การเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเทชันในเห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk) Sing. ด้วยโคลชิซิน

นายคมสัน นันทสุนทร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974 – 17 – 3384 - 4

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INDUCTION OF MUTATION IN SHIITAKE *Lentinus edodes* (Berk) Sing. BY COLCHICINE

Mr.Komsun Nuntasoontorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974 – 17 – 3384 –4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเทชันในเห็ดหอม *Lentinus edodes*.(Berk) Sing. ด้วยโคลชิซิน
โดย	นายคมสัน นันทสุนทร
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คมสัน นันทสุนทร : การเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเทชันในเห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk) Sing. ด้วยโคลชิซิน (INDUCTION OF MUTATION IN SHIITAKE *Lentinus edodes* (Berk) Sing. BY COLCHICINE) อ.ที่ปรึกษา : รศ. มุกดา คูหิรัญ , อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล , 54 หน้า ISBN 974 – 17 – 3384 –4

การเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเทชัน โดยการนำเซลล์เดี่ยวของเห็ดหอมสายพันธุ์ L074 มาตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วหยดด้วยสารโคลชิซิน เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณดีเอ็นเอลดลงจากเดิม จากการเปรียบเทียบด้วยวิธีวัดการดูดกลืนคลื่นแสงของ ดีเอ็นเอ (OD_{260nm}) ของเส้นใยเห็ดหอมซึ่งเป็นเหตุผลที่เชื่อถือได้ว่าเกิดอนิวพลอยด์ อย่างไรก็ตามไม่พบ mutinucleation จากผลงานวิจัยครั้งนี้จึงเป็นเหตุทำให้เชื่อว่า สารละลายโคลชิซิน ไม่เพียงแต่มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์เท่านั้น แต่ยังเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเทชันอื่นอีกด้วย คือ การเกิดอนิวพลอยด์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2545..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4272227323 : MAJOR GENENICS

KEY WORD : *Lentinus edodes*.,colchicine,aneuploidization,single cell

KOMSUN NUNTASOONTORN : INDUCTION OF MUTATION IN SHIITAKE *Lentinus edodes* (Berk) Sing. BY COLCHICINE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.MUKDA KUHIRUN. THESIS CO-ADVISOR ASSOC.PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL,Ph.D 54 pp.ISBN 974 – 17 – 3384 –4

Single cell of shiitake (*Lentinus edodes* (Berk) Sing) strain L074 was isolated from mucelia undermicroscope , was induced to be mutated by 1.5 percentage of colchicine. It was found that DNA content was reduced , by comparision with mycelial DNA spectrum absorbtion method. It is the reason which is believed to be aneuploid , but not multinucleation. The result of this research can inform that properties of colchicine not only polyploid induction but also aneuploid induction.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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

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

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดมา และกรุณาปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้ความรู้อันเป็นประโยชน์ และกรุณาปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันท์ ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ อาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล รองศาสตราจารย์สุมิตรา คงชื่นสิน ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำมาโดยตลอด

ขอขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆน้องๆและเจ้าหน้าที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่ไม่อาจเอ่ยนามได้ทั้งหมด ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งทางตรงและทางอ้อม มีส่วนร่วมให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยบัณฑิตวิทยาลัย และทุนสนับสนุนการวิจัยฯมูลนิธิการศึกษาเซล 100 ปี ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยในครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย……ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……จ
กิตติกรรมประกาศ……ฉ
สารบัญ……ช
สารบัญตาราง……ซ
สารบัญรูป……ฌ

บทที่

1 บทนำ……1
2 ตรวจเอกสาร……5
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง……13
4 ผลการทดลอง……19
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง……34

รายการอ้างอิง……43
ภาคผนวก……47
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……54

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ผลการตัดเส้นใยของเห็ดหอม L074 เพื่อแยกเป็นเซลล์เดี่ยว.....23

2 สรุปผลการตัดเส้นใยตามขนาดความยาวเส้นกิ่ง แบ่งตามกลุ่ม.....23

3 จำนวนเซลล์ที่รอดจากการใช้สารโคลชิซินความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาต่างๆ.....27

4 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง.....27

5 ผลการวัดการดูดกลืนคลื่นแสง UV ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของสารละลายดีเอ็นเอ และแสดงค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ.....30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	เห็ดหอม	1
2	สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน	11
3,4	จุดกำเนิด clamp connection	20
5,6	การเจริญของ clamp connection	20
7	clamp connection จรดกับตัวเซลล์	20
8	การสร้างกิ่งใหม่ใต้ clamp connection	20
9	ลักษณะเส้นใยที่เหมาะสมในการตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยว	21
10	ขณะตัดแยกเซลล์เดี่ยว	21
11	เซลล์เดี่ยวหลังตัด	22
12	เส้นกิ่งสูญเสียน้ำหลังตัด	22
13	ลักษณะเซลล์เดี่ยวหักพับหลังวางเซลล์	24
14,15	การวางเซลล์เดี่ยวที่ถูกต้อง	24
16	เส้นใยที่เลี้ยงในสารละลายโคลชิซิน 1.5 % (w/v)	26
17	เส้นใยที่เลี้ยงในน้ำกลั่น	26
18	เส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB	26
19	เส้นใยที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA	26
20	เส้นใยที่เลี้ยงในวุ้น (Agar)	26
21-26	ลักษณะนิวเคลียสของสายพันธุ์ทดลอง ย้อมด้วย propidium Iodide ผ่านแสง UV	28
27-29	ขนาดเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ดั้งเดิม และตัวอย่างสายพันธุ์ treatment	29
30	ปริมาณความเข้มข้น DNA แต่ละรหัสสายพันธุ์	30
31	PCR Product ถูกแยกด้วยเครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบนอะกาโรสเจล	31
32	ถุงขี้เลื่อยขนาด 300 กรัม สำหรับเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอม ขณะเปิดดอกในโรงเรือน	32
33	ลักษณะการเกิดดอกของเห็ดหอมสายพันธุ์ดั้งเดิม L074	32
34	ลักษณะดอกเห็ดผิดปกติจากสายพันธุ์ทดลอง	33
35	ลักษณะการแบ่งเซลล์ออกไปจากเซลล์หลักของเส้นกิ่ง	36

บทที่ 1
บทนำ

เห็ดหอมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinus edodes* (Berk) Sing.หรือ *Lentinula edodes* (Berk) Pegler. (Pegler,1983) และมีชื่อสามัญเรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่น ถือว่าเห็ดหอมขึ้นอยู่กับไม้จำพวก ไม้โอ๊ค หรือไม้ก่อ ซึ่งเรียกไม้ว่า ไม้ชิอิ (Shii) ส่วนเห็ดญี่ปุ่น เรียกว่า ทาเกะ (Ta-Ke) จึงเรียกเห็ดหอมว่า Shii – Take ภาษาจีนเรียกว่า เฮียโก (Haeng – Ko) ภาษาอังกฤษเรียกว่า Black Mushroom ภาษาเกาหลี เรียกว่า โพโกะ (Pyo – Ko) (อานนท์ เชื้อตระกูล , 2532)

รูปที่ 1 เห็ดหอม

เห็ดหอมจัดอยู่ใน Class Basidiomycetes เมื่อปัจจัยทางพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมเหมาะสม เส้นใยระยะที่ 2 (secondary mycelium) จะรวมตัวกันเป็นดอกเห็ด (basidiocarp) ซึ่งประกอบด้วย หมวกดอก (pileus หรือ cap) กว้าง 5 – 12 เซนติเมตร ผิวหมวกดอกจะแห้งและแตกลายงา ใต้หมวกดอกประกอบด้วยครีบ (lamellae) สีขาวจำนวนมากที่ครีบมีเซลล์ที่จะเจริญไปเป็น basidium ภายในเซลล์ basidium จะมีการรวมตัวกันของนิวเคลียสและเกิดการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซีสได้สี่นิวเคลียสเจริญเป็นสปอร์ที่มีขนาด 5.5 – 6.5 X 3 – 3.5 ไมโครเมตร ผิวเรียบ มีผนังบาง ก้าน (stipe) ยาว 3 – 5 เซนติเมตร กว้าง 8 – 13 มิลลิเมตร มีลักษณะแข็งและเหนียว (ฐิติมา ตันติกาญจน์ , 2529)

คุณลักษณะพิเศษที่สำคัญของเห็ดหอมอีกอย่างคือ มีกลิ่นหอมเฉพาะตัวไม่ว่าจะอยู่ในสภาพดอกสด หรือดอกแห้ง สารที่ทำให้มีกลิ่นหอม คือ Guanosine-5'-monophosphate

(อานนท์ เอื้อตระกูล, 2532) ถึงแม้เห็ดหอมจะมีคุณค่าทางอาหารและทางยาสูงแต่มีราคาแพงและผลิตได้น้อยในประเทศไทย เนื่องจากสภาพภูมิอากาศที่จำกัดและวัสดุเพาะ ได้แก่ ท่อนไม้ก่อหายาก จึงมีการนำเห็ดหอมแห้งเข้ามาจากต่างประเทศ ประเทศไทยนำเข้าเห็ดหอมในแต่ละปีไม่น้อยกว่า 300 – 500 ล้านบาท ด้วยการลักลอบและซื้อติดตัวมาตามสิทธิ์ ส่วนที่นำเข้าโดยถูกกฎหมายจริงๆ ประมาณสิบกว่าล้านบาทเท่านั้น (อานนท์ เอื้อตระกูล, 2532) ในประเทศไทยมีการวิจัยพัฒนาวัสดุเพาะที่เหมาะสมเพื่อการเพิ่มผลผลิต พบว่าวัสดุเพาะหลักที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ ขี้เลื่อยไม้ยางพารา การเติมวัสดุเสริม เช่น รำข้าว หรือวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรประมาณ 5 % จะเพิ่มผลผลิตยิ่งขึ้น เมื่อเลือกสายพันธุ์ที่ดีและฤดูที่เหมาะสมผลผลิตสูงสุดที่ได้จากการทดลองระดับฟาร์ม คือ น้ำหนักดอก/น้ำหนักวัสดุเพาะเท่ากับ 56% หรือ Biological efficiency เท่ากับ 124%(สุทธพรรณ ตรีรัตน์และคณะ, 2529) นอกจากนี้การปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดหอมเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถพัฒนาสายพันธุ์ เพื่อให้เหมาะสมกับภาวะแวดล้อมในประเทศไทย และเพื่อเพิ่มผลผลิตให้ได้ปริมาณมากๆ เช่น ได้มีการผสมพันธุ์ ระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes* (Berk) Pegler.)และเห็ดขอนขาว (*Lentinus sqarrosulus* (Mont) Pegler.) ด้วยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ ได้เห็ดหอมสายพันธุ์ลูกผสม 2 สายพันธุ์ (ประภัสสร โชคสวนทรัพย์, 2539) มีรายงานการวิจัยผลของอายุสปอร์ และสูตรอาหารที่มีผลต่อการงอกของสปอร์เห็ดหอมเพื่อเป็นแนวทางในการเพาะสปอร์และผสมพันธุ์เห็ดหอมให้ได้พันธุ์ใหม่ (มุกดา คูหิรัญ และฐิติมา ตันติกาญจน์, 2529) การสร้างสายพันธุ์ตรวจสอบเพื่อศึกษา incompatibility factors ของเห็ดหอมบางสายพันธุ์เพื่อเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในด้านผสมพันธุ์เห็ดหอม (มุกดา คูหิรัญ , ฐิติมา ตันติกาญจน์ และสุทธพรรณ ตรีรัตน์, 2530)

งานวิจัยครั้งเพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเทชัน ซึ่งเป็นการพัฒนาสายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิต ทำโดย การใช้สารโคลชิซิน ให้เกิดโพลีพลอยด์ กับเซลล์ของเห็ดหอม แล้วนำไปบ่มให้ได้เส้นใยและเกิดเป็นดอกเห็ดต่อไป

การชักนำให้เกิด โพลีพลอยด์ ด้วยสารโคลชิซิน

โพลีพลอยด์ เกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมมีกำเนิดจากพืชชนิดเดียวกันเรียกว่า autopolyploidy อีกพวกหนึ่งมีการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมที่มีต้นกำเนิดมาจากต่างชนิดกัน เรียกว่า allopolyploidy (สิรนุช ลามศรีจันทร์, 2540) โพลีพลอยด์ อาจเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ แต่เกิดขึ้นได้น้อยมาก ดังนั้นจึงได้มีการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ อาจทำได้โดยการใช้ อุณหภูมิ หรือสารเคมี เช่น โคลชิซิน Oryzalin Hydroquinole Vinblastin Trifluralin และ Amiprophos methyl (APM) ส่วนสารโคลชิซินเป็นสารเคมีที่ใช้กันแพร่หลายมากที่สุด โคลชิซินเป็นสารประเภทอัลคาลอยด์ (alkaloid) มีผลึกเป็นรูปเข็ม ไม่มีสี แต่จะมีสีเหลืองอ่อนเมื่อถูกแสง น้ำหนักโมเลกุล 399.43 จุดหลอมเหลว 155^{o} – 157 ^{o}C สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{26}NO_6$

(Eigsti and Dustin , 1955 ; King and Stansfield , 1990) มีคุณสมบัติเป็นด่างอ่อนๆหรือเป็นกลาง (Hussein and Narsa , 1974) ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์มและน้ำเย็น จะละลายได้น้อยในน้ำอุ่น น้ำร้อนและเบนซิน ในอีเทอร์แทบจะไม่มีการละลายเลย เป็นสารที่สกัดได้จากส่วนของเมล็ดกับหัวของ *Colchicum autumnale* Linn. (Eigsti and Dustin , 1955)

สารโคลชิซินมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้าง spindle fiber ในขณะที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวทำให้เซลล์หยุดอยู่ที่ระยะเมตาเฟส (Eigsti et al,1949) ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในห้องปฏิบัติการในการศึกษาโครโมโซม และชักนำให้พืชมีการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม โดยทั่วไปพืชที่เป็น โพลีพลอยด์ มักจะให้ลักษณะต่างๆ เช่น ลำต้นแข็งแรง ใบหนาใหญ่ ดอก ผล เมล็ด และปากใบใหญ่ นอกจากนี้ยังทำให้ส่วนประกอบทางเคมีบางชนิดที่มีอยู่ในลำต้น ใบ หรือ ผล มีปริมาณที่สูงกว่าในพืช diploid และอาจมีลักษณะที่ดีทางเศรษฐกิจ ทำให้ได้ต้นที่ให้ผลผลิตสูง ตลอดจนมีคุณภาพของผลผลิตที่ดีด้วย เช่น กล้วยไม้ที่เป็น tetraploid จะมีกลีบดอกขนาดใหญ่ ทำให้บานได้นาน (สาริณี ไชยเจริญ, 2538) แตงโมที่เป็น โพลีพลอยด์ จะมีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูงกว่า diploid (ดำรง สินไชย, 2521) พืชที่เป็น โพลีพลอยด์ ชนิดเลขคี่ ได้แก่ 3n , 5n , 7n มักจะเป็นหมัน เนื่องจากมีปัญหาเกี่ยวกับกระบวนการไมโอซิส ทำให้ได้สายพันธุ์พืชที่ไม่มีเมล็ด เช่น แตงโม องุ่น กล้วย ซึ่งเป็นประโยชน์ทางการค้าอย่างดี (วิสุทธิ ใบไม้ , 2538) ในต่างประเทศได้มีรายงานผลการวิจัย การชักนำให้เกิด โพลีพลอยด์ ในเห็ดกระดุม(*Agaricus bisporus*.) ด้วยโคลชิซินโดยใช้กับ basidiospore โปรโตพลาสต์ และส่วนของเส้นใย เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 100 – 1,500 µg/ml พบว่า โปรโตพลาสต์เพียงอย่างเดียว เท่านั้นที่พบการเปลี่ยนแปลงโดย colony เปลี่ยนเป็นสีครีม จากสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีสีขาว และพบว่า ปริมาณ DNA เพิ่มขึ้นมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่หลายเท่าตัว กลุ่มที่วัดได้สูงที่สุดคือ 24.4 µg/g ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากการเพิ่มจำนวนของโครโมโซม เนื่องจากถูกชักนำด้วยโคลชิซิน (Handa et al, 1997)

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาถึง การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในเห็ดหอม เพื่อเป็นการปรับปรุง และพัฒนาสายพันธุ์ทางด้านการเพิ่มปริมาณผลผลิต และให้ได้สายพันธุ์ที่แข็งแรง มีคุณภาพ รวมทั้งสารประกอบทางเคมีบางชนิดที่เป็นประโยชน์ในเห็ดหอมอาจเพิ่มปริมาณสูงขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นสายพันธุ์เห็ดหอมสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ดีทางเศรษฐกิจ และได้รับการเผยแพร่ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดมิวเทชันในเห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk) Sing. และ เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยากับปริมาณผลผลิตระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์มิวเทชัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เห็ดหอมสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูง
2. ลดการนำเข้าเห็ดหอมจากต่างประเทศ โดยบริโภคเห็ดหอมคุณภาพที่ผลิตได้ภายในประเทศเอง
3. กระตุ้นให้นักวิจัยวิเคราะห์หาทางเลือกใหม่ๆเพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิต โดยเฉพาะการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ จากสายพันธุ์เดิมที่มีความหลากหลายอยู่แล้วภายในประเทศ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

เห็ดหอมมีชื่อสามัญ (common name) ว่า Black Mushroom ชาวญี่ปุ่น เรียกว่า shiitake มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinus edodes* (Berk.) Sing ต่อมา Pegler (1983) ให้ชื่อที่ถูกต้องว่า *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler

การจัดจำแนกหมวดหมู่ของเห็ดหอม (Pegler ,1983) เป็นดังนี้

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหอม

เห็ดหอมสามารถแบ่งวงศ์ชีพได้เป็น 2 ระยะ คือ (ฐิติมา ตันติกาญจน์ , 2529)

1. ระยะเส้นใย

เมื่อสปอร์ถูกดีดออกจากดอกเห็ดและมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการงอก จะงอกเจริญไปเป็น เส้นใยระยะที่ 1 (primary mycelium หรือ monokaryotic mycelium) มีนิวเคลียสแบบแฮพลอยด์ (haploid) ไม่มี clamp connection เส้นใยระยะที่ 1ที่มีนิวเคลียสซึ่งมี incompatibility factor คนละชนิดมาพบกัน จะมีการรวมกันของไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสจากเซลล์หนึ่งไปรวมอยู่ในอีกเซลล์หนึ่ง กลายเป็นเส้นใยระยะที่ 2 (secondary mycelium หรือ dikaryotic mycelium) มีสภาพเป็น dikaryon (n+n) หรือ heterokaryon มีการสร้าง clamp connection ขึ้นในขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส (mitosis) ทำให้เส้นใยระยะที่ 2 นี้ แบ่งเซลล์ขยายออกไปได้เรื่อยๆ

2. ระยะดอกเห็ด

เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดดอกเห็ด เส้นใยระยะที่ 2 จะรวมตัวกันเกิดเป็นดอกเห็ด ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

2.1 หมวกดอก (pileus หรือ cap) ดอกเห็ดหอม กว้างประมาณ 5 - 12 เซนติเมตร มีรูปร่างนูนจนถึงเกือบแบนราบ 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 เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 – 13 มิลลิเมตร ขนาดเกือบเท่ากัน ตลอดความยาวของก้าน หรืออาจขนาดใหญ่กว่าตรงโคนก้าน เนื้อแข็งและเหนียว บริเวณผิวก้านมีเยื่อบางๆ คล้ายขนปกคลุม

ลักษณะสปอร์ของเห็ดหอม

ภายในเนื้อเยื่อของครีบในดอกเห็ด ซึ่งแต่ละเซลล์ประกอบด้วยสองนิวเคลียส จะมีการรวมกันของนิวเคลียสได้นิวเคลียสแบบดิพลอยด์ (2n) เฉพาะเซลล์ที่จะมีการเจริญไปเป็น basidium เท่านั้น และเกิดการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซีส (meiosis) ทันที ได้สี่นิวเคลียส เจริญเป็นสปอร์ซึ่งเรียกว่า เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) สปอร์กว้าง 5.5 – 6.5 X 3 – 3.5 ไมโครเมตร มีรูปร่าง subcylindric nonamyloid ผิวเรียบและมีผนังบาง หนึ่งเบสิเดีย (basidia) มีสี่เบสิดิโอสปอร์

สารออกฤทธิ์และสรรพคุณทางยาของเห็ดหอม

มีผู้ทดลองให้หนูกินเห็ดหอมแล้วพบว่า cholesterol ในเลือดลดลง (Kaneda et al.1964) ได้มีผู้วิจัยเรื่องนี้มาก Tokita และคณะ.(1972) ทดลองเลี้ยงหนูด้วยเห็ดหอมแห้ง พบว่า cholesterol ในเลือดลดลง และยังทดลองเลี้ยงด้วยเห็ดแห้งชนิดอื่นๆอีก เช่น เห็ดแชมปิยอง (*Agaricus bisporus*.) และเห็ดหูหนู (*Auricularia polytricha*.) ซึ่งก็ลด cholesterol ได้ โดยเห็ดแชมปิยองลดได้ดีกว่าเห็ดหูหนู ผู้วิจัยคณะนี้ได้สกัดสารจากเห็ดหอมทำให้บริสุทธิ์ หาสูตรได้เป็น $C_9H_{11}O_4N_6$ มีคุณสมบัติลด cholesterol (Hypocholesterolemic effect) ต่อมามีผู้เรียกชื่อสารนี้ว่า ERITADENINE และมีการทดลองสนับสนุนคุณสมบัติของสารนี้กับหนูอีกมาก (Takashima et al. 1973 : Yamamura , 1974) สถาบันทางโภชนาการของญี่ปุ่นได้ให้ความสนใจเห็ดหอมมาก Suzuki และ Ohshima (1974) จึงได้ทดลองกับคนได้ผลน่าพอใจว่า หญิงสาวที่ทานเห็ดหอมสด 90 กรัม ทุกวันเป็นเวลา 1 อาทิตย์ จะทำให้ cholesterol ในเลือดลดลง 12 เปอร์เซ็นต์ ถ้า

รับประทาน เห็ดหอมแห้ง 9 กรัมต่อวัน cholesterol ลดลง 7เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดลองกับคนอายุ 60 ปี พบว่า cholesterol ลดลง 9 เปอร์เซ็นต์ หลังจากทานเห็ด 1 อาทิตย์ Saitoh (1974) ศึกษาผลของ Eritadenine ต่อพวกไขมันในน้ำดีซึ่งออกมาจากตับพบว่า เมื่อให้ Eritadenine กับคนไข้ระดับ cholesterol ลดลงหลังจาก 7 วัน และมี bile acid สูงขึ้นซึ่งทำให้ cholesterol ละลายดีขึ้น

สถาบันมะเร็งแห่งชาติของประเทศญี่ปุ่นทำการวิจัยสารที่สกัดจากเห็ดหอม เห็ดแชมปิยอง และเห็ดอื่นอีก 3 – 4 ชนิด พบว่ามีสารที่สามารถต่อต้านเนื้องอกและมะเร็ง Chihara และคณะ (1969) และ Hamuro และคณะ (1974) รายงานถึงสาร LENTINAN เป็นสารประกอบพวก polysaccharide สามารถยับยั้งการเจริญของเนื้องอกชนิดหนึ่งซึ่งทำให้เกิดขึ้นในหนู (sarcoma – 180 transplanted mice) สารสกัดจากเห็ดหอมให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 80.7 เปอร์เซ็นต์

ได้มีการค้นพบมานานแล้วว่าสารสกัดจากเห็ดบางชนิดมีผลต่อต้านไวรัสที่ทำให้เกิดโปลิโอ และ ECHO ไวรัส (Cochran and Lucas , 1959 ; Goulet et al. 1960) ต่อมามีผู้ศึกษาว่าสารจากเห็ดหอมจะมีผลต่อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ Yamamura and Cochran (1974) เมื่อสกัดสารจากเห็ดหอมด้วยน้ำ แล้วแยก ได้สารชนิดหนึ่งให้ชื่อว่า Ac2P นำมาทดสอบความสามารถต่อต้านไวรัส (antiviral activity) กับไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ โปลิโอ และโรคอื่นๆ โดยทำในหลอดทดลองก่อน ได้ผลว่า Ac2P นี้สามารถต่อต้านไวรัสพวก myxovirus คือ RNA virus และเจาะจงเฉพาะไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ ต่อมานำมาทดลองกับหนูก็พบว่าระงับอาการของโรคได้อย่างดี Ac2P หยุดยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส แต่ยังไม่รู้กระบวนการแน่นอนและไม่เกี่ยวข้องกับการสร้าง interferon

Suzuki และคณะ (1974) ศึกษาสารต่อต้านไวรัสที่ได้จากเห็ดหอม แต่เขาคิดว่าสารนี้อยู่ที่สปอร์จึงทดลองสกัดสารจากสปอร์ด้วย phenol แล้วนำไปทดสอบกับหนูที่ทำให้เป็นโรคไข้หวัดใหญ่โดยไวรัส พบว่า สารนั้นช่วยให้หนูมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 60เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับสารซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 0 เปอร์เซ็นต์ สารที่สกัดมาได้นี้ มี RNA เขาจึงเรียกว่า “mushroom RNA” การทำงานต่อต้านไวรัสต่างจาก Lentinan โดย mushroom RNA จะชักนำให้เกิด interferon ยับยั้งมิให้ไวรัสเข้ารุกรานเซลล์พิสูจน์โดยฉีด mushroom RNA ให้กระต่ายแล้วตรวจเซรุ่มของเลือดก็พบสาร interferon

โพลีพลอยด์ในสิ่งมีชีวิต

โพลีพลอยด์ถือเป็นเรื่องธรรมดาที่เกิดขึ้นได้ง่ายและพบมากในธรรมชาติสำหรับพืช แต่สำหรับสัตว์มีเพียงไม่กี่สปีชีร์เท่านั้นที่รู้จัก เช่น Drosophila และ Salamander ในห้องทดลองเคยมีผู้สังเกตพบว่า เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์พบบ่อยครั้งที่เป็นโพลีพลอยด์

โพลีพลอยด์ แบ่งได้เป็น 2 ชนิดหลัก คือ

1. Aneuploidy คือ กรณีที่สิ่งมีชีวิติมีจำนวนโครโมโซมบางโครโมโซมในนิวเคลียสเพิ่มขึ้นหรือลดลงกว่าจำนวนปกติ (2n) ของสิ่งมีชีวิตนั้น เช่น สิ่งมีชีวิตที่มีโครโมโซมแท่งใดแท่งหนึ่งขาดหายไปหนึ่งแท่ง (2n – 1) เรียกว่า monosomic หากมีการเพิ่มขึ้นของโครโมโซมใดๆ หนึ่งแท่งจากปกติ (2n + 1) เรียกว่า trisomic ในสิ่งมีชีวิตที่เป็น tetrasomic คือมีการเพิ่มของโครโมโซมแท่งใดแท่งหนึ่งขึ้นอีกสองแท่ง (2n + 2) และหากเป็น (2n + 2 + 2) เรียกว่า double tetrasomic บางกรณีพบว่ามีการขาดหายไปของ homologous chromosome อย่างใดอย่างหนึ่ง (2n – 2) เรียกว่า nullisomic

2. Euploidy คือกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นหรือลดลงทั้งชุดของโครโมโซม เช่น monoploid มีหนึ่ง genome ต่อนิวเคลียส เป็นต้น หากมีการเพิ่มขึ้นของ genomes ที่เหมือนกันหรือใกล้เคียงกันมาก เช่นการเพิ่ม genomes ของตัวเอง เรียกว่า Autopolyploid แต่หากมีการเพิ่มขึ้นของ genomes จาก genomes ที่แตกต่างกัน เช่นมาจากต่างสปีชีร์ เรียกว่า Allopolyploid

อย่างไรก็ตามเป็นการยากที่จะแยกสิ่งมีชีวิตโพลีพลอยด์ ชนิดใดชนิดหนึ่งว่าเป็น Auto หรือ Allopolyploid

คุณสมบัติโดยทั่วไปของสิ่งมีชีวิตโพลีพลอยด์ (Dnyansagar,V.R. 1992.)

โดยทั่วไปมักจะเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตโพลีพลอยด์ กับสิ่งมีชีวิต diploids ตามลักษณะการแสดงออกที่มองเห็นเสมอ แต่ในความเป็นจริงการเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซม อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานพอๆกับลักษณะทางด้านกายภาพ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพตรวจสอบได้ยาก

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตโพลีพลอยด์ โดยทั่วไป

1. มีลำต้นหรือกอหนาแน่น และอวบใหญ่
2. มีใบกว้างหนา และเขียวเข้มกว่าเมื่อเทียบกับ diploid
3. ปากใบของพืชมักมีขนาดใหญ่กว่าต้น diploid
4. ขนที่พบตามลำต้นและใบจะดกและหยาบกว่าต้น diploid
5. โดยรวมแล้วจะเพิ่มขึ้นทั้งขนาดและความแข็งแรง ในทุกส่วนของต้น เช่น Nicotiana
6. ดอกและส่วนของดอกเพิ่มขนาดขึ้น เช่น Chrysanthemum
7. ละอองเกสรตัวผู้มีขนาดใหญ่กว่า
8. พืช โพลีพลอยด์ ส่วนใหญ่มักมีผลขนาดใหญ่ขึ้น เช่น แอปเปิ้ล
9. เมล็ดมักมีขนาดใหญ่กว่า

10. การเกิดโพลีพลอยด์ มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของสิ่งมีชีวิตด้วย อาจมีความผิดปกติในการแบ่งแบบไมโอซิส ทำให้เป็นหมัน นักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงใช้ประโยชน์ในเรื่องนี้สร้างสายพันธุ์พืชที่ไม่มีเมล็ด เช่น แตงโมไม่มีเมล็ด
11. จำนวนดอกต่อต้นจะลดลง
12. ท่อลำเลียงน้ำ (xylem) ในลำต้นมีขนาดใหญ่
13. ขนาดของนิวเคลียสมีขนาดใหญ่กว่า เมื่อเทียบกับ diploid

ลักษณะทางสรีระวิทยาของสิ่งมีชีวิตโพลีพลอยด์ โดยทั่วไป

1. เคยมีผู้สังเกตว่า อัตราการเจริญเติบโตของพืช Autotetraploids ช้ากว่าเมื่อเทียบกับพืช diploid
2. ออกดอกช้ากว่าพืช diploid
3. เคยพบว่าปริมาณ nectaric เพิ่มขึ้น ในมะเขือเทศ tetraploids
4. พบว่าปริมาณ Ascorbic acid เพิ่มขึ้นในมะเขือเทศและกระหล่ำปลี tetraploids
5. พบว่าปริมาณโดยรวมของ Alkaloid เพิ่มขึ้น ใน Autotetraploids ของ *Rauvolfia scrpentina.*
6. มีผู้สังเกตพบว่าเปอร์เซ็นต์ รวมของ Na Ca K และ Mg เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม คาร์โบไฮเดรต และ Sulphur กลับลดลง
7. ในข้าวโพด tetraploids พบว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตมีวิตามินเพิ่มขึ้น ในขณะที่องุ่น tetraploids มีปริมาณ riboflavin และ pantothenic acid เท่าๆกับ diploid
8. Osmotic concentration ของเซลล์ โพลีพลอยด์ สูงกว่า diploid
9. ปริมาณน้ำในเซลล์จะเพิ่มขึ้นตามขนาดของเซลล์ การเพิ่มขึ้นนี้ทำให้โพลีพลอยด์ มีความต้านทานการเป็นน้ำแข็งน้อยกว่า เมื่อเทียบกับ diploid

ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโพลีพลอยด์

1. โพลีพลอยด์ คือสิ่งมีชีวิตที่มี Allelomorphic genes มากกว่าสอง
2. โพลีพลอยด์ ที่เป็น Autotetraploids มีความเสถียรทางพันธุกรรมมากกว่า diploid เพราะ การแยกกันอย่างอิสระของโครโมโซมใน Autotetraploids มีผลทำให้ recessive types มีความถี่ที่เกิดขึ้นน้อยกว่า diploid
3. อัตราการกลายพันธุ์ในโพลีพลอยด์ น้อยกว่าเมื่อเทียบกับ diploid โดยหลักวิวัฒนาการ สปีชีร์ที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าถูกพิจารณาว่าเป็นสปีชีร์ ที่มีวิวัฒนาการสูงกว่า พืชที่มีจำนวนโครโมโซมมากๆ ถูกสันนิษฐานว่าเกิดจากพืชชนิดนั้นเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเอง หรือเกิดจากผสมกับโครโมโซมของพืชชนิดอื่น

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์

นอกจากโพลีพลอยด์ จะเกิดขึ้นตามธรรมชาติแล้ว อาจเกิดได้โดยการชักนำให้เกิด เช่น การขยายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และโดยฝีมือมนุษย์อีกด้วย ได้แก่ การใช้รังสี ความร้อน ความเย็น (environmental shock) หรือสารเคมี (สาริณี , 2538)

สารเคมีที่ใช้ชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในพืชได้แก่

Colchicine

Ethylmethane – sulphonate (EMS)

N-ethyl-N-nitrosourea (NE)

N-methyl-N-Nitro-N-Nitrosoquanidine (NG)

Benzene paradichlorobenzene

8 – bromonaphthalene

8 – oxyquinoline

5 – agacytidine

nitrogendioxide

ยาฆ่าแมลงบางชนิด เช่น lindane

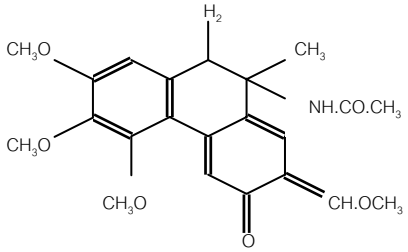
สารเคมีที่นิยมใช้กันแพร่หลายมากที่สุด คือ โคลชิซิน

การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ด้วยโคลชิซิน

โคลชิซิน เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ดีในพืชหลายชนิด หาซื้อได้ง่ายและไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในด้านอื่นๆ สารนี้จะทำให้โครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายในโครโมโซม แต่จะไปยับยั้งการเจริญของ spindle fiber ในกระบวนการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสหรือไมโอซิส การแยกตัวของ โครมาติดช้าลง ไม่มีการเคลื่อนที่ของโครโมโซมในระยะแอนาเฟส ทำให้โครโมโซมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (Dermen , 1940 , Eigsti and Dustin , 1955) สารนี้จะมีผลต่อเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวเท่านั้น จึงมักนิยมใช้สารนี้กับ ตา ยอดอ่อน ต้นอ่อน และเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Hagino et al , 1978)

คุณสมบัติของโคลชิซิน

โคลชิซิน เป็นสารประเภทอัลคาลอยด์ (alkaloid) มีผลึกเป็นรูปเข็ม ไม่มีสี แต่จะมีสีเข้มขึ้น (สีเหลืองอ่อน) เมื่อถูกแสง น้ำหนักโมเลกุล 399.43 จุดหลอมเหลว 155-157 °C สูตรโมเลกุล $C_{22}H_{25}NO_6$ และมีสูตรโครงสร้างโมเลกุลดังนี้ (รูปที่ 2)

สูตรโครงสร้าง 

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน

ที่มา : (Eigsti and Dustin , 1955 ; King and Stansfield , 1990)

โคลชิซิน มีคุณสมบัติเป็นด่างอ่อนหรือเป็นกลาง (Husscin and Narsa , 1974) จึงไม่สามารถทำปฏิกิริยากับกรด เพื่อให้เกิดเกลือของอัลคาลอยด์ ซึ่งแตกต่างจากอัลคาลอยด์ชนิดอื่น แต่ก็ถูกจัดว่าเป็นอัลคาลอยด์ เพราะสามารถตกตะกอนกับสารที่ใช้ทดสอบอัลคาลอยด์ได้ (alkaloidal reagent) หลายตัว (เอกรินทร์ , 2525) ละลายได้ดีในอัลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และในน้ำเย็น ละลายได้น้อยในน้ำอุ่น น้ำร้อน เบนซิน และอีเทอร์แทบจะไม่ละลายเลย เป็นสารที่สกัดได้จากส่วนของเมล็ดกับหัวของ autumn crocus (*Colchicum autumnale.* Linn) และใน Colchicum อีกหลายชนิด เช่น *C.luteum* . Baker. *Gloriosa superba* Linn. (Eigsti and Dustin , 1955)

สารโคลชิซินมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้าง spindle fiber ในขณะที่นิวเคลียสมีการแบ่งตัวทำให้เซลล์หยุดอยู่ที่ระยะเมทาเฟส (Eigsti et al , 1949) และจะทำให้เกิดการสร้าง autopolyploid nuclei ในเวลาต่อมา ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในห้องปฏิบัติการ ในการศึกษาโครโมโซมและชักนำให้มีการเพิ่มชุดของโครโมโซม เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ดีทางเศรษฐกิจ ส่วนใหญ่มักใช้ในพืช เช่น แตงโมที่เป็น โพลีพลอยด์ จะมีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูงกว่า diploid (ดำรง สินไชย , 2521) กล้วยไม้ที่เป็น tetraploid จะมีกลีบดอกขนาดใหญ่ ทำให้บานได้นาน (สาริณี ไชยเจริญ , 2538)

การใช้สารละลายโคลชิซินในเห็ดรา

มีรายงานผลการวิจัยการชักนำให้เกิด โพลีพลอยด์ ใน *Agaricus bisporus*. ด้วยโคลชิซิน โดยใช้กับ basidiospore โปรโตพลาสต์ และส่วนของเส้นใย เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ความเข้มข้น 100 – 1,500 µg/ml พบว่าโปรโตพลาสต์เพียงอย่างเดียวเท่านั้นที่มีปริมาณ DNA เพิ่มขึ้นมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่หลายเท่าตัว ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากการเพิ่มจำนวนของโครโมโซม เนื่องจากถูกชักนำด้วยโคลชิซิน (Handa et al , 1997)

Sarangbin , S. และคณะ. (1994) ทดลองชักนำให้เกิด autopolyploid กับ *Aspergillus niger.* wu – 2223 L ด้วย โคลชิซิน ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดซิตริก พบว่า สายพันธุ์โพลีพลอยด์ ให้ผลผลิตกรดซิตริก มากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ถึง 1.4 เท่า เมื่อให้น้ำแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อนำสายพันธุ์ที่เป็นโพลีพลอยด์มาชักนำให้กลับเป็น haploid ด้วย benomyl พบว่า

ประสิทธิภาพการผลิตกรดซิตริกจะกลับมาเท่ากับสายพันธุ์พ่อแม่เช่นเดิม แสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดซิตริกเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเพิ่มของชุดโครโมโซม ไม่ใช่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดซิตริก เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยโคลชิซิน

Toyama,H.และ Toyama,N. (1994) พบนิวเคลียสที่มีขนาดเล็กกว่าปกติ เรียกว่า smaller nuclei จากการชักนำให้เกิด Autopolyploid ด้วย โคลชิซิน กับ *Pleurotus ostreatus* .จากกลุ่มเส้นใย

Toyama,H.และ Toyama,N. (1995) ทดลองชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ ด้วยโคลชิซิน กับเส้นใย *Trichoderma reesei*. QM 9414 พบว่าพวก diploid มีการผลิต cellulase เพิ่มขึ้นเกือบเป็น 2 เท่าของสายพันธุ์เดิม แต่ binucleate conidia ที่เป็น tetraploids ไม่มีการผลิต cellulase เพิ่มขึ้น และเมื่อนำ tetraploids นี้ไปชักนำด้วย โคลชิซิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ อีกครั้งจึงเกิด multiple nuclei ที่ผลิต cellulase มากกว่า binucleate tetraploids เดิม และ diploid แสดงให้เห็นว่า multinucleation technique มีส่วนช่วยให้มีการเพิ่มการผลิต cellulase

Toyama,H.และ Toyama,N. (1995) ทดลองชักนำให้เกิด โพลีพลอยด์ กับ *Trichoderma reesei* .ด้วย โคลชิซิน เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดโครงสร้างคล้าย Micronucleus ซึ่งมี ส่วนประกอบของดีเอ็นเอ เฉลี่ย 30 เปอร์เซ็นต์ ของนิวเคลียสปกติ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่า nuclei เหล่านี้เป็น aneuploid nuclei ซึ่งอาจนำไปทำประโยชน์ในการถ่ายยีน transformation กลุ่ม DNA ที่มีประโยชน์ไปสู่ protoplast ได้

เส้นใยของ เห็ดหอม. เป็น binucleate ดังนั้นหากเหนี่ยวนำให้เกิด โพลีพลอยด์ ได้ยิ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพื่อจะได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติดีขึ้น และเป็นพื้นฐานในการทำวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไป งานวิจัยที่เกี่ยวกับ โพลีพลอยด์ ในรา โดยเฉพาะ ใน class Basidiomycetes ยังมีน้อยมาก (Toyama,H.and Toyama,N. ,1995) ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงพยายามที่จะชักนำให้เกิดมิวเทชัน ด้วยสารโคลชิซิน ในเห็ดหอมขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบกลับ (inverted microscopes) รุ่น Wilover 5 ของบริษัท Hund,Germany
2. เครื่องชั่ง (balance) แบบละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น 80 A-200M ของบริษัท Precisa,Switzerland
3. กล้องจุลทรรศน์
4. micrometer ของบริษัท Nikon,Japan
5. เทอร์โมมิเตอร์
6. Multi-Purpose light Microscope บริษัท Olympus
7. ฟิล์มสี ฟูจิ ISO 200
8. ฟิล์ม Instant Black and White FP-3000 B ฟูจิ
9. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
10. microcentifuge
11. เครื่อง thermocycler สำหรับ PCR
12. ชุดแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า
13. กล้องถ่ายภาพโพลาลอยด์

เส้นใยที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อเห็ดหอม สายพันธุ์ L074 จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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. โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate : KH_2PO_4 ของบริษัท May and Baker Laboratory,England
4. แมกเนเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate : $MgSO_4$ ของบริษัท May and Baker Laboratory,England
5. ผงสกัดยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories,U.S.A.
6. วุ้นผง (agar) ของบริษัท Difco Laboratories,U.S.A.

7. โพรพิเดียมไอโอไดด์ (Propidium Iodide , PI) ของบริษัท Sigma Chemical,U.S.A.
8. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท May and Baker Laboratory,England
9. เอนไซม์ RNase A ของบริษัท Sigma Chemical,U.S.A.
10. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Difco Laboratories,U.S.A.
11. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของบริษัท May and Baker Laboratory,England
12. โปแตสเซียมครอไรด์ (KCl) ของบริษัท May and Baker Laboratory,England
13. ดีเอ็นเอ เอ็กซ์แทร็กชั่น บัฟเฟอร์ (DNA extraction buffer (CTAB))
14. 1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์
15. 0.5 โมลลาร์ อีดีทีเอ (EDTA)
16. ทีอี แซททูเรต ฟีนอล (TE saturated phenol)
17. คลอโรฟอร์ม / ไอโซเอมิลอัลกอฮอล์
18. ฟีนอล / คลอโรฟอร์ม
19. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol)
20. ทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer)
21. 50 X TAE buffer
22. Loading buffer
23. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Et Br solution)
24. 7.5 M อัมโมเนียมอะซิเตต (7.5 M Ammonium Acetate)
25. ผงอะกาโรส (Agarose powder)
26. 10 X แท็ค ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส บัฟเฟอร์ (10X Tag DNA Polymerase buffer)
27. แท็ค ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (Tag DNA Polymerase)
28. dNTP
29. ไพรเมอร์ (Primer) บริษัท แปซิฟิค ไซเอ็นซ์ จำกัด

<u>วิธีการวิจัย</u>

1. การเตรียมเส้นใย

ใช้เส้นใยเห็ดหอม สายพันธุ์ L074 จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงเส้นใยในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เส้นใยเจริญเติบโตแข็งแรง และขยายเส้นใยเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยจะเรียก เส้นใยสายพันธุ์เริ่มต้นนี้ว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมในการกล่าวในหัวข้อต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การแยกเซลล์เดี่ยวโดยใช้สปอร์ไม่อาศัยเพศ (oidia)

นำเส้นใยเห็ดหอม L074 เลี้ยงบนอาหารแข็ง LcA (ภาคผนวก ก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สังเกตการสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 10 วัน

3. การแยกเซลล์เดี่ยวจากโคโลนีเห็ดหอม

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมบนอาหาร PDA ใน Petri-dish ที่อุณหภูมิห้อง

3.1 พฤติกรรมการเจริญของเส้นใยเห็ดหอม

สังเกตลักษณะและตำแหน่งของการเกิดเส้นใย กิ่ง ลักษณะและตำแหน่งของการเกิด clamp connection วัดขนาดของเส้นใย กิ่ง และตำแหน่งของเส้นใย กิ่งและ clamp connection จับเวลา บันทึกผล

3.2 การตัดเส้นใยให้ได้เซลล์เดี่ยว

ทดลองตัดเส้นใยที่ตำแหน่งเซลล์ที่สองนับจากปลายเส้นใยบน PDA ที่ความยาวของเส้นใย กิ่งขนาดต่างๆ เพื่อหาความเหมาะสมในการแยกเซลล์เดี่ยว ที่ทำให้เกิดเซลล์เดี่ยวรอดชีวิต และมีระยะเวลาในการแบ่งเซลล์หลังตัดคงที่

3.3 การย้ายเซลล์เดี่ยว

ทดลองย้ายเซลล์เดี่ยวบน PDA จาก Petri-dish หนึ่งไปยังอีก Petri-dish หนึ่ง บันทึกวิธีและจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต

4. หาภาวะที่เหมาะสมเพื่อชักนำเซลล์เห็ดหอมให้เกิดโพลีพลอยด์ด้วยโคลชิซิน

4.1 หาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์เห็ดหอมต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ด้วยโคลชิซิน

วางเซลล์เดี่ยวที่ได้ตามข้อ 3.3 บนอาหาร PDA ที่มีสารโคลชิซิน เข้มข้น 450, 990, 1290, 1500, 1725, 1875 และ 2025 µg/ml วัดอัตราการเจริญเติบโตและการอยู่รอดเทียบกับ control ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ทำ 3 ซ้ำ

4.2 ศึกษาผลกระทบของโคลชิซินต่อเจริญเติบโตของเส้นใย

วางแผ่น PDA ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรที่มีเส้นใยเห็ดหอมเจริญอยู่เต็มแล้ว บนอาหารเลี้ยงเส้นใยที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ดังต่อไปนี้

1. สารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 15 µg/µl (1.5 เปอร์เซ็นต์)
2. น้ำกลั่น
3. วุ้น (agar)
4. อาหารแข็ง PDA
5. อาหารเหลว PDB

ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน สังเกตบันทึกผล ทำ 3 ซ้ำ

4.3 การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์กับเซลล์เดี่ยวด้วยสารโคลชิซิน เข้มข้น 15 µg/µl

วางเซลล์เดี่ยวที่ได้ตามข้อ 3.3 บน Petri-dish เปล่า หยดสารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 15 µg/µl บนเซลล์ด้วย dropper จำนวน 2 หยด ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นหยดล้างเซลล์และแช่ชิ้น PDA ที่มีเซลล์อยู่ด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงย้ายวางลงใน Petri-dish ที่มีอาหาร PDA ปกติ เก็บเซลล์ที่รอดและขยายเส้นใยต่อไป

5. การตรวจสอบสายพันธุ์โพลีพลอยด์

5.1 วัดอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยใน PDA ของสายพันธุ์ทดลอง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

โดยย้ายสายพันธุ์ทดลอง จากอาหาร PDA โดยการเจาะด้วย cork borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางบนอาหาร PDA กลาง Petri-dish สายพันธุ์ละ 5 Petri-dish วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลองแบบ RBD วัดรัศมีของเส้นใยทุกวันจนเต็ม Petri-dish บันทึกและเปรียบเทียบผล

5.2 หาปริมาณ DNA ของสายพันธุ์ทดลอง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

5.2.1 เปรียบเทียบปริมาณ DNA ด้วยวิธีวัดความเข้มแสงของ Propidium Iodide

เลี้ยงเส้นใยแต่ละสายพันธุ์ด้วย PDA บนแผ่น cover glass จนเส้นใยเจริญเกินออกจากอาหาร PDA อยู่บนแผ่น cover glass ส่วนหนึ่งจึงแยกส่วนที่เป็น PDA ทิ้งไป คงเหลือแต่เส้นใยส่วนเกินอยู่บนแผ่น cover glass เท่านั้น นำเส้นใยบน cover glass แช่ใน ethyl alcohol 80 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำเส้นใยมาล้างด้วย PBS buffer 2 ครั้ง แล้วย่อยด้วย RNase A 5 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Propidium Iodide (PI) 100 µg/ml ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปถ่ายรูปผ่านแสง UV ค่า Excitation wavelength = 530 nm Emission wavelength = 615 nm ด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อนำไปวัดความเข้มของแสงที่ได้จากนิวเคลียส เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

5.2.2 เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสง ($OD_{260\ nm}$)

5.2.2.1 เปรียบเทียบขนาดและลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ทดลอง

วางแผ่น PDA ที่มีเส้นใยเจริญอยู่เต็มแล้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บนอาหาร PDB ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเส้นใยโดยไม่

เขย่า เป็นเวลา 10 วัน นำเส้นใยของแต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบลักษณะและขนาดเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ่ายภาพ

5.2.2.2 สกัดดีเอ็นเอและวัดการดูดกลืนคลื่นแสง UV (OD_{260nm}) ของเส้นใยสายพันธุ์ ทดลอง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ทดลอง ทุกสายพันธุ์ด้วยอาหารเหลว PDB ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 วัน โดยไม่เขย่า นำเส้นใยที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น อบเส้นใยให้แห้งใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักและอบต่อไปจนชั่งน้ำหนัก 3 ครั้งสุดท้ายน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง จึงเก็บเส้นใยใน Desicator หลังจากนั้นจึงชั่งน้ำหนักอย่างรวดเร็ว สายพันธุ์ละ 20 มิลลิกรัม ที่เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอต่อไป สกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีของ Stewart และ Via (1993) (ภาคผนวก ก) นำดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ ด้วย ทีอี บัฟเฟอร์ แล้ววัดการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่นแสง 260 280 และ 320 นาโนเมตร ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่า OD_{260} : OD_{280} เท่ากับ 1.7-1.9 จากนั้นหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากการวัดค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอในช่วงแสงอุลตร้าไวโอเลตความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยค่า OD_{260} เท่ากับ 1 จะเท่ากับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 µg/ml นำค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ของแต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ทำ 3 ซ้ำ

5.2.3 เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากวิธี PCR

ตรวจหายีนที่อยู่ใน *Lentinus edodes*. ที่เป็นยีนเดี่ยวได้หนึ่งยีน คือ“nuclease Le I” Protein-id “BAA94694.1” ที่มีขนาด 1,618 bp ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Gene Fisher Version 1.22 คงเหลือขนาดยีนในขั้นตอน PCR เท่ากับ 900 bp ไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่ ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

Sequence (5’→ 3’) 22 bp

ATGAGGTTGACAGTGACTTTGG

TGCAGTGGTTGACCAATATCAC

เติมส่วนประกอบสำหรับปฏิกิริยา PCR (ภาคผนวก) ในไมโครทิวบ์ที่แช่บนน้ำแข็ง ปิดฝาและปั่นเหวี่ยงเบาๆเพื่อให้สารละลายไม่ติดข้างหลอดนำไปใส่เครื่อง thermocycler สำหรับ PCR แต่ละรอบของ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

หาจำนวนรอบของ PCR โดยเก็บตัวอย่าง PCR producted ทุกรอบ PCR ตั้งแต่รอบที่ 24 ถึง 31 และตรวจความเจือจางของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุด ที่สามารถตรวจพบได้ เมื่อนำผลผลิตที่ได้แต่ละตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาแยกด้วยเครื่องแยกดีเอ็นเอ ด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ อะกาโรสเจล เข้มข้น 1%ใน DNA running buffer (1 x TAE) ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบ ดีเอ็นเอ โดยย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ มองเห็นโดยผ่านแสงอุลตร้าไวโอเลต ถ่ายรูปด้วยฟิล์มโพลาลอยด์ บันทึกจำนวนรอบของ PCR ที่แสดงผลได้ใน อะกาโรสเจลของแต่ละตัวอย่าง ในการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอที่เท่ากัน ใช้ในการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นของแต่ละตัวอย่าง

5.2.4 วัดปริมาณผลผลิตของสายพันธุ์ทดลอง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

นำเส้นใยของสายพันธุ์ทดลอง ทุกสายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ตัดแบ่งย้ายลงในขวดอาหารหัวเชื้อข้าวฟ่าง (ภาคผนวก) เก็บไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องจนเส้นใยเดินเต็มขวดหัวเชื้อ จึงย้ายลงในถุงอาหารขี้เลื่อยขนาด 300 กรัม (ภาคผนวก) สายพันธุ์ละ 50 ถุง เก็บไว้ในห้องมืด อุณหภูมิ 25 – 27 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเส้นใยเดินเต็มถุง และเกิดแผ่นผนังสีน้ำตาลเข้มประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ จึงนำมาเปิดถุงออก วางไว้ในที่มีแสงประมาณ 10 ลักซ์ (Lux) อากาศถ่ายเท ความชื้น 80 – 90 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิห้อง โดยวางก้อนเชื้อแบบ Randomized Complete Block Design ฉีดพ่นน้ำวันละ 3 – 5 ครั้ง จนเกิดดอกเห็ด เก็บดอกเห็ดที่มีลักษณะขอบหมวกดอกยังไม่บานออก ชั่งน้ำหนักแต่ละสายพันธุ์แล้วหารด้วยจำนวนถุงของสายพันธุ์นั้น ให้ได้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักดอกต่อถุงเพาะ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม บันทึกผล

5.2.5 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ทดลอง กับสายพันธุ์ดั้งเดิม

สังเกตสี รูปร่างของดอกและวัดขนาดของหมวกดอก ก้านดอก หาค่าเฉลี่ยของแต่ละสายพันธุ์ เปรียบเทียบ บันทึกผล

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การเตรียมเส้นใย

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหอม *Lentinus edoes* (Berk.) Sing. สายพันธุ์ L074 จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ให้เส้นใยเจริญเติบโตแข็งแรง เพื่อนำมาศึกษาในขั้นต่อไป

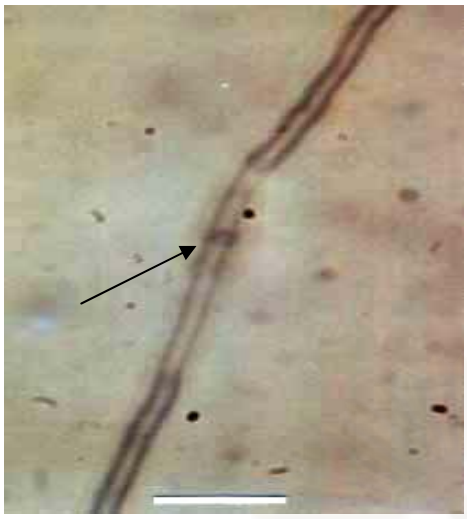
2. การแยกเซลล์เดี่ยวโดยการใช้สปอร์ไม่อาศัยเพศ

จากการศึกษาเลี้ยงเส้นใย L074 บนอาหารแข็ง LcA ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 10 วัน ไม่พบการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเลย

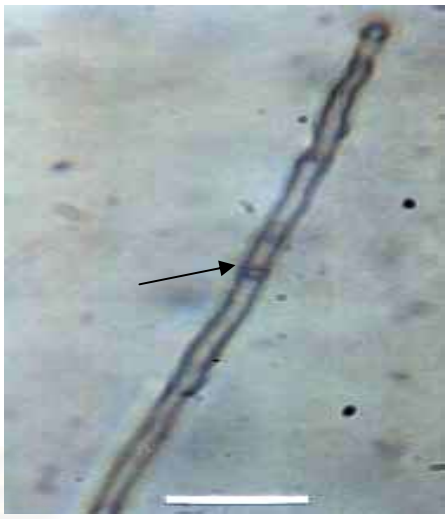
3. การแยกเซลล์เดี่ยวจากโคโลนี

3.1 ศึกษาพฤติกรรมการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ L074 บน PDA

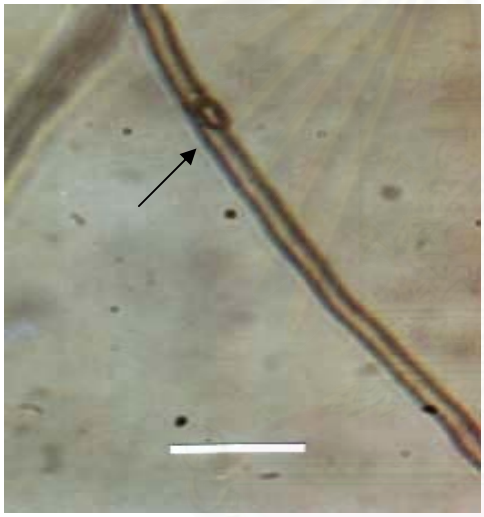
จากการศึกษาพฤติกรรมการเจริญของเส้นใยบนอาหาร PDA ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า การแบ่งเซลล์จะเริ่มขึ้นเมื่อเส้นใยมีความยาวประมาณ 450-700 µm โดยเริ่มสร้าง clamp connection เพื่อเป็นท่อส่งผ่านนิวเคลียสขณะแบ่งนิวเคลียส ใช้เวลาในการสร้าง clamp connection นับจากเกิดตุ่มเล็กๆ พอสังเกตได้ (ดังรูปที่ 3 - 4 ลูกศรชี้) จนงอกยาวมาจรดกับตัวเซลล์ด้านล่าง (นับจากปลายเซลล์) (ดังรูปที่ 5 – 7) ประมาณ 20 นาทีต่อมาจะเกิดผนังกั้นระหว่างเซลล์ตรงบริเวณ clamp connection เองประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นประมาณ 70-90 นาที จะมีการสร้างกิ่งที่บริเวณใต้ clamp connection ที่เกิดขึ้นใหม่ (ดังรูปที่ 8) และเมื่อกิ่งยาวออกไปจนมีขนาดพอเหมาะประมาณ 110 µm ก็จะเกิด clamp connection เพื่อแบ่งเซลล์ออกไปจากเส้นใยต่อไป เช่นเดียวกับเส้นใยหลักที่ยาวขึ้นไปทางด้านขอบของโคโลนี เมื่อได้ขนาดเหมาะสมก็จะแบ่งเซลล์โดยการสร้าง clamp connection ใหม่อีกครั้ง ซึ่งการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งของเส้นใยหลักจะห่างกัน ประมาณ 2 ½ ชั่วโมง ถึง 3 ชั่วโมง



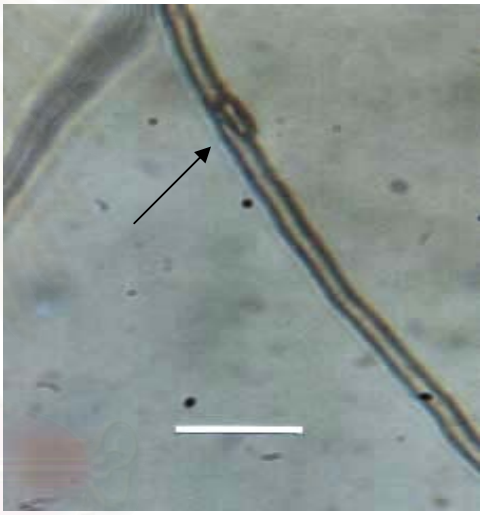
รูปที่ 3 จุดกำเนิด clamp connection



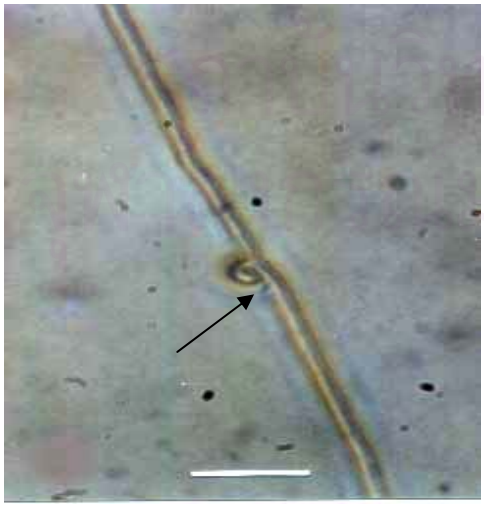
รูปที่ 4 จุดกำเนิด clamp connection



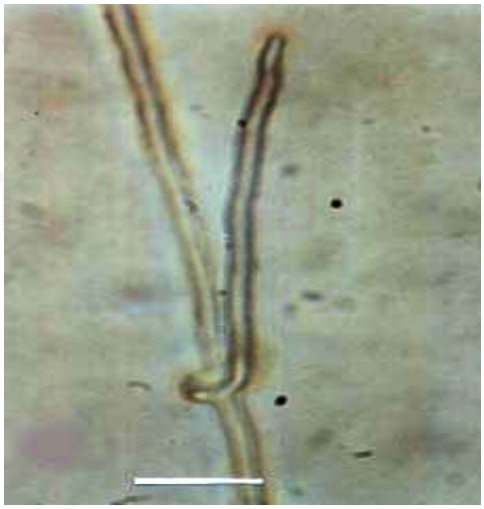
รูปที่ 5 การเจริญของ clamp connection



รูปที่ 6 การเจริญของ clamp connection



รูปที่ 7 clamp connection โค้งลงจรดกับตัวเซลล์



รูปที่ 8 การสร้างกิ่งใหม่ใต้ clamp connection

scale bar = 10 ไมโครเมตร

3.2 การตัดเส้นใยให้ได้เซลล์เดี่ยวที่ต้องการ

จากการทดลองตัดเส้นใยต่ำกว่า clamp connection แรก นับจากปลายเส้นใยลงมาประมาณ 200 µm หรือตำแหน่งเซลล์ที่ 2 (ภาคผนวก ข) พบว่าแบ่งผลได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เส้นใยที่ยังไม่มีกิ่งงอกออกมา

กลุ่มที่ 2 เส้นใยที่มีกิ่งแล้ว ตั้งแต่เริ่มงอกจนถึงยาวต่ำกว่า 30 µm

กลุ่มที่ 3 เส้นใยที่มีกิ่งยาว 30 µm จนถึง 100 µm

เส้นใยในกลุ่มที่ 1 พบว่ามีเซลล์ที่รอดชีวิตเพียง 1 เซลล์ หลังจากตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวจำนวน 8 เซลล์ หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอด 12.5 เปอร์เซ็นต์

เส้นใยในกลุ่มที่ 2 พบว่ารอดถึง 15 เซลล์ หลังจากตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวจำนวน 19 เซลล์ หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอด 79 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญและแบ่งเซลล์ต่อไปได้ แต่ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ใหม่แตกต่างกันมาก ตั้งแต่ 50 นาที จนถึง 2 ชั่วโมง หลังจากตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยว โดยเวลาที่มีความถี่ของเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์ใหม่มากที่สุด คือ 70 นาที ประมาณ 53.33 เปอร์เซ็นต์

เส้นใยในกลุ่มที่ 3 พบว่ารอดถึง 57 เซลล์ หลังจากตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวจำนวน 58 เซลล์ หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์รอด 98.30 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ของเซลล์ใหม่หลังตัดค่อนข้างคงที่ คือ ใช้เวลา 70 นาที เป็นจำนวน 40 เซลล์ จากการทดลองตัด 58 เซลล์ หรือคิดเป็น 70.17 เปอร์เซ็นต์ (ดังตารางที่ 1) หลังจากตัดแยกเซลล์เดี่ยวแล้วกิ่งจะสลายตัวไปในที่สุด (ดังรูปที่ 12) ทำให้ได้เซลล์เดี่ยวตามต้องการ ในการทดลองต่อไปนี้จะใช้ลักษณะเส้นใยและข้อมูลในการตัดแบ่งเซลล์เดี่ยวดังในกลุ่มที่ 3 ในการทดลองต่อไป รูปการตัดเซลล์ (รูปที่ 9 – 12) การตัดเส้นใยทั้ง 3 กลุ่มได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

รูปที่ 9 ลักษณะเส้นใยที่เหมาะสมในการตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยว

รูปที่ 10 ขณะตัดแยกเซลล์เดี่ยว (ใบมีดลูกศรชี้) scale bar = 10 ไมโครเมตร

รูปที่ 11 เซลล์เดี่ยวหลังตัด

รูปที่ 12 เส้นกิ่งสูญเสียน้ำหลังตัด (ลูกศรชี้)

scale bar = 10 ไมโครเมตร

3.3 การย้ายเซลล์เดี่ยว

จากการทดลองย้ายเซลล์เดี่ยวพบว่า วิธีที่ง่ายที่สุดคือการใช้ด้านบนของใบมีดที่ตัดเส้นใยตักช้อนส่วนปลายของเซลล์ เพื่อเคลื่อนย้ายไปสู่ตำแหน่งอื่นที่ต้องการ ซึ่งการทดลองนี้ต้องย้ายเซลล์เดี่ยวที่ตัดแล้วไปยังอาหาร PDA ของ Petri-dish อื่น เพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป ผลการย้ายเซลล์เดี่ยวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ตักย้ายเซลล์เดี่ยวจาก Petri-dish ที่ตัดแยกเซลล์ไปวางบน PDA ของ Petri-dish ใหม่โดยตรง ผลที่ได้จากการทดลองย้าย 15 เซลล์ พบว่า ไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตรอดหลังจากเลี้ยงใน PDA เป็นเวลา 5 วัน

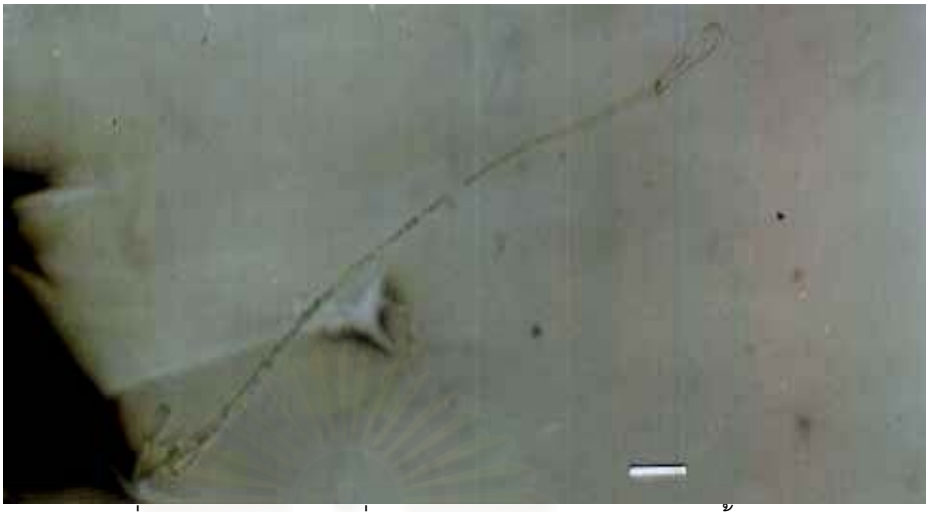
กลุ่มที่ 2 ตักย้ายเซลล์เดี่ยวจาก Petri-dish ที่ตัดแยกเซลล์โดยวิธีการลากเซลล์ไปบนผิวหน้าของ PDA ไปวางห่างจากขอบ colony แล้วตัดชิ้น PDA ที่มีเซลล์เดี่ยววางอยู่นี้ ย้ายไปวางบน PDA ใน Petri-dish ใหม่ จากการย้ายเซลล์เดี่ยว 15 เซลล์ พบว่ารอดตายและสามารถเจริญเติบโตได้ 14 เซลล์ รูปการวางเซลล์เดี่ยว (รูปที่ 13 – 15)

ตารางที่ 1 ผลการตัดเส้นใยของเห็ดหอม L074 เพื่อแยกเป็นเซลล์เดี่ยว

ความยาวกิ่ง (ไมครอน)	จำนวนเซลล์ที่ตัด	จำนวนเซลล์ที่ตาย	เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอด	จำนวนเซลล์ที่ใช้เวลาในการเริ่มแบ่งเซลล์หลังตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยว								เปอร์เซ็นต์เซลล์เดี่ยวที่แบ่งเซลล์หลังตัดที่เวลา 70 นาที
				50 นาที	60 นาที	70 นาที	80 นาที	90 นาที	100 นาที	110 นาที	120 นาที	
0	8	7	12.5	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0-<10	9	3	66.67	1	0	2	0	0	0	2	1	33.33
10-<20	2	0	100	0	0	1	1	0	0	0	0	50
20-<30	8	1	87.5	0	0	5	0	0	1	0	1	71.43
30-<40	8	0	100	0	0	6	1	0	0	1	0	75
40-<50	14	0	100	0	0	12	0	0	0	2	0	85.71
50-<60	15	0	100	1	1	11	2	0	0	0	0	73.33
60-<70	7	0	100	1	1	5	0	0	0	0	0	71.43
70-<80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80-<90	8	0	100	2	0	5	0	0	0	0	0	62.5
90-100	6	1	83.33	1	3	1	0	0	0	1	0	20
รวม	85	12	85.88	6	5	48	4	1	1	6	2	65.75

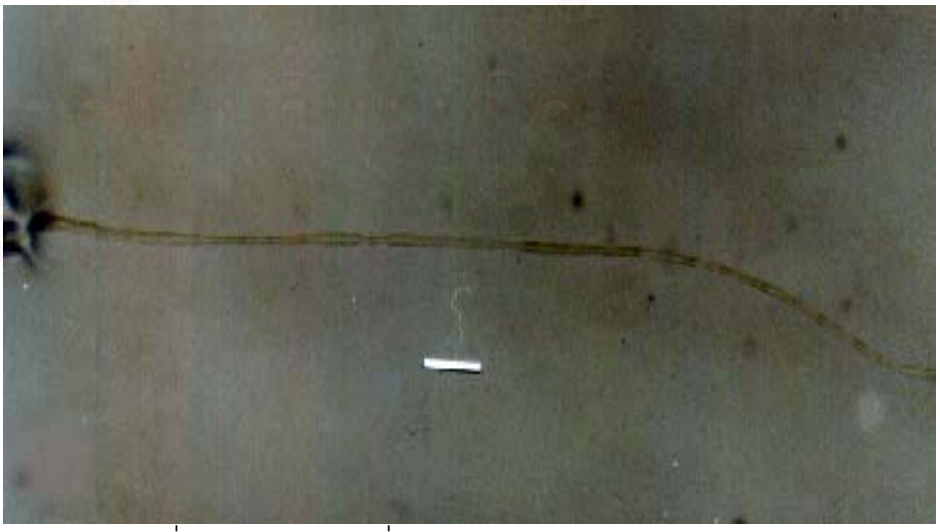
ตารางที่ 2 สรุปผลการตัดเส้นใยตามขนาดความยาวเส้นกิ่งแบ่งตามกลุ่ม

กลุ่มเซลล์เดี่ยว / ผลที่ได้หลังแยกเซลล์เดี่ยว	เซลล์เดี่ยวกลุ่มที่ 1 (ยังไม่มีกิ่ง)	เซลล์เดี่ยวกลุ่มที่ 2 กิ่งยาว 0 – <30 ไมโครเมตร	เซลล์เดี่ยวกลุ่มที่ 3 กิ่งยาว 30 – 100 ไมโครเมตร
เซลล์เดี่ยวที่รอดชีวิต	26.5 %	79%	98.30%
ระยะเวลาในการเริ่มแบ่งเซลล์ใหม่	ไม่แน่นอน	กว้าง ไม่แน่นอน 50 นาที – 2 ชั่วโมง	ค่อนข้างคงที่ ที่ 70 นาที
ระยะเวลาในการเริ่มแบ่งเซลล์ใหม่ที่ 70 นาที	0%	53.33%	70.17%



รูปที่ 13 ลักษณะเซลล์เดี่ยวหักพับหลังวางเซลล์ (ลูกศรชี้)

รูปที่ 14 การวางเซลล์ที่ถูกต้อง



รูปที่ 15 การวางเซลล์ที่ถูกต้อง

scale bar = 20 ไมโครเมตร

4. การหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์

4.1 การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

วางเซลล์เดี่ยวบนชิ้น PDA ที่มีสารโคลชิซิน เข้มข้น 450, 990, 1290, 1500, 1725, 1875, 2025 และ 0 µg/ml ที่ได้จาก cock borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางใน Petri-dish ที่มีอาหาร PDA ที่มีสารโคลชิซินเข้มข้นข้างต้นต่างๆ ดังกล่าว ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ไม่พบว่ามีการตายของเซลล์และ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยตามรัศมีโคโลนีไม่มีความแตกต่างกัน และตัดแยกเซลล์เดี่ยวจากอาหาร PDA ที่มีสารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 2025 µg/ml จำนวน 1 เซลล์ คือ sc2025 เพื่อขยายเส้นใยและใช้ตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ต่อไป

4.2 ศึกษาผลกระทบของโคลชิซินต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย

เมื่อวางแผ่น PDA ที่มีเส้นใยเจริญเต็มที่แล้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บนอาหารที่แตกต่างกันเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทั้ง 3 ซ้ำ พบว่า ลักษณะของเส้นใยที่เจริญในอาหารแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด คือ เส้นใยที่เลี้ยงในสารละลายโคลชิซิน 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีลักษณะหงิกงอ แตกกิ่งสาขามากมายผิดปกติ และยังมีขนาดเล็กกว่าเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารชนิดอื่นมากอย่างเห็นได้ชัด เจริญเติบโตช้ามาก (ดังรูปที่ 16)

เส้นใยที่เลี้ยงในน้ำกลั่นเส้นใยมีขนาดใหญ่กว่าเส้นใยที่เลี้ยงในสารละลายโคลชิซิน 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เล็กน้อย แต่การแตกกิ่งสาขายังคงเป็นปกติ (ดังรูปที่ 17)

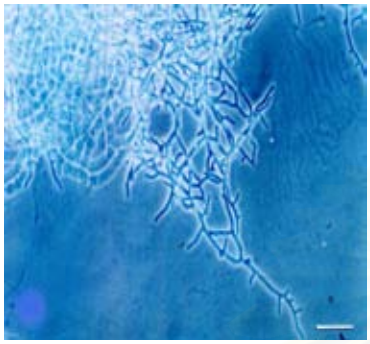
เส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB มีลักษณะเส้นใยเป็นปกติ มีขนาดใหญ่กว่าเส้นใยที่เลี้ยงในน้ำกลั่นและสารละลายโคลชิซิน 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มาก (ดังรูปที่ 18)

เส้นใยที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เป็นเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารควบคุมเพื่อเปรียบเทียบลักษณะเส้นใยในอาหารอื่นๆ ซึ่งจะมีลักษณะปกติ คือ เส้นใยมีขนาดใหญ่ เจริญเติบโตเร็ว (ดังรูปที่ 19)

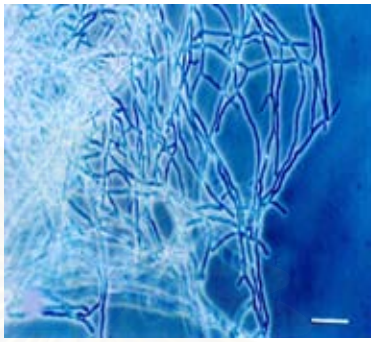
เส้นใยที่เลี้ยงบนวุ้น (agar) ลักษณะเส้นใยไม่แตกต่างจากเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหาร PDA (ดังรูปที่ 20)

เมื่อตัดแยกเส้นใยบางส่วนจากที่เลี้ยงในสารละลาย โคลชิซิน เข้มข้น 15 µg/µl นำมาเลี้ยงใหม่ใน PDA ปกติเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเส้นใยมีอัตราการเจริญเติบโตเป็นปกติ และลักษณะเส้นใยก็กลับเป็นปกติเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับ

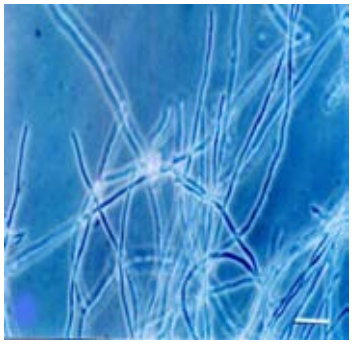
เส้นใยที่เลี้ยงในอาหาร PDA จึงตัดแยกเซลล์เดี่ยวจำนวน 5 เซลล์ จากเส้นใยที่ผ่านการเลี้ยงในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) คือ sc 01, 02, 03, 04, 05 เพื่อขยายเส้นใยและใช้ในการตรวจสอบความเป็นโพลีพลอยด์ต่อไป



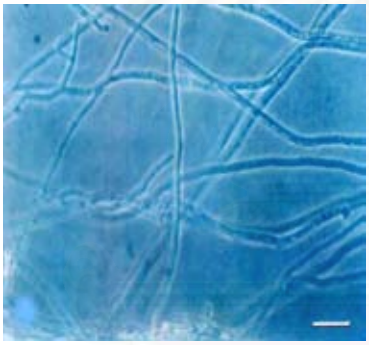
รูปที่ 16 เส้นใยที่เลี้ยงในสารละลายโคลชิซิน 1.5% (w/v)



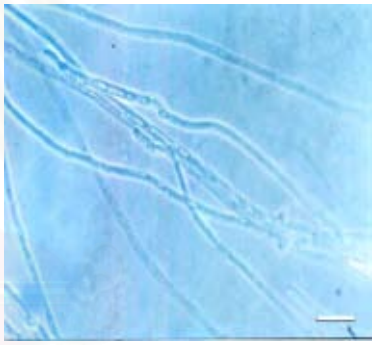
รูปที่ 17 เส้นใยที่เลี้ยงในน้ำกลั่น



รูปที่ 18 เส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB



รูปที่ 19 เส้นใยที่เลี้ยงในอาหารแข็ง PDA



รูปที่ 20 เส้นใยที่เลี้ยงในวุ้น (Agar)

Scale bar = 10 ไมโครเมตร

4.3 การชักนำให้เกิดมิวเทชันกับเซลล์เดี่ยวโดยการหยดสารละลายโคลชิซิน 15 µg/µl

เมื่อหยดสารละลายโคลชิซิน 15 µg/µl ลงบนเซลล์เดี่ยวเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 27 เซลล์ พบว่ารอดและเจริญเติบโตได้ 2 เซลล์ คือ sc06 และ sc07 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จำนวน 24 เซลล์ พบว่ารอดและเจริญเติบโตได้ 1 เซลล์ คือ sc08 จึงใช้ sc 06, 07 และ 08 ในการขยายเส้นใยและตรวจสอบความเป็นมิวเทชันต่อไป

ตารางที่ 3 จำนวนเซลล์ที่รอดจากการใช้สารโคลชิซินความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาต่างๆ

จำนวนเซลล์เดี่ยวที่ใช้หยดโคลชิซิน	เวลา	จำนวนเซลล์ที่รอด
27 เซลล์	2 ชั่วโมง	2 เซลล์ คือ sc06,sc07
24 เซลล์	5 ชั่วโมง	1 เซลล์ คือ sc08

5 การตรวจสอบสายพันธุ์มิวเทชัน

5.1 การวัดอัตราการเจริญของเส้นใยใน PDA ของสายพันธุ์ทดลองเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ได้ผลดังตาราง

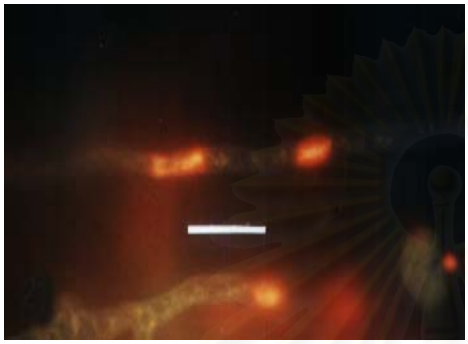
ตารางที่ 4 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง

สายพันธุ์	ความยาวเฉลี่ยของรัศมีของโคโลนีเห็ดหอม (เซนติเมตร)									ค่าเฉลี่ยความยาวรัศมีโคโลนี (ซม./วัน)
	5 วัน	6 วัน	7 วัน	8 วัน	9 วัน	10 วัน	11 วัน	12 วัน	13 วัน	
L074 (ดั้งเดิม)	0.1155	0.3120	0.7422	1.2100	1.6750	2.1510	2.6755	3.2096	3.8655	1.2274
sc2025	0.1212	0.3334	0.7500	1.2210	1.6760	2.1677	2.6250	3.2551	3.8954	1.2342
sc01	0.1100	0.3100	0.7510	1.2150	1.6666	2.1430	2.6542	3.2244	3.8540	1.2252
sc02	0.1422	0.3452	0.7482	1.2445	1.6332	2.1455	2.6554	3.2144	3.8922	1.2324
sc03	0.1422	0.3392	0.7326	1.2193	1.6900	2.1610	2.6255	3.2463	3.8644	1.2323
sc04	0.1298	0.3210	0.7422	1.2220	1.6492	2.1616	2.6554	3.2500	3.8770	1.2314
sc05	0.1310	0.3210	0.7533	1.2312	1.6822	2.1402	2.6752	3.2455	3.8886	1.2360
sc06	0.1155	0.3156	0.7444	1.2425	1.6670	2.1510	2.6336	3.2296	3.8474	1.2267
sc07	0.1336	0.3222	0.7399	1.2446	1.6666	2.1510	2.6675	3.2340	3.8094	1.2284
sc08	0.1222	0.3300	0.7474	1.2336	1.6761	2.1496	2.6495	3.2340	3.8666	1.2315

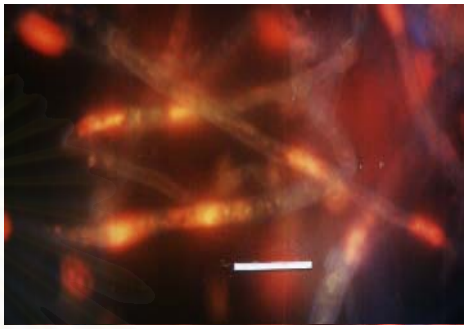
5.2 หาปริมาณ DNA ของสายพันธุ์ทดลอง เพื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

5.2.1 เปรียบเทียบปริมาณ DNA ด้วยวิธีวัดความเข้มแสงของ Propidium Iodide (PI)

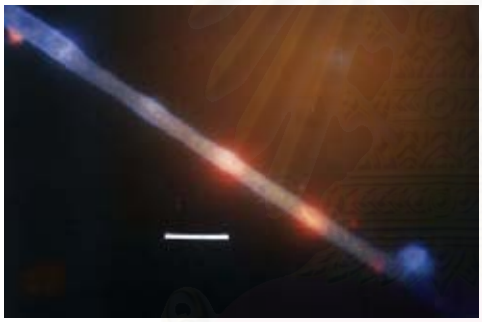
เมื่อย้อมนิวเคลียสด้วยสารละลาย Propidium Iodide ตามวิธีดังกล่าวแล้วนำมามองผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยแสง UV พบว่าส่วนใหญ่นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เต็มความกว้างของเซลล์ และยาวไปตามความยาวของเซลล์แต่ยาวไม่เท่ากันทุกนิวเคลียส เห็นเป็นแสงสีส้มแดงอยู่กันเป็นคู่ๆ (ดังรูปที่ 21-26)แต่การวัดปริมาณความเข้มแสงเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ไม่สามารถทำได้



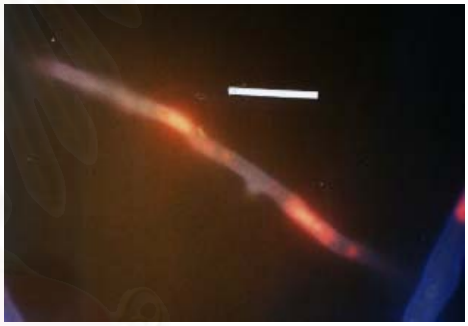
รูปที่ 21



รูปที่ 22

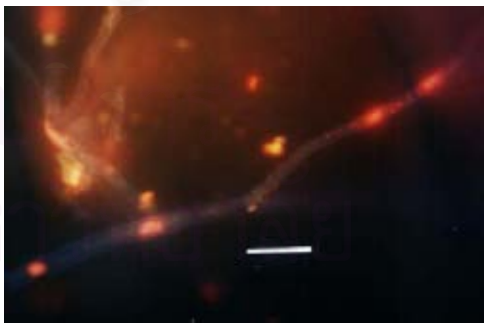


รูปที่ 23



รูปที่ 24

รูปที่ 25



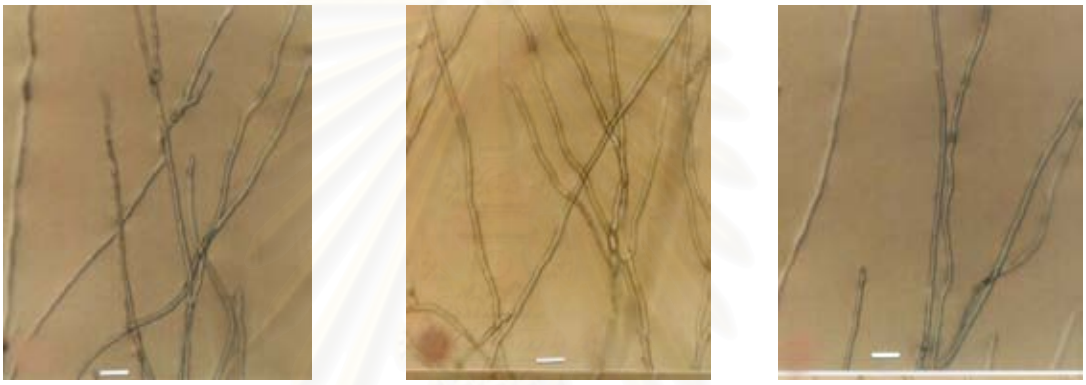
รูปที่ 26

รูปที่ 21 – 26 ลักษณะนิวเคลียสของเส้นใยเห็ดหอม ที่ย้อมด้วย Propidium Iodide ผ่านแสง UV เห็นเป็นคู่ของนิวเคลียส ใน 1 เซลล์ (ลักษณะ dikaryotic cell) Scale bar = 10 ไมโครเมตร

5.2.2 เปรียบเทียบปริมาณ DNA ด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนคลื่นแสงของ DNA (OD_{260nm})

5.2.2.1 การเปรียบเทียบขนาดและลักษณะเส้นใยสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ทดลอง

เมื่อเลี้ยงเส้นใยสายพันธุ์ ทดลอง และสายพันธุ์ดั้งเดิม ในอาหาร PDB แบบไม่เขย่าเป็นเวลา 10 วัน พบว่า ขนาดและลักษณะเส้นใยสายพันธุ์ทดลองและสายพันธุ์ดั้งเดิมไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 27 – 29 (รูปที่ 27 เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม)



รูปที่ 27 - 29 ขนาดเส้นใยเห็ดหอม สายพันธุ์ดั้งเดิม และตัวอย่างสายพันธุ์ทดลอง

scale bar = 10 ไมโครเมตร

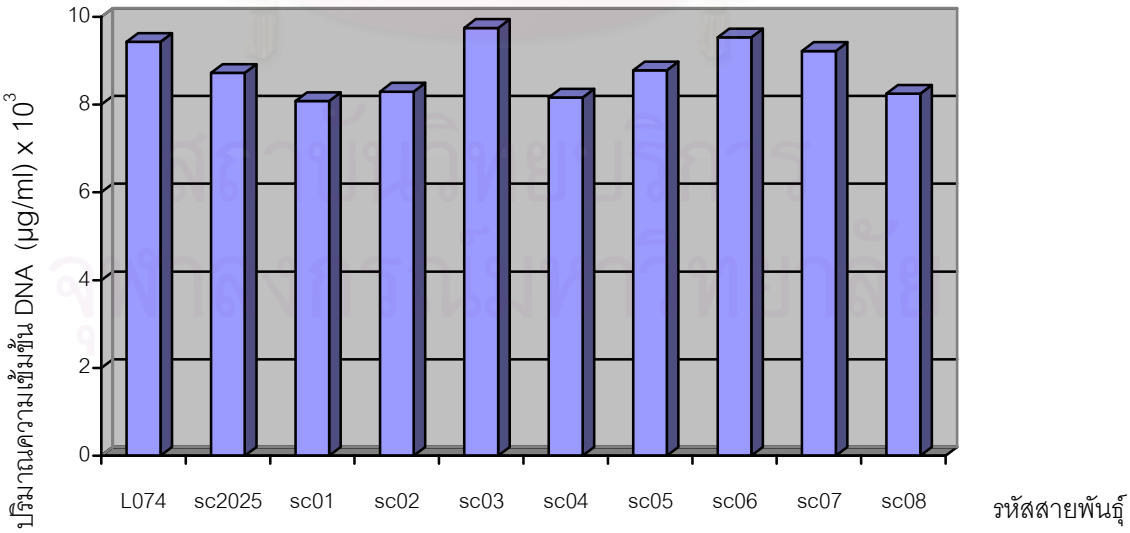
5.2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอและวัดการดูดกลืนคลื่นแสง UV (OD_{260nm}) ของเส้นใยสายพันธุ์ทดลอง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

ผลของการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของสายพันธุ์ทดลอง และสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่เลี้ยงในอาหาร PDB แล้วนำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสง UV ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลการวัดการดูดกลืนคลื่นแสง UV ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของสารละลายดีเอ็นเอ และแสดงค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ภาคผนวก ก)

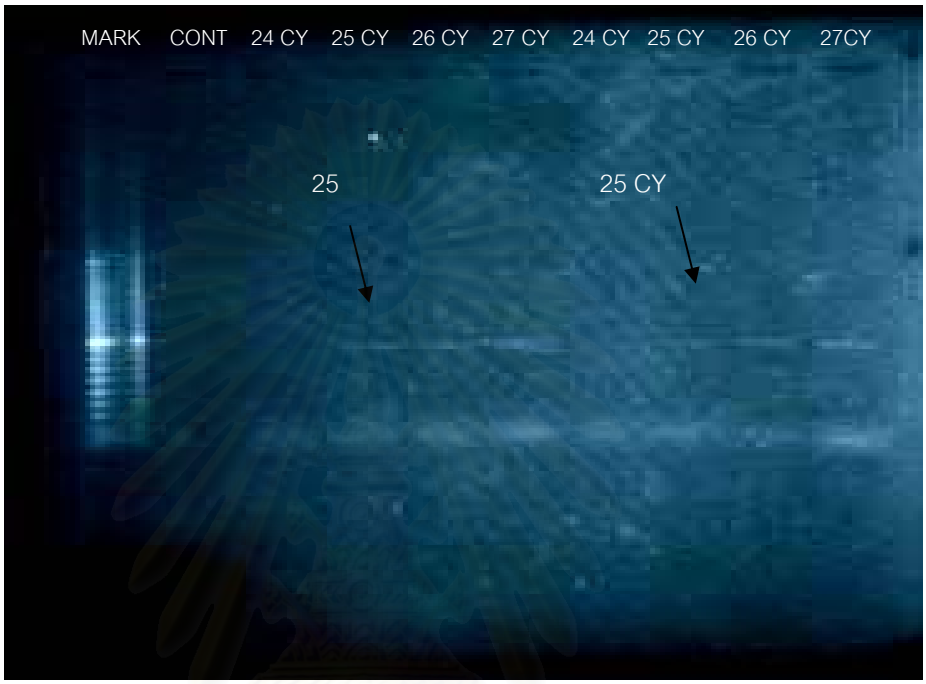
รหัสสายพันธุ์	OD (260 nm)	OD (280 nm)	OD (320 nm)	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นดีเอ็นเอเปรียบเทียบสายพันธ์ดั้งเดิม	ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (1.7-1.9)
L074 (ดั้งเดิม)	1.88600	1.16400	0.47392	9.4300×10^3	100	1.6203
sc2025	1.74400	0.88440	0.12083	8.7200×10^3	92.47	1.9720
sc01	1.61616	0.87361	0.28760	8.0808×10^3	85.69	1.8500
sc02	1.65910	0.91450	0.32011	8.2955×10^3	87.97	1.8142
sc03	1.94930	1.02550	0.20419	9.7465×10^3	103.36	1.9008
sc04	1.63230	0.92596	0.29539	8.1615×10^3	86.55	1.7628
sc05	1.75550	1.00960	0.19000	8.7775×10^3	93.08	1.7388
sc06	1.90660	1.12150	0.31560	9.5330×10^3	101.09	1.7000
sc07	1.84440	0.99070	0.22960	9.2220×10^3	97.79	1.8617
sc08	1.65000	0.86044	0.21110	8.2500×10^3	87.49	1.9176



รูปที่ 30 ปริมาณความเข้มข้น DNA แต่ละรหัสสายพันธุ์

5.2.3 เปรียบเทียบปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR

เมื่อ PCR producted ถูกแยกด้วยเครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า พบว่าแถบแรกที่สามารถมองเห็นได้ในการเจือจาง DNA ตัวอย่าง 1000 เท่า บนแผ่นอะกาโรส เจล คือ PCR ที่ 25 รอบ ในทุกสายพันธุ์ (ดังรูปที่ 31)



รูปที่ 31 PCR Product ถูกแยกด้วยเครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบนอะกาโรส เจล

5.2.4 ผลผลิตการเปิดดอกของสายพันธุ์ทดลอง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

หลังจากเปิดถุงขี้เลื่อยเห็ดเป็นเวลา 5 วัน พบว่าดอกที่เกิดจะมีลักษณะหงิกงอผิดปกติไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิม (ดังรูปที่ 32 – 34) และไม่พบการดีดออกมาของสปอร์เมื่อวางดอกไว้ใน Petri-dish

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 32 ถุงขี้เลื่อยขนาด 300 กรัม สำหรับเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอม ขณะเปิดดอกในโรงเรือน

รูปที่ 33 ลักษณะการเกิดดอกของเห็ดหอมสายพันธุ์ดั้งเดิม L074

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 34 ลักษณะดอกเห็ดผิดปกติที่เกิดขึ้นจากสายพันธุ์ทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ

ใช้เส้นใยเห็ดหอม สายพันธุ์ L074 ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ทนร้อนที่ได้ผ่านการวิจัยมาแล้ว สามารถเจริญเติบโตและออกดอกได้ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เจริญเติบโตแข็งแรงดีในอาหารเลี้ยงเชื้อราทั่วไป จึงเหมาะที่จะนำสายพันธุ์มาพัฒนาให้มีคุณภาพเพิ่มขึ้นต่อไป

2. การเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ L074 ในอาหาร LcA ไม่เหมาะสมที่ทำให้เส้นใยสร้างสปอร์ ไม่อาศัยเพศกับเห็ดหอมสายพันธุ์ L074

3. การแยกเซลล์เดี่ยวจากโคโลนี

3.1 พฤติกรรมการเจริญของเส้นใยเห็ดหอม L074 และการตัดแยกเส้นใยเป็นเซลล์เดี่ยว

การศึกษาถึงพฤติกรรมการเจริญของเส้นใยจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted microscope เนื่องจากเป็นการศึกษาเส้นใยขณะกำลังมีชีวิตอยู่ การศึกษาพฤติกรรมการเจริญของเส้นใยนี้ เพื่อต้องการข้อมูลสำหรับนำมาใช้ในการพิจารณาหาวิธีการแยกเซลล์เดี่ยวให้ได้เซลล์เดี่ยวที่มีโอกาสรอดใกล้เคียง 100 เปอร์เซ็นต์ที่สุด และยังสามารถเจริญเติบโตแบ่งเซลล์ได้ตามปกติ นอกจากนั้น ยังต้องการใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ ครั้งแรกจาก 1 เป็น 2 เซลล์ เพื่อให้ทราบเวลาที่ใช้ในการทดลองให้ใกล้เคียงกับเวลาที่เซลล์มีการแบ่งเซลล์จริงๆมากที่สุด นับจากตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวแล้ว

จากการศึกษาพบว่า ความยาวของเส้นกิ่งเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงความสมบูรณ์ของผนังกั้นเซลล์ของเซลล์ที่มีกิ่งงอกนั้น ในการตัดแยกเซลล์เดี่ยวจากเส้นใย จะตัดเซลล์เดี่ยวที่ปลายเส้นใยที่มีการงอกของเส้นกิ่งแล้ว และเป็นเซลล์สุดท้ายของเส้นใยนั้น (ขอบโคโลนีภาคผนวก ข) เนื่องจากเส้นใยบริเวณนี้จะกระจายตัวกันอยู่ห่างๆ นอกจากนี้เซลล์ที่ปลายเส้นใยยังเป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญ เติบโต มีสารอาหารมากมาย และ organells ต่างๆ ในเซลล์ก็อยู่ในช่วงทำงาน (active) เกือบทั้งสิ้นและเส้นกิ่งจะตาย จึงเหมาะที่จะทำเป็นเซลล์เดี่ยวเพื่อการทดลองต่อไป แต่เส้นใยที่ถัดเข้าไปด้านในของโคโลนียิ่งลึกมากเท่าใด เส้นใยยิ่งสานตัวกันไปมาจนแน่นขึ้นเท่านั้น อันเป็นผลจากการเจริญของกิ่งแยกออกจากเส้นใยหลักสานทับกันมากมายจนไม่สามารถแยกเป็นเซลล์เดี่ยวได้ การตัดที่ปลายเส้นใยที่ยังไม่มีกิ่ง หรือมีกิ่งแต่กิ่งยังไม่มีการสร้าง clamp connection ส่วนของกิ่งจะสูญเสียของเหลวในเซลล์เพราะยังไม่มีผนังกั้นกิ่งจึงตายในที่สุด เหลือเพียง

เซลล์ปลายเส้นใยเพียงเซลล์เดียวที่อาจรอดหรือไม่ ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของผนังกั้นระหว่างเซลล์ที่ 1 กับ เซลล์ที่ 2 (ภาคผนวก ข)

จากการทดลองตัดเส้นใย 3 กลุ่ม ตามความยาวของเส้นกิ่งจากผลการทดลองที่ 3.2 พบว่า

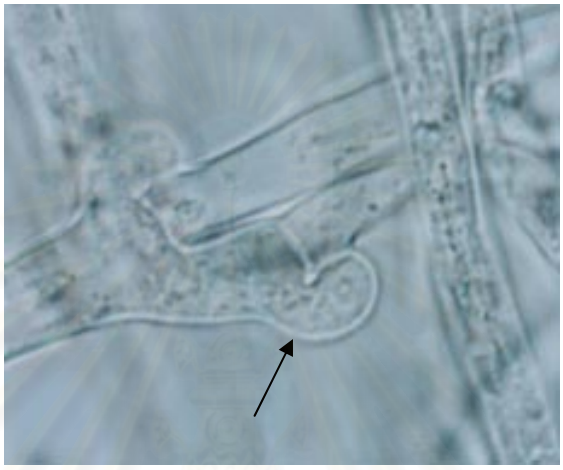
กลุ่มที่ 1 เส้นใยที่ยังไม่มีกิ่งงอกออกมาจากใต้ clamp connection พบว่ามีเซลล์รอดเพียง 12.50 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นจากการตัด 8 เซลล์ เชื่อว่าเซลล์ที่ 1 น่าจะสูญเสียของเหลวในเซลล์ทางผนังกั้นเซลล์หลัก เนื่องจากผนังกั้นยังไม่สมบูรณ์ดีซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ยังไม่สร้างกิ่งใหม่บริเวณนี้ ลักษณะผนังกั้นของเห็ดหอมเป็นแบบ Dolipore septum (Bold,H.C. et al) หากผนังกั้นสมบูรณ์ และมีการขาดของเส้นใยขึ้น Dolipore septum จะทำหน้าที่อุดรอยรั่วของของเหลวจากเส้นใยตั้งแต่ผนังกั้นแรกของรอยขาดเป็นต้นไป เพื่อให้เส้นใยส่วนที่เหลือยังคงเจริญ เติบโตต่อไปได้

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่มีกิ่งเริ่มงอกจนยาวเกือบ 30 μm พบว่ารอด 79 เปอร์เซ็นต์ หลังจากตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวแล้ว สันนิษฐานว่าการสร้างกิ่งเกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์ของผนังกั้นระหว่างเซลล์หลักทั้งสอง หรือเซลล์จะสร้างกิ่งก็ต่อเมื่อผนังกั้นระหว่างเซลล์สมบูรณ์แล้ว แต่ระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการแบ่งเซลล์ใหม่หลังตัดแยกเซลล์เดี่ยวของกลุ่มที่ 2 ยังมีความแปรปรวน โดยส่วนใหญ่จะใช้เวลา 70 นาที นานที่สุดถึง 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์เดี่ยวส่วนใหญ่มีกิ่งที่เพิ่งงอก อาจเป็นได้ว่า แม้ผนังกั้นจะสมบูรณ์แล้วก็ตาม แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความพร้อมต่อการถูกกระทบกระเทือนอย่างรุนแรง เช่น เซลล์ที่อยู่ติดกันถูกตัดทำลาย ทำให้เซลล์เดี่ยวที่ต้องการหยุดชะงักการเจริญเติบโตชั่วขณะ จึงเป็นเหตุให้การแบ่งเซลล์ใหม่เกิดความล่าช้านานถึง 2 ชั่วโมง

ในกลุ่มที่ 3 เส้นใยที่มีกิ่งยาวตั้งแต่ 30 μm ขึ้นไปจนถึง 100 μm พบว่ารอดตายถึง 98.30 เปอร์เซ็นต์ หลังตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวและมีระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ใหม่หลังตัดค่อนข้างคงที่ คือ 70 นาที เป็นจำนวน 70.17 เปอร์เซ็นต์ เหตุผลน่าจะเนื่องจากความสมบูรณ์และความพร้อมของผนังกั้นเซลล์เพียงพอต่อการถูกกระทบกระเทือนจากภายนอกมากกว่าเซลล์ในกลุ่มที่ 2 มีเพียงส่วนน้อยที่ระยะเวลาในการแบ่งเซลล์หลังตัดไม่เป็นเวลา 70 นาที อาจเนื่องมาจากมีปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น เซลล์ถูกกระทบกระเทือนขณะตัดหรือขณะเคลื่อนย้าย และปัจจัยภายในของเซลล์เองที่มีความแตกต่างกันอยู่แล้วตามธรรมชาติที่ไม่สามารถควบคุมได้

สำหรับขนาดความยาวกิ่งที่นอกเหนือจากการจำแนกทั้ง 3 กลุ่มนี้ คือ กิ่งที่ยาวมากกว่า 100 μm เป็นกลุ่มเสี่ยงที่อาจพบ clamp connection ของกิ่งได้มาก เมื่อกิ่งยาวประมาณ 110 ไมครอน หรืออาจต่ำกว่านั้นจะแบ่งเซลล์กิ่งออกไปจากเซลล์หลักโดยการ

สร้าง clamp connection บริเวณโคนของกิ่งใกล้กับตำแหน่ง clamp connection ของเส้นใยหลัก (ดังรูปที่ 36 ลูกศรชี้) เพื่อกลายเป็นเส้นใยหลักในรุ่นต่อไปหากต้องการตัดเส้นใยลักษณะนี้เพื่อให้เซลล์เดี่ยวตามต้องการค่อนข้างจะยุ่งยาก เนื่องจากต้องตัดทำลายเส้นกิ่งด้วยเพื่อป้องกันการอาจจะอยู่รอดของเซลล์กิ่งหลังจากถูกตัดแยกที่บริเวณเซลล์ถัดมา ซึ่งจะทำให้ผลที่ได้หลังตัดไม่เป็นเซลล์เดี่ยวที่แท้จริง



รูปที่ 36 ลักษณะ clamp connection การแบ่งเซลล์ออกไปจากเซลล์หลักของเส้นกิ่ง (ส่วนที่ลูกศรชี้ คือ clamp connection ของกิ่ง)

ผลที่ได้จากการตัดเซลล์ในกลุ่มที่ 3 เป็นที่น่าสังเกตว่า เซลล์เดี่ยวมีระยะ เวลาในการแบ่งเซลล์ใหม่หลังตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวส่วนใหญ่ใช้เวลา 70 นาที ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีขนาดความยาวของเส้นกิ่งแตกต่างกันอยู่มาก แต่กลับแบ่งเซลล์พร้อมๆกันหลังถูกตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยว นั่นน่าจะเป็นเหตุผลที่พอจะสรุปได้ว่ามีปัจจัยบางอย่างที่ทำให้การตัดแยกเส้นใยออกเป็นเซลล์เดี่ยวที่มีผนังกั้นเซลล์สมบูรณ์กระตุ้นให้เซลล์เดี่ยวเหล่านั้นแบ่งเซลล์ใหม่ ในระยะเวลา 70 นาที หลังถูกกระตุ้นหรือถูกตัดพร้อมๆกันซึ่งเป็นเรื่องที่น่าศึกษาและค้นคว้าต่อไป

3.2 การย้ายเซลล์เดี่ยว

เนื่องจากการย้ายเซลล์เดี่ยวที่ถูกตัดแยกออกจากเส้นใยแล้ว จะใช้ด้านบนของใบมีดที่ตัด ตักช้อนเซลล์เดี่ยวเพื่อเคลื่อนย้ายเซลล์ไปสู่ตำแหน่งอื่นตามต้องการ ดังนั้นเวลาตัดแยกเซลล์เดี่ยวจึงจำเป็นต้องตัดในตำแหน่งเซลล์ถัดไป ให้ต่ำกว่าผนังกั้นหรือ clamp connection ประมาณ 200 µm ซึ่งส่วนนี้เมื่อตัดแล้วจะเป็นส่วนที่ไม่มีชีวิต จะใช้เป็นตำแหน่งสำหรับสัมผัสด้านบนของใบมีดขณะตักช้อนเคลื่อนย้ายเซลล์ โดยไม่

กระทบกระเทือนตัวเซลล์ที่ต้องการ เพื่อป้องกันอันตรายจากการกระทบกระเทือนของเซลล์เดี่ยว อันอาจทำให้เกิดการชะงักการเจริญเติบโตของเซลล์หรือตายได้

จากการย้ายเซลล์เดี่ยวในกลุ่มที่ 1 โดยยกเซลล์เดี่ยวย้ายจาก Petri-dish ที่ตัดเส้นใยไปสู่อีก Petri-dish หนึ่งที่มี PDA อยู่ พบว่าไม่มีเซลล์ที่รอดในจำนวน 15 เซลล์ แต่ในกลุ่มที่ 2 ย้ายเซลล์เดี่ยวโดยใช้ด้านบนของใบมีดตักซ้อนเช่นกัน แต่ไม่ยกเซลล์ให้พ้นจากผิวหน้าของ PDA ใช้วิธีลากให้ห่างออกไปจากกลุ่มโคโลนีที่ตัดแยกเซลล์ เพื่อหาที่ว่างในการวางเซลล์ แล้วจึงตัก PDA ตำแหน่งที่มีเซลล์เดี่ยววางอยู่ ย้ายทั้งชิ้นไปสู่อีก Petri-dish หนึ่ง หรือกล่าวได้ว่าวิธีย้ายเซลล์เดี่ยวในกลุ่มที่ 2 ไปสู่อีก Petri-dish หนึ่งนั้น เซลล์เดี่ยวไม่ได้ถูกยกขึ้นจากผิวหน้าของ PDA เลย พบว่ารอดตายถึง 93.33 เปอร์เซ็นต์ การสูญเสียน้ำน่าจะเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้เซลล์เดี่ยวในกลุ่มที่ 1 ตาย เนื่องจากเซลล์เดี่ยวมีความยาวประมาณ 500 ไมครอน กว้างประมาณ 2.5 ไมครอน ซึ่งมีขนาดเล็กแต่ยาวมากเมื่อเทียบกับความกว้าง เป็นลักษณะที่มีโอกาสสูญเสียน้ำออกสู่อากาศภายนอกได้ง่ายและเร็ว การใช้ปลายมีดตักยกเส้นใยสู่อากาศโดยตรงจะทำให้เส้นใยสูญเสียน้ำอย่างรวดเร็วภายในไม่กี่วินาที เป็นผลให้เซลล์นั้นตายในที่สุด เหตุผลอีกประการก็คือ เซลล์บอบช้ำจากการวางเซลล์ลงบน PDA ใน Petri-dish ใหม่ ซึ่งการวางเซลล์เดี่ยวอาจทำให้เซลล์เดี่ยวไม่ได้ถูกวางในลักษณะยาวตามธรรมชาติ แต่อาจหักพับหรืองอ (ดังรูปที่ 13 ลูกศรชี้) ทำให้ของเหลวในเซลล์เคลื่อนที่ไม่สะดวกหรือเคลื่อนที่ไม่ได้เลย ทำให้ organells บางอย่างไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติได้ ผนังเซลล์เองก็อาจเสียหายจากการหักพับของเซลล์เช่นกัน แต่การวางเซลล์ในกลุ่มที่ 2 จะไม่มีปัญหาเหล่านี้เกิดขึ้น เนื่องจากการลากเซลล์ไปบน PDA ที่เรียบลื่นและเปียกเสมอ การลากก็ทำให้เซลล์วางตัวตามยาวเสมออีกด้วย การย้ายระหว่าง Petri-dish ในกลุ่มที่ 2 ก็เป็นการย้ายไปทั้งชิ้น PDA จึงไม่กระทบกระเทือนต่อตัวเซลล์แต่อย่างใด ทำให้การย้ายเซลล์ในกลุ่มที่ 2 มีโอกาสรอดเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์

4. ภาวะที่เหมาะสมเพื่อการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยโคลชิซิน

เนื่องจากเซลล์เดี่ยวเห็ดหอมยังสามารถเจริญเติบโตเป็นเส้นใยได้ด้วยอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันเมื่อเลี้ยงใน PDA ที่มีสารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 450 – 2025 µg/ml จึงทำให้ไม่สามารถหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดได้ในเบื้องต้น จึงได้ทดลองนำเส้นใยที่เจริญอยู่เต็มบนชิ้น PDA ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางลอยในสารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 15 µg/µl พบว่าเส้นใยยังคงเจริญเติบโตต่อไปได้เช่นกันแต่ช้า และเส้น

ใยมีลักษณะเล็ก สั้น หงิกงอ แตกกิ่งมากมายผิดปกติ แต่เมื่อนำกลับมาเลี้ยงบน PDA กลับเจริญเติบโตและเส้นใยมีลักษณะเป็นปกติเมื่อเทียบกับเส้นใยที่เลี้ยงใน PDA ควบคุม

ซึ่งมีรายงานว่าสารละลายโคลชิซิน เป็นสารยับยั้งการสร้างสาย spindle fiber (Eigstiet et al., 1949) ซึ่งไม่เพียงทำหน้าที่ในการแบ่งนิวเคลียสเท่านั้น แต่ยังทำหน้าที่เป็น cytoskeleton ใน cytoplasm ของเซลล์อีกด้วย เมื่อมีความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน สูงขึ้นถึงระดับหนึ่งจึงทำให้โครงสร้างของเซลล์ผิดปกติไป และเมื่อนำเส้นใยผิดปกติเหล่านี้ย้ายกลับมาเลี้ยงใน PDA ปกติ การสร้างสาย spindle fiber มีการกลับมาทำหน้าที่ตามปกติ ทำให้ลักษณะและขนาดของเซลล์กลับเป็นดังเดิม ความผิดปกติที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงเส้นใยในสารละลายโคลชิซิน ในการทดลองนี้ น่าจะเป็นข้อบ่งชี้ได้ว่า spindle fiber ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ในระยะ metaphase ก็น่าจะผิดปกติไปด้วย อันจะนำไปสู่การเกิดโพลีพลอยด์หรือมิวเทชันได้ จึงใช้สารละลายโคลชิซิน เข้มข้น 15 µg/µl สำหรับหยดลงบนเซลล์เดี่ยวเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง ในการทดลองต่อมา

5. ผลการตรวจสอบสายพันธุ์มิวเทชัน

จากการตรวจสอบสายพันธุ์มิวเทชันทุกวิธีดังกล่าวข้างต้น พบว่า วิธีวัดอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยแต่ละสายพันธุ์ในอาหารแข็ง PDA ไม่พบความแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม (L074) การเปรียบเทียบปริมาณ DNA ด้วยวิธีวัดความเข้มแสงของ Propidium Iodide (PI) เมื่อย้อมนิวเคลียสด้วยสารละลาย Propidium Iodide แล้วนำมามองผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยแสง UV พบว่าแสงที่เรืองออกมาจากนิวเคลียส เมื่อได้รับช่วงคลื่นแสงจาก UV จะลดความเข้มแสงลงอย่างรวดเร็วเกินกว่าที่จะควบคุมเวลาในการปรับความชัดของเลนส์กล้องกับนิวเคลียสเป้าหมายให้เท่ากันได้ ทำให้ค่าความเข้มแสงที่ถูกวัดของแต่ละสายพันธุ์ หรือแต่ละนิวเคลียสไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบในเชิงปริมาณกันได้ การวัดปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธีการดูดกลืนคลื่นแสงที่ $OD_{(260nm)}$ ดังตารางที่ 5 พบว่า สายพันธุ์ที่มีความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอลดลงจากสายพันธุ์เดิมถึง 7 สายพันธุ์ คือ sc2025 , sc01 , sc02 , sc04 , sc05 , sc07 และ sc08 ส่วนอีกสองสายพันธุ์ คือ sc03 และ sc06 มีความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าเล็กน้อย จากการเปรียบเทียบสายพันธุ์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือสายพันธุ์ sc01 มีปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอเพียง 85.69 เปอร์เซ็นต์ ของสายพันธุ์ดั้งเดิมเท่านั้น (ดังตารางที่ 5) ในการทดลองนี้การใช้น้ำหนักแห้งเป็นมาตรฐานในการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อวัดปริมาณดีเอ็นเอ ตามวิธีข้างต้นนี้น่าจะเป็นวิธีที่ใกล้เคียงความถูกต้องมากที่สุดสำหรับ

เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์ เนื่องจากเส้นใยของทุกสายพันธุ์มีขนาดเท่าๆกัน (ดังรูปที่ 27-29) ดังนั้นการชั่งน้ำหนักต่อจำนวนเซลล์จึงไม่เกิดการผิดพลาดผลจากการลดลงของปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 7 สายพันธุ์ดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงความเปลี่ยนแปลงภายในนิวเคลียสของสายพันธุ์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจำนวนโครโมโซมบางส่วนในจีโนมหายไป ทำให้ปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอลดลง เนื่องจากสารละลายโคลชิซินที่ใช้ในการชักนำในงานวิจัยครั้งนี้เข้มข้นถึง 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในขณะที่ Handa และคณะ,1997 ใช้โคลชิซินความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ กับ *Agaricus bisporus*. พบปริมาณ ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นหลายเท่าตัว Toyama,H.และ Toyama N.(1995) ใช้ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ กับ *Trichoderma reesei*. และ Toyama,H.และ Toyama N (1994) กับ *Pleurotus ostreatus*. พบ hyper polyploid multinucleation จำนวนมาก Toyama,H. และ Toyama N.(1995) ใช้สารละลาย โคลชิซิน 0.01 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กับเส้นใย *Lentinus edodes*. พบ multinucleate และ smaller nuclei จำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wakata,A. และ Sasaki,M.S.(1987) กล่าวว่า รังสีและสารเคมีที่รุนแรงหลายชนิดเป็นสาเหตุทำให้โครงสร้างของโครโมโซมผิดปกติไป หากความผิดปกตินี้เกิดขึ้นกับตำแหน่ง kinetochores ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีสาย spindle fiber มาเกาะ หรือทำให้หน้าที่ของ kinetochores นี้สูญเสียไปจะเรียกชิ้นส่วนเหล่านี้ว่า acentric fragment (AF) ในขณะที่เซลล์มีการแบ่งตัวแบบไมโตซิส AF บางส่วนจะถูกกันออกไปจากการแบ่งเซลล์รุ่นต่อมาและอาจสร้าง small extra nuclei ภายใน cytoplasm ในเซลล์ลูกหนึ่งเซลล์หรือทั้งสองเซลล์ก็ได้ เรียกว่า micronuclei (MN) แต่ในเซลล์ที่แบ่งตัวแบบช้าๆ หรือไม่แบ่งตัวหรือถูกยับยั้งการแบ่งตัว เมื่อถูกชักนำด้วยสารเคมีหรือรังสีดังกล่าว จึงอาจถูกตีความได้ว่าไม่เกิด MN ซึ่งในความเป็นจริงอาจมี AF บางส่วนถูกกันออกไปหลังจากเกิดการการแบ่งเซลล์ไปหลายรุ่นแล้วยังพบปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นในการใช้สารโคลชิซินกับเส้นใยเห็ดราเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมนั้น อาจเนื่องมาจากการแบ่งเซลล์ผ่านไปเพียงไม่กี่รุ่นทำให้ชิ้นส่วนโครโมโซม (AF) ยังคงอยู่ในนิวเคลียสหรือในไซโตปลาสซึม และสามารถสกัดเพื่อตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้

อย่างไรก็ตามผลการทดลองวัดความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธีการดูดกลืนคลื่นแสงที่ $OD_{(260nm)}$ ค่อนข้างสอดคล้องกับระยะเวลาและวิธีการใช้สารละลายโคลชิซินกับเซลล์ของเห็ดหอม คือ sc01 จนถึง sc05 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอม L074 ในสารละลายโคลชิซิน เป็นเวลา 10 วัน จึงนำมาตัดแยกเซลล์เดี่ยว ทำให้พบว่าปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมมาก (ยกเว้น sc03) ซึ่งอาจเป็นเหตุผลการใช้สารละลายโคลชิซินที่เข้มข้นและนานเกินไป จึงทำ

ให้โครโมโซมบางส่วนขาดหายไปหรือเกิด อนิวพลอยด์ขึ้น sc06 และ sc07 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวก่อนแล้วจึงหยดสารละลายโคลชิซิน เป็นเวลาเพียง 2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น ทำให้ความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอไม่ต่างไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิม (L074) มากนัก สำหรับ sc08 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการตัดแยกเซลล์เดี่ยวก่อนแล้วเช่นกัน แต่หยดสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ นานถึง 5 ชั่วโมง เพื่อต้องการให้มีการแบ่ง karyomitosis ถึง 2 ครั้ง จึงเป็นเหตุให้ได้ความเข้มข้นปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า sc06 และ sc07 มาก อาจจะเกิดจากการเกิดอนิวพลอยด์ของสายพันธุ์ sc08 สายพันธุ์ sc2025 เป็นเซลล์เดี่ยวที่ถูกเลี้ยงใน PDA ที่มีความเข้มข้นโคลชิซินไม่มากนัก คือ 2025 µg/ml หรือ 0.2025 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงตัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวออกมา แต่ก็ถือว่าใช้ปริมาณความเข้มข้นโคลชิซินสูงอยู่มาก เมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นๆที่กล่าวข้างต้น จึงทำให้ความเข้มข้นปริมาณดีเอ็นเอมีจำนวนน้อยลง หรือเกิดอนิวพลอยด์ด้วยนั่นเอง

การหาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ไม่พบการเพิ่มขึ้นเป็นอัตราส่วนในทุกสายพันธุ์ พบแถบของยีน Nuclease Le I ที่จำนวนรอบของ PCR ที่น้อยที่สุด คือ 25 รอบ จากการใช้ดีเอ็นเอสกัดเจือจางที่เท่ากันทุกสายพันธุ์ จึงสรุปได้ว่าไม่มีสายพันธุ์ใดเลยที่มีปริมาณดีเอ็นเอมากเป็นเท่าตัวหรือเป็นโพลีพลอยด์

นอกจากนี้ผลจากการเปิดดอกเพื่อเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด พบว่า ลักษณะดอกเห็ดออกดอกยากและลักษณะดอกของแต่ละสายพันธุ์ที่ทดลอง มีความผิดปกติค่อนข้างมาก และยังไม่สร้างสปอร์อีกด้วย (ดังรูปที่ 34) ลักษณะดอกมีลักษณะแผ่แบนออกด้านข้างเป็นแผ่นใหญ่ หนา หงิก งอ สีซีดจาง มีขนาดไม่แน่นอน ก้านดอกสั้นมาก

สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ผลจากการตรวจลักษณะนิวเคลียสในเส้นใยเห็ดหอมแต่ละสายพันธุ์ที่ทดลองไม่พบลักษณะ mutinucleate หรือ micronuclei แต่อย่างใดจากการใช้สารละลายโคลชิซินกับเซลล์เดี่ยวหรือเส้นใยเห็ดรา อาจเป็นไปได้ว่าในช่วงแรกที่เริ่มทดลองมีการเพิ่มขึ้นของชุดโครโมโซม เนื่องจากไม่มีการแยกกันของโครโมโซมในระยะเมตาเฟสจริงจากผลของโคลชิซินดังมีรายงานการเกิดโพลีพลอยด์มาก่อน แม้จะเกิด acentric fragment (AF) ดังมีรายงานที่กล่าวข้างต้นแล้วเกิดขึ้นร่วมด้วยก็ตาม แต่การแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสหลายๆครั้งอาจทำให้ปริมาณ ploidy ลดลงเรื่อยๆ ดังมีรายงานจาก Molnar และ Sipiczki (1993) กล่าวว่า การเกิดโพลีพลอยด์ของยีสต์จากการรวม โปรโตพลาสบางส่วนพบว่าไม่เสถียร เนื่องจากเกิดการสูญหายของโครโมโซม ที่น่าจะเกิดจากกลไกของการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสเป็นผลให้ระดับ ploidy ลดลงสู่ระดับที่ต่ำกว่าแต่ทั้งนี้งานวิจัยนี้ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเซลล์ดังกล่าวนี้เปลี่ยนแปลงจำนวน

โครโมโซมเพิ่มขึ้นในช่วงแรกหรือไม่ ต้องหาวิธีตรวจสอบที่ถูกต้องต่อไป เช่น ใช้วิธี flow cytrometry เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. อาหารแข็ง LcA ไม่สามารถชักนำให้เส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ L074 สร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศได้
2. พฤติกรรมการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ L074 บนอาหารแข็ง PDA พบว่า การแบ่งเซลล์จะเริ่มขึ้นเมื่อเส้นใยมีความยาว 450 – 700 ไมโครเมตร โดยสร้าง clamp connection ใช้เวลาประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นประมาณ 70 – 90 นาที จะมีการสร้างกิ่งขึ้นที่บริเวณใต้ clamp connection ใหม่ และเมื่อกิ่งยาวประมาณ 110 ไมโครเมตร ก็จะเกิด clamp connection แยกจากเซลล์หลัก การแบ่งเซลล์ของเซลล์หลักจะห่างกันประมาณ 2½ ชั่วโมง ถึง 3 ชั่วโมง
3. การตัดเส้นใยแยกเป็นเซลล์เดี่ยวของเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ L074 พบว่าการตัดเส้นใยที่ยังไม่มีกิ่งงอกออกมา รอดตาย 12.5 เปอร์เซ็นต์ การตัดเส้นใยที่มีกิ่งงอกยาวต่ำกว่า 30 ไมโครเมตร รอดตายถึง 79 เปอร์เซ็นต์ แต่ระยะเวลาในการเริ่มแบ่งเซลล์ใหม่แตกต่างกันมาก ตั้งแต่ 50 นาที จนถึง 2 ชั่วโมง การตัดเส้นใยที่มีกิ่งยาวตั้งแต่ 30 – 100 ไมโครเมตร รอดตาย 98.30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังให้ระยะเวลาในการเริ่มแบ่งเซลล์ใหม่ค่อนข้างคงที่ คือใช้เวลา 70 นาที ถึง 70.17 เปอร์เซ็นต์
4. การย้ายเซลล์เดี่ยววิธีที่ดีที่สุด คือ ลากเซลล์เดี่ยวไปบนผิวหน้าอาหารแข็ง PDA แล้วจึงย้ายเซลล์เดี่ยวนี้ไปกับชิ้นอาหาร PDA ทำให้รอดตายถึง 93.33 เปอร์เซ็นต์
5. เซลล์เดี่ยวที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็ง PDA ที่มีสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 450 ถึง 2025 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่เส้นใยที่เลี้ยงในสารละลายโคลชิซินเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเล็กและแตกกิ่งมากมายผิดไปจากเส้นใยที่เลี้ยงใน PDA ,PDB , วุ้น และน้ำกลั่น อย่างเห็นได้ชัด สารละลายโคลชิซินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเส้นใย ซึ่งเป็นสาเหตุมาจากความผิดปกติของ spindle fiber
6. การตรวจสอบสายพันธุ์มิวเทชัน ทั้ง 9 สายพันธุ์ คือ sc2025 , sc01 , sc02, sc03, sc04, sc05, sc06, sc07, sc08 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม L074 พบว่าผลการวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากค่าการดูดกลืนคลื่นแสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (OD_{260nm}) มีค่าลดลง 7 สายพันธุ์ คือ sc2025 , sc01 , sc02 , sc04 , sc05 , sc07 และ sc08 จึงสรุปได้ว่าอาจเกิดอนิวพลอยด์
7. จากการตรวจสอบลักษณะนิวเคลียสในเซลล์เห็ดหอมทุกสายพันธุ์ไม่พบลักษณะ multinucleation ดังที่เคยมีรายงานในผลงานวิจัยก่อนหน้านี้
8. ลักษณะดอกเห็ดที่เกิดขึ้นจากการทดลอง พบว่ามีลักษณะหงิกงอผิดปกติไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิมมาก นอกจากนี้ยังไม่มีการสร้างสปอร์อีกด้วย

รายการอ้างอิง

กนิษฐา คุ้มวณิชย์. 2542. **ผลของสารสกัดเมล็ดดองดึง** *Gloriosa super ba* Linn. **ที่มีต่อการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ของแตงโม** *Citrullus lanatus* Mats Nakai. **ในหลอดทดลอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ฐิติมา ตันติกาญจน์. 2529. **การศึกษาพันธุศาสตร์ของเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวและผลของสิ่งแวด ล้อมต่อดอกเห็ดหอม** (*Lentinus edodes* (Berk) Sing.)**บางสายพันธุ์**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดำรง สินไชย. 2521. **การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซม ในแตงโมพันธุ์ซูการ์เบบี้**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประภัสสร โชคสวนทรัพย์. 2539. **การผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มุกดา คูหิรัญ และ ฐิติมา ตันติกาญจน์. 2529. **ผลของอายุสปอร์และสูตรอาหารที่มีผลต่อการงอกของสปอร์เห็ดหอม**. รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 24 สาขาพืช ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม.

มุกดา คูหิรัญ , ฐิติมา ตันติกาญจน์ และ สุทธพรรณ ตรีรัตน์. 2530. **การทำสายพันธุ์ตรวจสอบเพื่อศึกษา** incompatibility factors **ของเห็ดหอมบางสายพันธุ์**. รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 25 สาขาพืช ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม.

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

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ. **การกลายพันธุ์ของพืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 10 – 11.

สุทธพรรณ ตรีรัตน์ และ ชวนพิศ รักษตุล. 2527. **การศึกษาการเพาะเห็ดหอมในถุงพลาสติกโดยใช้วัสดุจากการเกษตร**. รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 22 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2538. การเปลี่ยนแปลงโครโมโซม.**พันธุศาสตร์**. เอ็นพีซับพลายพริ้นติ้ง.กรุงเทพฯ. หน้า 177.

อานนท์ เอื้อตระกูล. 2532. **การเพาะเห็ดหอมในขอนไม้.** โรงพิมพ์พิมพ์สวย 88 กรุงเทพมหานคร หน้า 20 – 27

เอกรินทร์ สายฟ้า. 2525. **พฤกษศาสตร์ เล่ม 2 อัลคาลอยด์ (ตอน 1)** ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 88 หน้า .

Bold, H.C.,Alexopoulos,C.J.,Delevoryas,T.1980.**Morphology of plants and fungi**. Harper & Row, Publishers New York : 687.

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

Cochran, K.W. and E.H. Lucas. 1959 Chemoprophylaxis of poliomyelitis in mice through the administration of plant extracts. **Antibiotics Annual** 1958-1959 : 104.

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

Dnyansagar,V.R. 1992. Polyploidy. **Cytology and Genetics**.4th ed.TATA McGRAW-HILL PUBLISHING. Company Limited.New Delhi : 252-262.

Eigsti,O.J., and Dustin. Jr., 1955. **Chemistry Colchicine in Agriculture Medicine Biology and Chemistry.** U.S.A. : The Lowa State College Press.

Eigsti,O.J., and Dustin. Jr., Gay-Winn.N. 1949. Comments and Communications on the Discovery of the Actin of colchine on Mitosis in 1889. **Science.** 110:692.

Goulet, N.R., K.W. Cochran, and G.C. Brown. 1960. Differential and specific inhibition of ECHO viruses by plant extracts. **Proc. Soc. Exp. Bio. Med**. 103 : 96.

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

Handa, S., Sodhi, H.S. and Phutela,R.P. 1997. Induction of Autopolyploid in *Agaricus Bisporus.* **Mycol. Pl. Pathol.** 27 (3) : 261 –265.

Hosny,M., Gianinazzi-Pearson,V.and Dulieu, H. 1998. Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. **Genome**. 41 : 422-428.

Hussein, F.T. and M.A.A. Narsa. 1974. A chromatographic method for assay of Colchicine alkaloid. **Planta Media**. 25 : 396 – 400.

Kaneda, I., K. Arai, and S. Tokuda. 1964. **Jap. Soc. Food and Nutr**. 16:467.

King and Stansfield , 1990. **A Dictionary of genetics.** p.69.

Lü, H.S. and Mclaughlin, D.J.1995. Alight and electron microscopic study of mitosis in the clamp connection of *Auricularia auricula-judae*. **Can.J. Bot.**73 : 315.332.

Minckler, J., H.O. Anstali, T.M. Minckler. 1971. **Pathobiology**. London.The C.V. Mosby Company.

Molnar, M.and sipi czki, M.1993. Polyploid in the haplontic yeast *Schizosaccharomyces pombe*. : construction and analysis of strains. **Current Genetics**.

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

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

Sarangbin, S.et.al.1994 Formation of autodiploid strains *Aspergillus niger*. And their Application to citric acid production from starch. **J.Ferment.-Bioeng**.77(5) : 474-478.

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

Takashima, K., K. Izumi, H. Iwai, and S. Takeyama. 1973. The hypocholesterolemic action of eritadenine in the rat. **Atherosclerodis** 17 : 491.

Tokita, F., N. Shilukawa, T. Yasumoto, and T. Kaneda. 1972. Isolation and Chemical Structure of the plasma-cholesterol reducing substance from Shii-ta-ke mushroom . **Mushroom Science VIII** : 784.

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

Toyama, H. and Toyama, N. 1995. Multinucleation in conidia of polyploids derived from *Trichoderma reesei*. QM 9414 by colchicine treatment. **J.-IND.-Microbiol**. 15(2) : 121-124.

Toyama, H. and Toyama, N. 1995. Factors affecting formation of micronucleus-like Structures after colchicine treatment of *Trichoderma reesei*. **WORLD-J-Microbiol. Biotechnol**.11 (3) : 326-329.

Toyama, H. and Toyama, N. 1994. Nuclaer abnormality in mycelia of *Pleurotus ostreatus*.Inpresence of colchicine.**J.-Biotechnol**. 35(1) : 97-106.

Volkin, E. and Cohn, W.E. 1954. Estimation of Nuclei Acids. Methods of Biochemical Analysis. **Inter Science**. New York. 1:287 – 305.

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 K.W. Cochran. 1974. Chronic hypo-cholesterolemic effect of Lentinus edodes in mice and absence of effect on scrapic. **Mushroom Science IX (Part I)** : 489.

Yamamura, Y., and K.W. Cochran. 1974. A serective inhibitor of myxoviruses from Shii-ta-ke (*Lentinus edodes*) **Mushroom Science IX (Part I)** : 495.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

1. สูตรอาหาร

1.1 สูตรอาหารแข็ง PDA

Potato dextrose agar 39 กรัม

ละลาย Potato dextrose agar เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autocrave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหารเหลว PDB

Potato dextrose broth 39 กรัม

ละลาย Potato dextrose broth เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autocrave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สูตรอาหารแข็ง LCA

น้ำตาลกลูโคส	1	กรัม
โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.2	กรัม
โซเดียมไนเตรต	2	กรัม
ผงสกัดยีสต์	0.2	กรัม
ผงวุ้น	13	กรัม

pH 6.5 - 7.0

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ต้มให้เดือด ปรับ pH เป็น 6.5 – 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 สูตรหัวเชื้อข้าวฟ่าง

1. ข้าวฟ่างนึ่งเกือบสุก	1.8	กิโลกรัม
2. ขี้เลื่อย	0.2	กิโลกรัม
3. ยีสต์สกัด	10	กรัม
4. ยิปซั่ม	1	กรัม
5. กรดอะซิตริกเข้มข้น	1	กรัม
6. น้ำ	2	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผสมให้เข้ากันใส่ขวดประมาณ ¾ ขวด อุดด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

1.5 สูตรขี้เลื่อยสำหรับเลี้ยงเชื้อเห็ดหอม

1. ขี้เลื่อยไม้ยางพารา ความชื้น 50 – 60 เปอร์เซ็นต์	93.9 %
2. รำข้าว	5 %
3. ยิปซั่ม	1 %
4. ดีเกลือ	0.1 %

ผสมให้เข้ากันใส่ถุงทนร้อน (Polypropylene bag) ถุงละ 300 กรัม อัดให้แน่น ใส่คอขวดและจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. PBS buffer

โซเดียมคลอไรด์	0.8	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.02	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.144	กรัม

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.4 นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. สารละลายโพรพิเดียมไอโอไดด์ (Propidium Iodide)

โซเดียมซิเตรต	0.2235	กรัม
โพรพิเดียมไอโอไดด์	10	มิลลิกรัม

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันเติมน้ำกลั่นจนครบ 20 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.0 จะได้สารละลายโพรพิเดียมไอโอไดด์เข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในโซเดียมซิเตรต 3.8×10^{-2} โมลลาร์

4. 1M Tris-HCl (pH 8.0) buffer.

Tris-base 121.1 กรัม

น้ำกลั่น 800 มิลลิตร

ละลาย Tris-base ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย $HCl_{(conc)}$ แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

5. 0.5M EDTA (pH 8.0)

EDTA 186.1 กรัม

NaOH

ละลาย EDTA-2Na ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 800 มิลลิลิตร ขณะเดียวกันเติม NaOH pellet คนจนกระทั่งสารที่เติมละลายจนหมด (ไม่ควรเติม NaOH pellet มากเกินไป) จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลาย 5M NaOH

6. TE buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0))

Tris-base 1.21 กรัม

EDTA 0.29 กรัม

น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ลิตร

ละลาย Tris-base ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย 1M $HCl_{(conc)}$ จากนั้นเติม EDTA จำนวน 0.29 กรัม แล้วจึงนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน

7. TE saturated phenol

Phenol 500 กรัม

1M Tris-HCl (pH 8.0)

8-hydroxyquinoline 0.5 กรัม

ละลายผลึก Phenol ด้วยการแช่ขวดแก้วที่ภายในบรรจุ Phenol จำนวน 500 กรัม ลงในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 1M Tris-HCl (pH 8.0) จำนวนปริมาตรที่เท่ากันกับ phenol ที่ละลายแล้ว และเติม 8-hydroxyquinoline จำนวน 0.5 กรัม ลงในขวดเดียวกัน แล้วคนเป็นเวลานาน 30 นาที เพื่อให้สารละลายทั้งหมดเข้ากัน จากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) และทิ้งไว้ประมาณ 1 คืน จนกระทั่งเกิดการแยกชั้นของสารละลายออกเป็น 2 ส่วน แล้วจึงดูดเอาสารละลายชั้นบน (upper phase) ทิ้งไป จากนั้นเติม TE buffer ในปริมาตรที่เท่ากันลงในขวด เขย่าขวดเพื่อให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็นและทิ้งไว้สักครู่จนกระทั่งเกิดการแยกชั้นของสารละลายออกเป็น 2 ส่วน และดูดเอาสารละลายชั้นบน (upper phase) ทิ้งไป จากนั้นจึงนำขวดที่มีแต่สารละลายชั้นล่าง (lower phase) ไปทดสอบ pH ด้วย pH paper เมื่อได้ pH เท่ากับ 8.0 แล้วให้เติม 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) จำนวน 50 มิลลิลิตร และเติม 0.2% β-mercaptoethanol จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. Chloroform / isoamylalcohol

   Chloroform 480 มิลลิลิตร

   Isoamylalcohol 20 มิลลิลิตร

   ผสม Chloroform และ Isoamylalcohol เข้าด้วยกัน

9. Phenol/chloroform

   ผสม TE saturated phenol และ Chloroform / isoamylalcohol อัตราส่วนที่เท่ากัน (1:1 v/v) จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. DNA extraction buffer

   CTAB 1 กรัม

   NaCl 4.1 กรัม

   1M Tris-HCl (pH 8.0) 5 มิลลิลิตร

   0.5M EDTA (pH 8.0) 2 มิลลิลิตร

   2-mercarptoethanol 2 มิลลิลิตร

   ละลาย CTAB, NaCl, 1M Tris-HCl (pH 8.0) และ 0.5M EDTA (pH 8.0) ด้วยน้ำกลั่น จำนวน 80 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบในหม้อนึ่งความดัน จากนั้นเติม 2-mercarptoethanol จำนวน 2 มิลลิลิตร ลงไป (ปริมาณของ DNA extraction buffer ที่ต้องเตรียมประมาณ 500 มิลลิลิตร)

11. 50 X TAE buffer

   Tris-base 242 กรัม

   100% Acetic acid 57.1 มิลลิลิตร

   0.5M EDTA (pH 8.0) 100 มิลลิลิตร/ลิตร

12. Loading buffer

   Brophenol blue 25 มิลลิกรัม

   Xylen cyanol FF 25 มิลลิกรัม

   น้ำกลั่น

   Glycerol 5 มิลลิลิตร

   ละลาย Brophenol blue และ Xylen cyanol FF ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม glycerol ลงไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. RNase solution

ละลาย Rnase (Sigma ribonuclease A) จำนวน 10 มิลลิกรัม ใน TAE buffer ด้วยการต้มเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

14. 7.5M Ammonium Acetate

ละลาย Ammonium acetate ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

15. 3M sodium Acetate (pH 5.2)

ละลาย sodium Acetate ด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้เป็น 5.2 ด้วย acetic acid จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

16. Agarose gel 1%

ชั่ง Agarose power 1 g เติมสารละลาย 1 x TAE จนครบ 100 มิลลิลิตร ใน flask นำไปให้ความร้อนจนเดือด เขย่าให้ละลายเข้ากันดี ทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลง สามารถสัมผัสได้จึงเทลงบนถาดเครื่องมือ gel eletrophoresis รอจนแข็งตัว

17. วิธีทำ Agarose gel eletrophoresis

การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี gel eletrophoresis มักจะกระทำภายใต้บัฟเฟอร์ เพื่อลดภาวะ temperature gradient และทำให้กระแสไฟฟ้าเดินทางอย่างสม่ำเสมอ

1. วางแผ่นเจลลงใน eletrophoresis chamber แล้วเท 1X eletrophoresis buffer ลงไปใน chamber ให้ท่วมแผ่นเจล โดยให้ระดับของบัฟเฟอร์อยู่สูงกว่าแผ่นเจลประมาณ 3-5 มม.
2. ต่อ chamber เข้ากับ power supply ด้วยสายไฟฟ้า โดยให้ช่องใส่เจลอยู่ทางด้านขั้วลบ ขณะที่ยังไม่เปิด power supply
3. หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอลงในช่องเจลโดยใช้ micropipiet ในปริมาณที่พอเหมาะและทำด้วยความระมัดระวัง เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างดีเอ็นเอเกิดการฟุ้งกระจาย และอาจปนเปื้อนลงในช่องเจลข้างเคียงได้ บันทึกการหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ ลงในช่องเจลตามลำดับให้เรียบร้อย
4. ปิดฝา chamber แล้วเปิด power supply โดยใช้ constant voltage ที่ 75-100 โวลต์ ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสี bromphenol blue จะเคลื่อนที่ไปจนสุดเจล
5. เมื่อจบการทำ gel eletrophoresis ปิด power supply ถอดสายไฟฟ้า แล้วนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยสาร ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV

18. วิธีคำนวณหาความเข้มข้นปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นใย

วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของดีเอ็นเอในช่วงแสงอุลตร้าไวโอเลต ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260nm}) เท่ากับ 1 จะเท่ากับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำค่าที่ได้คูณกับจำนวนเท่าของการเจือจางดีเอ็นเอก่อนวัดก็จะได้ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จริง

ความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ = $OD_{(260nm)}$ X 50 X จำนวนเท่าของการเจือจางก่อนวัด

19. วิธีคำนวณหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นใย

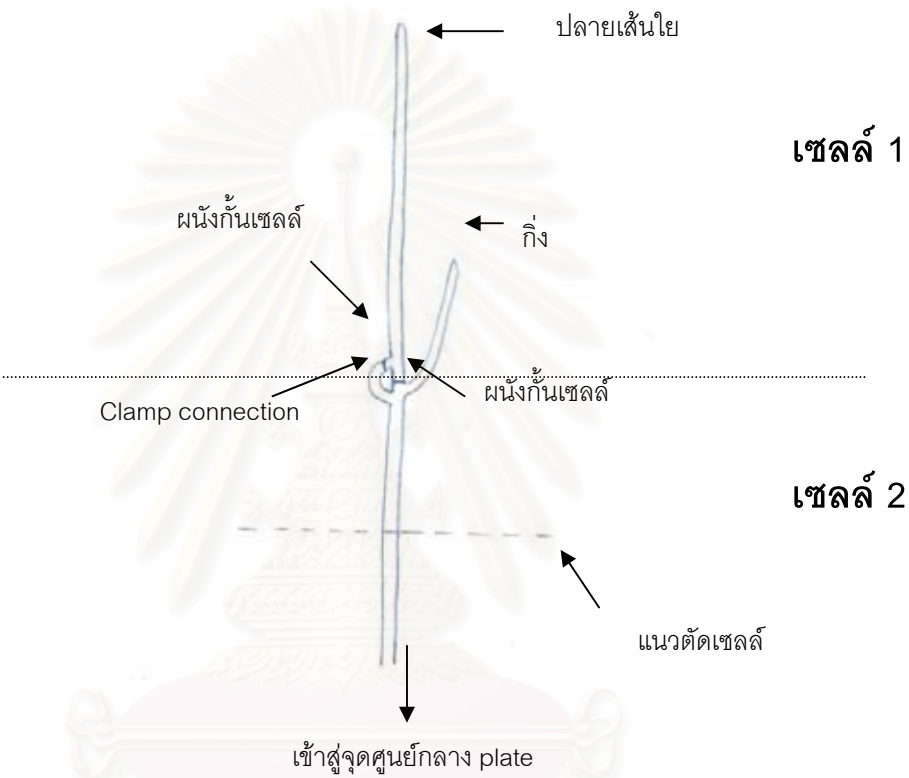
ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่า = $\frac{OD_{(260nm)}}{OD_{(280nm)}}$ = 1.7 – 1.9

.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

รูปประกอบคำอธิบายเส้นใยเห็ดหอม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายคมสัน นันทสุนทร เกิดวันที่ 5 เมษายน พ.ศ.2511 จังหวัดสุพรรณบุรี สำเร็จการศึกษาชั้นปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เข้าศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2542 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2545

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย