โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางนวลสีชมพู (*Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn) ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน

Strain improvement of pink oyster mushroom (*Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn) using hybridization technique

ชื่อนิสิต สุชาดา ทับเจริญ **เลขประจำตัวนิสิต** 6032154023

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางนวลสีชมพู (*Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn) ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน

นางสาวสุชาดา ทับเจริญ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

Strain improvement of pink oyster mushroom (*Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn) using hybridization technique

Miss Suchada Thapjaroen

A senior Project in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Degree of Bachelor of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2020

ชื่อเรื่อง	การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางนวลสีชมพู (*Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn) ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน
ชื่อนิสิต	นางสาวสุชาดา ทับเจริญ
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิตา ปาลิยะวุฒิ
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิตา ปาลิยะวุฒิ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รสริน พลวัฒน์)

ชื่อเรื่อง การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางนวลสีชมพู (*Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn) ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน

ชื่อนิสิต นางสาวสุชาดา ทับเจริญ

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิตา ปาลิยะวุฒิ

ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

เห็ดนางนวลสีชมพู (*Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn) เป็นเห็ดทางเศรษฐกิจที่สามารถนำมารับประทานได้ อุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการและสรรพคุณทางยา อย่างไรก็ตาม การเจริญเติบโตของดอกและประสิทธิภาพในการให้ผลผลิตของเห็ดชนิดนี้ต่ำกว่า *Pleurotus* ชนิดอื่นมาก ยิ่งไปกว่านั้น เนื้อผิวในธรรมชาติยังมีสีฉูดฉาดจึงไม่เป็นที่นิยมในการรับประทาน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะปรับปรุงผลผลิตของเห็ด *P. djamor* ด้วยเทคนิคแบบ โมโน-โมโน ไฮบริไดเซชัน 13 โมโนคาริออนจากสายพันธุ์พ่อแม่ ได้แก่ สายพันธุ์ BK และ CM ถูกนำมาผสมแบบพบกันหมด สายพันธุ์ลูกผสมทั้งหมดที่ได้ถูกเพาะเลี้ยงเพื่อประเมินอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหารวุ้นมันฝรั่ง (PDA) และในวัสดุเพาะขี้เลื่อย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ในการศึกษาครั้งนี้ได้สายพันธุ์ลูกผสมสองสายพันธุ์ ได้แก่ NS1 และ NS2 โดยสายพันธุ์ลูกผสม NS1 ให้อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่บน PDA เท่ากับ 1.40$\pm$0.02 เซนติเมตรต่อวัน และบนวัสดุเพาะขี้เลื่อยเท่ากับ 1.07$\pm$0.04 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ได้แก่ สายพันธุ์ BK และ CM ผลที่ได้จากการศึกษานี้บ่งชี้ว่าสายพันธุ์ NS1 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ด้วยเทคนิคแบบไฮบริไดเซชัน อาจเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตเห็ด *P. djamor* ทางเศรษฐกิจต่อไป

คำสำคัญ clamp connection สายพันธุ์ลูกผสม สายพันธุ์พ่อแม่

Title Strain improvement of pink oyster mushroom (*Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn) using hybridization technique

Student name Suchada Thapjaroen

Program Genetics

Department Botany

Senior project advisor Assist. Prof. Dr. Jittra Piapukiew

Senior project coadvisor Assist. Prof. Dr. Chanita Paliyavuth

Academic year 2020

Abstract

The pink oyster mushroom (*Pleurotus djamor* (Rumph. Ex Fr.) Boedijn) is an economic edible mushroom with high nutrition and medicinal properties. However, the fruiting body formation and yield efficiency on this mushroom is very low than other *Pleurotus* species. Moreover, its leathery texture in nature and flashy colors it was not popular in edibility. Therefore this study aimed to improve yield of *P. djamor* using mono-mono hybridization. Thirteen monokaryon cultures of the parental strains, BK and CM, were crossed in all combinations. All obtained hybrid strains were cultured to evaluate their mycelial growth rate on Potato Dextrose Agar (PDA) and in sawdust substrate comparing with the parental strains. Two hybrid strains, NS1 and NS2, were obtained from this study. The hybrid strain NS1 gave significantly the highest mycelial growth rate of 1.40± 0.02 cm/day on PDA and 1.07± 0.04 cm/day on sawdust substrate, respectively over the parent strains, BK and CM. The results from this study indicated that the strain NS1 from the hybridization technique could be a potential strain for further economic mushroom production of *P. djamor*

Keywords clamp conection, hybrid strains, parent strains

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิตา ปาลิยะวุฒิ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดีในทุกด้าน

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รสริน พลวัฒน์ ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการรา 212 ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษาและการช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านและผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่เป็นกำลังใจสำคัญและให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านอย่างเต็มที่

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข

กิตติกรรมประกาศ..... ค

สารบัญ..... ง

สารบัญรูป..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ..... 1

1.2 วัตถุประสงค์..... 2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 การตรวจสอบเอกสาร

2.1 ความสำคัญของเห็ด..... 3

2.2 เห็ดนางนวลสีชมพู..... 3

2.3 การปรับปรุงพันธุ์เห็ด..... 6

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา

3.1 วัสดุ อุปกรณ์..... 8

3.2 สารเคมี..... 8

3.3 วิธีดำเนินการศึกษา..... 9

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะของเห็ดสี่สายพันธุ์..... 12

4.2 การแยกเส้นใยบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อเห็ด..... 13

4.3 การแยกเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว..... 14

4.4 การผสมข้ามสายพันธุ์ (hybridization) 17

4.5 การทดสอบการเจริญของเส้นใยลูกผสม..... 20

บทที่ 5 อภิปรายผล.....23

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 25

เอกสารอ้างอิง..... 26

ภาคผนวก ก..... 31

ภาคผนวก ข..... 32

สารบัญรูป

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 2.1 วงจรชีวิตแบบ heterothallic life cycle (Palmer and Horton, 2006)..... 5

ภาพที่ 3.1 การทำรอยพิมพ์สปอร์..... 9

ภาพที่ 4.1 ลักษณะของเห็ดสายพันธุ์ GK, SP, BK และ CM..... 13

ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสคู่ของสายพันธุ์พ่อแม่ได้แก่ สายพันธุ์ GK, SP, BK และ CM..... 14

ภาพที่ 4.3 เส้นใยปฐมภูมิ และเส้นใยทุติยภูมิ 15

ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายพันธุ์ GK..... 15

ภาพที่ 4.5 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายพันธุ์ SP.....16

ภาพที่ 4.6 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายพันธุ์ BK..... 16

ภาพที่ 4.7 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายพันธุ์ CM..... 16

ภาพที่ 4.8 ลักษณะการเจริญของเส้นใยที่พบในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่าง สายพันธุ์ GK และ SP..... 18

ภาพที่ 4.9 ลักษณะการเจริญของเส้นใยที่พบในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่าง สายพันธุ์ BK และ CM..... 19

ภาพที่ 4.10 ลักษณะการเจริญโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสคู่ของสายพันธุ์พ่อแม่ และสายพันธุ์ลูกผสม..... 20

ภาพที่ 4.11 ลักษณะการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะ..... 21

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 การผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ของโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว
ระหว่างสายพันธุ์ GK และ SP..... 18
ตารางที่ 2 การผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ของโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว
ระหว่างสายพันธุ์ BK และ CM..... 19
ตารางที่ 3 อัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 6 วัน..... 21
ตารางที่ 4 อัตราการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะที่เวลา 9 วัน..... 22

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เห็ด (mushroom หรือ fungi) เป็นโครงสร้างหรือช่วงชีวิตหนึ่งของราบางกลุ่มที่มีวิวัฒนาการและวงจรชีวิตที่สลับซับซ้อนกว่าราทั่วไป โดยเห็ดมีบทบาทที่สำคัญต่อการย่อยสลายในระบบนิเวศและจัดเป็นสินค้าเกษตรในกลุ่มพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีการนำเห็ดมาบริโภคเป็นอาหาร อีกทั้งยังมีสรรพคุณทางยาที่ใช้ในการรักษาโรค ทำให้การบริโภคเห็ดได้รับความนิยมทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยด้วย โดยพบว่าสถิติการบริโภคเห็ดของคนไทยมีค่าสูงขึ้น จากเดิมที่มีค่าเฉลี่ยประมาณ 235 กรัมต่อคนต่อปี พบว่าในปัจจุบันมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 10 กิโลกรัมต่อคนต่อปี (รัตนชัย ม่วงงาม, 2560 : ออนไลน์)

Pleurotus djamor (Rumph. ex Fr.) Boedijn หรือเห็ดนางนวลสีชมพู (pink oyster mushroom) จัดเป็นเห็ดในสกุลเห็ดนางรม โดยทั่วไปมีลักษณะดอกสีชมพู หมวกเห็ดกว้าง 2-5 เซนติเมตร รูปพัด หรือกรวยตื้น มีขนละเอียดบาง ๆ กลางหมวกดอกเว้าเป็นแอ่ง ครีบยาวลงไปติดโคนและมีขนาดของครีบไม่เท่ากัน มีการเรียงซ้อนกันหลายชั้น ขอบของดอกเห็ดเรียบ มีสีขาวหรือครีม ก้านมีลักษณะสั้นหรือไม่มีเลย ในธรรมชาติเห็ดชนิดนี้จะเกิดเป็นกลุ่มซ้อนกันบนท่อนไม้ และกิ่งไม้แห้งในป่าดิบชื้นหรือป่าเต็งรัง สามารถออกดอกได้ทั้งปี (อุราภรณ์ สอาดสุด และคณะ, 2552) โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญของเส้นใยอยู่ที่ประมาณ 28 องศาเซลเซียส และค่า pH เท่ากับ 7.5 ทำให้เหมาะแก่การปลูกในสภาพแวดล้อมทั่วไป (Singh and Singh, 2018)

เห็ดนางนวลสีชมพูเป็นเห็ดที่มีความสำคัญทางการค้า ถูกจัดเป็นเห็ดที่สามารถบริโภคได้มากเป็นอันดับสามของโลก (Oropeza-Guerrero et al., 2018) และยังเป็นเห็ดที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ เป็นแหล่งโปรตีน แร่ธาตุ วิตามินที่สำคัญ ทั้งยังมีปริมาณโพแทสเซียมและโซเดียมสูงทำให้เป็นอาหารที่เหมาะสำหรับคนที่เป็นโรคความดันโลหิตสูงและโรคหัวใจ (Dehariya, Vyas, and Kashaw, 2013) รวมทั้งมีสารต้านอนุมูลอิสระที่มีส่วนช่วยในระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Su et al., 2016) อย่างไรก็ตาม สำหรับประเทศไทยเห็ดชนิดนี้ยังไม่เป็นที่นิยมแพร่หลาย เนื่องจากการมีสีฉูดฉาด ทำให้ถูกเข้าใจว่าเป็นเห็ดพิษจึงไม่นิยมนำมาบริโภค และการเพาะเลี้ยงยังอยู่ในวงจำกัด ดังนั้นการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางนวลสีชมพู จะทำให้เห็ดชนิดนี้เป็นที่รู้จักมากขึ้น ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์กับผู้บริโภค และยังเป็นการเพิ่มทางเลือกใหม่ให้กับกลุ่มเกษตรกรในประเทศไทย ได้มีแนวทางในการสร้างรายได้มากขึ้น

การปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดนางนวลสีชมพู มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี แต่วิธีที่ได้รับความนิยมและเป็นวิธีที่ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์สูง คือ การผสมพันธุ์ (Hybridization) โดยการผสมพันธุ์แบบเส้นใย

นิวเคลียสเดี่ยว (mono-mono crossing) จากเส้นใย 2 สายพันธุ์ ที่แต่ละเส้นใยมี 1 นิวเคลียส (n) ผสมกันแล้วได้เส้นใยที่มี 2 นิวเคลียส (n+n) (ชาญกิจ วงศ์เผ่าสกุล, 2555)

โครงงานนี้เน้นการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดนางนวลสีชมพู ด้วยวิธี Hybridization แบบ mono-mono hybridization ให้ได้สายพันธุ์เห็ดที่มีคุณภาพดีทั้งในเรื่องของผลผลิตและลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ รวมทั้งให้เป็นที่รู้จักแพร่หลายในประเทศไทยมากขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดนางนวลสีชมพูด้วยเทคนิคการผสมพันธุ์แบบ mono-mono Hybridization

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สายพันธุ์ลูกผสมของเห็ดนางนวลสีชมพูที่มีอัตราการเจริญเติบโตและมีลักษณะสัณฐานที่ดีขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่

บทที่ 2

การตรวจสอบเอกสาร

2.1 ความสำคัญของเห็ด

เห็ดเป็นโครงสร้างหนึ่งในวงจรชีวิตของราถูกจัดจำแนกอยู่ในอาณาจักรฟังใจ (Kingdom Fungi) ส่วนใหญ่จัดอยู่ในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (basidiomtcota) และไฟลัมแอสโคไมโคตา (ascomycota) ซึ่งมีการเจริญเติบโตเป็นเส้นใย (mycelium) เมื่อถึงระยะสืบพันธุ์เส้นใยจะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนและพัฒนาเป็นดอกเห็ด (fruiting body) เพื่อสร้างสปอร์ไว้กระจายพันธุ์ต่อไป (อนันท์ กล้ารอด, 2553: ออนไลน์) เห็ดเป็นที่รู้จักของมนุษย์มาเป็นเวลานานเนื่องจากสามารถนำมาบริโภคได้ ให้คุณค่าทางอาหารสูงและเห็ดบางชนิดยังมีสรรพคุณเป็นยาป้องกันและรักษาโรค จึงทำให้มีผู้นิยมบริโภคสูง ในปัจจุบันการศึกษาและการวิจัยคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เห็ดได้รับความสนใจอย่างมากในหลายประเทศ ในการพัฒนาเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์เห็ดเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตให้เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค สำหรับประเทศไทยนอกจากจะนิยมบริโภคเห็ดกันมากแล้ว ยังส่งออกเห็ดขายสู่ตลาดโลกจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าเห็ดเป็นอาหารที่ได้รับการยอมรับในเรื่องของรสชาติและคุณค่าทางอาหาร รวมทั้งความสำคัญทางเศรษฐกิจ (ศูนย์ฝึกและพัฒนาอาชีพราษฎรไทยบริเวณชายแดนสระแก้ว, 2555: ออนไลน์) ชนิดของเห็ดในปัจจุบันมีมากถึง 2.2 ล้าน ถึง 3.8 ล้านสายพันธุ์ โดยจาก 120,000 สายพันธุ์พบว่าเป็นสายพันธุ์ดีเพียง 8 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียง 3 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่ได้รับการตั้งชื่อชนิด (specific name) (Hawksworth and Lücking, 2017)

2.2 เห็ดนางนวลสีชมพู

2.2.1 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

Kingdom: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Class: Agaricomycetes

Order: Agaricales

Family: Pleurotaceae

Genus: Pleurotus

Species: *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn

ชื่อสามัญ: Pink Oyster mushroom

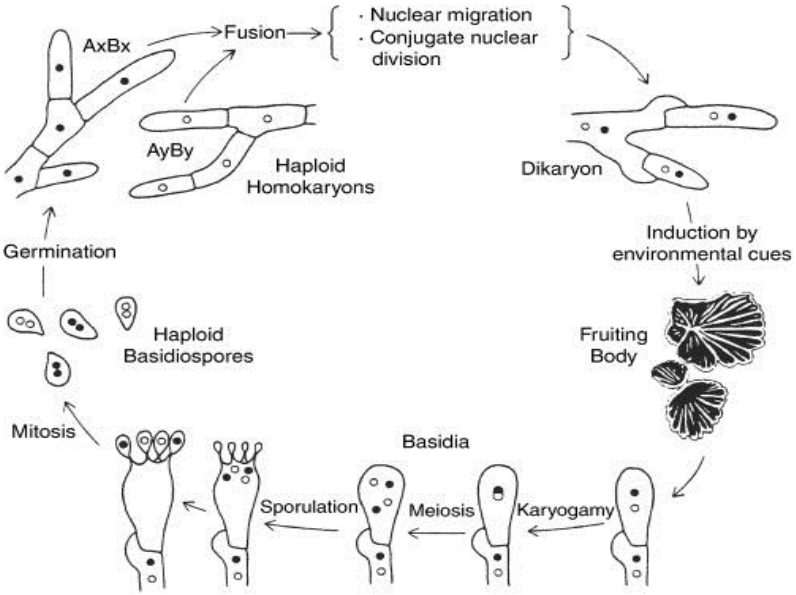
เห็ดนางนวลสีชมพูจัดเป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรฟังใจ ไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (Basidiomycota) ซึ่งเป็นราในกลุ่มที่มีการสร้างสปอร์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ที่เรียกว่า คอนนิเดีย (conidia) และสร้างสปอร์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เรียกว่า เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) เห็ดชนิดนี้อยู่ในชั้น Agaricomycetes อันดับ Agaricales วงศ์ Plerotaceae สกุล *Pleurotus* ซึ่งถือเป็นเห็ดในสกุลเห็ดนางรม

2.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดนางนวลสีชมพูจัดเป็นเห็ดในสกุลเห็ดนางรมซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปยุโรป ลักษณะทั่วไป มีหมวกเห็ดกว้าง 2-5 เซนติเมตร. คล้ายรูปพัด หรือกรวยตื้นสีชมพู มีขนละเอียดบาง ๆ ปกคลุม ครีบยาวลงไปติดโคนฐานและยาวไม่เท่ากันแต่ละดอก มีขอบของดอกเห็ดเรียบ สีขาวหรือครีม ไม่มีก้านดอกหรือมีก้านขนาดสั้น ตามธรรมชาติจะอาศัยเป็นกลุ่มซ้อนกันบนท่อนไม้ และกิ่งไม้แห้งในป่า สามารถรับประทานได้ และขยายพันธุ์ได้โดยการนำมาเพาะในถุงขี้เลื่อย และสามารถออกดอกได้ตลอดปี (หม่อนไม้, 2557: ออนไลน์)

2.2.3 วงจรชีวิตของเห็ดและการสืบพันธุ์

เห็ดนางนวลสีชมพูมีวงจรชีวิตแบบเฮทเทอโรทาลิค (heterothallic life cycle) (ภาพที่ 2.1) เมื่อดอกเห็ดมีการเจริญจะสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศเรียกว่าเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) บนโครงสร้างที่เรียกว่าเบสิเดียม (basidium) แต่ละสปอร์ที่สร้างขึ้นผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) จะมีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว (monoploid) เมื่อสปอร์ปลิวไปตกในบริเวณที่เหมาะสมจะมีการงอก (germinate) และแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) เจริญเป็นเส้นใย (hypha) ซึ่งมีผนังขวาง (septum) กั้นระหว่างเซลล์ ภายในแต่ละเซลล์มีหนึ่งนิวเคลียส (monokaryon, n) และเป็นนิวเคลียสแบบเดียวกันตลอดทั้งเส้นใย (homokaryotic mycelium) เรียกเส้นใยในระยะนี้ว่าเส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) เมื่อเซลล์สองเซลล์จากเส้นใยปฐมภูมิที่มีเมททิงไทป์ (mating type) ต่างกันที่สามารถเข้าคู่กันได้มารวมกัน (plasmogamy) และสร้างโครงสร้างที่เรียกว่าแคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection) เส้นใยจะเชื่อมต่อกันเกิดเซลล์ทีมีสองนิวเคลียส (dikaryon, n+n) เรียกเส้นใยในระยะนี้ว่าเส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) ต่อมาเมื่อเส้นใยทุติยภูมิเจริญจะรวมตัวกันแน่นเป็นเส้นใยตติยภูมิ (tertiary mycelium) โดยที่เซลล์เส้นใยยังมีสภาพเป็น dikaryon, n+n แล้วจึงค่อย ๆ พัฒนาเป็นดอกเห็ด (fruiting body) ที่นิวเคลียสทั้งสองภายในเซลล์มีการรวมตัวกัน (karyogamy) เป็นนิวเคลียสที่มีโครโมโซมสองชุด (diploid, 2n) จากนั้นจะเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเพื่อสร้างเบสิดิโอสปอร์ที่มีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งเหลือเพียงชุดเดียว (haploid) ที่เมื่อสปอร์ถูกปล่อยลงในพื้นที่ที่เหมาะสมจะเกิดการงอกเป็นเส้นใย แล้วพัฒนาเป็นดอกเห็ด วนตามวงจรชีวิตต่อไป (จรัชรัส มั่นถาวร, 2544)



ภาพที่ 2.1 วงจรชีวิตแบบ heterothallic life cycle
(Palmer and Horton, 2006)

2.2.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มเห็ดนางรม

2.2.4.1 pH

เห็ดแต่ละชนิดมี pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและพัฒนารูปร่าง พบว่า pH ระหว่าง 4.0 ถึง 7.0 เหมาะสำหรับการเจริญของเส้นใย (mycelium) ช่วง pH 3.5 ถึง 5.0 เหมาะสำหรับการสร้าง basidiocarp ส่วนช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยและดอกอยู่ระหว่าง 6.5 ถึง 7.0 (Kalmis et al., 2008)

2.2.4.2 ความชื้น

น้ำเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อความสำเร็จในการเจริญเติบโตของเห็ด โดยสารอาหารถูกลำเลียงจากเส้นใยไปยังดอกเห็ดมีความเกี่ยวข้องกับความชื้นที่สม่ำเสมอในอากาศและวัสดุเพาะ ความชื้นสูงในสารตั้งต้นจะส่งผลให้เส้นใยเจริญได้น้อยลง และยังไปยับยั้งการระบายน้ำทำให้ไม่สามารถสร้าง fruiting body หรือดอกเห็ดได้ ในขณะที่ความชื้นต่ำมากจะทำให้ดอกเห็ดไม่เจริญ งานวิจัยที่ได้มีการศึกษาไว้แล้วพบว่า ความชื้นสุดท้ายที่เหมาะสมในวัสดุเพาะถูกปรับเป็น 74% (w/w) (Lechner and Albertó, 2011) ซึ่งคิดเป็นค่าความชื้นเริ่มต้นของสารตั้งต้นในการเพาะปลูก *P. djamor* และความชื้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นเส้นใยควรอยู่ในช่วงระหว่าง 85–97 % (Chang and Miles, 2004)

2.2.4.3 อุณหภูมิ

สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันส่งผลให้การเจริญเติบโตของเห็ดมีความแตกต่างกันอุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อการเจริญของเห็ด จากตัวอย่างงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาเห็ดนางรมในสกุล *Pleurotus* ที่ต่างชนิดกัน 3 ได้แก่ ชนิด *P.* hiking, *P. ostreatus, P. geesteranus* เพื่อประเมินผลผลิตและองค์ประกอบทางเคมี ส่วนหนึ่งของผลการวิจัยพบว่าอุณหภูมิโรงเพาะที่เหมาะสมอยู่ที่ 22-25 องศาเซลเซียส (Ahmed et al., 2013) และจากอีกหนึ่งงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับอายุของสายพันธุ์เห็ดชนิด *P. eryngii* ในการศึกษาพบว่าการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดอยู่ที่ 22-24 องศาเซลเซียส (Kim et al., 2013) ผลจากงานวิจัยทั้งสองชี้ให้เห็นว่าเห็ดในสกุล *Pleurotus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิช่วงประมาณ 22-25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ได้รายงานเกี่ยวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการฟักตัวของสปอร์ซึ่งอยู่ที่ 15-35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเหนียวนำให้เกิดดอกจะอยู่ที่ 18-35 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิสำหรับดอกเห็ดอยู่ที่ 24-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสำหรับการเก็บเกี่ยวผลผลิตอยู่ที่ 20-30 องศาเซลเซียส (Oei and Nieuwenhuijzen, 2005)

2.2.5 สรรพคุณ

เห็ดนางนวลสีชมพูมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากมีไขมันต่ำและไม่มีโคเลสเตอรอล มีโปรตีนและไฟเบอร์สูง นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณทางยาที่ช่วยในการรักษาโรคอีกหลายประการสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่สกัดได้จากเห็ดนางนวลสีชมพู มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งและยับยั้งเนื้องอก (Borges et al., 2013) สารสกัดเมทานอลิค (methanolic) มีผลต่อการกระตุ้นการสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Raaman, et al., 2011) นอกจากนี้เห็ดนางนวลสีชมพูยังมีสรรพคุณในการลดความเข้มข้นของระดับโคเลสเตอรอลในเลือด (Aletor, 1995) ป้องกันโรคหัวใจและลดระดับน้ำตาลในเลือด (Manzi and Pizzferrato, 2000) และยังช่วยป้องกันการติดเชื้อที่เกิดจาก แบคทีเรีย ไวรัส และพยาธิอีกด้วย (Breene, 1990)

2.3 การปรับปรุงพันธุ์เห็ด

การปรับปรุงพันธุ์เป็นการจัดการทางพันธุกรรมโดยหวังผลให้ได้สิ่งมีชีวิตรุ่นลูก สามารถแสดงลักษณะที่พึงประสงค์ดีกว่ารุ่นพ่อแม่ หรือเป็นการปรับปรุงและคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามที่ต้องการ สิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน วิธีการปรับปรุงพันธุ์ วิธีการคัดเลือกที่ใช้จะมีความแตกต่างกัน ในเห็ดการปรับปรุงพันธุ์มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี วิธีที่ได้รับความนิยม ได้แก่

2.3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ (Selection) เป็นการคัดเลือกพันธุ์ใหม่โดยตรงจากเชื้อสปอร์เดี่ยวที่ถูกเก็บรวบรวมไว้จำนวนมาก (multispores) หรือคัดเลือกจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีการงอกเป็นเส้นใย ในการคัดเลือก multispores เส้นใยที่มี 2 นิวเคลียส (dikaryotic mycelium) จะถูกคัดเลือกโดยธรรมชาติทำให้การผสมพันธุ์แบบนี้มีความหลากหลายของพันธุกรรมของสายพันธุ์ใหม่ (Sonnenberg et al., 2016)

2.3.2 การผสมพันธุ์ (hybridization) เป็นวิธีที่ใช้ในการถ่ายโอนลักษณะที่ต้องการไปยังสายพันธุ์ใหม่ มีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 3 วิธี ได้แก่ Intraspecific hybridization เป็นวิธีการผสมพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันที่มีสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน โดยมี monokaryon ที่เข้าคู่กันได้ ในขณะที่ Interspecefic hybridization เป็นการผสมพันธุ์ระหว่าง monokaryon ของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน 2 ชนิด เป็นวิธีที่ประสบความสำเร็จอย่างมากในการวิจัยภายในห้องปฏิบัติการ วิธีการสุดท้ายคือ Intergeneric hybridization ซึ่งเป็นการผสมข้ามสายพันธุ์ที่เกิดระหว่างการผสม monokaryon ของเห็ด 2 สกุลที่ต่างกัน เป็นวิธีการที่ใช้สำหรับการรวบรวมลักษณะเฉพาะเช่นการผลิตเม็ดสีที่ไม่มีอยู่ในสกุลเดิม ให้มีในสายพันธุ์ที่ปรับปรุงขึ้นใหม่ แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถสร้าง fruiting body ได้เนื่องจากเป็นหมัน (Barh et al., 2019)

รูปแบบที่ใช้ในการผสมพันธุ์ข้ามด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน (Hybridization) โดยการผสมเส้นใยของเห็ด มีอยู่ด้วยกัน 2 รูปแบบ คือ

2.3.2.1 mono-mono hybridization

เป็นการผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของ 2 สายพันธุ์เข้าด้วยกันแบบเฉพาะเจาะจง เป็นหนึ่งในวิธีการปรับปรุงพันธุ์ที่ต้องใช้เทคนิคการคัดเลือกอย่างต่อเนื่องเพื่อให้สายพันธุ์ใหม่มีลักษณะที่ดีขึ้น ข้อดีของวิธีการนี้คือประสบความสำเร็จสูง โดยในการทดลองผสมเส้นใยด้วยวิธีการนี้ของเห็ดชนิด *P. ostreatus* พบว่าสามารถผสมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสองสายพันธุ์เข้ากันได้ด้วยอัตราการผสมพันธุ์ (mating frequency) 100 เปอร์เซ็นต์ (Bresinsky et al., 1987) ชนิด *P. eryngii* 31.7 เปอร์เซ็นต์ (Kim et al., 2013) จะเห็นได้ว่าการใช้วิธีผสมพันธุ์แบบ mono-mono hybridization สามารถให้อัตราการผสมพันธุ์ในเห็ดสกุล *Pleurotus* สูง จึงเหมาะสำหรับใช้ปรับปรุงพันธุ์เห็ดในการศึกษาครั้งนี้

2.3.2.2 Di-mono hybridization

เป็นการผสมพันธุ์ที่เกิดระหว่างการรวมกันของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวและเส้นใยนิวเคลียสคู่เข้าด้วยกัน ลักษณะหนึ่งของวิธีการนี้คือ กระบวนการ dikaryotization หรือกระบวนการเปลี่ยนเส้นใยที่ภายในมีนิวเคลียสรวมกัน (homokaryon) ไปเป็นเส้นใยที่มี 2 นิวเคลียส (dikaryon) ซึ่งจะสามารถเจริญและพัฒนาเป็นดอกเห็ดต่อไป (Chang, Buswell, and Miles, 1993) อย่างไรก็ตาม ในทางชีววิทยาพบว่าผนังกั้นของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวและเส้นใยนิวเคลียสคู่อาจมีปริมาณของไคติน (Marchant, 1978) และองค์ประกอบของน้ำตาล (Bottom and Siehr, 1979) ที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นสาเหตุให้การเคลื่อนย้ายนิวเคลียสระหว่างผนังกั้นเกิดการอุดตัน ทำให้ไม่สามารถสร้างเส้นใยนิวเคลียสคู่ของสายพันธุ์ใหม่ได้ในที่สุด

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการศึกษา

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัท/ประเทศ-
- ไมโครปิเปตต์	GILSON/ France
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (รุ่น OLYMPUS SZ- ST)	E for L International CO., LTD./ Japan
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (รุ่น OLYMPUS CX31)	E for L International CO., LTD./ Japan
- Laminar flow	LAB SERVICE LTD., PART/ Thailand
- Autoclave (รุ่น SX-500E)	TOMY KOGYO CO., LTD./ Japan
- Biochemical Incubators (รุ่น ZSD-A1090A)	ZHICHENG/ China
- เมล็ดข้าวฟ่าง	
- ขี้เลื่อย	

3.2. สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับทำอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) และวัสดุเพาะ

- Streptomycin Injection 1 g.
- glucose
- agar
- ปูนขาว (calcium hydroxide)
- ยิปซัม (calcium sulfate)
- ดีเกลือ (magnesium sulfate)

3.2.2 สารเคมีสำหรับการทำความสะอาดอุปกรณ์แยกเชื้อ

- Ethanol absolute for analysis บริษัท MERCK/ Germany

3.2.3 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบโครงสร้างของเห็ด

- lacto phenol cotton blue

3.3 วิธีดำเนินการศึกษา

3.3.1 การทำรอยพิมพ์สปอร์

คัดเลือกเห็ดสี่สายพันธุ์จากแหล่งเพาะพันธุ์ที่แตกต่างกัน ได้รับความอนุเคราะห์สายพันธุ์เห็ดจากร้านโกคีพานิช จังหวัดกรุงเทพมหานคร (สายพันธุ์ GK) ร้านเห็ดแม่ลูกอ่อน จังหวัดสมุทรปราการ (สายพันธุ์ SP) ฟาร์มเห็ด Fresh Ville Farm จังหวัดกรุงเทพมหานคร (สายพันธุ์ BK) และจากฟาร์มเห็ดบ้านสุภาวัฒน์ จังหวัดเชียงใหม่ (สายพันธุ์ CM) ทำการเลือกดอกเห็ดแต่ละสายพันธุ์จากการพิจารณาดอกที่มีขนาดดอกเห็ดใหญ่ น้ำหนักมาก องค์ประกอบของเห็ดครบถ้วน ตัดบริเวณหมวกเห็ดที่มีส่วนของครีบให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตรโดยเฉลี่ย วางลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาครอบป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นทิ้งไว้ 6-12 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.1) เมื่อครบเวลาให้นำเอาชิ้นเห็ดออกจากจานเลี้ยงเชื้อและเก็บรักษาสปอร์ที่ได้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 3.1 การทำรอยพิมพ์สปอร์

3.3.2 การแยกเส้นใยบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อเห็ดทั้ง 2 สายพันธุ์

นำเห็ดที่คัดเลือกมาตัดเนื้อเยื่อบริเวณก้านดอกด้านในออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5 มิลลิเมตร วางลงบนจานเพาะเชื้อที่มี Potato dextrose Agar (PDA) ที่ได้เตรียมไว้ (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง หลังจากเส้นใยเจริญ ตัดชิ้นวุ้นเส้นใยขนาดเล็กวางบนอาหาร PDA เพื่อเก็บรักษาเส้นใยที่บริสุทธิ์ของทั้งสองสายพันธุ์ สำหรับใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบต่อไป

3.3.3 การแยกสปอร์เดี่ยว (Single spore Isolated)

3.3.3.1 การเจือจางสปอร์

นำสปอร์ที่เก็บรักษาไว้ของทั้งสองสายพันธุ์ มาเจือจางแบบอนุกรม (serial dilution) จากนั้นใช้สารแขวนลอยสปอร์ที่มีการเจือจาง 10^{-4} เท่า 10^{-5}เท่า และ 10^{-6} เท่า โดยทำการดูดสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำการทดลองแต่ละเท่าของการเจือจางซ้ำ อย่างละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 วัน

3.3.3.2 การคัดแยกเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว

คัดเลือกสปอร์ที่มีการงอกของ germ tube ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายสปอร์ที่มีการงอก germ tube ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยว monokaryons (n) หรือเส้นใยปฐมภูมิ จะไม่พบโครงสร้าง clamp connection เก็บรักษาเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.4 การผสมพันธุ์ (Hybridization)

3.3.4.1 การผสมพันธุ์ข้าม

นำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่แยกได้ของทั้งสี่สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 5 ไอโซเลตมาผสมพันธุ์ข้ามแบบเลือกสุ่ม ตามวิธีการของ Kumara and Edirimana (2009) โดยจับคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ GK กับสายพันธุ์ SP และ สายพันธุ์ BK กับสายพันธุ์ CM แบบเจอกันครบทุกคู่ จะทำให้ได้สายพันธุ์ผสมทั้งหมด 25 คู่ ในแต่ละคู่ผสม ในการผสมพันธุ์ข้ามทำได้โดยการตัดชิ้นส่วนเส้นใยปฐมภูมิของทั้งสองสายพันธุ์ให้มีลักษณะเป็นวงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร วางลงบน PDA โดยให้ชิ้นส่วนทั้งสองห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร ทำการทดลองซ้ำในแต่ละคู่ ๆ ละ 3 ซ้ำ

3.3.4.2 ตรวจสอบผลของการผสมข้ามเส้นใยของทั้งสองสายพันธุ์

ตรวจสอบความสามารถในการผสมข้ามโดยการตัดชิ้นส่วนของเส้นใยในแต่ละคู่ผสม คัดเลือกเส้นใยลูกผสมที่มีโครงสร้าง clamp connection เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บรักษาเส้นใยลูกผสมที่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องสำหรับใช้ในการทดลองขั้นถัดไป

3.3.5 การทดสอบการเจริญของเส้นใยลูกผสม

ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยลูกผสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของสายพันธุ์ลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่สองสายพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ คัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมที่มีอัตราการเจริญเส้นใยดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ หรือมีการเจริญดีที่สุดเก็บรักษาไว้บน PDA

3.3.6 การทดสอบความสามารถของสายพันธุ์ลูกผสมในการสร้างดอกเห็ดและผลผลิต

ผลิตหัวเชื้อเส้นใยสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์ลูกผสมที่มีการเจริญบนข้าวฟ่าง โดยการนำเมล็ดข้าวฟ่างแช่น้ำ 1 คืน จากนั้นต้มจนสุกพอดีแล้วกรอกใส่ขวดแก้ว ฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน นำเส้นใยบนอาหารวุ้นใส่ลงในขวดแก้ว รอจนเส้นใยเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง จากนั้นนำหัวเชื้อข้าวฟ่างย้ายลงวัสดุเพาะขี้เลื่อย (ภาคผนวก ก) ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยในถุงวัสดุเพาะขี้เลื่อย วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองในสายพันธุ์ลูกผสมและสายพันธุ์พ่อแม่ อย่างละ 3 ซ้ำ หลังจากเส้นใยเจริญเต็มถุงขี้เลื่อย เปรียบเทียบผลผลิตของสายพันธุ์ลูกผสมและสายพันธุ์พ่อแม่โดยการเปิดดอกเห็ดที่

โรงเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบผลผลิตของแต่ละสายพันธุ์ด้วยค่าประสิทธิภาพในการใช้อาหาร Biological Efficiency (B.E) (วราพร ไชยมา, วสันณ์ เพชรรัตน์ และ พัลลภา กฤษณ์ไพบูลย์, 2007)

$$\text{Biological Efficiency (B.E)} = \frac{\text{น้ำหนักผลผลิตเห็ดสดที่ได้}}{\text{น้ำหนักวัสดุแห้งที่ใช้เพาะ}} \times 100$$

3.3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างข้อมูลที่ได้จากแต่ละชุดการทดลองจากข้อ 3.3.5 และ 3.3.6 โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p< 0.05$ ด้วยโปรแกรม IBM SPSS statistic version 22 (IBM, England) แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์พ่อแม่

<u>สายพันธุ์ที่ 1</u> (สายพันธุ์ GK)

แหล่งที่มา : จังหวัดกรุงเทพมหานคร (ร้านขายพันธุ์และวัสดุเพาะเห็ด โกคีพานิช)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา : หมวกเห็ดมีความกว้างและความยาวเฉลี่ย 5.42±1.65 และ 6.94±1.66 เซนติเมตรตามลำดับ น้ำหนักดอกโดยเฉลี่ย 4.81±1.91 กรัม ขอบดอกหยักมีสีชมพูอ่อนโดยรอบ ก้านดอกยาว 2-3 เซนติเมตร ตรงกลางดอกมีลักษณะเป็นแอ่งสีขาวหรือสีครีม มีดอกซ้อนกันหลายชั้น ด้านหลังมีลักษณะเป็นเส้นยาวตลอดความยาวของครีบดอก เมื่อดอกแก่จะมีสีขาวเหลือง (ภาพที่ 4.1 ก)

<u>สายพันธุ์ที่ 2</u> (สายพันธุ์ SP)

แหล่งที่มา : จังหวัดสมุทรปราการ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา : หมวกเห็ดมีความกว้างและความยาวเฉลี่ย 5.72±1.29 และ 7.88±2.10 เซนติเมตร ตามลำดับ น้ำหนักดอกโดยเฉลี่ย 6.29±3.38 กรัม ดอกอ่อนมีลักษณะขอบดอกเรียบมีสีชมพูโดยรอบ ก้านดอกยาว 2-3 เซนติเมตร ครีบดอกยาวคลุมลงมาถึงก้านดอก เมื่อดอกแก่จะมีสีชมพูอ่อน (ภาพที่ 4.1 ข)

<u>สายพันธุ์ที่ 3</u> (สายพันธุ์ BK)

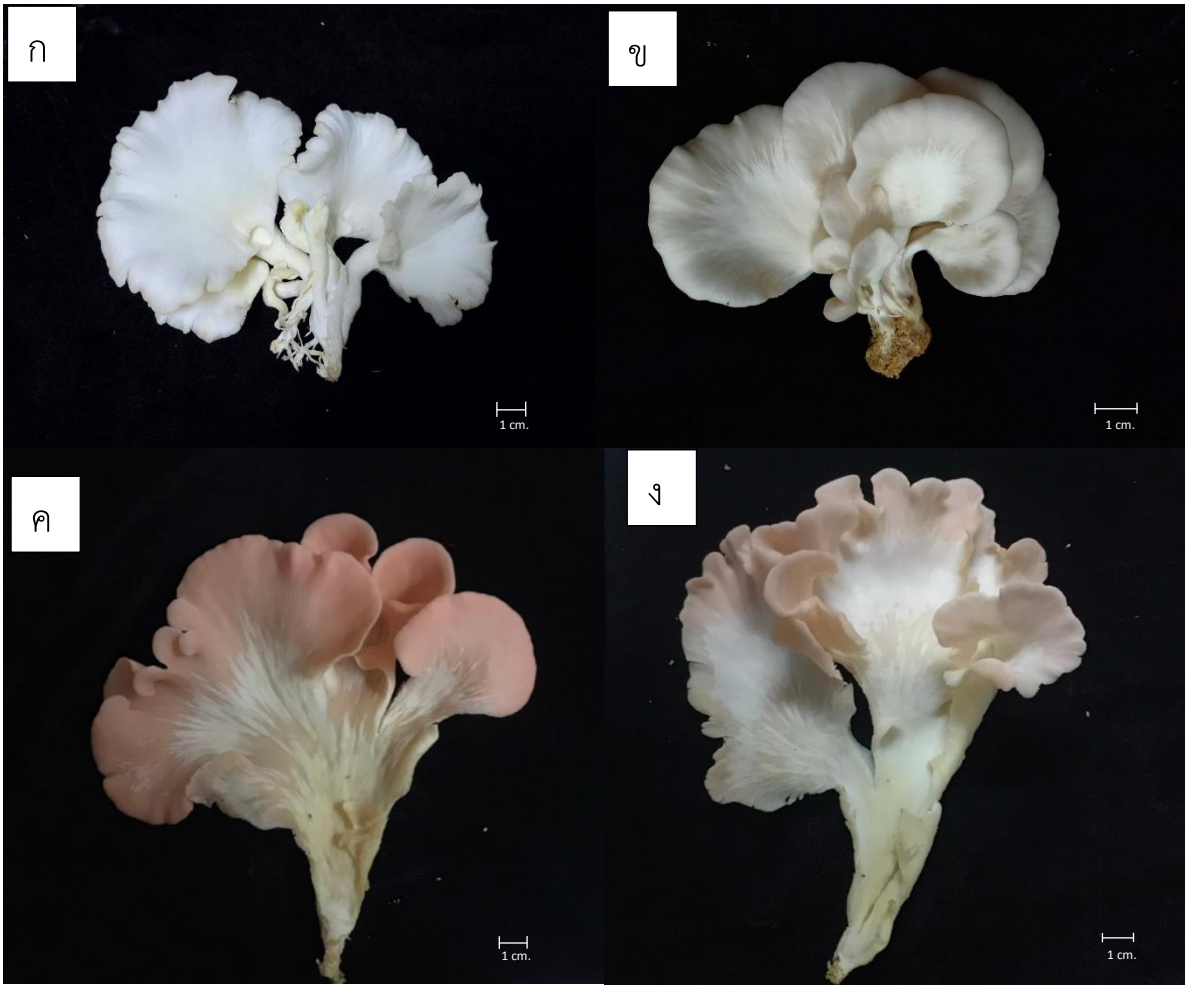
แหล่งที่มา : จังหวัดกรุงเทพมหานคร (ฟาร์ม Fresh Ville Farm)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา : หมวกเห็ดมีความกว้างและความยาวเฉลี่ย 10.42±3.49 และ 12.92±1.02 เซนติเมตร ตามลำดับ น้ำหนักดอกโดยเฉลี่ย 14.18±7.80 กรัม ดอกอ่อนมีลักษณะขอบดอกเรียบมีสีชมพูเข้มโดยรอบ ก้านดอกยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ในหนึ่งก้านดอกมีการแยกครีบดอกออกเป็นครีบย่อยๆหลายครีบ ดอกแก่จะยังคงมีขอบดอกสีชมพูเข้ม (ภาพที่ 4.1 ค)

<u>สายพันธุ์ที่ 4</u> (สายพันธุ์ CM)

แหล่งที่มา : จังหวัดเชียงใหม่ (ฟาร์ม บ้านเห็ดสุภาวัฒน์)

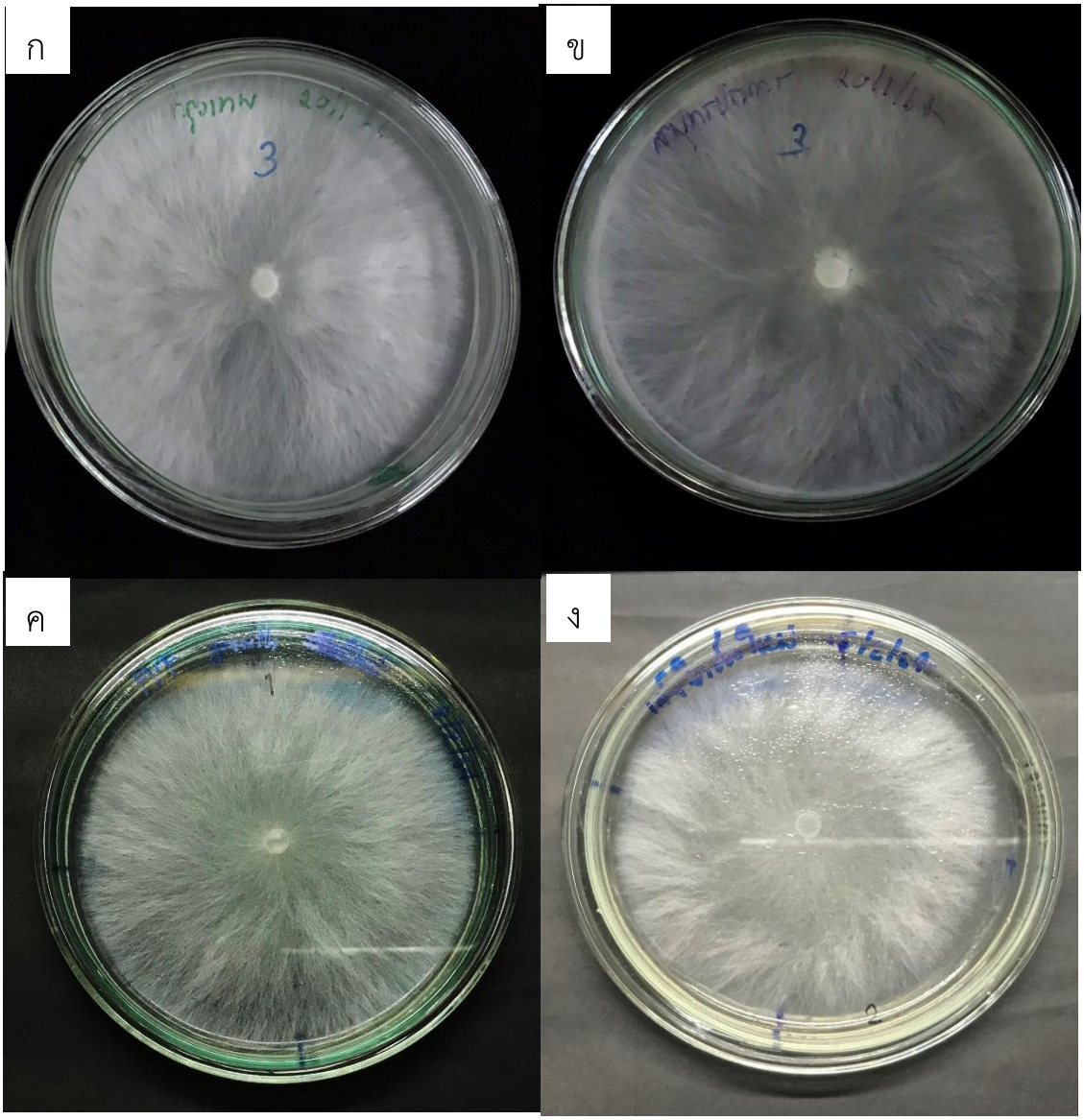
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา : หมวกเห็ดมีความกว้างและความยาวเฉลี่ย 7.86±1.73 และ 10.14±1.51 เซนติเมตร ตามลำดับ น้ำหนักดอกโดยเฉลี่ย 8.70±1.83 กรัม ดอกอ่อนมีลักษณะขอบดอกเรียบมีสีชมพูโดยรอบ ก้านดอกยาว 3 เซนติเมตร เมื่อดอกแก่จะมีสีชมพูอ่อน ขอบดอกมีลักษณะหยักงอตลอดรอบขอบ (ภาพที่ 4.1 ง)



ภาพที่ 4.1 (ก) ลักษณะเห็ดสายพันธุ์ GK (ข) ลักษณะเห็ดสายพันธุ์ SP (ค) ลักษณะเห็ดสายพันธุ์ BK (ง) ลักษณะเห็ดสายพันธุ์ CM

4.2 การแยกเส้นใยบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อเห็ด

เห็ดสายพันธุ์ GK, SP, BK, และ CM ถูกนำมาแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์ โดยการเลี้ยงเชื้อจากเนื้อเยื่อเห็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) พบการเจริญของเส้นใยของทั้งสี่สายพันธุ์ ตัดชิ้นส่วนเส้นใยขนาดเล็กย้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ พบการเจริญของเส้นใยออกจากชิ้นวุ้น โดยลักษณะของเส้นใยทั้งสี่สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกัน คือ ลักษณะของเส้นใยมีสีเป็นสีขาว มีการเจริญของเส้นใยเป็นแบบบางๆ ขยายออกจากจุดศูนย์กลางชิ้นเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 4.2)

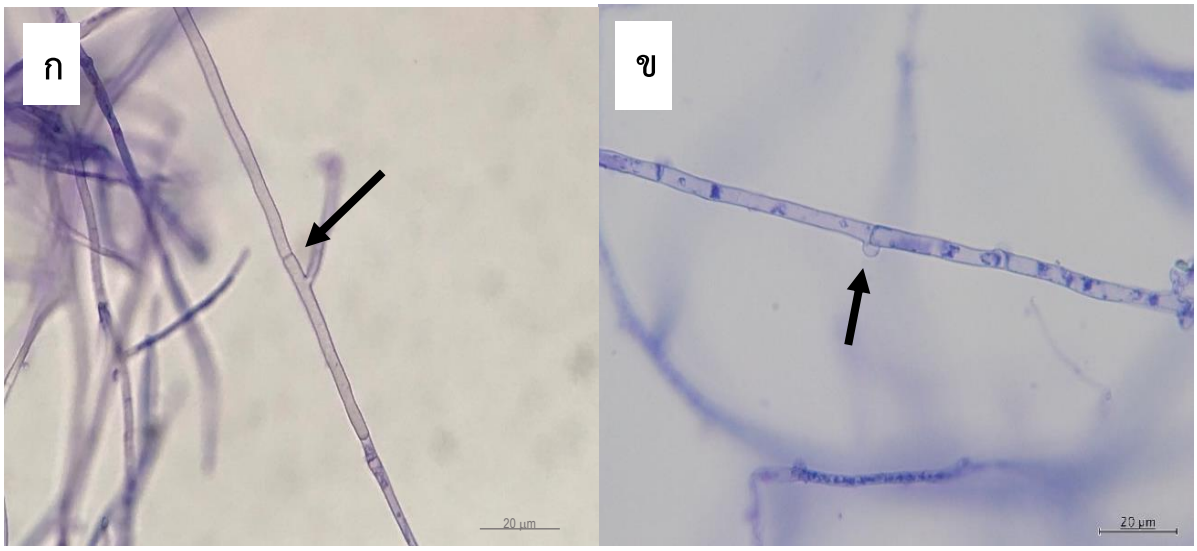


ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสคู่ของสายพันธุ์พ่อแม่ได้แก่ (ก) สายพันธุ์ GK (ข) สายพันธุ์ SP (ค) สายพันธุ์ BK (ง) สายพันธุ์ CM

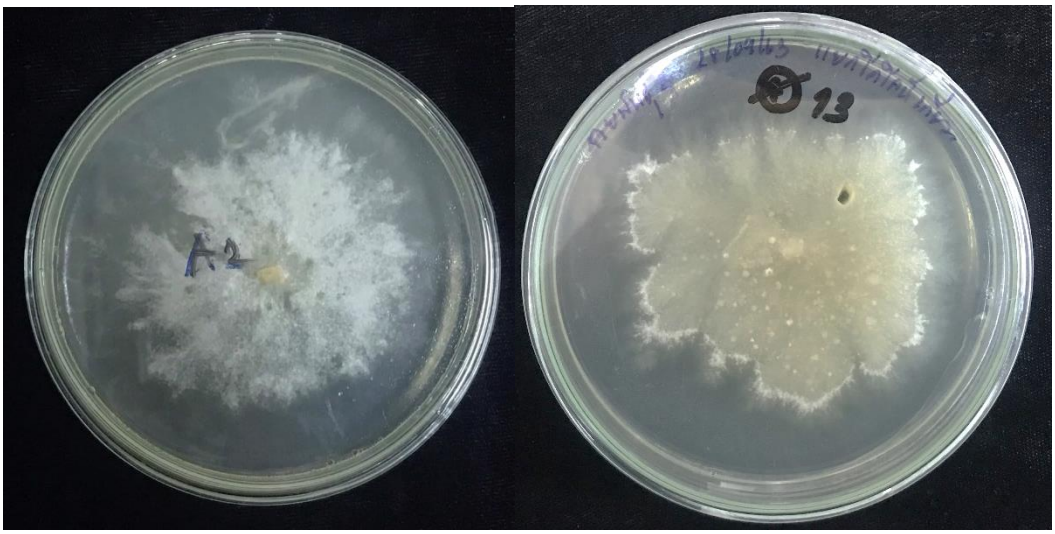
4.3 การแยกเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว

แยกสปอร์เดี่ยวของแต่ละสายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 20 สปอร์ เมื่อสปอร์งอกแล้วเจริญเป็นเส้นใย ตรวจสอบเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวโดยดูจากเส้นใยที่ไม่มีโครงสร้าง clamp connection ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบเฉพาะในเส้นใยนิวเคลียสคู่ พบว่าสายพันธุ์ GK เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่แยกได้จากสปอร์(ภาพที่ 4.3 ก) มีจำนวน 6 ไอโซเลท (GK1-GK6) โดยลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ได้แยกได้พบว่าส่วนมากลักษณะการเจริญช้า เส้นใยอ่อนแอเจริญไม่สม่ำเสมอ และบาง เส้นใยที่แยกได้ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ภาพที่ 4.4) สายพันธุ์ SP 15 ไอโซเลท (SP1-SP15) มีลักษณะการเจริญของโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวช้า

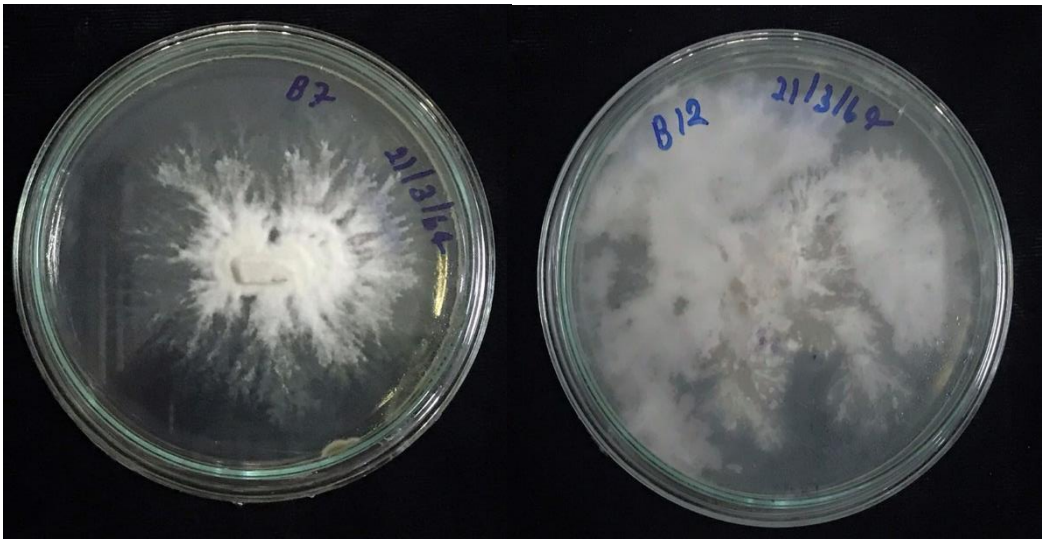
เส้นใยมีลักษณะแบนราบไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเส้นใยยุบตัวได้ง่ายเมื่อมีการเจริญ (ภาพที่ 4.5) สายพันธุ์ BK 7 ไอโซเลท (BK1-BK7) ลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวพบว่ามีการเจริญสม่ำเสมอ เส้นใยมีความหนาบางต่างกันในแต่ละโคโลนี (ภาพที่ 4.6) และสายพันธุ์ CM 6 ไอโซเลท (CM1-CM6) มีลักษณะการเจริญของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวสม่ำเสมอ มีความหนาบางในแต่ละโคโลนีแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.7)



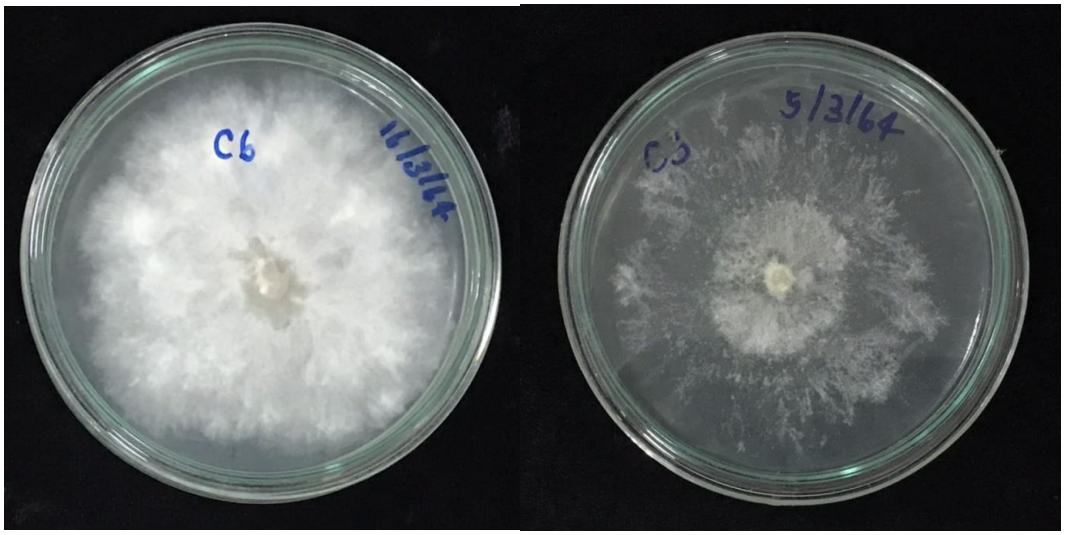
ภาพที่ 4.3 (ก) เส้นใยปฐมภูมิ โครงสร้างที่ลูกศรชี้แสดงผนัง (septum) ที่กั้นตามแนวขวางของเส้นใยและไม่มีการสร้าง Clamp connection (ข) เส้นใยทุติยภูมิ โครงสร้างที่ลูกศรชี้คือ บริเวณผนังกั้นที่มีการสร้าง Clamp connection



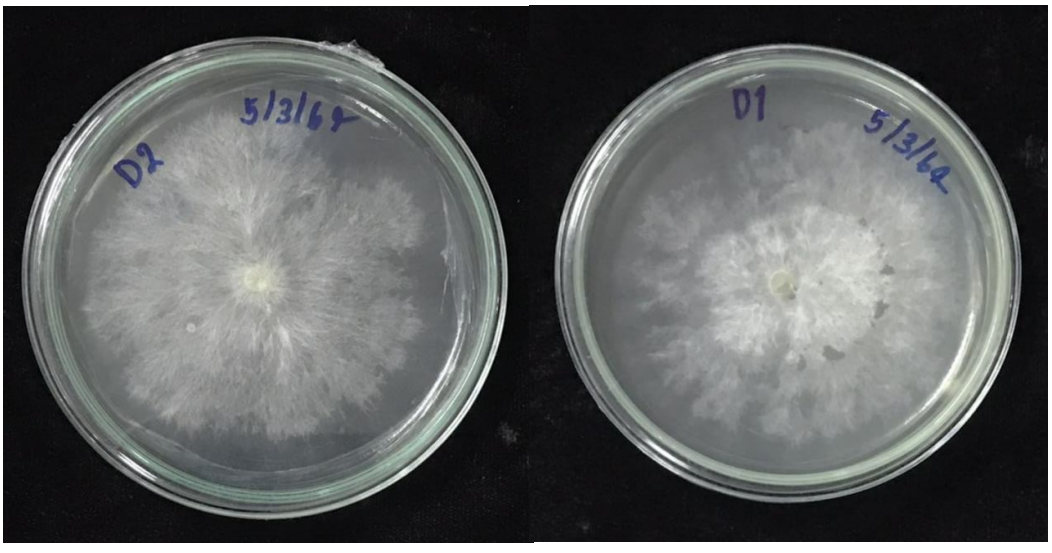
ภาพที่ 4.4 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายพันธุ์ GK



ภาพที่ 4.5 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายพันธุ์ SP



ภาพที่ 4.6 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายพันธุ์ BK



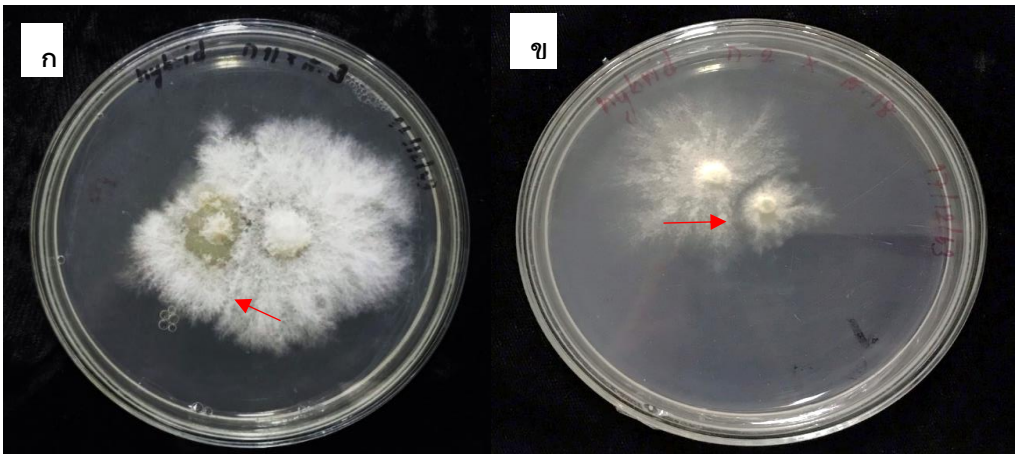
ภาพที่ 4.7 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายพันธุ์ CM

4.4 การผสมข้ามสายพันธุ์ (Hybridization)

จากการผสมกันของสายพันธุ์ GK และ SP ที่มีจำนวน 6 และ 15 ไอโซเลท ตามลำดับ จับคู่ได้ทั้งหมด 90 คู่ (ตารางที่ 1) พบว่า เมื่อมีการเจริญของเส้นใยจะเกิดการเจริญในสองลักษณะคือ ลักษณะที่หนึ่ง มีจำนวน 26 คู่ คือ เส้นใยเจริญมีการเจริญมาใกล้กัน หรือชนกันทับเป็นแนวหนา (ภาพที่ 4.8 ก) เมื่อตัดเส้นใยบริเวณที่มีการทับกันตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ไม่พบโครงสร้าง clamp connection ลักษณะที่สอง มีจำนวน 64 คู่ เส้นใยมีการเจริญแต่เมื่อมีการเจริญมาเจอกับเส้นใยของสายพันธุ์ตรงข้ามจะเคลื่อนที่ออกจากกันโดยเกิดช่องว่างระหว่างเส้นใยทั้งสองสายพันธุ์เป็นแนวตลอดแนวกึ่งกลางระหว่างเส้นใยที่เจริญของสายพันธุ์ทั้งสอง (ภาพที่ 4.8 ข) ลักษณะการเจริญของเส้นใยที่พบทั้งสองลักษณะนี้แสดงถึงการผสมเข้ากันไม่ได้ของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายพันธุ์ GK และ SP

การจับคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ GK และ SP ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากเส้นใยทั้งสองสายพันธุ์ไม่สามารถผสมเข้าได้ ทำให้ไม่พบสายพันธุ์ลูกผสมจากการผสมระหว่างทั้งสองสายพันธุ์นี้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้มีการนำสายพันธุ์ใหม่มาทำการจับคู่ผสม โดยดำเนินการตามขั้นตอนการทดลองเดิมเพื่อทำการแยกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของแต่ละสายพันธุ์แล้วนำมาจับคู่ผสม สายพันธุ์ที่นำมาทดลองได้แก่ สายพันธุ์ BK และ สายพันธุ์ CM

การทดลองผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ BK และ CM ที่มีจำนวน 7 และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ จับคู่ได้ทั้งหมด 42 คู่ (ตารางที่ 2) ผลการจับคู่พบว่ามีลักษณะของการเจริญของเส้นใยเกิดขึ้นทั้งหมด 3 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะที่หนึ่ง พบจำนวน 6 คู่ โดยเส้นใยของทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญเข้าหากันและซ้อนทับกันเป็นแนวหรือแถบหนาบริเวณกึ่งกลาง (ภาพที่ 4.9 ก) เมื่อตัดชิ้นวุ้นเส้นใยบริเวณดังกล่าวตรวจสอบโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบโครงสร้างของ clamp connection ลักษณะที่สอง มีจำนวน 34 คู่ ลักษณะที่พบคือเส้นใยของทั้งสองสายพันธุ์ที่ต่างกันไม่มีการเจริญเข้าหากัน และสร้างช่องว่างตรงกลางระหว่างทั้งสองไอโซเลทที่เห็นได้ชัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.9 ข) ลักษณะที่สาม เป็นลักษณะของคู่ที่ผสมเข้ากันได้ และให้สายพันธุ์ลูกผสม ลักษณะนี้พบจำนวน 2 คู่ โดยมีลักษณะการเจริญของเส้นใยทั้งสองสายพันธุ์เข้าหา และสร้างแถบหนาบริเวณกึ่งกลางสายพันธุ์ (ภาพที่ 4.9 ค) เมื่อตัดเส้นใยบริเวณดังกล่าวตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีโครงสร้าง clamp connection (ภาพที่ 4.3 ข) สายพันธุ์ลูกผสมที่ได้ ได้แก่ สายพันธุ์ NS1 และ สายพันธุ์ NS2



ภาพที่ 4.8 ลักษณะการเจริญของเส้นใยที่พบในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่าง สายพันธุ์ GK และ SP (ก) การเจริญของเส้นใยลักษณะที่หนึ่ง ที่มีการเจริญของเส้นใยมาชนกันเป็นแนวหนาตามลูกศรชี้ (ข) การเจริญของเส้นใยลักษณะที่สอง ลูกศรชี้แสดงแนวช่องว่างที่เกิดจากเส้นใยไม่สามารถเจริญเข้าคู่กันได้

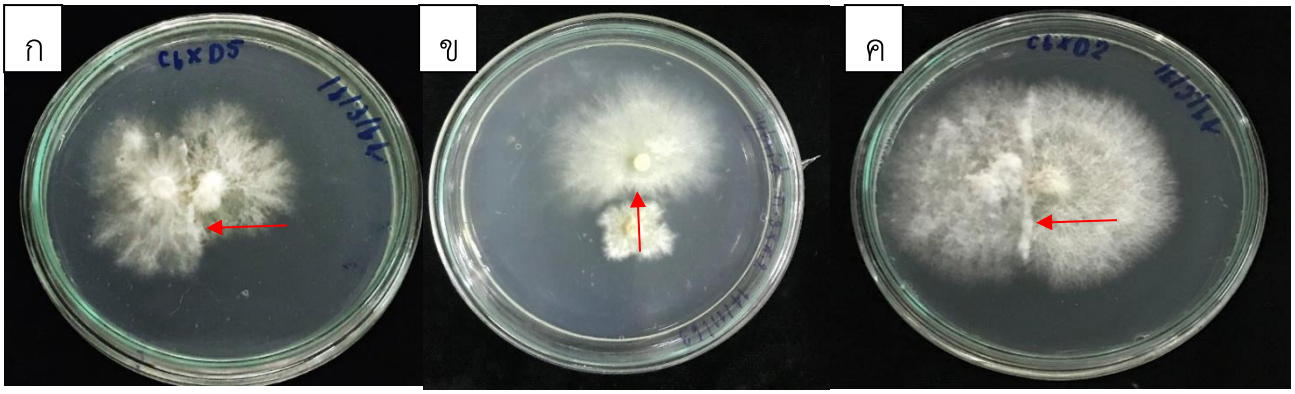
ตารางที่ 1 การผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ของโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวระหว่างสายพันธุ์ GK และ SP

Isolate	GK1	GK2	GK3	GK4	GK5	GK6
SP1	-	-	0	0	-	-
SP2	-	0	-	0	-	-
SP3	-	0	-	-	0	-
SP4	-	0	0	--	-	-
SP5	-	-	-	-	-	-
SP6	-	-	-	-	-	-
SP7	-	0	0	-	0	-
SP8	-	0	0	-	0	-
SP9	-	-	0	-	-	-
SP10	-	0	-	-	0	-
SP11	-	-	0	-	0	-
SP12	-	-	0	-	-	-
SP13	-	-	-	-	-	-
SP14	-	-	0	0	0	-
SP15	-	-	0	-	0	-

หมายเหตุ - แสดงถึงเส้นใยที่ผสมเข้ากันไม่ได้

+ แสดงถึงเส้นใยที่มีการเจริญซ้อนทับกันเป็นแนวตรงกลาง และพบโครงสร้าง clamp connection

0 แสดงถึงเส้นใยที่มีการเจริญซ้อนทับกันเป็นแนวตรงกลาง แต่ไม่พบโครงสร้าง clamp connection



ภาพที่ 4.9 ลักษณะการเจริญของเส้นใยที่พบในการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่าง สายพันธุ์ BK และ CM (ก) การเจริญของเส้นใยลักษณะที่หนึ่ง ที่มีการเจริญของเส้นใยมาชนกันเป็นแนวหนาตามลูกศรชี้ (ข) การเจริญของเส้นใยลักษณะที่สอง ลูกศรชี้แสดงแนวช่องว่างที่เกิดจากเส้นใยไม่สามารถเจริญเข้าคู่กันได้ (ค) การเจริญของเส้นใยลักษณะที่สาม เส้นใยมีการเจริญเข้าหากันและสร้างแถบหนาที่บริเวณลูกศรชี้ ตรวจสอบแล้วพบ clamp connection

ตารางที่ 2 การผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ของโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวระหว่างสายพันธุ์ BK และ CM

Isolate	BK1	BK2	BK3	BK4	BK5	BK6	BK7
CM1	0	-	-	-	-	0	-
CM2	0	-	-	-	-	+	-
CM3	-	-	-	-	0	+	-
CM4	0	-	-	-	-	-	-
CM5	-	-	-	-	-	0	-
CM6	-	-	-	-	-	-	-

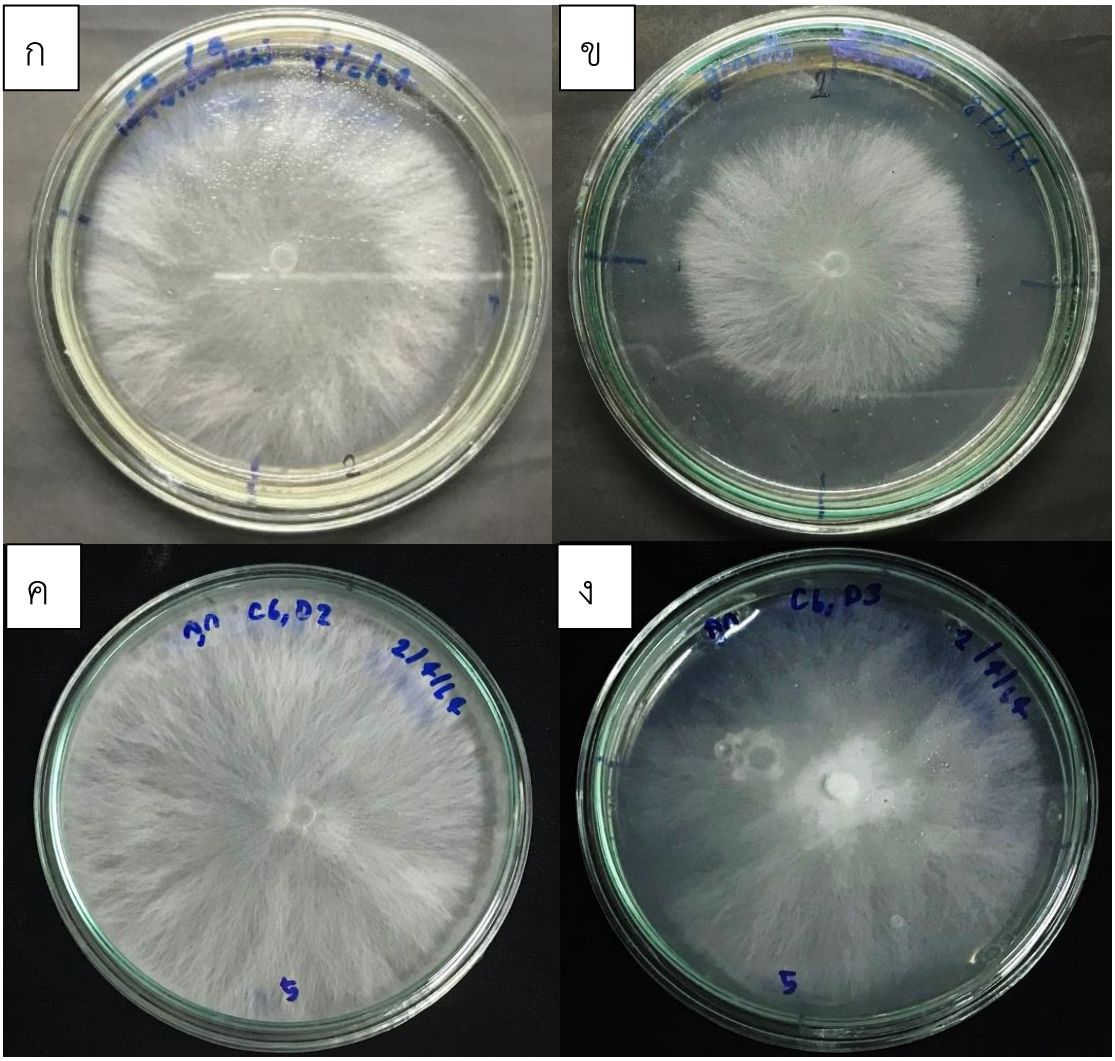
หมายเหตุ - แสดงถึงเส้นใยที่ผสมเข้ากันไม่ได้

+ แสดงถึงเส้นใยที่มีการเจริญซ้อนทับกันเป็นแนวตรงกลาง และพบโครงสร้าง clamp connection

0 แสดงถึงเส้นใยที่มีการเจริญซ้อนทับกันเป็นแนวตรงกลาง แต่ไม่พบโครงสร้าง clamp connection

4.5 การทดสอบการเจริญของเส้นใยลูกผสม

การเจริญของเส้นใยลูกผสม NS1และ NS2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ BK และ CM ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ วัดอัตราการเจริญของเส้นใยที่เวลา 6 วัน พบว่าสายพันธุ์ ลูกผสม NS1 มีการเจริญดีและเส้นใยมีความหนา (ภาพที่ 4.10 ค) มีอัตราการเจริญของเส้นใย เท่ากับ 1.40±0.02 เซนติเมตรต่อวัน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ (ภาคผนวก ข) ในขณะที่ลูกผสม NS2 ลักษณะการเจริญของเส้นใยบางกว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์ลูกผสม NS1 (ภาพที่ 4.10 ง) มีอัตราการเจริญของเส้นใย เท่ากับ 1.21±0.04 เซนติเมตรต่อวัน ซึ่งลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สูงกว่าสายพันธุ์ BK (ภาพที่ 4.10 ก) และ CM (ภาพที่ 4.10 ข) ที่มีอัตราการเจริญของเส้นใย เท่ากับ 1.12±0.10 เซนติเมตรต่อวัน และ 0.97±0.16 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ (ตารางที่ 3)



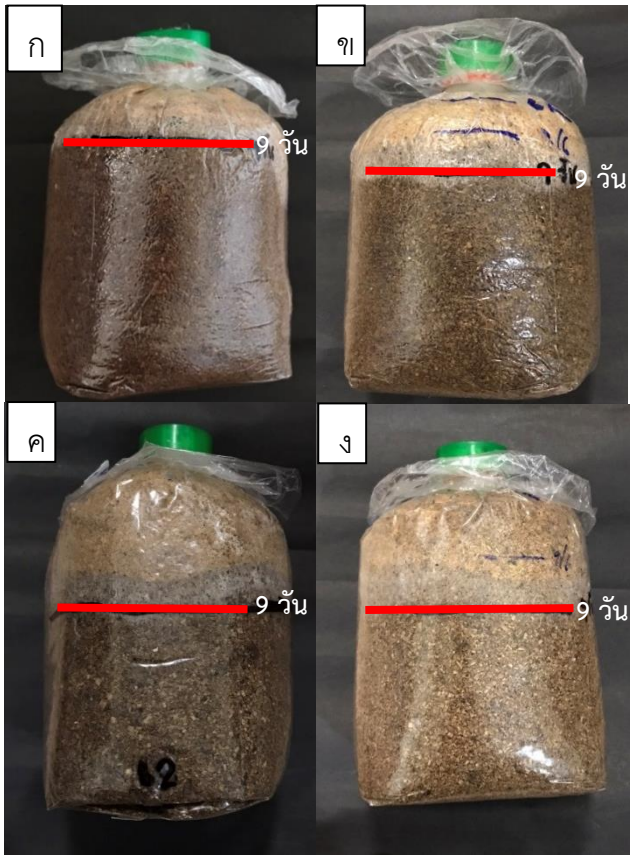
ภาพที่ 4.10 ลักษณะการเจริญโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสคู่ของสายพันธุ์พ่อแม่ ได้แก่ (ก) สายพันธุ์ BK (ข) สายพันธุ์ CM และสายพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ (ค) สายพันธุ์ NS1 (ง) สายพันธุ์ NS2 ที่เวลา 6 วัน

ตารางที่ 3 อัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 6 วัน

สายพันธุ์	อัตราการเจริญ (เซนติเมตรต่อวัน)
BK	1.12 ± 0.10^{ab}
CM	0.97 ± 0.16^{a}
NS1	1.40 ± 0.02^{c}
NS2	1.21 ± 0.04^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

การทดสอบการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะขี้เลื่อย เมื่อวัดอัตราการเจริญของเส้นใยทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 9 วัน พบว่าสายพันธุ์ลูกผสม NS1 (ภาพที่ 4.11 ค) และ สายพันธุ์ลูกผสม NS2 (ภาพที่ 4.11 ง) มีอัตราการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 1.07 ± 0.04 เซนติเมตรต่อวัน และ 0.95 ± 0.07 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ลูกผสมแสดงอัตราการเจริญสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ได้แก่ สายพันธุ์ BK (ภาพที่ 4.11 ก) และสายพันธุ์ CM (ภาพที่ 4.11 ข) ที่มีอัตราการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะขี้เลื่อยเท่ากับ 0.62 ± 0.02 เซนติเมตรต่อวัน และ 0.59 ± 0.02 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 4.11 ลักษณะการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะขี้เลื่อย โดยเส้นสีแดงแสดงระดับการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะขี้เลื่อย ของสายพันธุ์พ่อแม่ ได้แก่ (ก) สายพันธุ์ BK (ข) สายพันธุ์ CM และสายพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ (ค) สายพันธุ์ NS1 (ง)สายพันธุ์ NS2 ที่เวลา 9 วัน

ตารางที่ 4 อัตราการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะขี้เลื่อยที่เวลา 9 วัน

สายพันธุ์	อัตราการเจริญ (เซนติเมตรต่อวัน)
BK	0.62 ± 0.02^{a}
CM	0.59 ± 0.02^{a}
NS1	1.07 ± 0.04^{c}
NS2	0.95 ± 0.07^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

การทดลองแยกเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวของสายพันธุ์เห็ดนางนวลสีชมพูที่แตกต่างกันสี่สายพันธุ์ แล้วทำการจับคู่ผสมสายพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ GK และ SP ทั้งหมด 90 คู่ พบว่าเส้นใยที่แยกได้ไม่สามารถผสมแล้วสร้างสายพันธุ์ลูกผสมได้ ในขณะที่การจับคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ BK และ CM ทั้งหมด 42 คู่ สามารถสร้างลูกผสมได้ 2 สายพันธุ์ การผสมเข้ากันไม่ได้เป็นผลมาจากลักษณะของโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่แยกได้จากการทดลอง มีลักษณะอ่อนแอ เส้นใยมีความบาง และเจริญเติบโตได้ไม่ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA Eillott (1993) รายงานว่า ความหนาแน่นของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวมีความหลากหลายสามารถพบได้ตั้งแต่อ่อนแอมากไปจนถึงความหนาแน่นสูง แต่โดยทั่วไปการเจริญเติบโตของส่วนประกอบและความหนาแน่นของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวจะมีความอ่อนแอกว่าเส้นใยนิวเคลียสคู่ของสายพันธุ์พ่อแม่ นอกจากนี้ Gharehaghaji และคณะ (2007) ได้รายงานว่า ในการเลือกจับคู่ผสมของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีผลต่อความสามารถการผสมเข้ากันได้ (compatibility) ดังนั้นในการทดลองหากแยกโคโลนีที่ประกอบด้วยเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวมากขึ้นและทำการคัดเลือกเส้นใยที่มีลักษณะแข็งแรงอาจเพิ่มโอกาสในการสร้างลูกผสมได้มากขึ้น

การผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ BK และ CM ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน โดยทำการจับคู่เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว แบบ mono-mono crossing ได้อัตราการผสมพันธุ์ (mating frequency) ของการทดลองเท่ากับ 4.76% ซึ่งน้อยกว่ารายงานของ Samberg and Koltin (1973) ที่กล่าวว่าเห็ดที่มีระบบการสืบพันธุ์แบบ tetrapolar mating system มีอัตราการผสมพันธุ์อยู่ที่ 25% อย่างไรก็ตามใน การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์แบบ mono-mono crossing ของเห็ดสกุล *Pleurotus* ของ Yun และคณะ (2020) ได้รายงาน mating frequency ของ *P. giganteus* ไว้เท่ากับ 28.6% Kumara and Edirimanna (2009) รายงาน mating frequency ของ *P. ostriatus* เท่ากับ 92% และ การทดลองที่ทำการศึกษาใน *P. florida* ของ Kaur, Sodhi, and Kapoor (2008) ได้ mating frequency เท่ากับ 0.01% จะเห็นได้ว่า mating frequency ที่พบในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus* มีความหลากหลาย ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความแข็งแรงของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว การควบคุมปัจจัยสภาพแวดล้อมที่ส่งผลต่อการเจริญของเส้นใย เช่น อุณหภูมิ อย่างเหมาะสม เป็นต้น

การผสมพันธุ์เส้นใยนิวเคลียสเดียวพบลักษณะการเจริญของเส้นใยได้สามรูปแบบ ลักษณะดังกล่าวสามารถอธิบายได้ด้วยงานวิจัยของ Kües (2020) โดยการผสมพันธุ์ของเห็ดที่มีระบบการสืบพันธุ์แบบ tetrapolar mating system ถูกควบคุมการด้วยตำแหน่งประเภทการผสมพันธุ์ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ A และ B ดังนั้น ลักษณะการเจริญของเส้นใยที่พบลักษณะแรกคือเส้นใยของทั้งสองสายพันธุ์เจริญซ้อนทับกันเป็นแนว

หนา แต่ไม่พบโครงสร้าง clamp connection ลักษณะนี้แสดงความเข้ากันได้กึ่งเดียว (Hemicompatibility) เกิดจากการที่เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวมีตำแหน่งของยีน A หรือ ยีน B เหมือนหรือต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง ลักษณะที่สอง เส้นใยที่ไม่สามารถเข้าคู่กันได้ (Incompatibility) เกิดจากการที่ ตำแหน่งของยีน A และ ยีน B ของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 2 ตำแหน่งที่ควบคุมการเข้าคู่ และลักษณะสุดท้ายแสดงความสามารถในการเข้ากันได้ของเส้นใย (compatibility) เกิดเป็นสายพันธุ์ลูกผสมได้สำเร็จเกิดจากการที่ตำแหน่งประเภทการผสมพันธุ์แตกต่างกันในทั้งตำแหน่ง A และ B

ลูกผสมสายพันธุ์ NS1 และ NS2 มีอัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ สอดคล้องกับการศึกษาของ Yun และคณะ (2020) ที่รายงานว่าลูกผสมสายพันธุ์ใหม่จากการปรับปรุงพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus* อย่างเห็ดโต่งฝน (*P. giganteus*) ด้วยวิธีการผสมแบบ mono-mono hybridization มีอัตราการเจริญของเส้นใยสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่เช่นเดียวกัน ทั้งนี้การเจริญของเส้นใยที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์อาจขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง การทดลองของ Bilal, Mushtaq and Moinuddin (2014) ระบุว่าการเลือกส่วนประกอบที่นำมาผลิตวัสดุเพาะที่มีความเหมาะสมต่อสายพันธุ์เห็ดส่งผลต่อการเจริญของเส้นใย อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อทำการทดสอบการเจริญของเส้นใยต่อโดยการเพาะเส้นใยบนวัสดุเพาะที่ส่วนผสมหลักทำจากขี้เลื่อย ลูกผสมทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่สอดคล้องกับการทดสอบการเจริญของเส้นใยบน PDA นอกจากนี้ในการทดลองของ Yun และคณะ (2020) ได้ทำการทดลองเพาะสายพันธุ์ลูกผสมบนวัสดุเพาะและเก็บผลผลิตดอกเห็ด จากนั้นวิเคราะห์น้ำหนักผลผลิตด้วยค่า Biological efficiency (B.E.) สายพันธุ์ลูกผสมที่ถูกปรับปรุงมีผลผลิตดอกเห็ดสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังที่กล่าวมาแสดงว่าการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการแบบ mono-mono hybridization สามารถให้ลูกผสมที่มีการเจริญของเส้นใยและให้ปริมาณผลผลิตที่ดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ได้

ในการทดลองขั้นเปรียบเทียบผลผลิตของสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์ลูกผสมที่ปรับปรุงได้ โดยการเพาะหัวเชื้อลงวัสดุเพาะขี้เลื่อยจนเส้นใยเจริญเต็มถุงเพาะขี้เลื่อย จากนั้นทำการเปิดดอกเห็ดที่โรงเพาะแล้วเก็บค่าเฉลี่ยน้ำหนักดอก เปรียบเทียบผลผลิตของแต่ละสายพันธุ์ด้วยค่า Biological efficiency (B.E.) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถทำขั้นตอนการเปิดดอกได้ เนื่องจากจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสโควิด 19 ส่งผลให้มีการจำกัดเวลาในการเข้าห้องปฏิบัติการ จึงไม่สามารถปฏิบัติการทดลองได้จนครบกระบวนการศึกษาได้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางนวลสีชมพู *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn ด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน โดยใช้การผสมพันธุ์แบบ mono-mono hybridization การจับคู่ผสมระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายพันธุ์ GK 6 ไอโซเลท และ SP 15 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้น 90 คู่ผสม ไม่พบสายพันธุ์ลูกผสมจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ทั้งสองได้ เนื่องจากเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่แยกได้ของทั้งสองสายพันธุ์มีความอ่อนแอ ทำให้เส้นใยมีการเจริญไม่ค่อยดีและไม่สามารถผสมเข้าคู่กันเพื่อสร้างสายพันธุ์ลูกผสมได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้มีการนำสายพันธุ์ใหม่มาทำการทดลองปรับปรุงพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ BK และ CM การจับคู่ผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ BK และ CM ซึ่งแยกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของแต่ละสายพันธุ์ได้ 7 ไอโซเลท และ 6 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมจับคู่ผสมทั้งสิ้น 42 คู่ผสม การผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ทั้งสองพบลูกผสม 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ลูกผสมสายพันธุ์ NS1 และลูกผสมสายพันธุ์ NS2 ซึ่งเมื่อทำการทดสอบการเจริญของเส้นใย ผลการทดลองสรุปได้ว่าสายพันธุ์ลูกผสม NS1 มีอัตราการเจริญของเส้นใยสูงกว่าสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เก็บผลข้อมูลเป็นเวลา 6 วัน โดยมีอัตราการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 1.40$\pm$0.02 เซนติเมตรต่อวัน และบนวัสดุเพาะขี้เลื่อยที่เวลา 9 วัน เท่ากับ 1.07$\pm$0.04 เซนติเมตรต่อวัน ดังนั้นจากการปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางนวลสีชมพู (*P. djamor*) ด้วยวิธีการผสมพันธุ์แบบ mono-mono hybridization สายพันธุ์ลูกผสม NS1 อาจเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพต่อการผลิตเห็ดเศรษฐกิจในด้านการเจริญเติบโตของเส้นใยที่รวดเร็วและอาจให้ปริมาณผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์ดังเดิมได้

เอกสารอ้างอิง

จรัชรัส มั่นถาวร. 2544. การสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) โดยการรวมโพรโทพลาสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชาญกิจ วงศ์เผ่าสกุล. 2555. การคัดเลือกพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus sp.* ด้วยวิธี mono-mono Crossing. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

รัตนชัย ม่วงงาม. 2560. ธุรกิจการเพาะเห็ดฟาง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.thaismescenter.com [7 เมษายน 2563]

วราพร ไชยมา, วสันณ์ เพชรรัตน์ และ พัลลภา กฤษณีไพบูลย์. 2007. สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการเพาะเห็ด *Corpinus comatus* (O.F. Mull.) Gray. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 29: 261-274

ศูนย์ฝึกและพัฒนาอาชีพราษฎรไทยบริเวณชายแดนสระแก้ว. 2555. ความสำคัญของเห็ด. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://sakaeomushroom.blogspot.com [6 กันยายน 2563].

หม่อนไม้. 2557. เห็ดนางนวล เห็ดสีสันสวยงาม. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.monmai.com [6 กันยายน 2563].

อนันท์ กล้ารอด. 2553. เห็ดเกิดขึ้นได้อย่างไร. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://klarod.blogspot.com [6 กันยายน 2563].

อนงค์ จันทรศรีกุล. 2542. เห็ดเมืองไทยเทคโนโลยีการเพาะเห็ด. โรงพิมพ์วัฒนาพานิช. กรุงเทพมหาคร

อุราภรณ์ สอาดสุด และคนอื่นๆ. 2552. การควบคุมคุณภาพและยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยวเห็ดสกุลนางรม. ใน รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, หน้า 7. ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Ahmed, M., Abdullah, N., Ahmed, K.U., and Bhuyan, M.H.M.B. 2013. Yield and nutritional composition of oyster mushroom strains newly introduced in Bangladesh. Pesquisa Agropecuária Brasileira 2: 197-202

Aletor, V.A., 1995. Compositional studies on edible tropical species of mushrooms. Food Chemistry 54: 265-268.

Barh, A., et al. 2019. Genetic improvement in Pleurotus (oyster mushroom): a review. 3 biotech : 322.

Bilal, S., Mushtaq, A., and Moinuddin, K. 2014. Effect of diferrent grains and alternate substrates on oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) production. 8(14): 1474-1479.

Borges, G.M., et al. 2013. Extracellular polysaccharide production by a strain of *Pleurotus djamor* isolated in the south of Brazil and antitumor activity on Sarcoma 180. Brazilian Journal of Microbiology 44(4): 1059–1065.

Bottom, C.B., Siehr, D.J. 1979. Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the hyphal wall of the basidiomycete Coprinus macrorhizus var. microsporus. Carbohydrate Research. 77:169–181.

Breene, W.M. 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. Journal of Food Protection 53: 883–894.

Bresinsky, A., Fischer, M., Meixner, B., and Paulus, W. 1987. Speciation in *Pleurotus.* Mycologia 79: 234-245

Chang, S.T., and Miles, P.G. 2004. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value Medicinal Effect and Environmental Impact (first edition). CRC Press: Boca Raton.

Chang, S.T., Buswell, J.A., Miles, P.G., 1993. Genetics and breeding of edible mushrooms. Malaysia: The Gordon and Breach Science Publishers.

Dehariya, P., Vyas, D., and Kashaw, S.K. 2013. Mushroom nutraceuticals on different substrates. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 5: 88–90.

Elliott, T. J. 1993. Genetics and breeding of cultivated mushrooms. In: Mair, M. C., Gokulapalan, C. and Das, L. Eds. Advances in Mushrooms Biotechnology. Mycological Society of India. : 11-30.

Ficior, D., et al. 2006. Importance of substrate disinfection on oyster mushroom (*Pleurotus* Spp.) culture. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. : 48-53.

Gharehaghaji, A. N., Goltapeh, E. M., Masiha, S. and Gordan, H. R. 2007. Hybrid production of oyster mushroom Pleurotus ostreatus (Jacq: Fries) Kummer. Parkistan Journal of Biological Science. 10: 2334-2340.

Hawksworth, D.L., and Lücking, R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiology Spectrum 5: 1–17.

Kalmis, E., Azbar, N., Yildiz, H., and Kalyoncu, F. 2008. Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on wheat straw. Bioresource Technology 99: 164-169.

Kaur, J., Sodhi, H., Kapoor, S. 2008. Breeding of Pleurotus florida (oyster mushroom) for phenotypic pigmentation and high yield potential. Journal of the Science of Food and Agriculture. 88: 2676-2681.

Kim, M.K., Ryu, J., Lee, Y., and Kim, H. 2013. Breeding of a long shelf-life strain for commercial cultivation by mono-mono crossing in *Pleurotus eryngii.* Scientia Horticulturae. 162: 265-270

Kumara, K.L.W., and Edirimanna, I.C.S. 2009. Improvement of strains of two oyster mushroom cultivars using duel culture technique. World Applied Sciences Journal 7: 654-660.

Lechner, B., Albertó, E. 2011. Search for new naturally occurring strains of Pleurotus to improve yields. P. albidus as a novel proposed species for mushroom production. Revista Iberoamericana de Micología. 28: 148-154.

Manzi, P. and Pizzoferrato, L. 2000. Beta-glucans in edible mushrooms. Food Chemistry 68: 315–318.

Marchant, R. 1978. Wall composition of monokaryons and dikaryons of Coprinus cinereus. Journal of General Microbiology. 106: 195–199.

Oei, P., Nieuwenhuijzen, B.V. 2005. Small-scale Mushroom Cultivation: Oyster, Shiitake and Wood Ear Mushrooms. (first ed.), Agromisa Foundation and CTA, Wageningen.

Oropeza-Guerrero, M.P., et al. 2018. Productivity and antioxidant activity of wild, Reconstituted, and Hybrid Strains of the Pink Oyster Mushroom, *Pleurotus djamor* (Agaricomycetes), from Mexico.International Journal of Medicinal Mushrooms 20: 607-621.

Palmer, G. E. and Horton, J.S., 2006. Mushrooms by magic: Making connections between signal transduction and fruiting body development in the basidiomycete fungus Schizophyllum commune. FEMS microbiology letters. 262: 1-8

Petersen, R.H., and Ridley, G.S. 1996. A New Zealand *Pleurotus* with multiple-species Sexual Compatibility. Mycologia 88: 198-207.

Raaman, N., et al. 2011. Effect of Pleurotus djamor var. roseus, an edible mushroom on neutrophil functions. Food and Agricultural Immunology 22: 229-234

Stamberg, J., and Koltin, Y. 1973. The organization of the in compatibility factors in higher fungi: The effect of structure and symmetry on breeding. Heredity 30: 15-26

Singh, S., and Singh, G. 2018. Effect of different pH, Temperature and Media on Redial Growth of Oyster Mushrooms (*Pleurotus djamor*). Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences 7: 73-77.

Sonnenberg, A.S.M., Visser, M.H.M., Lavrijssen, B., Cone, J.W., Hendrickx, P.M. 2016. Evaluation of king oyster mushrooms strains (*Pleurotus eryngii*) on selective lignin degradation in wheat straw: an update. Wageningen

Su, J., Jiang, L.L., Wu, J.N., Liu, Z.Y., and Wu, Y.P. 2016. Anti-tumor and anti-virus activity of polysaccharides extracted from Sipunculus nudus (SNP) on Hepg 2.2.15. International Journal of Biological Macromolecules 87: 597–602.

Yun, H. K., Boon, C. S., Shin, T. Y., and Sabaratnam, V. 2020. Breeding and Evaluation of Pleurotus giganteus (Berk.) Karunarathna & K.D. Hyde Hybrids via Intraspecific Mating**.** Sains Malaysiana. 49: 1223-1236

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหารเลี้ยงวุ้นมันฝรั่งและวิธีการเตรียม

ส่วนผสม

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเด็กซ์โทรสหรือกลูโคส	20	กรัม
Agar	15 -20	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำสะอาด	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการทำ

1. น้ำมันฝรั่งมาปอกเปลือก แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดเท่ากับลูกเต๋า หรือ มีขนาด 1 x 1 x 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มกับน้ำที่สะอาดประมาณ 1000 มิลลิลิตร

2. กรองเอากากมันฝรั่งออก แล้วต้มน้ำที่กรองต่อไป จากนั้นจึงเติมน้ำตาลเด็กโตรสในอัตราส่วนตามสูตรลงไป คนจนกระทั่งน้ำตาลละลายหมด

3. ใส่วุ่นขณะที่อาหารไม่ร้อนจนเกิดไป ป้องกันการจับกันเป็นก้อนของผงวุ้น

4. เมื่ออาหารวุ้นละลายหมดแล้วจึงนำอาหารมาบรรจุขวด พร้อมกับปิดจุกด้วยสำลี แล้วหุ้มด้วยกระดาษ ใช้ยางรัดให้เรียบร้อย

5. นำขวดอาหารวุ้นมานึ่งฆ่าเชื่อด้วยหม้อนึ่งความดัน โดยใช้ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นานประมาณ 15-20 นาที

2. สูตรวัสดุเพาะขี้เลื่อย

ขี้เลื่อย	100	กิโลกรัม
รำละเอียด	5	กิโลกรัม
ปูนขาว	1	กิโลกรัม
ยิปซัม	0.5	กิโลกรัม
ดีเกลือ	0.2	กิโลกรัม

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี One-way analysis of variance (ANOVA) ของอัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เวลา 6 วัน

Descriptives								
อัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เวลา 6 วัน								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BK	3	1.1247	.10104	.05833	.8737	1.3757	1.01	1.18
CM	3	.9723	.16878	.09744	.5531	1.3916	.87	1.17
NS1	3	1.4030	.02425	.01400	1.3428	1.4632	1.38	1.42
NS2	3	1.2113	.04179	.02413	1.1075	1.3151	1.17	1.25
Total	12	1.1778	.18407	.05314	1.0609	1.2948	.87	1.42

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี One-way analysis of variance (ANOVA) ของอัตราการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะ ที่เวลา 9 วัน

Descriptives								
อัตราการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะที่เวลา 9 วัน								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
BK	3	.6233	.01528	.00882	.5854	.6613	.61	.64
CM	3	.5867	.02082	.01202	.5350	.6384	.57	.61
NS1	3	1.0733	.04509	.02603	.9613	1.1853	1.03	1.12
NS2	3	.9467	.06658	.03844	.7813	1.1121	.89	1.02
Total	12	.8075	.22001	.06351	.6677	.9473	.57	1.12

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ของอัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เวลา 6 วัน

อัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เวลา 6 วัน					
	สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan[a]	CM	3	.9723		
	BK	3	1.1247	1.1247	
	NS1	3		1.2113	
	NS2	3			1.4030
	Sig.		.103	.325	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ของอัตราการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะขี้เลื่อย ที่เวลา 9 วัน

อัตราการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะที่เวลา 9 วัน					
	สายพันธุ์	จำนวนซ้ำ	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan[a]	CM	3	.5867		
	BK	3	.6233		
	NS2	3		.9467	
	NS1	3			1.0733
	Sig.		.319	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					