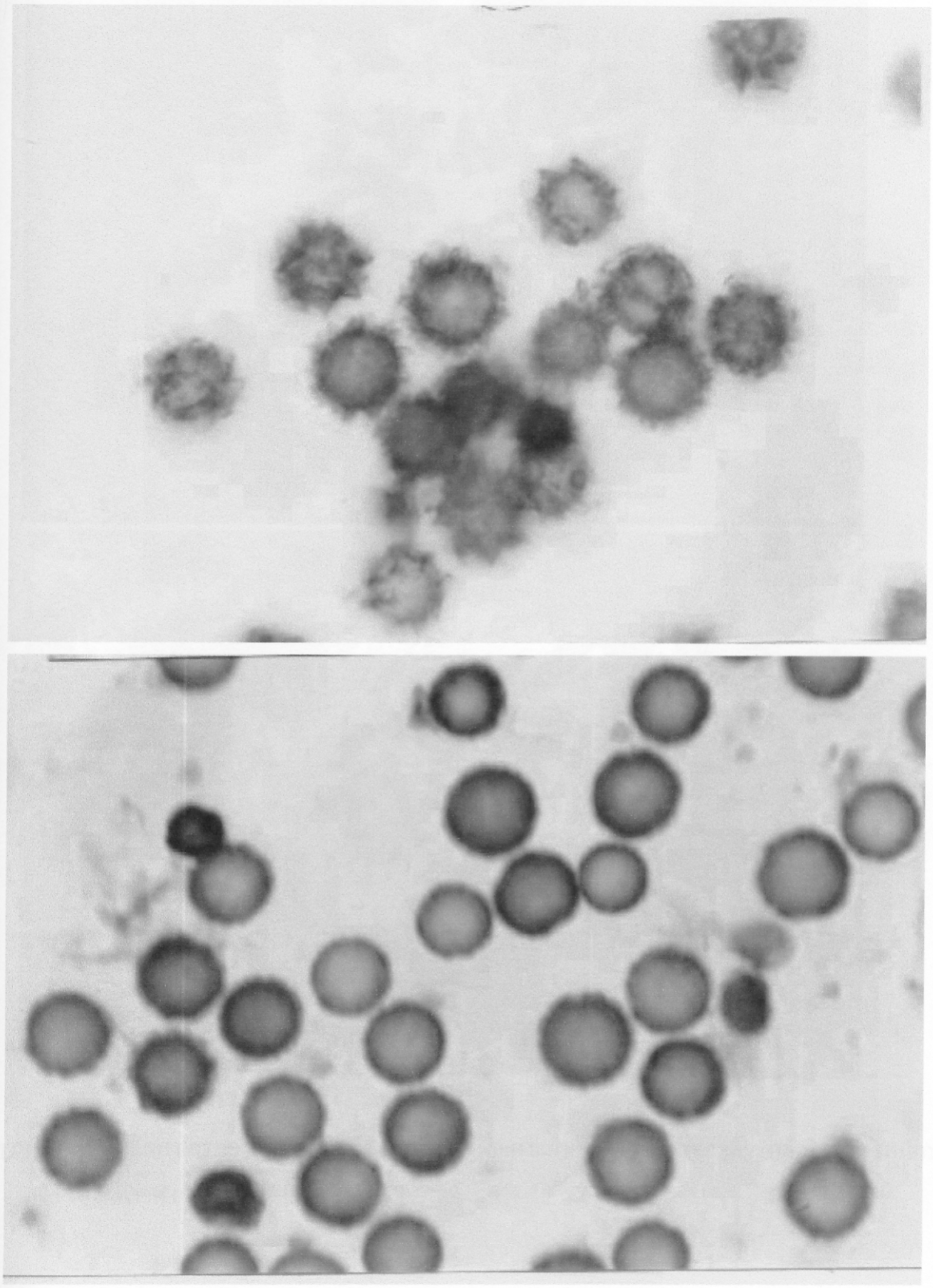
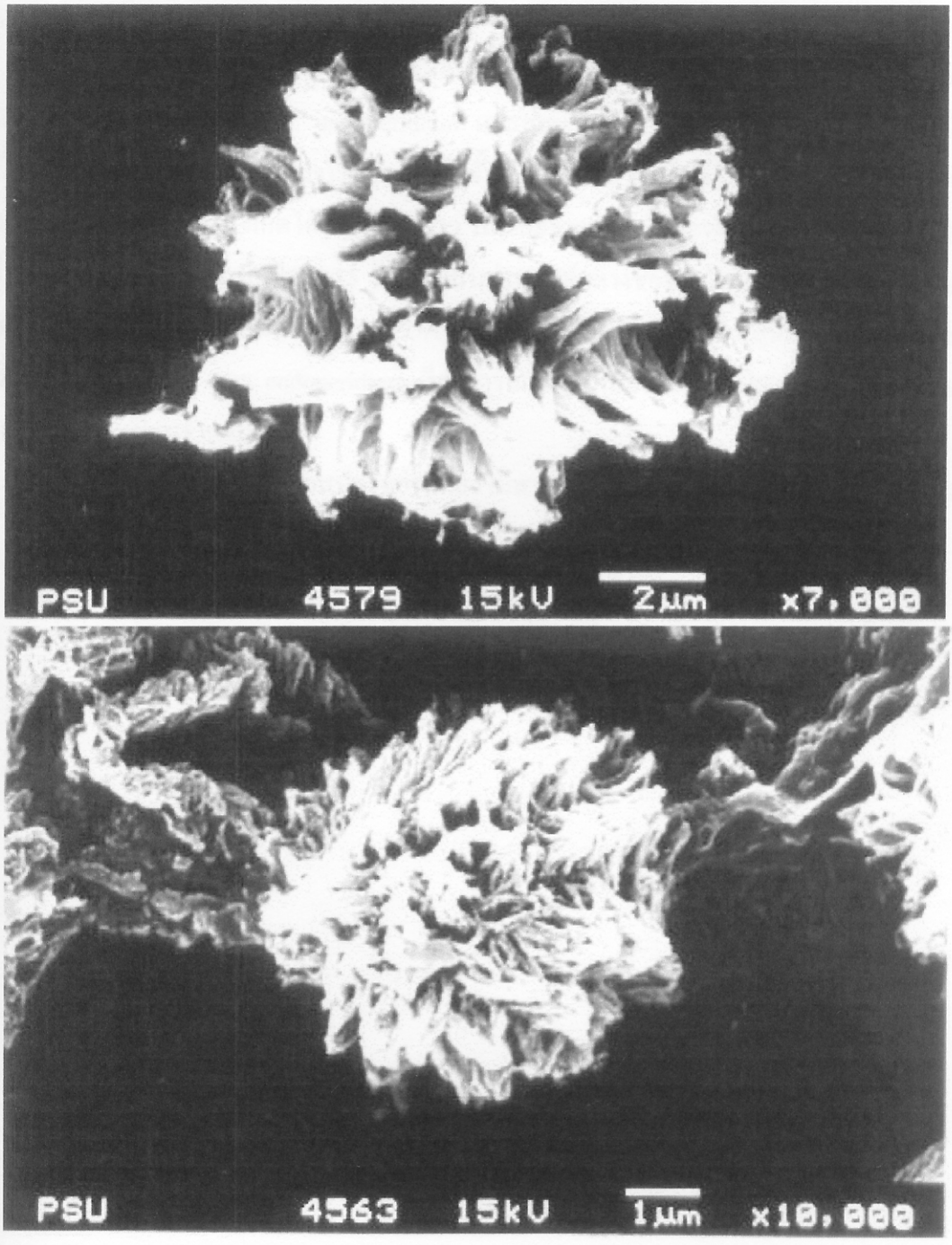


<u>ภาพที่ 6</u> ก. เบสิดิโอสปอร์ของเห็ดเผาะหนัง (บน) และเห็ดเผาะฝ้าย (ล่าง) เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 7 เบสิดิโอสปอร์ของเห็ดเผาะหนัง (บน) และเห็ดเผาะฝ้าย (ล่าง) เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)

3. การแยกเชื้อ

จากการแยกเชื้อเห็ดเผาะหนังและเห็ดเผาะฝ้ายโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของดอกเห็ด 3 ส่วนคือ exoperidium, endoperidium และส่วน gleba ภายในดอกเห็ด พบว่าเมื่อใช้ดอกเห็ดที่แก่ เนื้อเยื่อของดอกเห็ดไม่สามารถเจริญเป็นเส้นใยชั้นที่สองได้ ส่วนเห็ดที่ยังอ่อนโดยเฉพาะดอกเห็ดที่ส่วนของ gleba กำลังสร้างสปอร์สังเกตได้โดยยังมีสีขาว เนื้อเยื่อจากดอกเห็ดจะพัฒนาเป็นเส้นใยชั้นที่ 2 ได้อย่างรวดเร็วภายใน 4-7 วัน และเมื่อมีอายุ 15 วันจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างประมาณ 10-15 มม. โคโลนีของเห็ดเผาะหนังบนอาหารวุ้น PDA จะสร้าง exudate ใส้สีแดงมากกว่าเห็ดเผาะฝ้าย (ภาพที่ 8) เนื้อเยื่อ exoperidium และ endoperidium ก็สามารถเจริญเป็นเส้นใยได้แต่ในส่วนของ exoperidium มักเกิดปัญหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย

การแยกเชื้อเห็ดเผาะจากสปอร์อย่างเดียวไม่สามารถทำได้เนื่องจากสปอร์ไม่งอกในอาหารวุ้น

กุณฑญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ตารางที่ 2 การเจริญของเนื้อเยื่อและสปอร์จากดอกเห็ดเผาะพันธุ์หนังและพันธุ์ฝ้ายเป็นโคโลนี หลังจากแยกเชื้อ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 28 °C

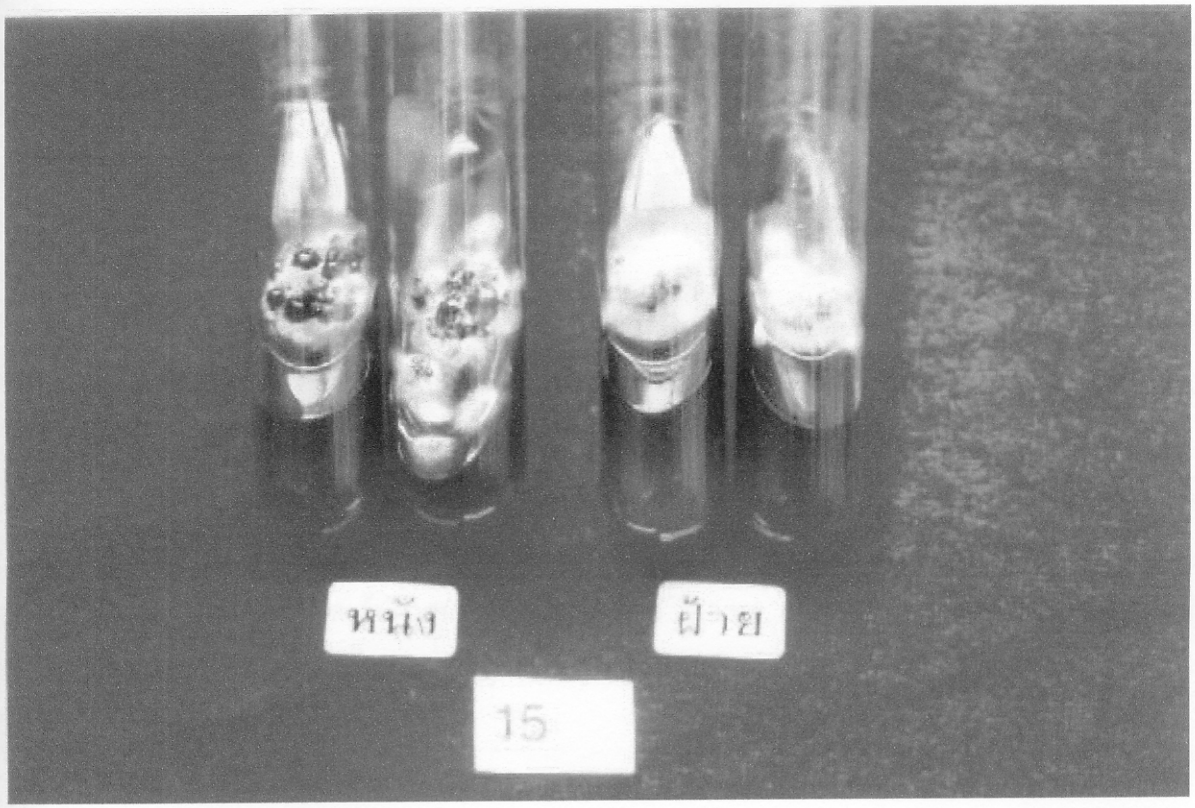
ส่วนของดอกเห็ด	เห็ดเผาะหนัง		เห็ดเผาะฝ้าย	
	ดอกแก่	ดอกอ่อน	ดอกแก่	ดอกอ่อน
การแยกโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture method)				
Exoperidium	-	+	-	+
Endoperidium	-	++	-	++
Gleba (spore+capillitium+basidium)	-	++++	-	++++
การแยกเชื้อจากสปอร์ (Spore culture method)				
Spore	-	ND	-	ND

\+ = เจริญได้น้อย

++ = เจริญได้ปานกลาง

+++ = เจริญได้ดี

ND = ไม่ได้ทำการทดลอง



ภาพที่ 8 เปรียบเทียบเชื้อเห็ดเผาะหนังและเห็ดฝ้ายบนอาหารวุ้น PDA เมื่อมีอายุ 15 วันหลังจากแยกเชื้อ สังเกตโคโลนีของเชื้อเห็ดเผาะหนังมี exudate สีน้ำตาลแดง โปร่งแสง มากกว่าเชื้อเห็ดเผาะฝ้าย

4. การงอกของสปอร์

จากการเพาะเลี้ยงสปอร์ของเห็ดเผาะหนังบนอาหารวุ้น 5 ชนิด ที่อุณหภูมิ 30 °C และ 35 °C เพาะเลี้ยงสปอร์เห็ดร่วมกับเชื้อยีสต์, ใช้สปอร์เห็ดที่ผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ 5 วิธี รวมทั้งเพาะเลี้ยงร่วมกับรากยางนาและสารอาหารที่คาดว่ารากยางนาจะปลดปล่อยออกมาในอาหารปรากฏว่าทุกกรรมวิธีไม่สามารถกระตุ้นให้สปอร์เห็ดเผาะงอกได้

5. การเก็บรักษาเชื้อ

5.1 การเก็บเชื้อเห็ดเผาะหนังบนอาหาร MSM และเททับด้วย parafin oil เป็นเวลา 7-80 วัน เมื่อทำการย้ายเชื้อเห็ดเผาะลงอาหารวุ้น MSM ใหม่ปรากฏว่าเชื้อเห็ดเผาะไม่มีการเจริญเติบโตต่อแสดงให้เห็นว่าเชื้อเห็ดเผาะไม่สามารถเก็บเชื้อโดยวิธีดังกล่าว

5.2 การเก็บเชื้อโดยการย้ายเชื้อลงอาหารใหม่เป็นระยะ ๆ โดยทำทุก ๆ 20 วัน พบว่าเชื้อเห็ดสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ โดยเชื้อเห็ดมีแนวโน้มเจริญได้ดีขึ้นเรื่อย ๆ (ตารางที่ 3) เชื้อเห็ดที่เพิ่งแยกจากดอกเห็ดจะเจริญได้ช้าที่สุดคือ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี 27.3 มม. เมื่อมีอายุ 20 วัน แต่หลังจากผ่านการย้ายเชื้อ (subculture) ไป 11 ครั้ง เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมีขนาดเฉลี่ย 37.8 มม.

ตารางที่ 3 การเจริญของเห็ดเผาะหนังเมื่อเก็บรักษาโดยวิธีย้ายเชื้อเป็นระยะ ๆ

ย้ายครั้งที่	อายุเชื้อเห็ดหลังการแยกเชื้อ (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มม.)* MFM pH 7 เวลา 20 วัน
1	20	27.3 f
2	40	27.5 f
3	60	29.0 ef
4	80	29.0 ef
5	100	31.0 cef
6	120	31.8 bcd
7	140	34.0 cde
8	160	34.8 abc
9	180	36.8 ab
10	200	37.8 a
11	220	37.8 a

6. การเจริญของเส้นใย

6.1 อาหารวุ้น ในการทดลองเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะหนังและเห็ดเผาะฝ้ายบนอาหารวุ้น 7 ชนิด (ตาราง 4) ปรากฏว่าหลังการปลูกเชื้อ 20 วัน เห็ดเผาะหนังมีการเจริญบนอาหาร MFM โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เฉลี่ย 40.6 มม. รองลงไปคือบนอาหาร $MA+M_1$ ส่วนในเห็ดเผาะฝ้ายพบว่าบนอาหาร MA+M ขนาดโคโลนีใหญ่กว่าบนอาหาร MFM โดยมีขนาดของโคโลนีเท่ากับ 40.8 และ 30.4 มม. ตามลำดับ

6.2 แหล่งไนโตรเจน จากการทดลองเพาะเลี้ยงเห็ดเผาะหนังและเห็ดเผาะฝ้ายบนอาหารวุ้นที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันจำนวน 10 ชนิด พบว่า asparagine, arginine, NH_4NO_3 และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดเผาะ โดยทั้งเห็ดเผาะหนังและเห็ดเผาะฝ้ายมีโคโลนีใหญ่สุดเป็นอาหารวุ้นที่มี NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน เห็ดเผาะไม่สามารถใช้ $Ca(NO_3)_2$ และ urea เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ทั้งนี้ไม่มีการเจริญของเส้นใยบนอาหารดังกล่าว (ตารางที่ 5)

6.3 แหล่งคาร์บอน การทดสอบการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะบนอาหารวุ้นที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน 13 ชนิด พบว่าเห็ดเผาะหลังเจริญได้ดีบน soluble starch และ dextrin โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 40.75 และ 39.75 ตามลำดับ โดยบนอาหารทั้ง 2 ชนิดเส้นใยมีความหนาแน่นสูงสุด เห็ดเผาะหนังไม่สามารถใช้ arabinose และ galactose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (ตารางที่ 6)

6.4 ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง จากการเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะหนังบนอาหาร MFM ที่มีความเข้มข้นของ H-ion 5 ระดับพบว่าเห็ดเผาะหนังสามารถเจริญได้ดีในช่วง pH 5-7 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีระหว่าง 33.75-36.50 มม. เมื่อมีอายุ 20 วัน (ตารางที่ 7)

6.5 เห็ดเผาะที่เลี้ยงในที่มืดจะมีการเจริญได้ดีกว่าพวกที่ได้รับแสงสว่างตามปกติภายในห้องปฏิบัติการ โคโลนีเห็ดเผาะหนังบนอาหารวุ้น MFM และ PDA เมื่อเลี้ยงในที่มืดจะมีขนาดใหญ่กว่าโคโลนีที่เลี้ยงให้ได้รับแสงสว่าง 12 ชม. (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 4 การเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะหนังและเห็ดเผาะฝ้ายบนอาหารชนิดต่าง ๆ ที่ระดับ pH 8, อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 20 วัน

ชนิดอาหาร	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มม.)	
	เห็ดเผาะหนัง	เห็ดเผาะฝ้าย
MA+M_1	25.0 b	40.8 a
MFM	40.6 a	30.4 b
PDA	20.4 b	16.0 c
PDA+ใบยางนา	5.0 c	5.0 d
PDA+M_1	18.0 b	11.2 c
PYPDA	18.0 b	12.8 c
เห็ดเผาะ+ดิน+M_1	5.0 c	5.0 d

* ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.05) ตามวิธี Dancan's multiple range test