โดยต่างกันเล็กน้อยในวันที่เจริญเต็มจานเพาะ

2.12 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 23 $^{\circ}C$ (ตารางที่12) 5M 10M 30M 60M 70M CUL074 และ S05 เส้นใยที่เจริญเร็วใกล้เคียงกัน 40M 50M เจริญช้าที่สุด

2.13 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ในหลอดอาหารข้าวฟ่างที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm2^{\circ}C$) (ตารางที่13) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ เช่นเดียวกับการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm2^{\circ}C$)

2.14 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ในหลอดอาหารข้าวฟ่างที่อุณหภูมิ 23 $^{\circ}C$ (ตารางที่14) พบว่า 10M 30M60M 70M CUL074 และ S05มีการเจริญดีกว่า5M 40M และ 50M

2.15 การเจริญของเส้นใยในอาหารเหลว PDB ให้ผลใกล้เคียงกับในอาหารแข็ง PDA

3. การเก็บผลผลิตดอกเห็ดหอม

3.1 การเก็บผลผลิตดอกเห็ดหอมรุ่น G1 (ตารางที่15) โดยเก็บผลครั้งเดียว

3.1.1 จำนวนดอกเฉลี่ยต่อถุงขี้เลื่อย 600 กรัม พบว่า 10M 40M 60M 70Mมีจำนวนดอกต่อถุงมากกว่าสายพันธุ์ตั้งเดิม CUL074 โดย 40M ให้ดอกมากที่สุด แต่ 5M 30M 50M CUL074 มีจำนวนดอกเฉลี่ยต่อถุงน้อยกว่า และ 5M ให้ดอกน้อยที่สุด

3.1.2 น้ำหนักสดต่อถุงขี้เลื่อย 600 กรัม พบว่าสายพันธุ์ตั้งเดิม CUL074 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยต่อถุงน้อยกว่าสายพันธุ์เหนี่ยวนำ และ S05 มีน้ำหนักมากสุด ส่วน 30M 40M และ 5M มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน

3.1.3 น้ำหนักดอกแห้งต่อถุงขี้เลื่อย 600 กรัม 5M 40M 70M S05มีน้ำหนักแห้งของดอกมากกว่าสายพันธุ์ตั้งเดิม CUL074 ขณะที่ 10M 30M 50M 60M มีน้ำหนักแห้งดอกใกล้เคียง CUL074 โดย CUL074 มีน้ำหนักน้อยที่สุด แสดงว่าทุกสายพันธุ์เหนี่ยวนำให้น้ำหนักแห้งต่อถุงเพิ่มขึ้น

3.1.4 น้ำหนักเฉลี่ยต่อ 1 ดอก พบว่า 5M มีค่าน้ำหนักดอกมากสุด รองมาคือ 50M 30M 60M S05 CUL074 10M และ 40M มีน้ำหนักใกล้กัน และ 70M มีน้ำหนักดอกต่ำสุด

3.1.5 สัดส่วนของดอก พบว่าไม่ต่างกันทางสถิติ

3.2 การเก็บผลผลิตดอกเห็ดหอมรุ่น G2 (ตารางที่16) โดยเก็บผลครั้งเดียว

3.2.1 จำนวนดอกเฉลี่ยต่อถุง พบว่า 50M และ S05 ให้จำนวนดอกมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 ขณะที่สายพันธุ์อื่นให้จำนวนดอกไม่ต่างจาก CUL074

3.2.2 น้ำหนักดอกสดต่อถุงชี้เลื่อย 600 พบว่า 50M ให้น้ำหนักดอกเพิ่มสูงสุดและเพิ่มมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 รองมาคือ 5M 10M 30M 40M 60M 70M S05 ซึ่งไม่ต่างจาก CUL074

3.2.3 น้ำหนักดอกแห้งต่อถุงชี้เลื่อย 600 กรัม ตามการวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกัน

3.2.4 น้ำหนักเฉลี่ยต่อ 1 ดอก ตามการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าไม่แตกต่างกัน

3.2.5 สัดส่วนของดอก จากอัตราส่วนระหว่างความยาวก้านดอกส่วนขนาดหมวกดอก พบว่า 40M ให้ดอกที่มีสัดส่วนดี คือมีก้านดอกสั้น หมวกใหญ่ ไม่ต่างกันตามสถิติกับ 50M 60M 70M และ CUL074 ส่วน 5M 10M 20M และ S05 มีก้านยาวกว่าเมื่อเทียบกับหมวก

4. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงเซลล์และโครโมโซมของดอกเห็ดหอม

4.1 ขนาดเซลล์จำนวน 50 เซลล์ ของเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆไม่ต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ G3-CUL074 มีลักษณะต่างออกไป

4.2 จำนวนโครโมโซมของ 50M และ60M เชื่อได้ว่าเพิ่มขึ้นมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 2 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)

G1 สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) * **						
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12
CUL074	1.00±0.00 ns	1.81±0.06 b	3.22±0.08 b	4.75±0.13 b	6.50±0.17 b	8.59±0.12 bc	9.00±0.00 ns
5M	1.00±0.00 ns	1.23±0.05 de	2.28±0.12 ef	3.50±0.16 de	5.24±0.14 ef	7.57±0.16 e	9.00±0.00 ns
10M	1.00±0.00 ns	1.32±0.01 d	2.57±0.10 d	3.69±0.08 d	5.50±0.06 e	7.65±0.11 de	9.00±0.00 ns
20M	1.00±0.00 ns	1.34±0.08 cd	2.48±0.09 de	3.70±0.09 d	5.53±0.02 e	7.89±0.07 d	9.00±0.00 ns
30M	1.00±0.00 ns	2.12±0.07 a	3.65±0.03 a	5.12±0.06 a	7.08±0.08 a	8.75±0.10 ab	9.00±0.00 ns
40M	1.00±0.00 ns	2.16±0.04 a	3.82±0.02 a	5.34±0.02 a	7.06±0.08 a	9.00±0.00 a	na
50M	1.00±0.00 ns	1.48±0.03 c	2.88±0.15 c	4.27±0.11 e	6.18±0.16 cd	8.35±0.09 c	9.00±0.00 ns
60M	1.00±0.00 ns	1.48±0.01 c	2.85±0.08 c	4.18±0.04 c	6.06±0.03 d	8.35±0.14 c	9.00±0.00 ns
70M	1.00±0.00 ns	1.83±0.03 b	3.33±0.07 b	4.77±0.04 b	6.47±0.11 bc	8.57±0.07 bc	9.00±0.00 ns
S05	1.00±0.00 ns	1.11±0.02 e	2.10±0.05 f	3.31±0.03 e	4.96±0.11 f	7.07±0.11 f	9.00±0.00 ns
S07	1.00±0.00 ns	1.24±0.04 de	2.38±0.08 de	3.71±0.11 d	5.35±0.02 e	7.77±0.03 de	9.00±0.00 ns

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากเส้นใยเจริญเต็มพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ณ อุณหภูมิ 23 °C

G1 สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) * **						
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12
CUL074	1.00±0.00 ns	1.93±0.03 d	3.75±0.02 d	6.07±0.07 bc	7.94±0.09 b	9.00±0.00 a	9.00±0.00 ns
5M	1.00±0.00 ns	1.32±0.04 g	3.02±0.11 h	5.14±0.19 ef	7.13±0.14 d	8.66±0.15 ab	9.00±0.00 ns
10M	1.00±0.00 ns	1.65±0.02 e	3.41±0.05 f	5.65±0.07 cde	7.58±0.11 c	8.76±0.18 ab	9.00±0.00 ns
20M	1.00±0.00 ns	1.35±0.02 g	3.11±0.03 gh	5.32±0.06 def	7.48±0.11 c	8.86±0.14 ab	9.00±0.00 ns
30M	1.00±0.00 ns	2.48±0.04 a	4.66±0.06 a	6.83±0.10 a	8.39±0.06 a	9.00±0.00 a	9.00±0.00 ns
40M	1.00±0.00 ns	2.32±0.07 b	4.37±0.00 b	6.54±0.09 ab	8.39±0.09 a	9.00±0.00 a	9.00±0.00 ns
50M	1.00±0.00 ns	1.59±0.04 e	3.53±0.09 ef	5.29±0.51 def	7.93±0.09 b	9.00±0.00 a	9.00±0.00 ns
60M	1.00±0.00 ns	1.69±0.04 e	3.63±0.02 de	5.79±0.07 cd	7.93±0.05 b	9.00±0.00 a	9.00±0.00 ns
70M	1.00±0.00 ns	2.17±0.02 c	3.99±0.06 c	6.35±0.06 ab	8.00±0.00 b	9.00±0.00 a	9.00±0.00 ns
S05	1.00±0.00 ns	1.18±0.02 h	3.23±0.03 g	4.87±0.07 f	6.87±0.08 e	8.02±0.19 c	9.00±0.00 ns
S07	1.00±0.00 ns	1.47±0.03 f	2.80±0.00 i	5.19±0.11 ef	7.33±0.04 cd	8.62±0.03 b	9.00±0.00 ns

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)

G1	ความยาวของเส้นใยเห็ดหอม (ซม.) * **									
สายพันธุ์	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 16	วันที่ 20	วันที่ 24	วันที่ 28	วันที่ 32	วันที่ 36	วันที่ 40
CUL074	0.73±0.07^{ab}	2.18±0.10^{ns}	3.47±0.15^{a}	4.77±0.15^{a}	5.90±0.18^{a}	6.98±0.15^{a}	7.87±0.16^{a}	9.02±0.21^{a}	9.73±0.17^{a}	10.00±0.00^{a}
5M	0.37±0.03^{d}	1.97±0.21^{ns}	3.15±0.28^{ab}	4.50±0.28^{ab}	5.68±0.32^{ab}	6.83±0.27^{a}	7.72±0.26^{a}	8.80±0.25^{ab}	9.57±0.15^{ab}	10.00±0.00^{a}
10M	0.30±0.06^{d}	1.93±0.32^{ns}	3.18±0.28^{ab}	4.65±0.31^{a}	5.65±0.35^{ab}	6.95±0.26^{a}	7.85±0.30^{a}	8.95±0.30^{a}	9.73±0.22^{a}	10.00±0.00^{a}
20M	0.57±0.07^{bc}	1.93±0.07^{ns}	3.02±0.07^{abc}	4.33±0.09^{abc}	5.45±0.03^{abc}	6.62±0.06^{ab}	7.48±0.09^{ab}	8.63±0.29^{ab}	9.38±0.23^{ab}	10.00±0.00^{a}
30M	0.80±0.06^{a}	1.80±0.12^{ns}	2.87±0.09^{abc}	4.12±0.10^{abc}	5.18±0.06^{abc}	6.33±0.09^{abc}	7.22±0.06^{abc}	8.32±0.02^{abc}	9.17±0.03^{ab}	9.97±0.03^{a}
40M	0.70±0.00^{ab}	2.00±0.25^{ns}	3.12±0.29^{ab}	4.35±0.42^{abc}	5.38±0.48^{abc}	6.48±0.60^{ab}	7.37±0.71^{ab}	8.33±0.85^{abc}	8.75±0.82^{abc}	9.27±0.64^{abc}
50M	0.63±0.03^{ab}	1.33±0.27^{ns}	2.43±0.12^{c}	3.67±0.07^{c}	4.73±0.07^{c}	5.43±0.07^{c}	6.27±0.03^{c}	7.13±0.19^{c}	7.65±0.29^{c}	8.50±0.26^{c}
60M	0.43±0.03^{cd}	1.58±0.22^{ns}	2.58±0.32^{bc}	3.82±0.36^{bc}	4.83±0.39^{bc}	5.78±0.47^{bc}	6.63±0.54^{bc}	7.67±0.57^{bc}	8.37±0.62^{bc}	9.07±0.47^{bc}
70M	0.63±0.03^{ab}	1.93±0.12^{ns}	3.02±0.16^{abc}	4.28±0.17^{abc}	5.27±0.19^{abc}	6.18±0.27^{abc}	6.95±0.33^{abc}	8.00±0.26^{abc}	8.73±0.30^{abc}	9.60±0.26^{ab}
S05	0.57±0.33^{bc}	2.10±0.00^{ns}	3.28±0.04^{b}	4.60±0.08^{a}	5.60±0.00^{ab}	6.64±0.05^{ab}	7.47±0.07^{ab}	8.63±0.08^{ab}	9.48±0.17^{ab}	10.00±0.00^{a}
S07	0.43±0.12^{cd}	1.62±0.04^{ns}	3.02±0.02^{abc}	4.28±0.12^{abc}	5.60±0.21^{ab}	6.18±0.34^{abc}	7.40±0.16^{ab}	7.90±0.16^{abc}	8.90±0.06^{ab}	10.00±0.00^{a}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิ 23 °C

G1 สายพันธุ์	ความยาวของเส้นใยเห็ดหอม (ซม.) * **									
	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 16	วันที่ 20	วันที่ 24	วันที่ 28	วันที่ 32	วันที่ 36	วันที่ 40
CUL074	0.70±0.03 ^{ns}	2.22±0.04 ^{ab}	3.82±0.12 ^{ab}	5.50±0.13 ^{ab}	7.47±0.15 ^{abc}	9.08±0.11 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}	na	na	na
5M	0.68±0.09	2.10±0.21 ^{abc}	3.85±0.30 ^{ab}	5.67±0.33 ^{ab}	7.63±0.41 ^{abc}	9.40±0.32 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}	na	na	na
10M	0.57±0.24 ^{ns}	2.23±0.22 ^{ab}	3.93±0.27 ^{ab}	5.87±0.35 ^{a}	7.90±0.34 ^{a}	9.63±0.37 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}	na	na	na
20M	0.82±0.02 ^{ns}	2.43±0.03 ^{a}	4.10±0.06 ^{a}	5.85±0.09 ^{a}	7.78±0.17 ^{ab}	9.53±0.33 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}	na	na	na
30M	0.67±0.07 ^{ns}	2.15±0.15 ^{abc}	3.80±0.15 ^{ab}	5.53±0.19 ^{ab}	7.47±0.22 ^{abc}	8.88±0.70 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}	na	na	na
40M	0.75±0.03 ^{ns}	2.27±0.12 ^{ab}	3.77±0.17 ^{abc}	5.48±0.26 ^{ab}	7.35±0.26 ^{abc}	8.75±0.19 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}	na	na	na
50M	0.63±0.09 ^{ns}	1.75±0.05 ^{cd}	3.25±0.03 ^{cd}	5.02±0.02 ^{b}	6.95±0.03 ^{cd}	8.63±0.07 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}	na	na	na
60M	0.57±0.12 ^{ns}	1.92±0.19 ^{bc}	3.52±0.20 ^{bc}	5.10±0.28 ^{b}	7.10±0.25 ^{bcd}	8.77±0.34 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}	na	na	na
70M	0.77±0.07 ^{ns}	2.27±0.17 ^{ab}	3.97±0.18 ^{ab}	5.70±0.15 ^{ab}	7.63±0.14 ^{abc}	9.32±0.12 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}	na	na	na
S05	0.78±0.06 ^{ns}	2.30±0.06 ^{ab}	3.88±0.07 ^{ab}	5.52±0.07 ^{ab}	7.45±0.10 ^{abc}	8.88±0.25 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}	na	na	na
S07	0.70±0.08 ^{ns}	1.45±0.03 ^{d}	2.78±0.04 ^{d}	4.40±0.06 ^{c}	6.55±0.15 ^{d}	8.07±0.31 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}	na	na	na

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากเส้นใยเจริญเต็มก้นหลอดทดลอง

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในถุงขี้เลื่อย ณ อุณหภูมิ 23 °C

G1 สายพันธุ์	ความยาวของเส้นใยเห็ดหอม (ซม.) * **						
	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 16	วันที่ 20	วันที่ 24	วันที่ 28
CUL074	0.70±0.04^{ab}	1.58±0.12^{ab}	3.23±0.17^{b}	4.62±0.70^{b}	5.19±0.16^{c}	6.16±0.25^{c}	7.10±0.23^{c}
5M	0.35±0.06^{de}	0.97±0.13^{cd}	1.33±0.12^{c}	2.23±0.02^{c}	3.66±0.46^{d}	4.77±0.37^{d}	5.82±0.44^{d}
10M	0.43±0.12^{cd}	1.40±0.26^{bc}	1.83±0.15^{c}	2.37±0.12^{c}	3.23±0.43^{de}	4.17±0.73^{d}	4.53±0.53^{ef}
20M	0.55±0.13^{bcd}	1.30±0.26^{bc}	1.90±0.21^{c}	2.22±0.07^{c}	3.12±0.06^{de}	3.97±0.07^{d}	4.85±0.09^{de}
30M	0.88±0.08^{a}	1.89±0.10^{a}	3.98±0.20^{a}	5.88±0.19^{a}	6.49±0.13^{ab}	7.55±0.07^{ab}	9.31±0.34^{ab}
40M	0.90±0.14^{a}	1.99±0.14^{a}	4.19±0.28^{a}	6.14±0.11^{a}	7.54±0.65^{a}	8.58±0.36^{a}	9.87±0.13^{a}
50M	0.62±0.06^{bc}	1.34±0.12^{bc}	2.90±0.23^{b}	5.02±0.10^{b}	6.40±0.59^{ab}	8.48±0.34^{a}	9.94±0.09^{a}
60M	0.73±0.04^{ab}	1.55±0.08^{ab}	3.31±0.17^{b}	4.28±0.38^{b}	6.21±0.47^{bc}	8.50±0.58^{a}	9.90±0.10^{a}
70M	0.71±0.04^{ab}	1.53±0.08^{ab}	3.27±0.15^{b}	4.94±0.32^{b}	5.89±0.32^{bc}	6.58±0.36^{bc}	8.59±1.03^{b}
S05	0.28±0.04^{e}	0.77±0.09^{d}	1.30±0.21^{c}	2.10±0.05^{c}	2.77±0.09^{de}	3.80±0.06^{de}	4.71±0.05^{def}
S07	0.25±0.00^{e}	0.72±0.04^{d}	na	1.58±0.06^{c}	2.37±0.07^{e}	2.93±0.06^{e}	3.53±0.03^{f}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากเส้นใยเจริญเต็มก้นหลอดทดลอง

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ตารางที่ 5 (ต่อ) การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในถุงขี้เลื่อย ณ อุณหภูมิ 23 °C

G1 สายพันธุ์	ความยาวของเส้นใยเห็ดหอม (ซม.) * **						
	วันที่ 32	วันที่ 36	วันที่ 40	วันที่ 44	วันที่ 48	วันที่ 52	วันที่ 56
CUL074	7.99±0.20^{b}	9.00±0.29^{a}	10.00±0.00^{a}	na	na	na	na
5M	6.30±0.44^{c}	6.73±0.34^{b}	7.73±0.53^{b}	8.73±0.82^{ns}	9.80±0.20^{a}	na	na
10M	6.17±0.33^{c}	na	na	na	na	na	na
20M	5.73±0.12^{c}	6.72±0.19^{b}	7.60±0.24^{b}	8.48±0.30^{ns}	9.33±0.33^{a}	10.00±0.00^{a}	na
30M	10.00±0.00^{a}	na	na	na	na	na	na
40M	10.00±0.00^{a}	na	na	na	na	na	na
50M	10.00±0.00^{a}	na	na	na	na	na	na
60M	10.00±0.00^{a}	na	na	na	na	na	na
70M	8.97±1.03^{ab}	na	na	na	na	na	na
S05	5.62±0.06^{c}	6.58±0.09^{b}	7.44±0.12^{b}	8.30±0.15^{ns}	9.07±0.21^{a}	9.93±0.07^{a}	10.00±0.00^{ns}
S07	4.33±0.07^{d}	5.45±0.13^{c}	6.88±0.16^{b}	7.28±0.16^{ns}	8.17±0.28^{b}	8.95±0.29^{b}	9.73±0.34^{ns}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากเส้นใยเจริญเต็มก้นหลอดทดลอง

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)

G2 สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) * **						
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12
CUL074	1.42±0.08 ns	2.82±0.14 ns	4.12±0.17 ns	5.95±0.13 ab	7.53±0.17 ns	9.10±0.18 a	9.00±0.00 ns
5M	1.32±0.02 ns	2.63±0.04 ns	3.78±0.07 ns	5.35±0.08 d	6.77±0.11 ns	7.30±0.06 c	9.00±0.00 ns
10M	1.50±0.06 ns	3.02±0.06 ns	4.03±0.12 ns	5.65±0.21 abcd	7.17±0.33 ns	8.65±0.22 ab	9.00±0.00 ns
30M	1.50±0.09 ns	2.93±0.14 ns	4.40±0.10 ns	6.07±0.16 a	7.43±0.18 ns	8.73±0.03 ab	9.00±0.00 ns
40M	1.45±0.05 ns	2.72±0.10 ns	3.95±0.26 ns	5.55±0.28 bcd	7.12±0.30 ns	8.52±0.25 b	9.00±0.00 ns
50M	1.43±0.06 ns	2.83±0.07 ns	4.05±0.06 ns	5.67±0.02 abcd	7.23±0.10 ns	8.42±0.07 b	9.00±0.00 ns
60M	1.47±0.02 ns	2.77±0.02 ns	4.18±0.12 ns	5.92±0.13 abc	7.52±0.15 ns	8.87±0.19 ab	9.00±0.00 ns
70M	1.43±0.04 ns	2.80±0.08 ns	4.10±0.16 ns	5.87±0.15 abc	7.38±0.19 ns	8.73±0.16 ab	9.00±0.00 ns
S05	1.45±0.00 ns	2.87±0.04 ns	3.97±0.02 ns	5.43±0.09 cd	6.93±0.06 ns	8.45±0.18 b	9.00±0.00 ns

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากเส้นใยเจริญเต็มพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ณ อุณหภูมิ 23 °C

G2 สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) * **						
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12
CUL074	1.60±0.03^{ab}	3.00±0.13^{bc}	4.12±0.65^{ns}	6.02±0.38^{ab}	7.72±0.29^{a}	9.00±0.00^{ns}	na
5M	1.45±0.03^{bc}	2.87±0.03^{c}	3.93±0.09^{ns}	5.28±0.14^{bc}	7.03±0.19^{ab}	9.00±0.00^{ns}	na
10M	1.68±0.04^{a}	3.47±0.07^{a}	4.57±0.39^{ns}	6.25±0.45^{a}	7.73±0.35^{a}	9.00±0.00^{ns}	na
30M	1.45±0.02^{ab}	3.13±0.09^{abc}	4.33±0.13^{ns}	6.03±0.24^{ab}	7.63±0.26^{a}	9.00±0.00^{ns}	na
40M	1.68±0.04^{abc}	2.87±0.12^{c}	3.70±0.06^{ns}	5.23±0.16^{bc}	6.73±0.20^{b}	9.00±0.00^{ns}	na
50M	1.30±0.17^{c}	2.30±0.20^{d}	3.52±0.26^{ns}	4.80±0.22^{c}	6.53±0.29^{b}	9.00±0.00^{ns}	na
60M	1.62±0.02^{ab}	3.20±0.05^{abc}	4.52±0.24^{ns}	6.33±0.41^{a}	7.73±0.27^{a}	9.00±0.00^{ns}	na
70M	1.58±0.06^{ab}	3.15±0.13^{abc}	4.10±0.14^{ns}	5.70±0.23^{abc}	7.12±0.24^{ab}	9.00±0.00^{ns}	na
S05	1.52±0.03^{ab}	3.25±0.09^{ab}	4.03±0.02^{ns}	5.62±0.02^{abc}	7.35±0.00^{ab}	9.00±0.00^{ns}	na

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากเส้นใยเจริญเต็มพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)

G2 สายพันธุ์	ความยาวของเส้นใยเห็ดหอม (ซม.) *,**									
	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 16	วันที่ 20	วันที่ 24	วันที่ 28	วันที่ 32	วันที่ 36	วันที่ 40
CUL074	0.83±0.09^{bc}	1.97±0.07^{bc}	2.67±0.10^{cd}	4.38±0.15^{b}	5.32±0.14^{b}	6.55±0.28^{b}	7.47±0.31^{b}	7.67±0.31^{b}	9.15±0.43^{ns}	10.0±0.00^{ns}
5M	0.73±0.12^{bcd}	1.87±0.11^{bcd}	2.58±0.15^{cd}	4.22±0.13^{b}	5.22±0.17^{b}	6.37±0.16^{b}	7.05±0.16^{bc}	7.72±0.18^{b}	8.48±0.24^{ns}	9.42±0.20^{ns}
10M	0.53±0.07^{d}	1.63±0.09^{cd}	2.37±0.09^{d}	4.05±0.19^{b}	4.82±0.37^{b}	6.17±0.26^{b}	6.87±0.26^{bc}	7.57±0.26^{b}	8.47±0.26^{ns}	9.33±0.26^{ns}
20M	0.62±0.02^{cd}	2.13±0.02^{b}	3.80±0.17^{b}	5.30±0.16^{a}	6.73±0.23^{a}	7.73±0.23^{a}	9.43±0.57^{a}	10.00±0.00^{a}	na	na
30M	0.70±0.10^{bcd}	1.65±0.17^{cd}	2.43±0.16^{cd}	4.05±0.19^{b}	4.87±0.20^{b}	6.03±0.19^{b}	6.72±0.24^{bc}	7.42±0.24^{bc}	8.27±0.28^{ns}	9.13±0.27^{ns}
40M	0.97±0.03^{b}	2.08±0.02^{b}	2.80±0.06^{c}	4.27±0.08^{b}	5.40±0.20^{b}	6.35±0.26^{b}	6.98±0.33^{bc}	7.68±0.32^{b}	8.47±0.40^{ns}	9.32±0.36^{ns}
50M	0.87±0.03^{bc}	1.83±0.19^{bcd}	2.65±0.17^{cd}	4.17±0.33^{b}	4.93±0.46^{b}	6.00±0.60^{b}	6.63±0.71^{bc}	7.33±0.71^{bc}	7.92±0.83^{ns}	8.70±0.70^{ns}
60M	0.80±0.06^{bcd}	1.85±0.14^{bcd}	2.53±0.12^{cd}	4.12±0.16^{b}	4.73±0.15^{b}	5.95±0.13^{b}	6.58±0.29^{bc}	7.22±0.26^{bc}	8.08±0.29^{ns}	9.07±0.31^{ns}
70M	0.73±0.07^{bcd}	1.55±0.05^{d}	2.42±0.10^{cd}	3.85±0.08^{b}	4.68±0.17^{b}	5.72±0.17^{b}	6.22±0.19^{c}	6.52±0.19^{c}	7.65±0.20^{ns}	8.52±0.22^{ns}
S05	0.73±0.15^{bcd}	1.82±0.07^{bcd}	2.53±0.07^{cd}	4.12±0.07^{b}	4.97±0.04^{b}	6.18±0.14^{b}	6.75±0.13^{bc}	7.05±0.13^{bc}	8.40±0.23^{ns}	9.37±0.32^{ns}
S07	1.50±0.10^{a}	6.12±0.21^{a}	10.00±0.00^{a}	na	na	na	na	na	na	na

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากเส้นใยเจริญเต็มก้นหลอดทดลอง

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงบนอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิ 23 °C

G2	ความยาวของเส้นใยเห็ดหอม (ซม.) * **									
สายพันธุ์	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 16	วันที่ 20	วันที่ 24	วันที่ 28	วันที่ 32	วันที่ 36	วันที่ 40
CUL074	0.93±0.13^{ab}	2.00±0.22^{cde}	3.73±0.23^{bc}	5.00±0.30^{b}	6.73±0.29^{b}	7.70±0.47^{ns}	10.00±0.00^{ns}	na	na	na
5M	1.03±0.18^{a}	2.53±0.20^{abc}	4.48±0.22^{b}	5.47±0.52^{b}	7.55±0.22^{b}	8.85±0.22^{ns}	10.00±0.00^{ns}	na	na	na
10M	1.03±0.09^{a}	2.65±0.26^{ab}	4.30±0.17^{bc}	5.65±0.14^{b}	7.33±0.18^{b}	8.65±0.20^{ns}	10.00±0.00^{ns}	na	na	na
20M	0.48±0.04^{d}	1.50±0.09^{e}	3.68±0.31^{c}	5.67±0.62^{b}	7.22±0.85^{b}	8.22±0.85^{ns}	9.62±0.33^{ns}	na	na	na
30M	0.62±0.08^{bcd}	1.83±0.27^{de}	3.62±0.43^{c}	4.87±0.33^{b}	6.77±0.50^{b}	8.03±0.55^{ns}	10.00±0.00^{ns}	na	na	na
40M	0.87±0.07^{abc}	2.33±0.17^{bcd}	4.08±0.23^{bc}	5.47±0.27^{b}	7.27±0.26^{b}	8.57±0.22^{ns}	10.00±0.00^{ns}	na	na	na
50M	0.83±0.12^{abc}	2.12±0.09^{bcde}	3.92±0.10^{bc}	5.23±0.09^{b}	6.95±0.13^{b}	8.20±0.15^{ns}	10.00±0.00^{ns}	na	na	na
60M	1.07±0.07^{a}	2.48±0.14^{bc}	4.37±0.16^{bc}	5.85±0.03^{b}	7.68±0.09^{b}	9.10±0.20^{ns}	10.00±0.00^{ns}	na	na	na
70M	0.80±0.16^{abcd}	2.30±0.25^{bcd}	3.73±0.18^{bc}	5.12±0.25^{b}	6.68±0.36^{b}	8.00±0.40^{ns}	10.00±0.00^{ns}	na	na	na
S05	0.60±0.06^{cd}	1.97±0.16^{cde}	3.92±0.14^{bc}	5.35±0.18^{b}	7.08±0.22^{b}	8.40±0.22^{ns}	10.00±0.00^{ns}	na	na	na
S07	1.02±0.06^{a}	3.10±0.15^{a}	6.02±0.17^{a}	8.57±0.23^{a}	10.00±0.00^{a}	na	na	na	na	na

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากเส้นใยเจริญเต็มก้นหลอดทดลอง

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงในถุงขี้เลื่อย ณ อุณหภูมิ 23 °C

G2 สายพันธุ์	ความยาวของเส้นใยเห็ดหอม (ซม.) * **						
	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 16	วันที่ 20	วันที่ 24	วันที่ 28
CUL074	0.47±0.07^{abc}	0.93±0.13^{ns}	1.10±0.21^{ns}	1.80±0.29^{ns}	2.60±0.21^{ns}	3.39±0.23^{ns}	4.18±0.25^{ns}
5M	0.53±0.06^{a}	1.06±0.14^{ns}	1.62±0.2^{ns}	2.25±0.08^{ns}	3.25±0.13^{ns}	4.09±0.10^{ns}	4.92±0.07^{ns}
10M	0.52±0.04^{ab}	1.03±0.09^{ns}	1.20±0.15^{ns}	1.9±0.15^{ns}	2.80±0.13^{ns}	3.61±0.14^{ns}	4.42±0.15^{ns}
30M	0.37±0.02^{bcd}	0.73±0.03^{ns}	1.00±0.18^{ns}	1.85±0.08^{ns}	2.12±0.56^{ns}	2.98±0.54^{ns}	3.83±0.52^{ns}
40M	0.43±0.04^{abcd}	0.87±0.09^{ns}	1.20±0.45^{ns}	2.05±0.35^{ns}	2.82±0.32^{ns}	3.63±0.32^{ns}	4.43±0.33^{ns}
50M	0.42±0.06^{abcd}	0.83±0.12^{ns}	0.83±0.03^{ns}	1.68±0.10^{ns}	2.50±0.15^{ns}	3.37±0.12^{ns}	4.20±0.13^{ns}
60M	0.32±0.06^{cd}	1.83±1.08^{ns}	1.63±0.03^{ns}	2.35±0.05^{ns}	3.20±0.07^{ns}	4.12±0.09^{ns}	5.07±0.15^{ns}
70M	0.42±0.02^{abcd}	0.83±0.03^{ns}	1.17±0.44^{ns}	1.87±0.27^{ns}	2.32±0.24^{ns}	3.18±0.24^{ns}	4.17±0.37^{ns}
S05	0.30±0.03^{d}	0.60±0.06^{ns}	1.15±0.03^{ns}	1.80±0.15^{ns}	2.70±0.10^{ns}	3.53±0.09^{ns}	4.35±0.08^{ns}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากเส้นใยเจริญเต็มก้นหลอดทดลอง

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 (ต่อ) การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงในถุงขี้เลื่อย ณ อุณหภูมิ 23 °C

G2 สายพันธุ์	ความยาวของเส้นใยเห็ดหอม (ซม.) * **					
	วันที่ 32	วันที่ 36	วันที่ 40	วันที่ 44	วันที่ 48	วันที่ 52
CUL074	4.97±0.2 ^{bc}	5.82±0.33 ^{bc}	6.67±0.38 ^{b}	7.43±0.38 ^{ns}	8.77±0.43 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}
5M	5.82±0.07 ^{ab}	6.72±0.08 ^{ab}	7.62±0.09 ^{ab}	8.35±0.09 ^{ns}	9.57±0.07 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}
10M	5.55±0.22 ^{abc}	6.36±0.12 ^{abc}	7.17±0.07 ^{ab}	7.87±0.09 ^{ns}	9.20±0.06 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}
30M	4.75±0.55 ^{c}	5.68±0.56 ^{c}	6.62±0.56 ^{b}	7.37±0.56 ^{ns}	8.77±0.54 ^{ns}	9.72±0.28 ^{ns}
40M	5.40±0.35 ^{abc}	6.30±0.33 ^{abc}	7.20±0.32 ^{ab}	8.00±0.36 ^{ns}	8.98±0.10 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}
50M	5.10±0.13 ^{bc}	5.95±0.15 ^{bc}	6.80±0.17 ^{b}	7.57±0.20 ^{ns}	8.68±0.22 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}
60M	6.10±0.23 ^{a}	7.06±0.26 ^{a}	8.02±0.28 ^{a}	8.83±0.36 ^{ns}	9.80±0.20 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}
70M	4.92±0.25 ^{bc}	5.79±0.29 ^{bc}	6.67±0.33 ^{b}	7.47±0.37 ^{ns}	8.73±0.39 ^{ns}	10.00± ^{ns}
S05	5.25±0.10 ^{abc}	6.16±0.13 ^{abc}	7.07±0.16 ^{ab}	7.85±0.15 ^{ns}	9.42±0.32 ^{ns}	10.00±0.00 ^{ns}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากเส้นใยเจริญเต็มก้นหลอดทดลอง

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)

G3 สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) * **						
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12
CUL074	1.00±0.00^{ns}	1.91±0.07^{ns}	2.82±0.14^{ns}	4.10±0.10^{ns}	5.92±0.16^{ns}	7.60±0.18^{ns}	9.00±0.00^{a}
5M	1.00±0.00^{ns}	1.66±0.21^{ns}	2.72±0.02^{ns}	3.80±0.09^{ns}	5.32±0.11^{ns}	6.78±0.07^{ns}	8.30±0.06^{d}
10M	1.00±0.00^{ns}	1.34±0.30^{ns}	3.02±0.06^{ns}	4.12±0.06^{ns}	5.63±0.18^{ns}	7.22±0.27^{ns}	8.80±0.15^{ab}
30M	1.00±0.00^{ns}	1.64±0.30^{ns}	2.93±0.14^{ns}	4.23±0.09^{ns}	5.80±0.08^{ns}	7.37±0.03^{ns}	9.00±0.00^{a}
40M	1.00±0.00^{ns}	1.86±0.05^{ns}	2.72±0.10^{ns}	3.88±0.16^{ns}	5.45±0.22^{ns}	7.02±0.25^{ns}	8.75±0.20^{abc}
50M	1.00±0.00^{ns}	1.92±0.04^{ns}	2.83±0.07^{ns}	3.88±0.09^{ns}	5.50±0.05^{ns}	6.92±0.07^{ns}	8.53±0.08^{bcd}
60M	1.00±0.00^{ns}	1.89±0.01^{ns}	2.77±0.02^{ns}	4.05±0.09^{ns}	5.72±0.12^{ns}	7.37±0.19^{ns}	8.90±0.00^{a}
70M	1.00±0.00^{ns}	1.90±0.04^{ns}	2.80±0.08^{ns}	4.03±0.09^{ns}	5.63±0.14^{ns}	7.23±0.16^{ns}	9.00±0.00^{a}
S05	1.00±0.00^{ns}	1.94±0.02^{ns}	2.87±0.04^{ns}	3.92±0.03^{ns}	5.38±0.11^{ns}	6.95±0.18^{ns}	8.48±0.08^{cd}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ณ อุณหภูมิ 23 °C

G3 สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)						
	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6	วันที่ 8	วันที่ 10	วันที่ 12
CUL074	1.00±0.00^{ns}	1.70±0.06^{b}	3.17±0.02^{ab}	4.45±0.23^{a}	6.07±0.22^{ab}	7.67±0.34^{a}	9.00±0.00^{ns}
5M	1.00±0.00^{ns}	1.25±0.03^{c}	2.90±0.06^{bc}	3.92±0.06^{abc}	5.30±0.13^{bcd}	6.98±0.16^{abc}	9.00±0.00^{ns}
10M	1.00±0.00^{ns}	1.33±0.09^{c}	3.35±0.09^{a}	4.55±0.38^{a}	6.20±0.58^{a}	7.55±0.45^{a}	9.00±0.00^{ns}
30M	1.00±0.00^{ns}	2.40±0.06^{a}	3.25±0.05^{ab}	4.22±0.14^{ab}	6.00±0.21^{abc}	7.53±0.24^{ab}	9.00±0.00^{ns}
40M	1.00±0.00^{ns}	2.33±0.07^{a}	2.95±0.08^{abc}	3.77±0.09^{bc}	5.20±0.08^{cd}	6.77±0.15^{bc}	9.00±0.00^{ns}
50M	1.00±0.00^{ns}	1.63±0.09^{b}	2.57±0.32^{c}	3.48±0.24^{c}	4.83±0.23^{d}	6.43±0.22^{c}	9.00±0.00^{ns}
60M	1.00±0.00^{ns}	1.60±0.15^{b}	3.20±0.03^{ab}	4.52±0.19^{a}	5.93±0.04^{abc}	7.38±0.06^{ab}	9.00±0.00^{ns}
70M	1.00±0.00^{ns}	1.80±0.06^{b}	3.17±0.12^{ab}	4.15±0.09^{ab}	5.75±0.18^{abc}	7.25±0.09^{ab}	9.00±0.00^{ns}
S05	1.00±0.00^{ns}	1.13±0.03^{c}	3.05±0.05^{ab}	3.98±0.07^{abc}	5.50±0.10^{bcd}	7.15±0.09^{abc}	9.00±0.00^{ns}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเนื่องจากเส้นใยเจริญเต็มพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)

G3 สายพันธุ์	ความยาวของเส้นใยเห็ดหอม (ซม.)									
	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 16	วันที่ 20	วันที่ 24	วันที่ 28	วันที่ 32	วันที่ 36	วันที่ 40
CUL074	2.10±0.05^{a}	6.83±0.04^{a}	9.60±0.12^{a}	10.00±0.00^{a}	na	na	na	na	na	na
5M	0.68±0.06^{c}	2.37±0.18^{c}	3.85±0.13^{cd}	5.25±0.09^{bc}	6.50±0.06^{ns}	7.50±0.06^{ns}	8.72±0.25^{ns}	na	na	na
10M	1.52±0.04^{b}	4.87±0.14^{b}	7.40±0.23^{b}	10.00±0.00^{a}	na	na	na	na	na	na
30M	0.83±0.10^{c}	2.55±0.24^{c}	4.02±0.32^{c}	5.15±0.39^{bc}	6.30±0.49^{ns}	7.3±0.49^{ns}	8.10±0.70^{ns}	na	na	na
40M	0.68±0.10^{c}	2.37±0.23^{c}	4.23±0.34^{c}	5.20±0.25^{bc}	6.42±0.24^{ns}	7.42±0.24^{ns}	8.67±0.22^{ns}	na	na	na
50M	0.65±0.08^{c}	2.12±0.08^{c}	3.08±0.54^{d}	4.87±0.07^{c}	6.00±0.10^{ns}	7.27±0.03^{ns}	7.95±0.40^{ns}	na	na	na
60M	0.80±0.08^{c}	2.53±0.20^{c}	4.40±0.19^{c}	5.68±0.10^{b}	6.96±0.12^{ns}	8.17±0.27^{ns}	9.35±0.19^{ns}	na	na	na
70M	0.58±0.11^{c}	1.98±0.21^{c}	3.57±0.17^{cd}	5.00±0.15^{c}	6.38±0.04^{ns}	7.58±0.04^{ns}	8.80±0.00^{ns}	na	na	na
S05	0.67±0.03^{c}	2.12±0.12^{c}	3.83±0.15^{cd}	5.30±0.15^{bc}	6.52±0.19^{ns}	7.77±0.12^{ns}	8.62±0.29^{ns}	na	na	na

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูล

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ที่เลี้ยงในอาหารข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิ 23 °C

G3 สายพันธุ์	ความยาวของเส้นใยเห็ดหอม (ซม.)									
	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 16	วันที่ 20	วันที่ 24	วันที่ 28	วันที่ 32	วันที่ 36	วันที่ 40
CUL074	1.70±0.10^{a}	4.62±0.25^{a}	6.43±1.14^{a}	7.72±1.78^{a}	8.15±1.85^{a}	8.53±1.47^{ns}	10.00±0.00^{a}	na	na	na
5M	0.58±0.03^{c}	1.80±0.00^{d}	3.47±0.03^{b}	4.88±0.06^{b}	6.38±0.04^{b}	7.57±0.03^{ns}	9.27±0.17^{b}	na	na	na
10M	1.30±0.06^{b}	3.60±0.12^{b}	5.7±0.10^{a}	7.67±0.16^{a}	9.53±0.23^{a}	10.0±0.00^{ns}	na	na	na	na
30M	0.75±0.08^{c}	2.22±0.11^{cd}	3.83±0.20^{b}	5.47±0.22^{b}	6.88±0.38^{b}	8.08±0.38^{ns}	10.00±0.00^{a}	na	na	na
40M	0.65±0.03^{c}	2.08±0.06^{d}	3.65±0.03^{b}	5.40±0.10^{b}	6.58±0.13^{b}	7.78±0.13^{ns}	9.47±0.32^{b}	na	na	na
50M	0.62±0.09^{c}	2.00±0.15^{d}	3.62±0.10^{b}	5.05±0.16^{b}	6.55±0.10^{b}	7.75±0.10^{ns}	9.33±0.09^{b}	na	na	na
60M	0.73±0.08^{c}	2.52±0.14^{c}	4.33±0.13^{b}	5.90±0.15^{ab}	7.53±0.32^{ab}	8.63±0.22^{ns}	10.00±0.00^{a}	na	na	na
70M	0.55±0.03^{c}	1.87±0.07^{d}	3.35±0.03^{b}	4.83±0.03^{b}	6.32±0.12^{b}	7.53±0.03^{ns}	10.00±0.00^{a}	na	na	na
S05	0.68±0.06^{c}	2.08±0.08^{d}	3.83±0.30^{b}	5.08±0.22^{b}	6.53±0.35^{b}	7.77±0.36^{ns}	10.00±0.00^{a}	na	na	na

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูล

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 ผลผลิตดอกรุ่นที่ 1 (G1)

รุ่น G1 สายพันธุ์	จำนวนดอกเฉลี่ยต่อถุงขี้เลื่อย600กรัม* ,**	น้ำหนักสดต่อถุงขี้เลื่อย 600กรัม (กรัม/ถุง) * ,**	น้ำหนักดอกแห้งต่อถุงขี้เลื่อย 600กรัม (กรัม/ถุง) * ,**	น้ำหนักเฉลี่ย 1 ดอก (กรัม) * ,**	สัดส่วนดอก* ,**
CUL074	2.00±0.00 cd	25.60±2.58 c	3.89±0.88 d	12.80±1.29 bc	0.66±0.08 ns
5m	1.33±0.33 d	49.10±8.67 abc	13.92±2.46 a	38.10±3.15 a	0.59±0.03 ns
10m	6.00±1.53 ab	63.64±5.23 ab	8.03±0.66 bcd	12.21±3.22 bc	0.89±0.08 ns
30m	3.33±0.33 bcd	55.69±4.53 abc	6.18±0.57 bcd	16.77±0.36 bc	0.85±0.02 ns
40m	7.33±1.86 a	53.22±24.94 abc	10.35±0.57 ab	11.97±2.14 bc	0.74±0.03 ns
50m	1.67±0.33 d	30.08±1.22 bc	3.96±0.38 d	20.05±5.05 b	0.55±0.02 ns
60m	5.67±2.19 ab	64.43±4.78 ab	5.53±0.41 cd	16.08±3.45 bc	0.78±0.22 ns
70m	6.00±0.58 ab	60.65±4.99 ab	10.24±2.65 ab	10.14±0.22 c	0.98±0.09 ns
S05	5.33±0.33 abc	83.13±12.12 a	9.68±1.49 abc	15.54±1.96 bc	0.78±0.06 ns

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูล

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ผลผลิตดอกรุ่นที่ 2 (G2)

รุ่น G2 สายพันธุ์	จำนวนดอกเฉลี่ยต่อถุงขี้เลื่อย600กรัม* ,**	น้ำหนักสดต่อถุงขี้เลื่อย600กรัม (กรัม/ถุง) * ,**	น้ำหนักดอกแห้งต่อถุงขี้เลื่อย600กรัม (กรัม/ถุง) * ,**	น้ำหนักเฉลี่ย 1 ดอก (กรัม) * ,**	สัดส่วนดอก* ,**
CUL074	3.00±0.58 ^{c}	56.68±15.37 ^{b}	9.98±2.71 ^{ns}	18.25±1.70 ^{ns}	0.65±0.03 ^{cd}
5m	6.67±2.19 ^{abcd}	97.40±17.96 ^{ab}	10.59±1.62 ^{ns}	16.31±3.59 ^{ns}	0.89±0.07 ^{a}
10m	9.67±0.33 ^{abc}	93.92±3.57 ^{ab}	11.66±1.30 ^{ns}	9.73±0.40 ^{ns}	0.87±0.04 ^{ab}
30m	9.00±3.46 ^{abc}	80.35±4.68 ^{b}	7.50±0.44 ^{ns}	13.23±5.83 ^{ns}	0.86±0.06 ^{ab}
40m	3.00±0.00 ^{c}	72.91±4.35 ^{b}	13.92±0.83 ^{ns}	24.30±1.45 ^{ns}	0.57±0.03 ^{d}
50m	10.00±0.58 ^{ab}	131.84±17.04 ^{a}	14.60±2.25 ^{ns}	13.47±2.49 ^{ns}	0.69±0.05 ^{bcd}
60m	4.33±1.86 ^{bcd}	89.04±15.67 ^{b}	12.64±2.23 ^{ns}	26.75±9.55 ^{ns}	0.75±0.07 ^{abcd}
70m	4.00±2.00 ^{cd}	81.68±4.82 ^{b}	11.87±0.70 ^{ns}	29.94±9.72 ^{ns}	0.74±0.03 ^{abcd}
S05	11.00±1.73 ^{a}	84.35±13.04 ^{b}	8.94±1.38 ^{ns}	7.67±0.02 ^{ns}	0.82±0.07 ^{abc}

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษหลังตัวเลขที่เหมือนกันในแนวดิ่ง ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ ns แสดงผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ na แสดงผลที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูล

** (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ 2 รุ่น (G1 และ G2) ของแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ก้านดอก			หมวกดอก			ลักษณะครีบ
	ศก.(ซม.)	ลักษณะ	สี	ขนาด(ซม.)	ลักษณะ	สี	
G1-CUL074	1.35-2.3	เนื้อหยาบ เห็นเป็นเส้นใย มีผิวบางส่วนเป็นขุยขึ้นมา	สีขาวนวล	4.7-9	เป็นขนคล้ายกำมะหยี่สีขาว ปกคลุมทั่วดอกเห็ด มีขนรวมเป็นกระจุกขนาดเล็กกระจายโดยรอบ ดอกเห็ดแตกบริเวณขอบในบางดอก ดอกรูปทรงร่ม กลม ไม่บิดเบี้ยว	สีน้ำตาลเบอร์ 10 Cinnamon สีจะเข้มบริเวณยอดค่อยจางลงบริเวณขอบหมวก	ครีบยาว สีขาวนวล เนื้อเรียบ
G2-CUL074	1.3-1.4	*	*	9-11	*	*	*
G1-5M	0.7-1.7	ผิวเรียบ ไม่มีขุย	น้ำตาลอ่อน	5.3-10	ผิวเลี่ยงเรียบ มีกระจุกขนน้อยมาก ไม่มีขนปกคลุม รูปทรงบิดเบี้ยว	สีน้ำตาลอ่อนอมเหลือง	ไม่ต่าง
G2-5M	0.6-1.95	ก้านเป็นขุยหยาบกว่า	สีขาวนวลอมน้ำตาล	5.5-13	เป็นกระจุกขนกระจายมากและผิวหยาบกว่า	สีน้ำตาลเข้มกว่า	*
G1-10M	1.05-1.5	*	*	5.8-7.9	ผิวเรียบแต่มีขนสีขาวปกคลุมจำนวนมาก	สีน้ำตาลอ่อนกว่า CUL	*
G2-10M	0.8-2.1	*	*	8.7-10.9	ผิวค่อนข้างเรียบมีขนปกคลุมน้อยมาก แต่ขนที่เป็นกระจุกยังมีและกระจายตัวโดยทั่ว รูปทรงบิดเบี้ยวมากในบางดอกจนเด่นชัด	มีสีน้ำตาลอ่อนอมเหลืองในบางดอก สีค่อนข้างอ่อนลง ตามขอบมีจุดเป็นจ้ำขนาดใหญ่สีน้ำตาลเข้ม	*

* หมายถึง ไม่ต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 ศก. หมายถึง เส้นผ่านศูนย์กลางก้านดอก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17(ต่อ) เปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ 2 รุ่น (G1 และ G2) ของแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ก้านดอก			หมวกดอก			ลักษณะครีบ
	ศก. (ซม.)	ลักษณะ	สี	ขนาด(ซม.)	ลักษณะ	สี	
G1-30M	0.7-1.7	*	*	4.0-8.5	ผิวเกลี้ยงเรียบ มีขนปกคลุมน้อยมาก ไม่พบกระจุกขน	*	*
G2-30M	0.7-1.85	ค่อนข้างหยาบเป็นขุยมากกว่าเล็กน้อย	*	4.3-9.5	รูปทรงของหมวกบิดเบี้ยว เป็นลอนอย่างเด่นชัด มีขนปกคลุมโดยทั่ว กลุ่มของกระจุกเป็นขนมีขนาดเล็กผิวหยาบแห้ง	*	*
G1-40M	0.7-1.7	*	*	4.5-13	รูปทรงเป็นลอนอย่างเด่นชัด ผิวเกลี้ยงเกลาไม่หยาบ มีกระจุกขนสีขาวกระจายทั่วและมีขนปกคลุม	สีน้ำตาลเข้ม	*
G2-40M	0.6-1.5	*	*	5.1-14.5	รูปทรงบิดเบี้ยวเป็นลอนอย่างเด่นชัด ผิวหยาบมีขนที่หยาบมากปกคลุมโดยทั่ว ขนที่ปรากฏมีสีน้ำตาลอ่อน	สีน้ำตาลเข้ม	*
G1-50M	0.65-1.1	*	*	5.3-8.5	รูปทรงบิดเบี้ยวเล็กน้อย ผิวหยาบเล็กน้อย มีกระจุกขนสีขาวกระจายทั่ว	สีน้ำตาลค่อนข้างดำ	*
G2-50M	0.65-1	*	*	5.5-8.7	รูปทรงบิดเบี้ยว ผิวหยาบเล็กน้อย กระจุกขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม	สีน้ำตาลเข้ม (15 Brick)	*

* หมายถึง ไม่ต่างจากสายพันธุ์ตั้งเดิม CUL074

ศก. หมายถึง เส้นผ่านศูนย์กลางก้านดอก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 (ต่อ) เปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ 2 รุ่น (G1 และ G2) ของแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ก้านดอก			หมวกดอก			ลักษณะครีบ
	ศก.(ซม.)	ลักษณะ	สี	ขนาด(ซม.)	ลักษณะ	สี	
G1-60M	0.8-2.05	ผิวหยาบ เป็นเส้น	สีขาวนวล มีสีน้ำตาลอ่อนแซมในบางจุด	5.6-8.7	เกิดเป็นลอนอย่างเด่นชัด ผิวหยาบเล็กน้อย มีกระจุกขนสีขาวปกคลุม		*
G2-60M	0.7-2.01	*	*	6-16.5	มีกระจุกขนสีขาวขนาดใหญ่ปกคลุมรอบขอบดอกอย่างหนาแน่น รูปทรงบิดเบี้ยว	สีน้ำตาลเข้มอมเหลือง มีจุดเป็นจ้ำสีน้าตาลเข้มบริเวณขอบ	*
G1-70M	1.3-1.6	*	*	5.5-7.2	รูปทรงบิดเบี้ยวเล็กน้อย เป็นลอนเห็นชัด มีขนปกคลุมบริเวณขอบหมวกอย่างหนาแน่น	สีน้ำตาลอ่อน	*
G2-70M	0.9-1.7	สีน้ำตาลอ่อนและหยาบ	สีน้ำตาลอ่อนแซมกับสีขาวนวล	6-12.5	ผิวหยาบมากในบางดอก รูปทรงบิดเบี้ยวเล็กน้อย แต่เป็นลอนอย่างเด่นชัดมาก มีขนปกคลุมบริเวณขอบหมวก	สีน้ำตาลเข้ม	*
G1-S05	0.5-1.0	ก้านสีน้ำตาลอมแดง	*	4-8.5	ผิวเรียบไม่พบกระจุกขนสีขาว	สีน้ำตาลและเท่ากันเกือบทั้งดอก	*
G2-S05	0.55-1.2	*	*	4.1-8.7	มีขนปกคลุมน้อยกว่าแต่ยังมีกระจุกของขนกระจายเด่นชัด มีทรงบิดเบี้ยวในบางดอก	*	*

* หมายถึง ไม่ต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074

ศก. หมายถึง เส้นผ่านศูนย์กลางก้านดอก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่18 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 1 (G1) ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)

G1 สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหอม (กรัม)			
	4 วัน	8วัน	12วัน	16วัน
G1-CUL074	0.0247	0.0725	0.1365	0.2077
G1-5M	0.0174	0.0358	0.0734	0.1260
G1-10M	0.0112	0.0391	0.0723	0.1325
G1-20M	0.0254	0.0556	0.0986	0.1515
G1-30M	0.0253	0.0653	0.1367	0.2080
G1-40M	0.0237	0.0586	0.1423	0.2110
G1-50M	0.0098	0.0306	0.1099	0.1893
G1-60M	0.0147	0.0357	0.1121	0.1772
G1-70M	0.0238	0.050	0.1150	0.1983
G1-S05	0.0085	0.0255	0.0304	0.0459
G1-S07	0.0184	0.0306	0.0730	0.1289

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 2 (G2) ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)

G2 สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหอม (กรัม)			
	4 วัน	8วัน	12วัน	16วัน
G2-CUL074	0.0253	0.0584	0.1352	0.2081
G2-5M	0.0210	0.0485	0.0884	0.1760
G2-10M	0.0198	0.0472	0.0904	0.1822
G2-20M	0.0187	0.0489	0.0820	0.1830
G2-30M	0.0182	0.0532	0.1104	0.1962
G2-40M	0.0174	0.0546	0.1246	0.1986
G2-50M	0.0221	0.0523	0.0893	0.1870
G2-60M	0.0214	0.0489	0.0904	0.1891
G2-70M	0.0174	0.0345	0.0887	0.1861
G2-S05	0.0256	0.0506	0.0802	0.1881

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่20 การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมรุ่นที่ 3 (G3) ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 °C)

G3 สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหอม (กรัม)			
	4 วัน	8วัน	12วัน	16วัน
G3-CUL074	0.0221	0.4067	0.1205	0.2154
G3-5M	0.0180	0.0384	0.0755	0.1640
G3-10M	0.0265	0.0487	0.0970	0.1785
G3-20M	0.0244	0.0455	0.0985	0.1770
G3-30M	0.0189	0.0473	0.1088	0.1956
G3-40M	0.0247	0.0659	0.1212	0.1980
G3-50M	0.0108	0.0365	0.0905	0.1886
G3-60M	0.0143	0.0509	0.0880	0.1877
G3-70M	0.0242	0.0484	0.0845	0.1868
G3-S05	0.0238	0.0505	0.1025	0.1781

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่21 ลักษณะสัณฐานวิทยา

สายพันธุ์	ขนาดเซลล์เส้นใย กว้างxยาว(μ)	ลักษณะเส้นใย	ลักษณะโคโลนี	สีโคโลนี
G1-CUL074	17.64x828.67	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G1-5m	17.48x833.98	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G1-10m	17.09x828.52	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G1-20m	17.55x829.78	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G1-30m	17.60x830.34	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G1-40m	17.16x831.35	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G1-50m	16.73x831.69	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G1-60m	17.03x836.50	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G1-70m	17.01x830.69	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G1-S05	16.56x700.12	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G1-S07	16.54x700.01	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G2-CUL074	17.65x828.66	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G2-5m	17.50x834.02	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G2-10m	17.11x828.59	เรียวยาว	เรียบ	ขาว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่21 ลักษณะสัณฐานวิทยา (ต่อ)

สายพันธุ์	ขนาดเซลล์เส้นใย กว้างxยาว(μ)	ลักษณะเส้นใย	ลักษณะโคโลนี	สีโคโลนี
G2-20m	17.57x829.81	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G2-30m	17.65x830.35	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G2-40m	17.17x831.38	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G2-50m	16.76x831.59	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G2-60m	17.05x836.50	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G2-70m	17.01x830.67	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G2-S05	16.60x700	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G2-S07	-	เรียวยาว	เรียบหนาแน่น	ขาวขุ่น
G3-CUL074	17.70x828.56	เรียวยาว	เรียบหนาแน่น	ขาวขุ่น
G3-5m	17.52x834.00	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G3-10m	17.11x828.57	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G3-30m	17.66x830.35	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G3-40m	17.18x831.36	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G3-50m	16.74x831.62	เรียวยาว	เรียบ	ขาว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่21 ลักษณะสัณฐานวิทยา (ต่อ)

สายพันธุ์	ขนาดเซลล์เส้นใย กว้างxยาว(μ)	ลักษณะเส้นใย	ลักษณะโคโลนี	สีโคโลนี
G3-60m	17.05x836.51	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G3-70m	17.01x830.68	เรียวยาว	เรียบ	ขาว
G3-S05	16.67x720.00	เรียวยาว	เรียบ	ขาว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

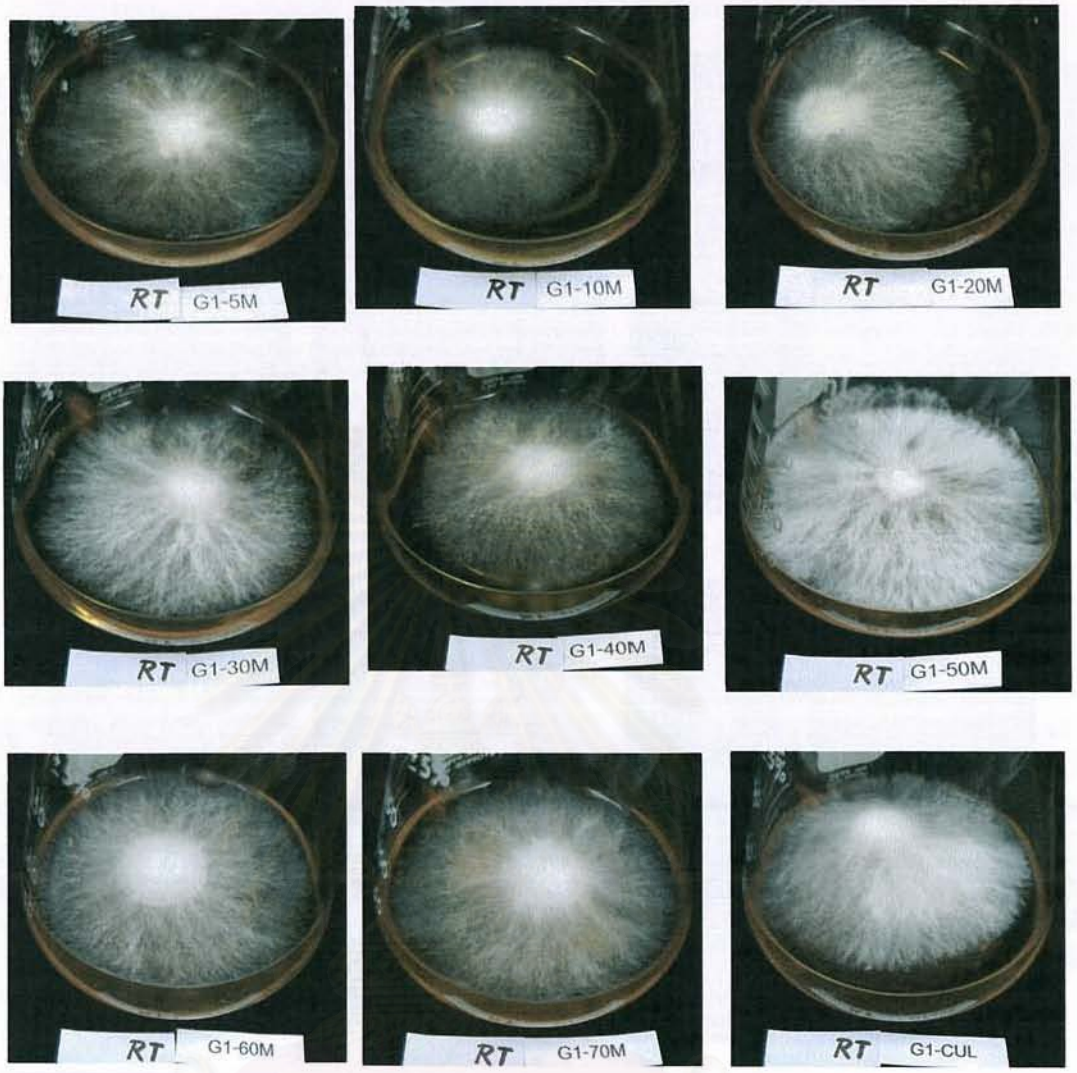
ตารางที่ 22 แสดงจำนวนโครโมโซมในเซลล์เบสิเดียม

สายพันธุ์	จำนวนโครโมโซมที่พบในเซลล์เบสิเดียม					
	เซลล์ที่ 1	เซลล์ที่ 2	เซลล์ที่ 3	เซลล์ที่ 4	เซลล์ที่ 5	ผลสรุป
CUL 074	26-28	28	28	27	26	26-28
5 M	29	28-30	28	32	42	
30 M	30	43	28	29-30	30	
50 M	16	40	40-42	39	41	Poly.
60 M	40	38-41	40	39	25	Poly.
70 M	26	34	29	-	-	
S 07	39	26	28	26-28	28	

Poly = Polyploid

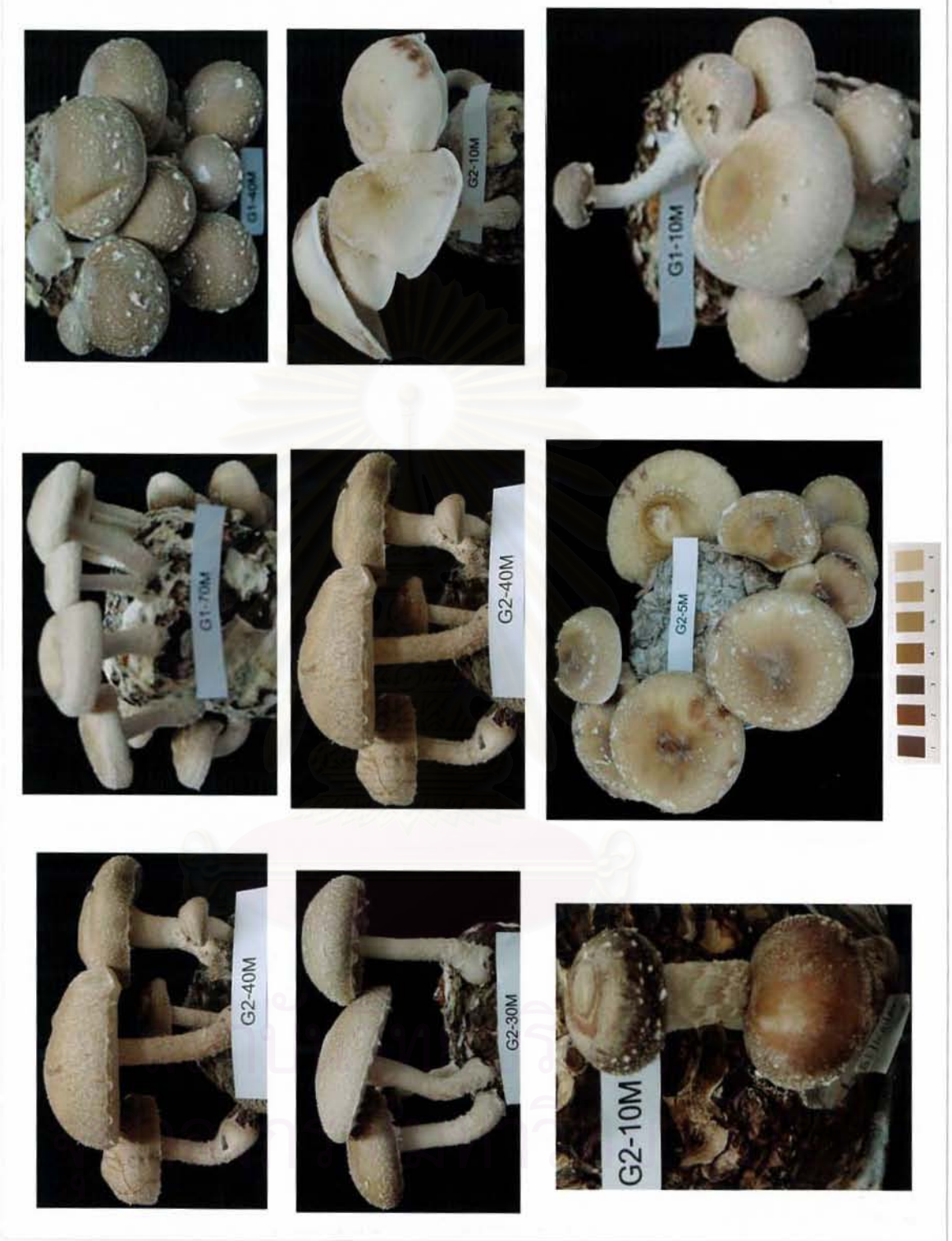
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพแสดงตัวอย่างการเจริญของเส้นใยในอาหาร PDA

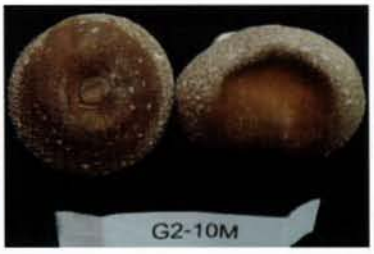


ภาพแสดงการเจริญของเส้นใยในอาหาร PDB

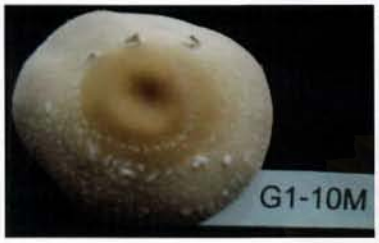
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


G1-40M
G2-10M
G1-10M
G1-70M
G2-40M
G2-5M
G2-40M
G2-30M
G2-10M

G2-50M


G2-10M

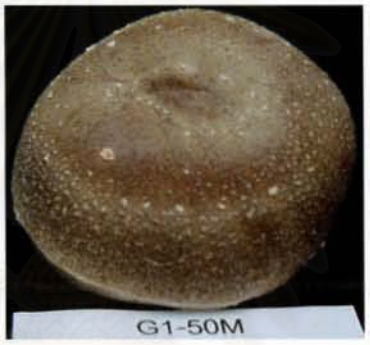
G1-60M


G1-10M

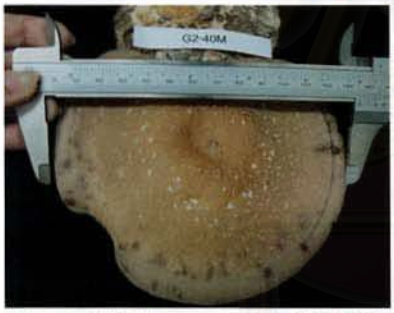
G1-40M

G1-70M

G2-30M


G1-50M

G1-5M


G2-40M

G2-40M

G2-5M

G2-60M

G2-70M

G2-40M

G2-70M

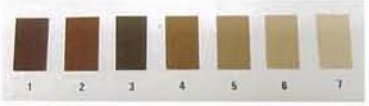
G2-40M

G2-60M

G2-S5

G2-50M

G2-CUL


1
2
3
4
5
6
7

G2-70M

G2-10M

G2-5M

G2-40M

G1-40M

G1-60M

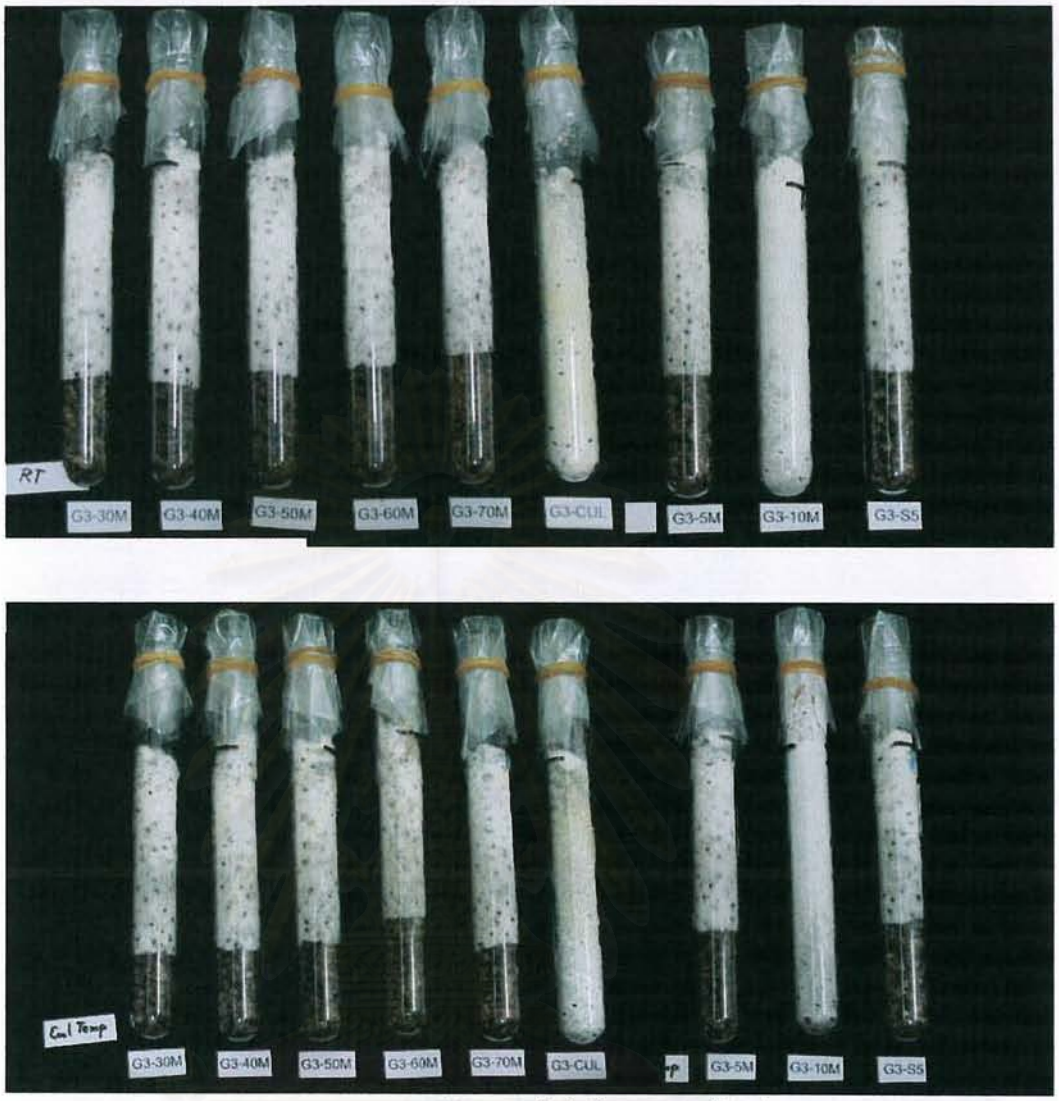
G2-10M
จากถุงเดียวกัน

G1-70M

G2-40M

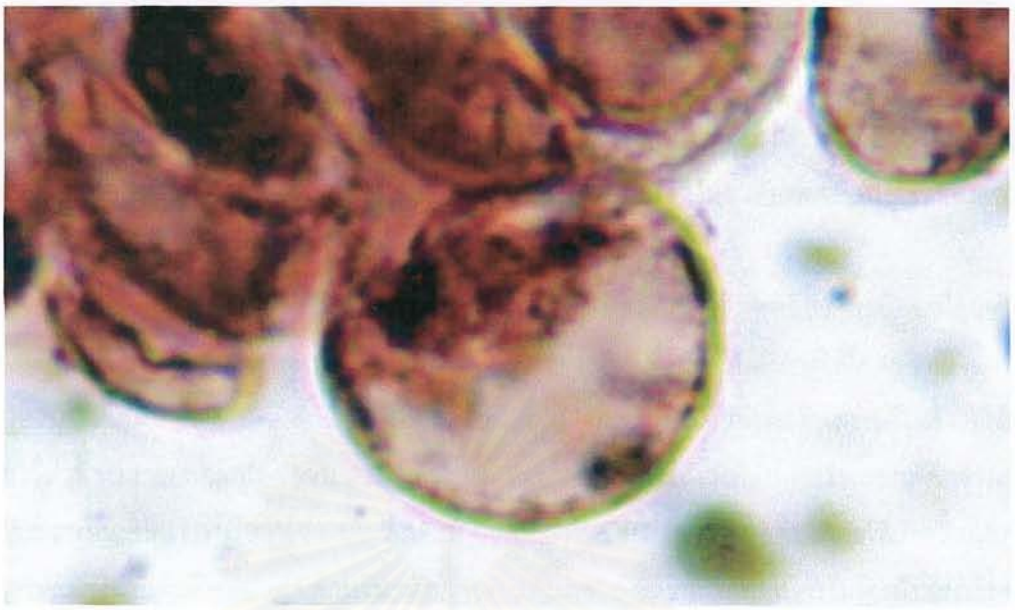
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพแสดงตัวอย่างการเจริญของเส้นใยในอาหาร ข้าวฟ่าง

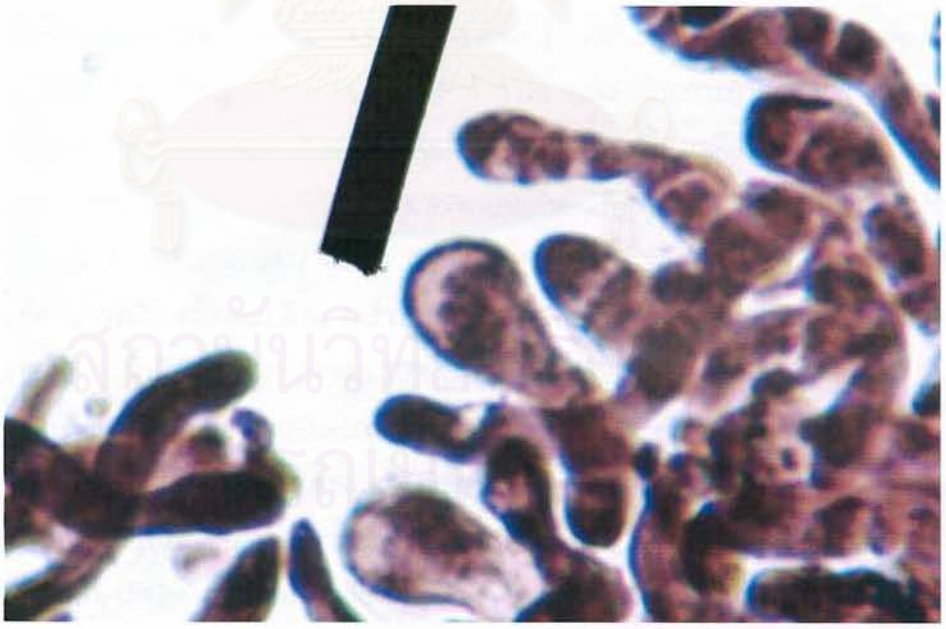


ภาพแสดงการเจริญของเส้นใยในอาหาร ข้าวฟ่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 9 แสดงโครโมโซมสายพันธุ์ 50 M



ภาพที่ 10 แสดงโครโมโซมสายพันธุ์ 60 M

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมแชื้อ

จากการเหนี่ยวนำเพื่อให้เกิดมิวเตชั่นในภาวะที่เหมาะสมควรใช้สิ่งมีชีวิตที่เป็นเซลล์เดียว เพื่อป้องกันความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงเช่น การใช้สปอร์ที่ไม่อาศัยเพศ สปอร์อาศัยเพศ หรือ เซลล์เดี่ยวที่ได้จากเส้นใย เป็นต้น

การที่นิยมใช้สารโคลชิซินในการเหนี่ยวนำให้สิ่งมีชีวิตเช่นพืชเกิดพอลิพลอยด์ เนื่องจากเป็นสารที่มีประสิทธิภาพ หาง่าย และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งปัจจุบันนี้การใช้โคลชิซินนี้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้นยังคงนิยมใช้อยู่ เช่น การชักนำให้เกิดพอลีพลอยด์ในต้นบัวบก โดยใช้สำลีชุบสารละลายโคลชิซีน 2% วางบนต้นอ่อน สามารถชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ดีกว่าการใช้วุ้นผสมโคลชิซิน1%หรือ2%วางบนกับปลายยอดของต้นอ่อน โดยต้นพอลิพลอยด์ที่เกิดขึ้นแสดงลักษณะต่างจากต้นดิพลอยด์ จำนวนคลอโรพลาสต์ในเซลล์คุมและจำนวนโครโมโซมในเซลล์ของต้นพอลิพลอยด์สูงกว่าต้นดิพลอยด์ (Chulalaksananukul and Chimnoi, 1999)

การศึกษาเส้นใยที่คงมีชีวิต ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope

การตัดแยกเซลล์เดี่ยวเห็ดหอมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยปลายมีดผ่าตัด ควรตัดที่เซลล์ท้ายของขอบโคโลนี เนื่องจากมีการกระจายตัวของเซลล์สะดวกต่อการตัด และเป็นเซลล์ที่ active คืออยู่ในระยะเจริญเติบโต มีสารอาหารและ organells สมบูรณ์

การตัดแยกเซลล์เดี่ยวควรตัดเส้นใยที่มีกิ่งยาวตั้งแต่ 30 μm ถึง 100 μm หรือเส้นกิ่งยังไม่สร้าง clamp connection เพื่อให้เส้นกิ่งสูญเสียของเหลวในเซลล์เนื่องจากยังไม่มีผนังกั้นและตายสลายไปในที่สุด คงเหลือเซลล์เดี่ยวที่ต้อง ซึ่งต้องทำการย้ายเซลล์โดยการย้ายแผ่นวุ้น PDA ที่มีเซลล์นั้นอยู่แทนที่จะย้ายเฉพาะตัวเซลล์ เพื่อป้องกันเซลล์กระทบกระเทือนมากเกินควร วิธีดังกล่าวสามารถแยกเซลล์เดี่ยวที่มีชีวิตได้ 98.30% (คมสัน, 2545) ซึ่งวิธีดังกล่าวมีความแม่นยำและเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์สูงกว่า การแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธีอื่นเช่น การแยกเซลล์เดี่ยวเห็ดหมื่บปีด้วยการปั่นเหวี่ยงแบบที่ความเร็วรอบ 6900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วผ่านผ้ากรองขนาดรู 50 μ ซึ่งมีอัตราการรอดเพียง 10% (ชาลินี, 2542)

เมื่อตัดแยกเซลล์เดี่ยวโดยวิธีดังกล่าวพบว่า 70.17% ใช้เวลาในการแบ่งสร้างเซลล์ใหม่ 70 นาที การทดลองนี้จึงใช้เวลาในทดสอบเซลล์เดี่ยวหลังตัดทันที่ด้วยสารละลายโคลชิซินเป็นเวลาภายใน 70 นาทีที่อยู่ในช่วงกระบวนการการแบ่งเซลล์นี้

2. การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมทั้ง 11 สายพันธุ์ ในอาหารต่างๆ

เส้นใยของสายพันธุ์ 20M และ S07 มีความอ่อนแอและมักหยุดเจริญเมื่อเพาะในถุงขี้เลื่อย จนไม่สามารถเก็บผลทางสถิติได้

ทุกสายพันธุ์มีการเจริญที่อุณหภูมิควบคุม 23 °C ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) ซึ่งเป็นธรรมชาติของเห็ดหอม ยกเว้น G2-S07 ในอาหารข้าวฟ่าง ซึ่งควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเส้นใยนี้ต่อไป อย่างไรก็ตามแสดงว่าเส้นใยเห็ดหอมทั้งหมดเจริญได้ที่อากาศในกรุงเทพมหานคร ยกเว้นการเจริญในถุงขี้เลื่อยในฤดูที่ร้อนจัดเช่นเดือนมีนาคม ถึงเมษายน

การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมในอาหารต่างกัน กลับพบว่าบางสายพันธุ์เจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น แต่เมื่อเปลี่ยนอาหารกลับเจริญได้ด้อยกว่า อาจเป็นเพราะการกลายพันธุ์นี้ส่งผลต่อสรีรวิทยา หรือการสร้างเอนไซม์ บางสายพันธุ์จึงย่อย C-source ได้ต่างกัน ดังเช่น สายพันธุ์ 20M และ S07 ที่เจริญได้ตามปกติในอาหาร PDA และ PDB ที่มีน้ำตาล dextrose เป็นแหล่งคาร์บอน และข้าวฟ่างนึ่งสุกที่มีแป้งสุกเป็นแหล่งคาร์บอน แต่กลับชะงักการเจริญในถุงขี้เลื่อยไม้ยางพาราซึ่งมีปริมาณเซลลูโลสจำนวนมากเป็นแหล่งคาร์บอน

การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมในถุงขี้เลื่อยเพาะเห็ด มักประสบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ก่อนการถ่ายเชื้อจึงควรนึ่งฆ่าเชื้ออีกอย่างน้อย 3 ชั่วโมง และปฏิบัติทุกขั้นตอนด้วยด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ หลังถ่ายเชื้อข้าวฟ่างลงถุงควรปิดปากถุงด้วยกระดาษอีกครั้ง เพื่อเป็นการป้องกันแมลงวางไข่ (สุทธพรรณ, 2530)

จากระยะเวลาการเจริญของเส้นใยในอาหาร PDA ข้าวฟ่าง และขี้เลื่อย ซึ่งเป็นลำดับขั้นตอนการขยายเพิ่มเชื้อในการปฏิบัติในภาคการเกษตร หากใช้เวลาน้อยจะเป็นประโยชน์ต่อการลงทุน แต่พบว่าเส้นใยที่เจริญเร็วบางครั้งให้ดอกขนาดเล็ก น้ำหนักดอกน้อยกว่าเส้นใยที่เจริญช้า

สายพันธุ์เห็ดหอมที่เซลล์เดี่ยวถูกเหนี่ยวนำด้วยโคลชิซิน 0.15%(w/v) เป็นเวลา 40 นาที (40 M) และ 30 นาที (30M) เป็นสายพันธุ์ที่ดีเนื่องจากมีการเจริญของเส้นใยได้ดีในทุกชนิดอาหารทั้ง 2 อุณหภูมิ คงที่ตลอด 3 รุ่นทดลอง ในขณะที่บางสายพันธุ์เจริญได้ดีในบางสภาวะเท่านั้น

การเจริญของเส้นใยและการเจริญของดอกเทียบแต่ละรุ่นที่ต่างกันนั้น พบว่าบางอาหารรุ่นที่ 2 และ 3 เจริญดีกว่ารุ่นที่ 1 อาจเนื่องจาก เส้นใยได้ถูกคัดเลือกจากขั้นตอนการสร้างดอกตามธรรมชาติจนได้ เส้นใยที่มีความแข็งแรง และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้น ส่วนสายพันธุ์ทดลองที่ได้จากเซลล์เดี่ยวใดให้ผลการเจริญดี หรือผลผลิตดีกว่าสายพันธุ์อื่น มักจะให้ผลใกล้เคียงกันนี้ในทุกรุ่นด้วยแม้เส้นใยจะผ่านการ subculture หลายๆครั้งตลอด 2 ปี ก็ตาม โดยแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงยืนยันได้ว่าสายพันธุ์เหล่านี้มีความเสถียรของสายพันธุ์

3. การเก็บผลผลิตดอกเห็ดหอม

การเหนี่ยวนำเซลล์เดี่ยวด้วยสารละลายโคลชิซิน 0.15%(w/v) ในช่วงเวลา 5-70 นาที ก่อนเกิดการแบ่งเซลล์ใหม่ ซึ่งวิธีดังกล่าวพบว่าได้เซลล์เดี่ยวที่ถูกเหนี่ยวนำมีลักษณะการเจริญของเส้นใยและการสร้างดอกที่หลากหลายต่างกัน

เส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ S05 และ S07 ที่ถูกทดสอบด้วยสารละลายโคลชิซิน 1.5% และรอดชีวิตแม้ในครั้งแรกมีลักษณะเซลล์หงิกงอนั้นแต่เจริญได้ตามปกติ อย่างไรก็ตามยังคงมีการเจริญที่ไม่ดีและ S07 สร้างดอกยากกว่าปกติ อย่างชัดเจนเช่นเดียวกับ 20M แตกต่างจากสายพันธุ์อื่น แสดงว่าการใช้ความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินมาก หรือใช้เวลาไม่เหมาะจะมีผลต่อเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นต่อเนื่องกันมา

หากเส้นใยเดินเต็มถุงแล้วยังไม่ได้รับการเปิดดอกจะมีผลให้ดอกมีการดันอยู่ภายในถุง และมีขนาด รูปทรงที่ผิดปกติ ซึ่งไม่ควรนำมาใช้เป็นข้อมูลทางสัญฐานวิทยาได้

จากการสรุปข้อมูลทางสัณฐานนั้นได้สรุปจากตัวอย่างบางดอก ซึ่งบางดอกก็มีลักษณะที่ต่างออกไปแม้เจริญจากสายพันธุ์เดียวกัน และถุงเดียวกันก็ตาม จึงกล่าวได้ว่าสายพันธุ์เหนี่ยวนำนี้มีลักษณะดอกที่ไม่ค่อยคงที่ รวมถึงสัดส่นดอก และน้ำหนักดอกด้วย อย่างไรก็ตามถือเป็นทางเลือกหนึ่งของตลาดการค้าที่บางเวลานิยมเห็ดดอกใหญ่เช่นอาหารจีน แต่บางคราวนิยมดอกเล็กพอคำเช่นอาหารญี่ปุ่นเป็นต้น

การเก็บผลผลิตดอกเห็ดหอมโดยเก็บผลครั้งเดียวนั้น โดยทั่วไปพบว่าผลผลิตดอกรอบแรกจะสมบูรณ์กว่า และการเปิดถุงขี้เลื่อยเพื่อเปิดดอกไว้นานมีโอกาสที่ถุงจะปนเปื้อนเชื้ออื่นจนเสียหายได้ง่ายจึงทำการเปรียบเทียบผลผลิตเฉพาะการออกดอกรอบแรก

จำนวนดอกเฉลี่ยต่อถุงขี้เลื่อย 600 กรัม สอดคล้องกับน้ำหนักเฉลี่ยต่อ 1 ดอก เพราะเมื่อดอกมีขนาดใหญ่ น้ำหนักสดมากมักมีจำนวนดอกน้อย ในขณะที่ดอกขนาดเล็กน้ำหนักสดน้อยมักให้จำนวนดอกต่อครั้งมากกว่า อย่างไรก็ตามน้ำหนักแห้งมักจะคงที่เท่ากัน

สายพันธุ์เห็ดหอมที่เซลล์เดี่ยวถูกเหนี่ยวนำด้วยโคลชิซิน 0.15%(w/v) เป็นเวลา 5 นาที (5M) 10 นาที (10 M) 30 นาที (30 M) 40 นาที (40M) 50 นาที (50M) 60 นาที (60M) 70 นาที (70M) รวมทั้ง S05 เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถให้น้ำหนักสดของดอกต่อถุง น้ำหนักแห้งของดอกต่อถุง และน้ำหนักต่อหนึ่งดอกได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 ในทั้ง 2 รุ่นการทดลอง

จากการทดลอง พบว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยต่อถุงและน้ำหนักดอกแห้งต่อถุงขี้เลื่อย 600 กรัม น้อยกว่าสายพันธุ์เหนี่ยวนำ ซึ่งแสดงว่าการเหนี่ยวนำมีผลดีต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิตและพัฒนาสายพันธุ์เห็ดเพื่อให้ได้ผลผลิตทางการค้าที่ดีขึ้น และคุ้มทุน

สัดส่วนของดอกจากอัตราส่วนระหว่างความยาวก้านดอกส่วนขนาดหมวกดอกในรุ่นแรกพบว่าไม่ต่างกันทางสถิติ แต่สัดส่วนของดอกในรุ่นที่ 2 มีความหลากหลายเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากการปรับตัวของเส้นใย ทั้งนี้เป็นทางเลือกที่ดีทางเศรษฐกิจ

การทำเห็ดหอมแห้งควรใช้วิธีที่เหมาะกับสถานที่ หากใช้ตู้อบไฟฟ้า ควรผึ่งลมให้แห้งระดับหนึ่งก่อน โดยหงายดอกเห็ดขึ้นเพื่อรักษาทรงดอกจากนั้นจึงอบในอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส จนแห้งได้คุณภาพตามที่นิยม (พรพรรณ, 2531)

4. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงเซลล์และโครโมโซมของดอกเห็ดหอม

พบว่าขนาดเซลล์ของเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆไม่ต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% อย่างไรก้ตามยังคงต้องทำการศึกษาถึงความแตกต่างของ โปรโตพลาส และนิวเคลียสต่อไป การที่เซลล์ของ G3-CUL074 และ G2-S07 มีลักษณะต่างออกไปนั้นจำเป็นต้องนำไปศึกษาเส้นใย และเปิดดอกเพื่อตรวจสอบต่อไป

ในการศึกษานับจำนวนโครโมโซมเปรียบเทียบกันโดยการนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุล-ทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 2000X พบว่าผลการนับจำนวนโครโมโซมที่ได้ พบว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการหยดโคลชิซินที่ 50M และ 60M นั้นน่าจะเกิดพอลีพลอยด์แบบเนื่องจากสามารถตรวจนับโครโมโซมได้เป็นจำนวนประมาณ 2 เท่าของจำนวนโครโมโซมชุดเดียว(n) ของสายพันธุ์ควบคุม (CUL074) ที่มีจำนวนโครโมโซมประมาณ 26-28 แท่ง ในขณะที่สายพันธุ์ 5M, 30M, 70M และ S07 พบว่าจำนวนโครโมโซมที่นับได้มีค่าเท่า หรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ควบคุม จึงไม่น่าจะเกิดพอลีพลอยด์ ส่วนสายพันธุ์ 40M พบว่าไม่สามารถสรุปผลได้เนื่องจากไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจเนื่องจากมีมากจนนับยากก็เป็นได้

การเลือกเก็บดอกเห็ดหรือส่วน Fruiting body เพื่อนำไปตรึงในสาร fixation นั้นเลือกเก็บดอกเห็ดที่มีขนาดของดอกและอายุของดอกแตกต่างกัน โดยเรียงตามอายุ 2 วัน 3 วัน 4 วัน 5 วัน 6 วัน และ 7 วันหลังจากเกิดตุ่มดอกเล็กๆ งอกออกมาจากถุงอาหารขี้เลื่อยเพื่อจะทำการคัดเลือกดอกเห็ดที่เหมาะสมต่อการนับจำนวนโครโมโซมต่อไป โดยพบว่าดอกที่เหมาะสมคือดอกที่กำลังอยู่ในช่วงการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส เพื่อสร้างเบสิดิโอสปอร์ ซึ่งคือดอกเห็ดที่มีอายุประมาณ 4-5 วัน และ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอกเห็ดประมาณ 4 เซนติเมตร หลังจากเกิดตุ่มดอกเล็กๆ งอกออกมาจากถุงขี้เลื่อย โดยหากเป็นดอกที่มีอายุน้อย เมื่อทำการย้อมสีเพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมในระยะนี้เซลล์ที่จะเจริญเป็นเบซิเดียจะมีขนาดเล็กเกินไปและไม่พองออก ดังนั้นจึงไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ แต่หากเลือกใช้ดอกที่มีอายุมากกว่า 5 วันขึ้นไป พบว่าเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเบสิเดียจะแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสเสร็จสิ้นแล้วซึ่งจะสังเกตเห็น 4 นิวเคลียสเกิดขึ้นภายในเบสิเดียม และบางครั้งหากดอกเห็ดที่มีอายุมากๆ ก็จะงอก sterigma และเกิดเบสิดิโอสปอร์เรียบร้อยแล้ว ซึ่งจะไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมในช่วงนี้ได้

เมื่อเลือกขนาดและอายุของดอกเห็ดที่เหมาะสมในแต่ละสายพันธุ์ได้แล้ว นำมาทำการย้อมสีเพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซม โดยในการทดลองครั้งแรกได้ใช้สีย้อม propiono-orcein

ย้อมเซลล์ โดยคัดเลือกเนื้อเยื่อส่วนใต้ครีบ โดยเลือกชิ้นที่บางที่สุดมาย้อมสี พบว่าผลที่ได้จากการย้อมสีจะสังเกตเห็นเซลล์ชัดเจน แต่ไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมที่ปรากฏอยู่ในเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเบสิเดียได้ เนื่องจากโครโมโซมติดสีแดง เช่นเดียวกับภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเบสิเดียก็ติดเป็นสีแดงเช่น เดียวกัน ดั้งนั้นจึงได้เปลี่ยนสีที่ใช้ย้อมโครโมโซมจาก propiono-orcein เป็น aceto-iron-hematoxylin โดย พบว่าเซลล์ที่ย้อมมีการติดสีที่ดีกว่า และโครโมโซมที่สังเกตเห็นจะชัดเจนมากขึ้นเนื่องจากไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเบสิเดียค่อนข้างใส ทำให้เห็นโครโมโซมภายในเซลล์ชัดเจน และสามารถทำการนับจำนวนโครโมโซมได้ และเป็นที่น่าสังเกตถ้าหากมีการให้ความร้อนนาน และบ่อยแต่ไม่ถึง จุดเดือดของสีย้อม จะยิ่งทำให้บริเวณไซโทพลาสซึมใสมากยิ่งขึ้น

ในการศึกษานับจำนวนโครโมโซมเปรียบเทียบกันโดยการนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุล-ทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 2000X พบว่าผลการนับจำนวนโครโมโซมที่ได้ พบว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการหยดโคลชิซินที่ 50M และ 60M นั้นน่าจะเกิดพอลีพลอยด์แบบเนื่องจากสามารถตรวจนับโครโมโซมได้เป็นจำนวนประมาณ 2 เท่าของจำนวนโครโมโซมชุดเดียว(n) ของสายพันธุ์ควบคุม (CUL074) ที่มีจำนวนโครโมโซมประมาณ 26-28 แท่ง ในขณะที่สายพันธุ์ 5M, 30M, 70M และ S07 พบว่าจำนวนโครโมโซมที่นับได้มีค่าเท่า หรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ควบคุม จึงไม่น่าจะเกิดพอลีพลอยด์ ส่วนสายพันธุ์ 40M พบว่าไม่สามารถสรุปผลได้เนื่องจากไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจเนื่องจากมีมากจนนับยากก็เป็นได้

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของ 50M และ60M เพิ่มขึ้นมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 2 เท่าเชื่อได้ว่าอาจเป็นพอลีพลอยด์ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่วิธีดังกล่าวไม่สามารถตรวจสอบได้ชัดเจน เนื่องจากโครโมโซมของเห็ดมีขนาดเล็กมาก จำเป็นต้องใช้กำลังขยายของกล้องสูงกว่า 2500เท่า และจากที่โครโมโซมมีมิติความลึก อาจเกิดการบังกันของโครโมโซม ทำให้นับจำนวนได้ไม่ชัดเจน ซึ่งควรทำการศึกษาโดยวิธีอื่นเพิ่มเติมเช่นวิธีทางไมโครเทคนิคต่อไป

จากที่ Toyama (1995) ศึกษาโดยใช้น้ำหนักแห้งของเส้นใยในการเปรียบเทียบดีเอนเอนั้นมีข้อสังเกตว่าแม้เซลล์มีขนาดเท่ากัน แต่อาจเป็นไปได้ที่เซลล์จะมีน้ำหนักไม่เท่ากันหากเป็นเช่นนั้นปริมาณ DNA ที่ได้ย่อมไม่สามารถเปรียบเทียบกัน จึงอาจเปรียบเทียบDNAภายในเซลล์เดียวกันด้วยวิธี biosensor เพื่อบอกความเป็นพอลีพลอยด์ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์เห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk) Sing ด้วยโคลชิซิน โดยการนำเซลล์เดี่ยวของเห็ดหอมสายพันธุ์ CUL074 มาหยดสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 0.15% (w/v) ในช่วง 5-70 นาที ก่อนเกิดการแบ่งเซลล์ใหม่ พบว่า 40M 50M 60M และ 70 M มีการเจริญได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 โดย ผลผลิตดอกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์

2. จำนวนโครโมโซมจากวิธีการย้อมสีโครโมโซมและนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นเหตุให้เชื่อได้ว่า 50M และ 60M อาจเกิดพอลีพลอยด์เนื่องจากสามารถตรวจนับโครโมโซมได้เป็นจำนวนประมาณ 2 เท่าของจำนวนโครโมโซมของสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่มีจำนวนโครโมโซมประมาณ 26-28 แท่ง อย่างไรก็ดี จากวิธีการย้อมสีโครโมโซมสายพันธุ์ 5M, 30M, 70M และ S07 ถูกพบว่ามีจำนวนโครโมโซมที่มีค่าใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

3. สายพันธุ์เห็ดหอมที่เซลล์เดี่ยวถูกเหนี่ยวนำด้วยโคลชิซิน 0.15%(w/v) เป็นเวลา 40 นาที (40 M) และ 30 นาที่ (30M) เป็นสายพันธุ์ที่ดีเนื่องจากมีการเจริญของเส้นใยได้ดีในทุกชนิดอาหารทั้ง 2 อุณหภูมิ คงที่ตลอด 3 รุ่นทดลอง ในขณะที่บางสายพันธุ์เจริญได้ดีในบางสภาวะเท่านั้น

4. สายพันธุ์ดั้งเดิม CUL074 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยต่อถุงและน้ำหนักดอกแห้งต่อถุงขี้เลื่อย 600 กรัม น้อยกว่าสายพันธุ์เหนี่ยวนำ ซึ่งแสดงว่าการเหนี่ยวนำมีผลดีต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิตและพัฒนาสายพันธุ์เห็ดเพื่อให้ได้ผลผลิตทางการค้าที่ดีขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คมสัน นันทสุนทร. 2545. การเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเทชั่นในเห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk) Sing. ด้วยโคลชิซิน วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชะบา อ่ำรำไพ. 2527. การใช้โคลชิซินชักนำให้เกิดพอลิพลอยด์ในแพงพวยฝรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ฐิติมา ตันติกาญจน์. 2529. การศึกษาพันธุศาสตร์ของเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวและของสิ่งแวดล้อมต่อดอกเห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk) Sing.บางสายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดำรง สินไชย. 2521. การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในแตงโมพันธุ์ชูการ์เบบี้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บรรณ บูรณะชนบท. 2542. เห็ดหอม Shiitake. พิมพ์ครั้งที่4. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม.

ปิยพัทธ์ ปิ่นอ่อน. 2546. ผลของโคลชิซินที่มีต่อการเจริญและลักษณะของเส้นใยเห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk) Sing. โครงงานวิทยาศาสตร์. ภาคพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรพรรณ สังขวดี. 2531. การอบแห้งเห็ดหอม(*Lentinus edodes*) และข้อมูลพื้นฐานทางด้านซอพชันไอโซเทอร์ม.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สาริณี ไชยเจริญ. 2538. การศึกษาจำนวนโครโมโซมลักษณะดอก และความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้หวาย. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์) 29: 150-157.

สุทธพรรณ ตรีรัตน์. 2523. ยาอายุวัฒนะจากเห็ดหอม. วารสารเห็ด สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย 1: 5-10

สุทธพรรณ ตรีรัตน์ และคณะ. 2530. การพัฒนาการเพาะเห็ดหอม *Lentinus edodes* ในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. 2546. หลักพันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ

อานนท์ เอื้อตระกูล. 2532. การเพาะเห็ดหอมในขอนไม้. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์พิมพ์สวย 88.

ภาษาอังกฤษ

Alexopoulos, C.J., C.W.Mims and M.Blackwell : 1996: Introductory Mycology : 4th ed : John Wiley and Sons , Inc : USA

Allard, R.W. 1960. Principles of Plant Breeding. Japan. Toppan Printing

Chihara, G., Meada, Y., Hamuro, G., Sasaki, T., and Fukuoka, F. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes.* (Berk) Sing. Nature 222: 689.

Chulalaksananukul, W., and Chimnoi, W. 1999. Polyploid Induction in *Centella asiatica* (L.) Urban by Colchicine Treatment . J.Sci. Res.Chula. Univ., Vol. 24, No. 2 : 55-65

Dermen, H. 1940. A Colchicine polyploid and technique. Bot. Rev. 6: 599 – 635.

Dnyansagar, V.R. 1992. Polyploid. Cytology and Genetics. 4th ed. TATA McGRAW Hill Publishing Co.Ltd. New Delhi, India : 252-262.

Eigsti, O.J., Dustin. Jr., and Gay-Winn, N. 1955. Chemistry Colchicine in Agriculture Medicine Biology and Chemistry. U.S.A. The Iowa State College Press.

Espino, Hamuro, J., Meada, Y., Fuknoka, F. and Chihara, G. 1974. Antitumor polysaccharides, Lentinan and pachymaran as immunopotentiators. Mushroom Science IX (PartI). 477

Hagino, K., Murakami-Murofushi, K., and Ohta, J. 1978. Effects of colchicine on the mitosis of *Physarum polycephalum.* Plant Cell Physiol. 19: 711-715.

Handa, S., Sodhi, H.S., and Phutela, R.P. 1997. Induction of Autopolyploid in *Agaricus Bisporus*. Mycol. Pl. Pathol. 27: 261-265.

Husscin, F.T. and M.A.A. Narsa. 1974. A chromatographic method for assay of colchicines alkaloid. Planta Media. 25 : 396-400

Mukda Kuhirun. 1975. A Genetic and Cytologic Analysis of the life cycle of *Coprinus curtus* Kalchbrenner. Master's Thesis. Department of Biology, Washington University.

Pegler, D.N. 1983. The genus Lentinula (Tricholomataceae tribe Collybieae. Shiitake Growers Handbook. : 217.

Sarangbin, S., Morikawa, S., Kirimura, K., and Usami, S., 1994. Formation of autodiploid strains *Aspergillus niger* and their application to citric acid production from

starch. J. Ferment. Bioeng. 77: 474-478.

Saitoh, T. 1974. Effect of eritadenine on lipids in hepatic bile. Mushroom extract as an interferon inducer I. Biological and physiological properties of spore extract of *Lentinus edodes*. Mushroom Science IX (Part I). 509.

Suzuki, S., and Ohshima, S. 1974. Influence of shiitake (*Lentinus edodes)* on human serum cholesterol. Mushroom Science IX (Part I) 463.

Toyama, H. and Toyama, N. 1994. Nuclear abnormality in mycelia of *Pleuratus ostreatus*. In presence of colchicines. J. Biotechnol. 35: 97-106

Toyama, H. and Toyama, N. 1995a. Multinucleation in conidia of polyploid derived from *Trichoderma reesei*. QM 9414 by colchicine treatment. J. IND. Microbiol. 15: 121-124.

Toyama, H. and Toyama, N. 1995b. Factors affecting formation of micronucleus-like structures after colchicine treatment of *Trichoderma reesei*. World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 97-106.

Toyama, H. and Toyama, N. 1995c. Multinucleation through hyperpolyploidization in the binucleate basidiomycete *Lentinus edodes*i with colchicine treatment. Microbios 84: 221-230.

Toyama, H. and Toyama, N. 2000. Cellulase hyperproducers constructed from polyploids of *Lentinus edodes*. Microbios 101: 73-80.

Van Tuyl, Jaap. M., Meijer, Bertus an Van Die'n, Maria. 1991. The use of oryzalin as an alternative for colchicines *in vitro* chromosome doubling of lilium and nerine. Netherland. (Mimeograghed).

Wakata, A. and Sasaki , M.S. (1987) Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells : Comparison with types and rate of chromosome aberrations. Mutation Research. 190 : 51-57.

Yamamura, Y., and Cochran, K.W. 1974. A selective inhibitor of myxoviruses from shiitake (*Lentinus edodes)*. Mushroom Science IX (Part I). 495.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1. สูตรอาหาร

1.1 สูตรอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

ละลาย PDA 39 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB)

ละลาย PDB 24 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สูตรอาหารข้าวฟ่าง

ข้าวฟ่างนึ่ง	1800	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Calcium sulphate	1	กรัม
ขี้เลื่อย	0.2	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 สูตรอาหารขี้เลื่อย (วัสดุเพาะ)

ขี้เลื่อยไม้ยางพาราแห้ง	600	กรัม
รำ	30	กรัม
ยิปซั่ม	12	กรัม
ดีเกลือ	0.1	%
น้ำ		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ให้มีความชื้น 55 % บรรจุใส่ถุงทนร้อนถุงละ 600 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

การเตรียมน้ำยา Fixation (Mukda Kuhirun, 1975)

1. Propionic acid	1	ส่วน
2. Ethanol	2	ส่วน

ใส่ Fruiting bodies ที่อยู่ใน button stage ลงไปใน propionic acid และ ethanol บริสุทธิ์ (ผสมด้วยอัตราส่วน 1:2) ทิ้ง Fruiting body ไว้ในนั้น 24 ชั่วโมงก่อนที่จะ stain

การเตรียมสีย้อมโครโมโซม Aceto-iron-hematoxylin (Whittman, 1962).

1. Hematoxylin	2	กรัม
2. Iron alum	0.5	กรัม
3. Acetic acid 45%	50	มิลลิลิตร

ละลาย Hematoxylin 2 กรัมในกรด Acetic 45% หลังจากนั้นก็ใส่ Iron alum ลงไป ทิ้งไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้

$$\text{สัดส่วนดอก} = \frac{\text{ความยาวก้านดอก}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางดอก}}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพัชนี เอื้อรักสกุล เกิดวันอังคารที่ 24 สิงหาคม พ.ศ. 2514 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2537 ประสบการณ์ทำงาน นักวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม บริษัท พัฒนากรุ๊ป จำกัด พนักงานฝ่ายอุปกรณ์ทางการแพทย์ บริษัท ดีทแฮล์ม(ประเทศไทย) จำกัด ครูระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนอัสสัมชัญ ปัจจุบันประกอบธุรกิจส่วนตัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย