บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดดอกในลูกผสมที่ไม่เกิดดอกในการทดสอบครั้งแรก

จากข้อมูลเกี่ยวกับการเกิดดอก ทำการทดสอบโดยหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด จุฬา ฯ ลูกผสมที่ไม่เกิดดอก ได้นำมาทดสอบความสามารถในการเกิดดอกในถุงขี้เลื่อยซ้ำอีกครั้ง เพื่อยืนยันผลการทดลองครั้งแรก ได้แก่ C369, C377, C516 และ C504 ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ เมื่อใส่หัวเชื้อเห็ดหอมสายพันธุ์ลูกผสมดังกล่าว ลงในถุงขี้เลื่อยที่ใช้สำหรับการเพาะเห็ดหอม บ่มที่อุณหภูมิ 25 ° ซ. ใช้เวลาประมาณ 3 เดือน เส้นใยจึงเดินเต็มถุง หลังจากนั้นนำไปเปิดดอกในโรงเพาะควบคุมสภาวะแวดล้อม ผลที่ได้เป็นดังนี้ คือ

C369 เกิด maturation และเกิดดอก แต่ผลผลิตต่ำ

C377 เส้นใยเจริญเร็ว แต่ไม่เกิด maturation และไม่เกิดดอก

C516 เส้นใยเจริญช้า ไม่เกิด maturation และไม่เกิดดอก

C504 เส้นใยเจริญช้า ไม่เกิด maturation และไม่เกิดดอก

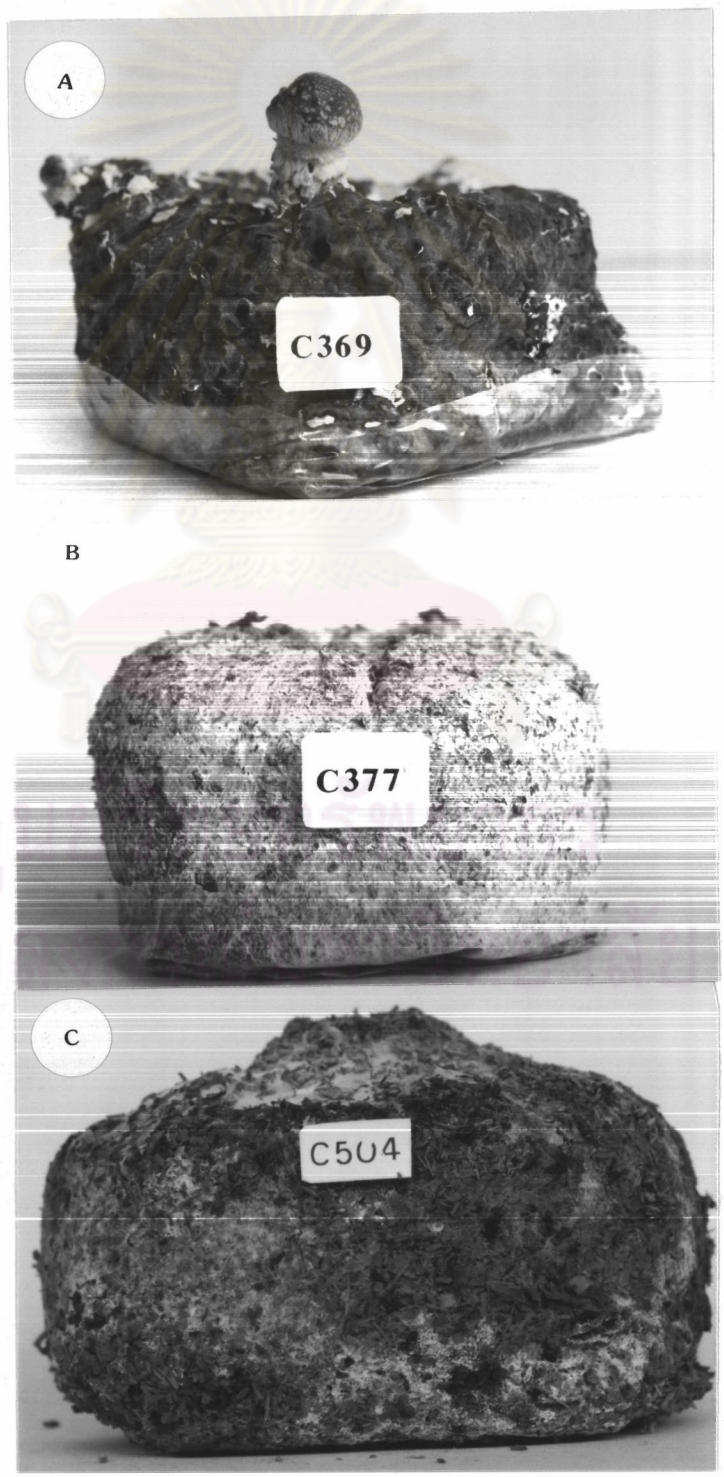
ลักษณะถุงเห็ด C369, C377 และ C504 แสดงในรูปที่ 6 ซึ่งสายพันธุ์ที่ให้ผลที่แตกต่างจากการทดสอบครั้งแรกคือ C369

3.2 ผลการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย (hyphal interaction)

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของเส้นใย di-karyon (somatic incompatibility) เพื่อดูความแตกต่างของสายพันธุ์ เส้นใยที่มีความแตกต่างกัน เมื่อเจริญมาพบกัน จะเกิดแนวระหว่างเส้นใย (barrage) ส่วนเส้นใยที่มีความคล้ายกันจะแทรกประสานกันได้ (ไม่เกิด barrage) ในการทดลองนี้ ทำการทดลองกับ *L. edodes* สายพันธุ์ต่าง ๆ 6 สายพันธุ์ คือ MU2, MU4, MU5, MU9, MU11 และ MU12 จากรูปที่ 7 A *L. edodes* สายพันธุ์ MU2 เกิดแนวระหว่างเส้นใยกับ MU5, MU9 และ MU12 แต่ไม่เกิดแนวระหว่างเส้นใยกับ MU4 และ MU11 สายพันธุ์ MU4 เกิดแนวระหว่าง

รูปที่ 6 Fruiting trial of *L. edodes* hybrids : C369, C377, C516 and C504 (the second trial) ; C369 can fruit but with low yield; C377 and C504 cannot fruit (Note that the culture blocks of C377 and C504 are immature)

A. C369 B.C377 C. C504



เส้นใยกับ MU5, MU9 และ MU12 แต่ไม่เกิดแนวระหว่างเส้นใยกับ MU11 ดังรูปที่ 7 B สายพันธุ์ MU5 เกิดแนวระหว่างเส้นใยกับ MU9, MU11 และ MU12 ดังรูปที่ 7 C และจากรูปที่ 7 D MU9 เกิดแนวระหว่างเส้นใยกับ MU11 และ MU12 ส่วน MU11 ก็เกิดแนวระหว่างเส้นใยกับ MU12 เช่นกัน

จากผลของปฏิกิริยาระหว่างเส้นใยทำให้สามารถจัดกลุ่ม *L. edodes* ทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 MU2, MU4, MU11

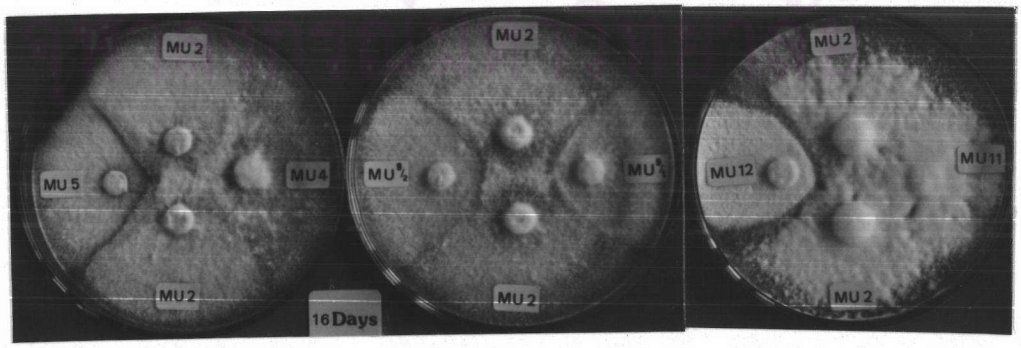
กลุ่มที่ 2 MU5

กลุ่มที่ 3 MU9

กลุ่มที่ 4 MU12

รูปที่ 7 Hyphal interaction among 6 strains of *L. edodes* (MU2, MU4, MU5, MU9, MU11 and MU12) on PDY agar plate, self-pairings with no barrage were placed in each plate as a control.

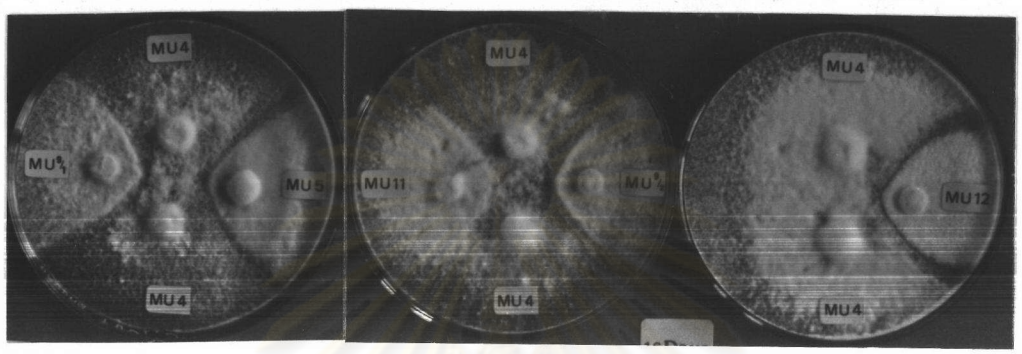
7 A MU2 and MU4, MU11 have no barrage
MU2 and MU5, MU9, MU12 have barrage



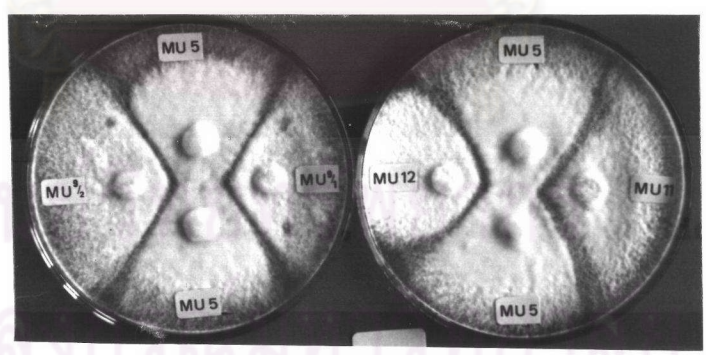
รูปที่ 7 (ต่อ)

7 B MU4 and MU11 have no barrage

MU4 and MU5, MU9, MU12 have barrage



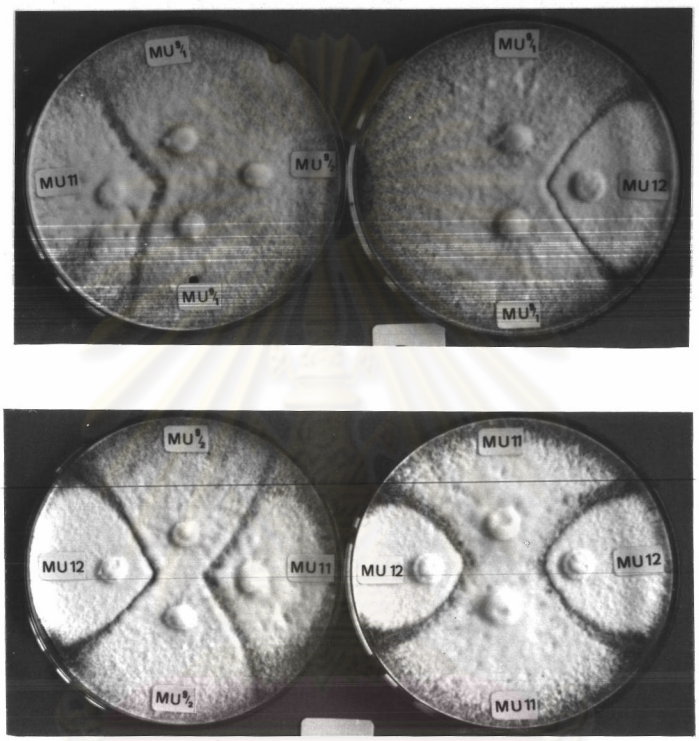
7 C MU5 and MU9, MU11, MU12 have interaction zone



รูปที่ 7 (ต่อ)

7 D MU9 and MU11, MU12 have barrage

MU11 and MU12 have barrage



3.3 การศึกษารูปแบบการเจริญของเส้นใย *L. edodes* ในอาหารเหลว(PDYB)

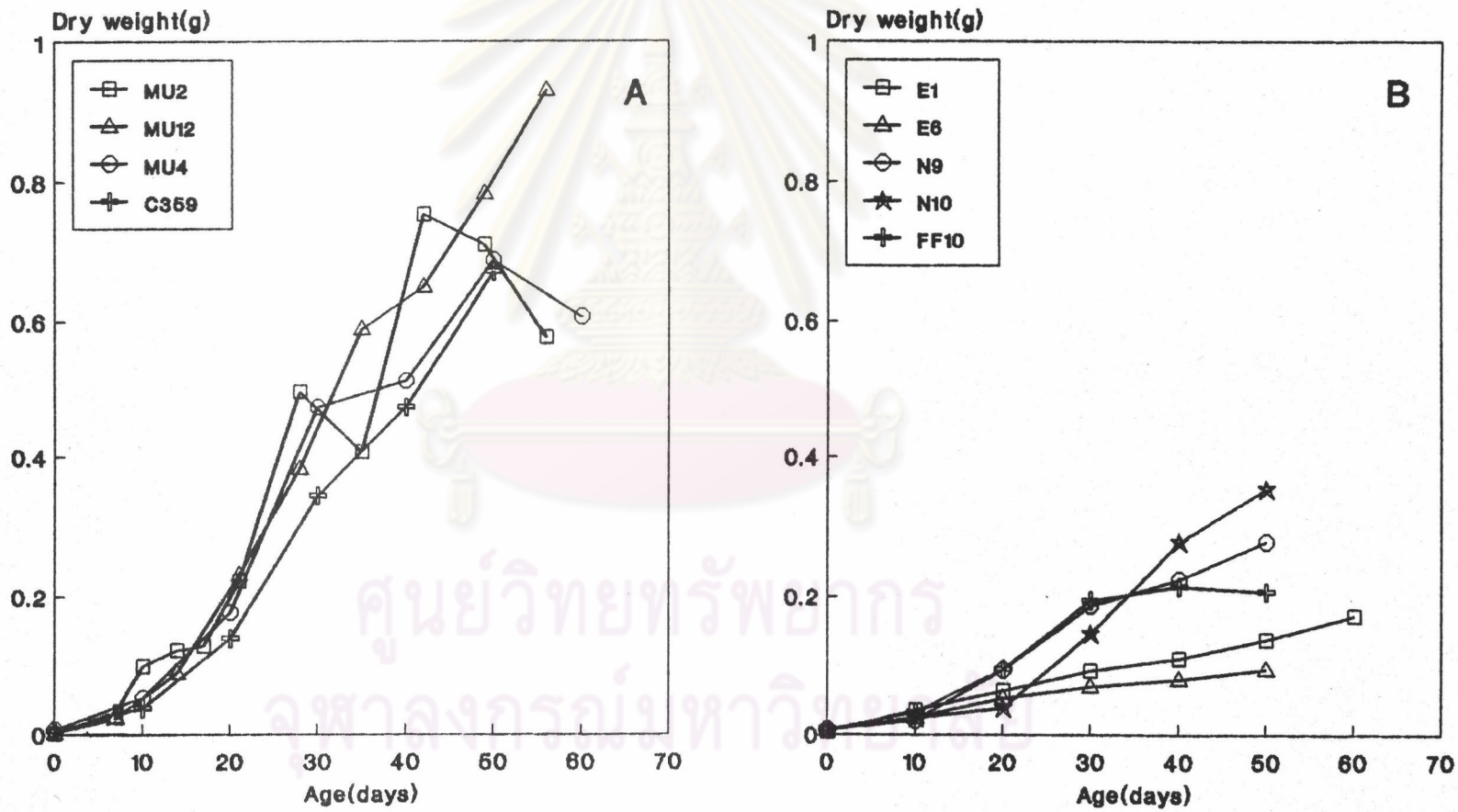
การศึกษารูปแบบการเจริญของเส้นใยเห็ดหอม เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว (PDYB) ในช่วงอายุ 10-50 วัน เพื่อให้ทราบถึงการเจริญในแต่ละช่วงอายุ ทำการศึกษาโดยการชั่งน้ำหนักแห้งเส้นใย dikaryon สายพันธุ์ พ่อ-แม่ คือ MU2, MU12 และ MU4 และสายพันธุ์ลูกผสม คือ C359 ส่วนเส้นใย monokaryons ได้แก่ E1, E6, N9, N10 และ FF10

ผลที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 8 A,B คือเส้นใย dikaryon ทุกสายพันธุ์มีรูปแบบการเจริญเป็นแบบทวีคูณ (logarithmic growth) ช่วง log phase อยู่ในช่วงอายุ 20-30 วัน และจะเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่อายุ 40-50 วัน การเจริญของทุกสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ส่วนเส้นใย monokaryon มีการเจริญใกล้เคียงกันทุกตัว ยกเว้น E6 ที่มีการ

รูปที่ 8 Typical pattern of growth curve demonstrating the accumulation of *L. edodes* mycelial dry weight during growth in static PDYB medium

A. Dikaryotic culture : parents (MU2, MU12, MU4) and hybrid (C359)

B. Monokaryotic culture (E1, E6 ; N9, N10 FF10)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เจริญต่ำที่สุด รูปแบบการเจริญของ N9, N10 และ FF10 เป็นแบบทวิคูณเช่นกัน และเข้าสู่ stationary phase ที่อายุ 40-50 วัน เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญระหว่างเส้นใย dikaryon และ เส้นใย monokaryon จะเห็นว่าเส้นใย dikaryon มีการเจริญสูงกว่าเส้นใย monokaryon ประมาณ 2-3 เท่า

3.4 <u>การสกัดโปรตีนจากเส้นใย *L. edodes*</u>

เนื่องจากการศึกษาเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซล จำเป็นที่จะต้องทำให้เซลแตก เนื้อที่สิ่งต่าง ๆ ภายในเซลรวมทั้งโปรตีนจะได้ถูกปลดปล่อยออกมาจนหมด ในการทดลองนี้ทำให้เซลแตกโดยการบดด้วยเครื่อง (homogenization)และตามด้วยการใช้เสียงความถี่สูง(sonication) ซึ่งทำให้เซลแตกอย่างสมบูรณ์ รูปที่ 9 A แสดงลักษณะของเส้นใย dikaryon ปกติ มี clamp connection (ศรชี้) เมื่อบดแล้วเส้นใยจะแตกเป็นท่อนเล็กลงและโปร่งแสงขึ้น ดังรูปที่ 9 B ต่อจากนั้นเมื่อใช้เสียงความถี่สูง จะทำให้เส้นใยแตกเป็นท่อนเล็กลงกว่าเดิม และสิ่งที่อยู่ภายในเซลจะถูกปล่อยออกมาหมด เหลือเพียงโครงร่างเซล ดังรูปที่ 9 C

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ชี้ให้เห็นว่า การบดเพียงอย่างเดียวไม่สามารถที่จะทำให้เซลแตกอย่างสมบูรณ์ได้ เนื่องจากเมื่อใช้เสียงความถี่สูง ก็จะมีโปรตีนถูกปล่อยออกมาในปริมาณสูง โดยเฉพาะในเส้นใย dikaryon หลังจากการใช้เสียงความถี่สูง ยังตรวจพบโปรตีนในปริมาณที่สูง และสูงกว่าการบดในครั้งแรกประมาณเท่าตัวขึ้นไป (รูปที่ 10.1, 10.2, 11.1 และ 11.2) ส่วนในเส้นใย monokaryon ตรวจพบโปรตีนในปริมาณใกล้เคียงหรือสูงกว่าการบดครั้งแรก (รูปที่ 10.3 และ 11.3)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

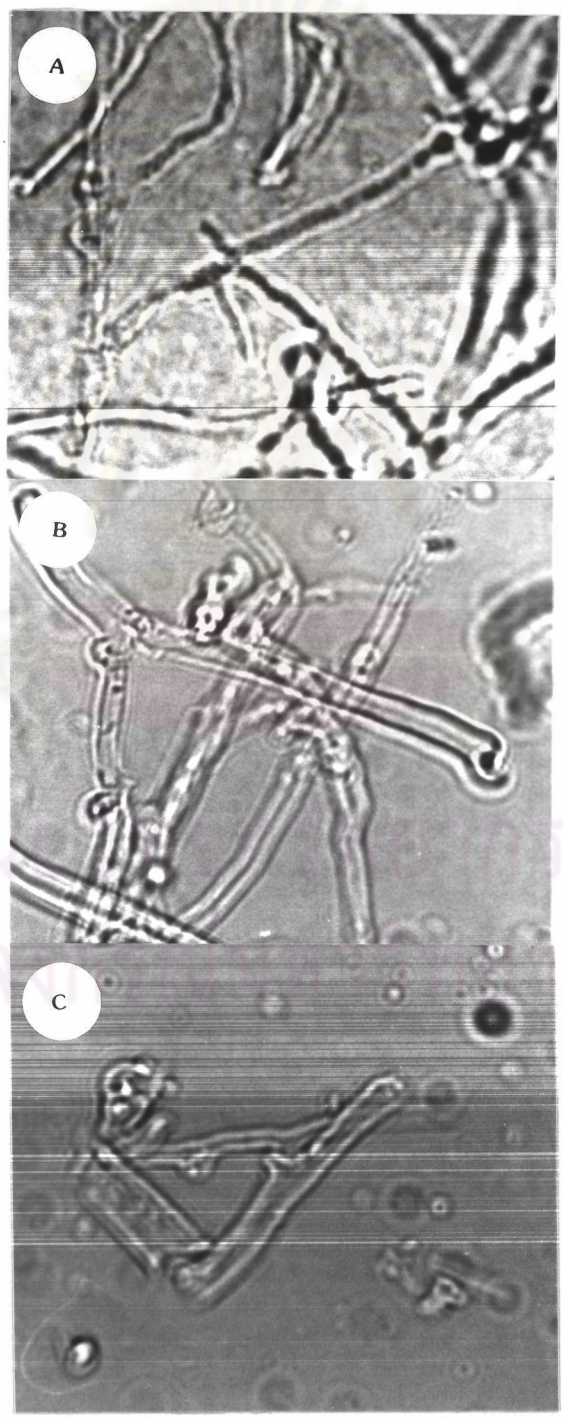
I17112404

รูปที่ 9 The light micrograph of *L. edodes* myceluim (x200), after breaking with homogenizer and sonicater

A. Intact mycelium

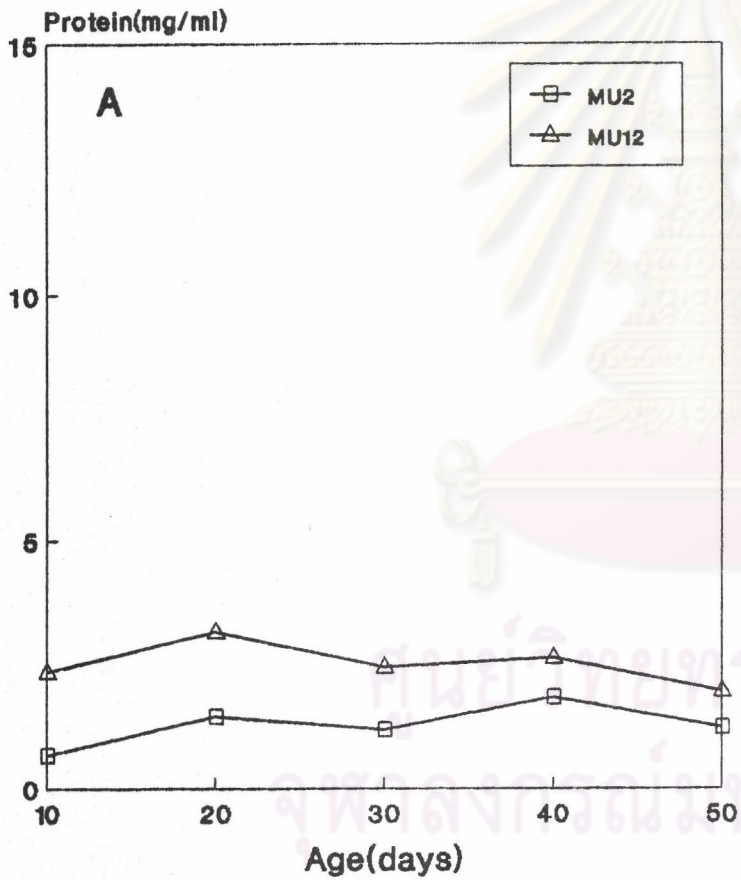
B. Homogenized mycelium

C. Sonicated mycelium

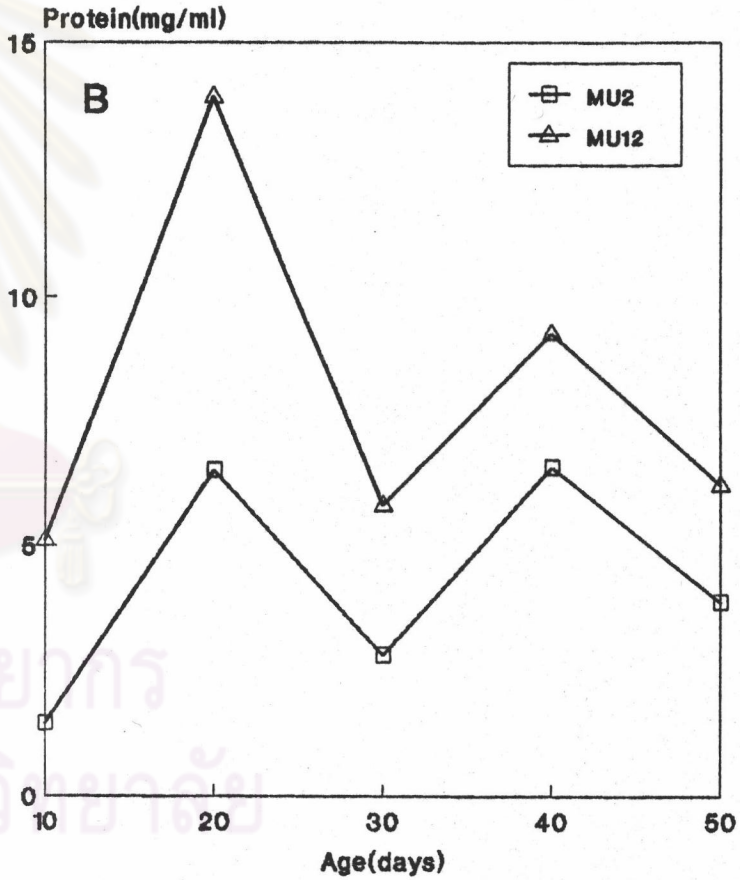


รูปที่ 10.1 Protein (mg/ml) from *L. edodes* dikaryotic mycelia : parents (MU2 and MU12) after breaking with homogenizer and sonicater

10.1 A Homogenization



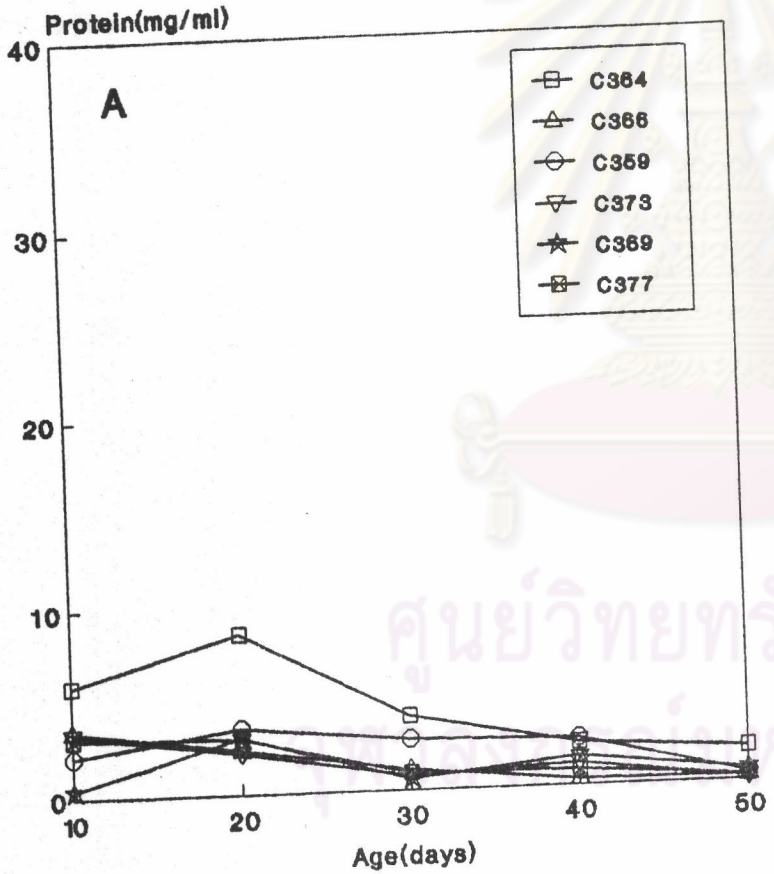
10.1 B Homogenization plus Sonication



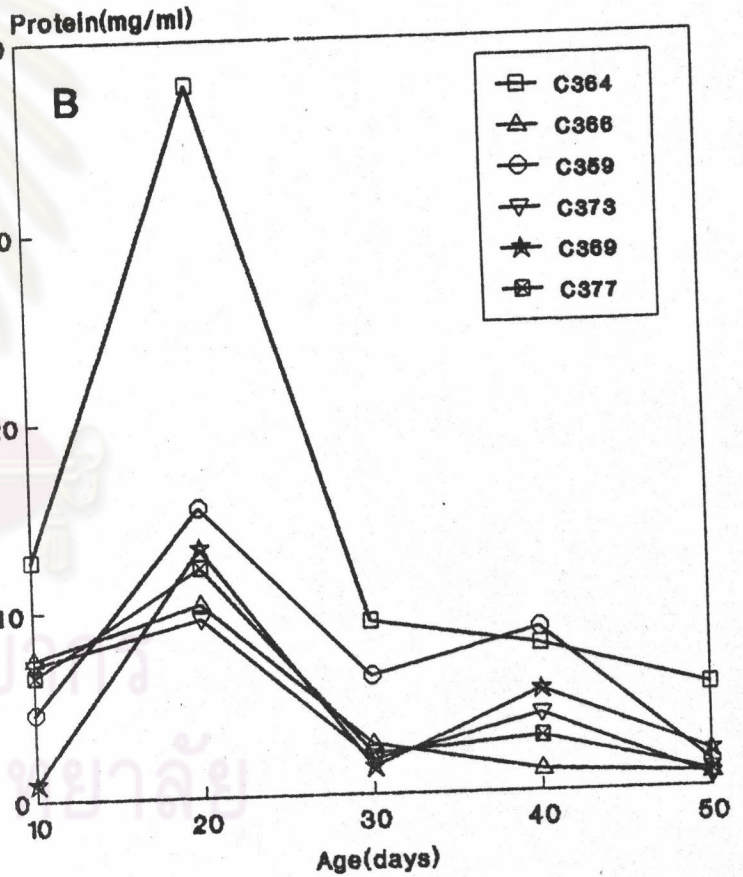
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10.2 Protein (mg/ml) from *L. edodes* dikarytic mycelia : hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377) after breaking with homogenizer and sonicater

10.2 A Homogenization



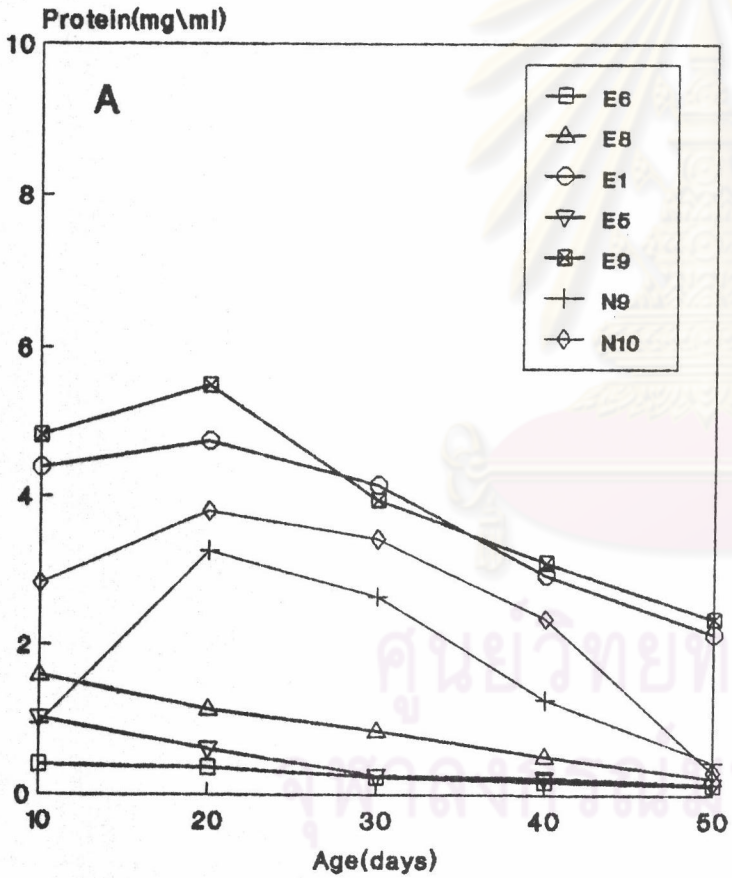
10.2 B Homogenization plus Sonication



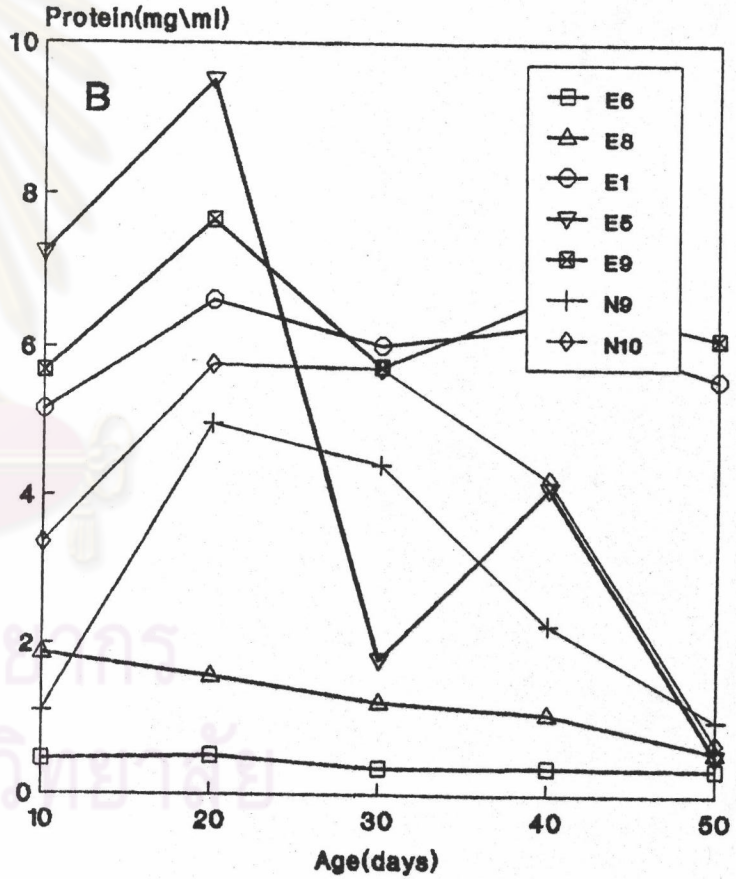
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10.3 Protein (mg/ml) from *L. edodes* monokaryotic mycelia (E6, E8, E1, E5, E9, N9, N10) after breaking with homogenizer and sonicater

10.3 A Homogenization

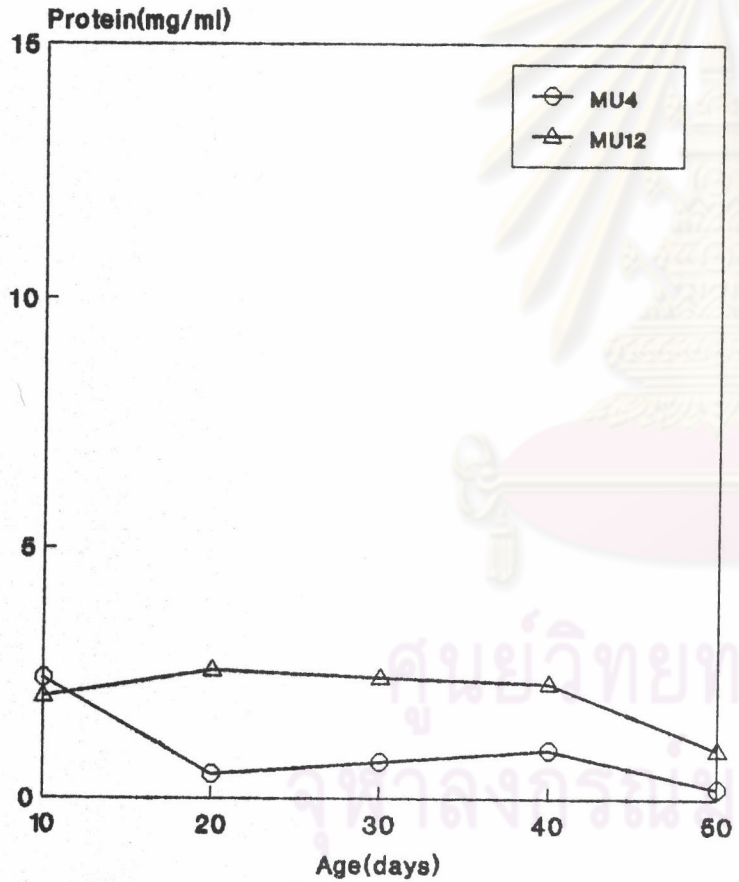


10.3 B Homogenization plus Sonication

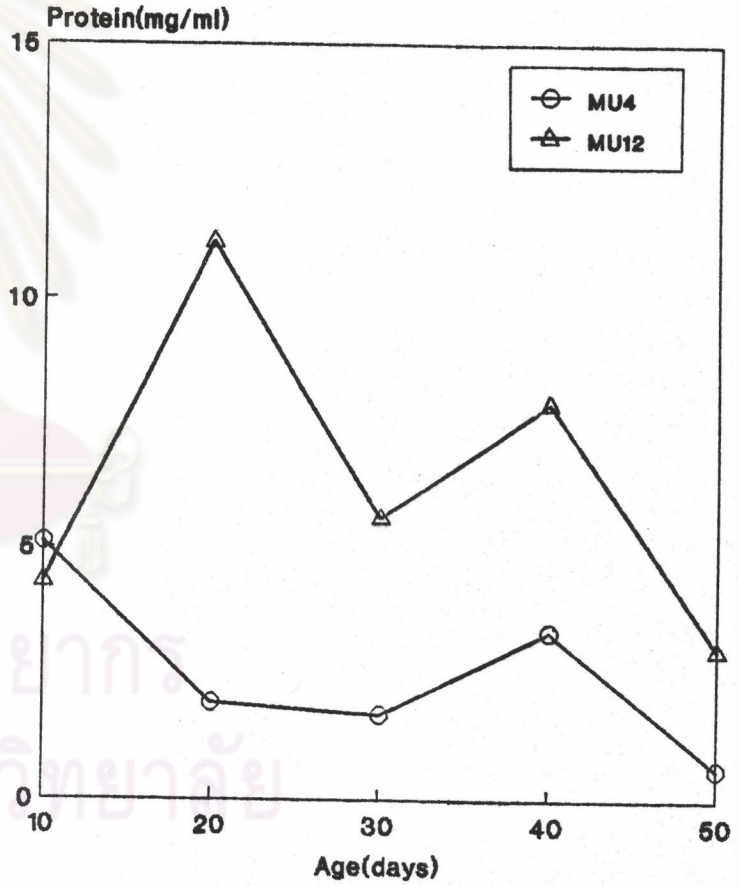


รูปที่ 11.1 Protein (mg/ml) from *L. edodes* dikaryotic mycelia : parents (MU4 and MU12) after breaking with homogenizer and sonicater

11.1 A Homogenization



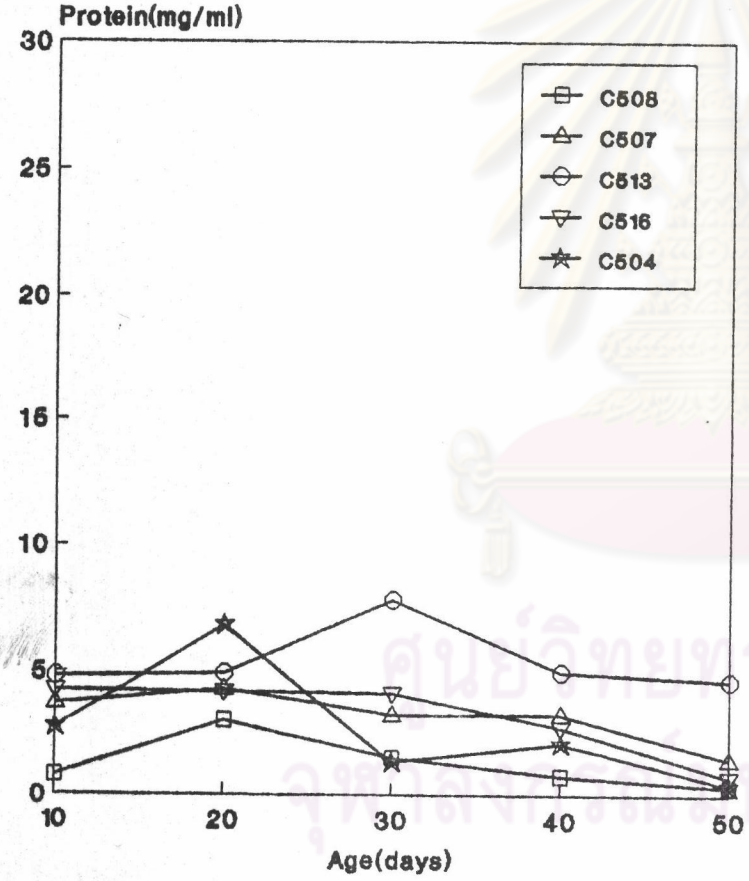
11.1 B Homogenization plus sonication



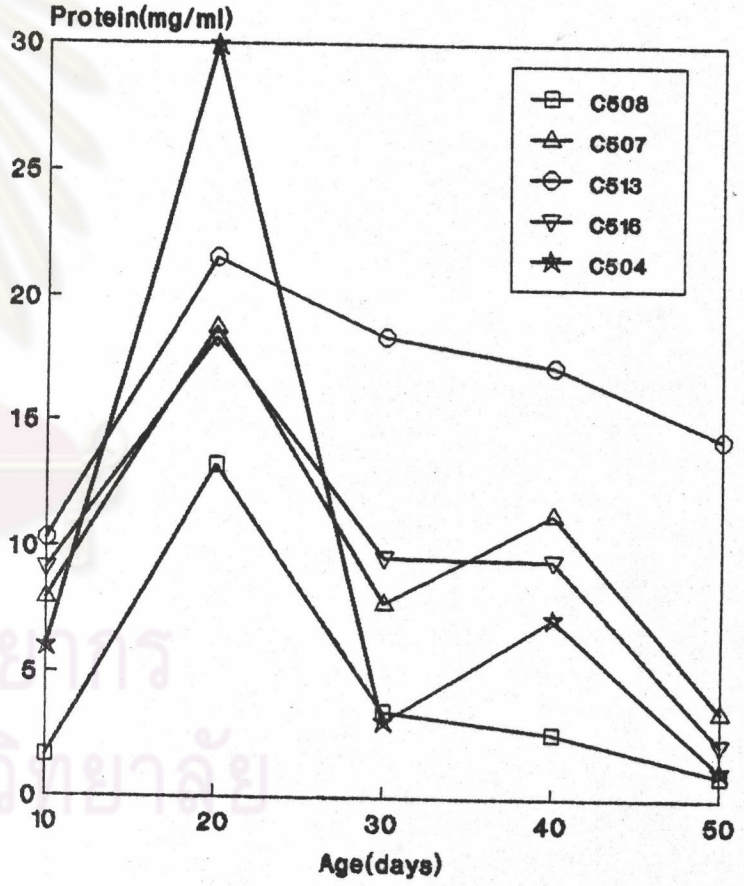
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11.2 Protein (mg/ml) from *L. edodes* dikaryotic mycelia : hybrids (C508, C507, C513, C516, C504) after breaking with homogenizer and sonicater

11.2 A Homogenization



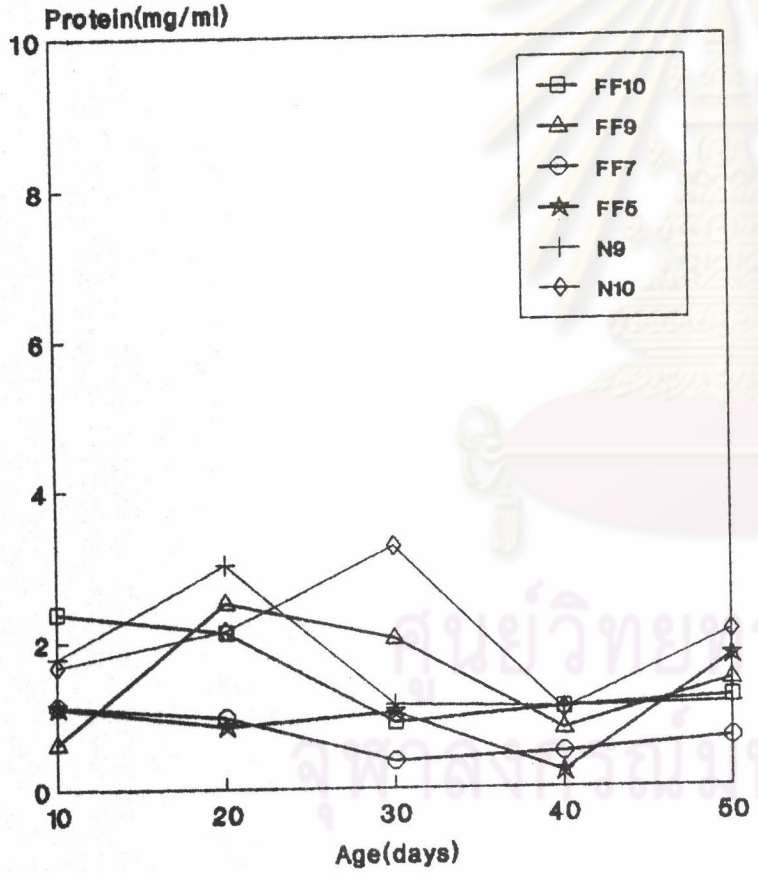
11.2 B Homogenization plus Sonication



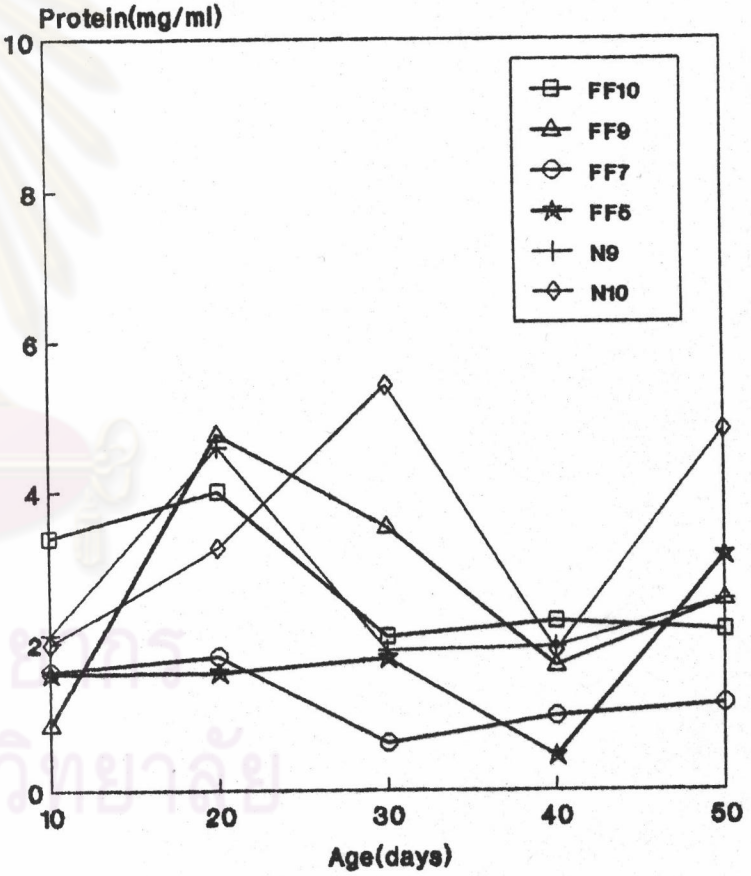
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11.3 Protein (mg/ml) from *L. edodes* monokaryotic mycelia (FF10, FF9, FF7, FF5, N9, N10) after breaking with homogenizer and sonicater

11.3 A Homogenization



11.3 B Homogenization and Sonication



3.5 ผลการศึกษารูปแบบการเจริญของเส้นใย *L. edodes* กับการผลิตเอนไซม์ laccase และ acid phosphatase

เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการเจริญของเส้นใย *L. edodes* กับการผลิตเอนไซม์ laccase ภายในเซล, laccase ที่ปล่อยออกมาภายนอกเซล และ acid phosphatase ทำการทดสอบในเส้นใย dikaryon สายพันธุ์ พ่อ-แม่ ได้แก่ MU2, MU12 และ MU4 และในสายพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ C359 และในเส้นใย monokaryon E6, N9, N10 และ FF10 ซึ่งผลจากการทดลองนี้พบว่า สำหรับเอนไซม์ laccase ภายในเซล นั้น เส้นใย dikaryon (พ่อ-แม่ และลูกผสม) มีการสร้างเอนไซม์เป็นแบบควบคู่ไปกับการเจริญ (Growth associative enzymes) กล่าวคือ เมื่อเส้นใยมีการเจริญมากขึ้น การผลิตเอนไซม์ก็มากขึ้นด้วย (รูปที่ 12.1) ในเส้นใย monokaryon พบว่า E6 ซึ่งมีการเจริญต่ำที่สุด กลับมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าเส้นใย monokaryon ตัวอื่นประมาณ 100 เท่า อย่างไรก็ตาม การผลิตเอนไซม์จะสูงขึ้นเมื่อการเจริญมากขึ้น (รูปที่ 12.2) โดยเฉพาะในช่วงอายุ 30-50 วัน ซึ่งเป็นช่วง mid-log ถึง stationary phase สำหรับการผลิตเอนไซม์ laccase ที่ปล่อยออกมานอกเซล และ acid phosphatase ก็มีความสัมพันธ์กับรูปแบบการเจริญของเส้นใย เช่นเดียวกับ laccase ภายในเซล คือ เป็นแบบควบคู่ไปกับการเจริญ (รูปที่ 13.1, 13.2, 14.1, 14.2)

3.6 การผลิตเอนไซม์ laccase ใน *L. edodes*

3.6.1 เอนไซม์ laccase ภายในเซล (intracellular laccase)

การวิเคราะห์เอนไซม์ laccase ภายในเซล ในช่วงอายุ 10-50 วัน ทำการวิเคราะห์ในสารละลายที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเส้นใย *L. edodes* โดยการบด และการใช้เสียงความถี่สูงรวมกัน (ภาคผนวกที่ 6)

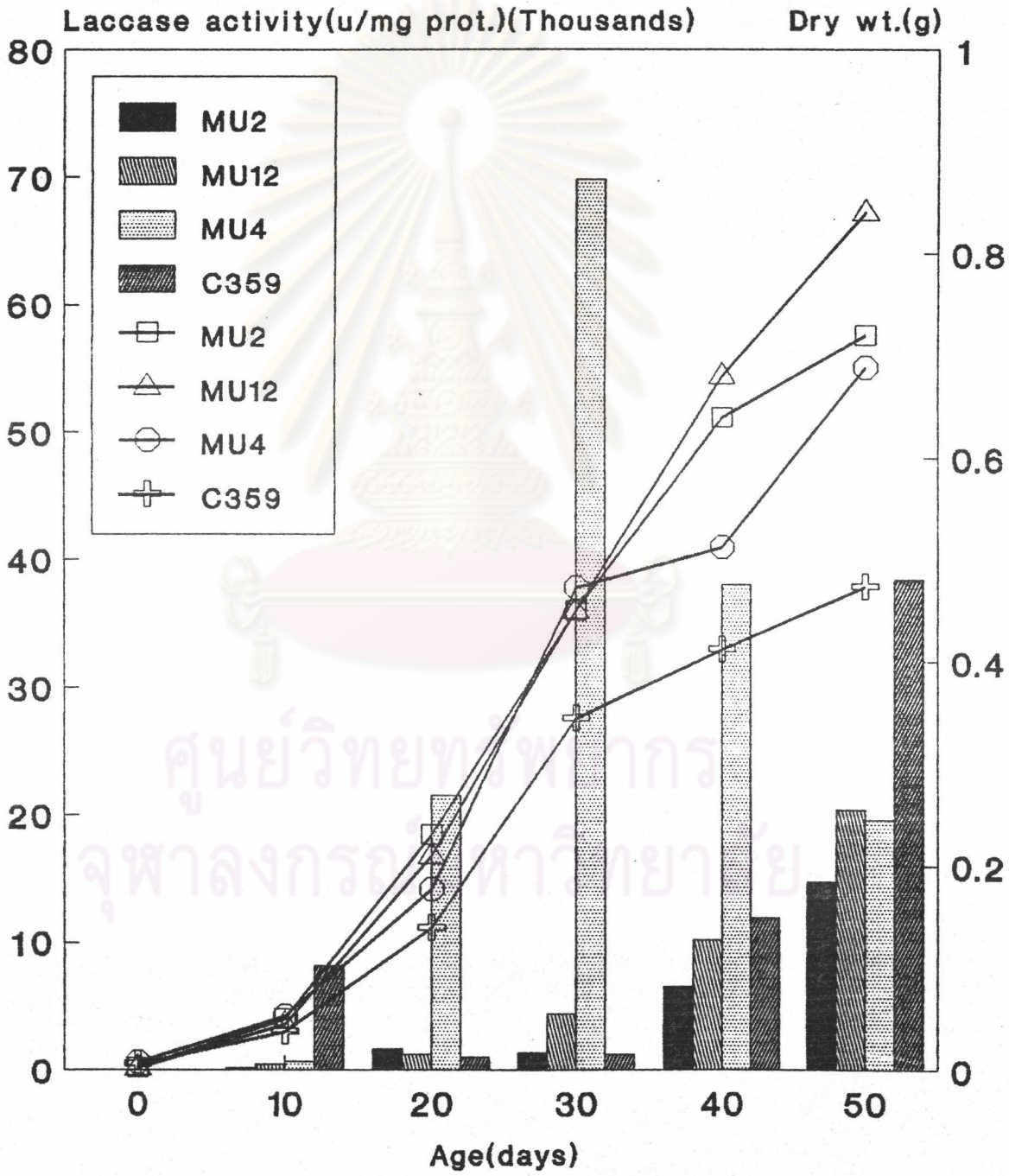
ทำการเปรียบเทียบระดับการผลิตเอนไซม์ที่ช่วงอายุ 30-50 วัน เนื่องจากการเจริญของเส้นใยอยู่ใน mid-log ถึง stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่มีการผลิตเอนไซม์ได้สูง

ในการทดลองชุด ที่มี MU2 และ MU12 เป็นสายพันธุ์ พ่อ-แม่ ที่มีลูกผสมรหัส C3- นั้น MU12 มีแอคติวิตีสูงกว่า MU2 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับลูกผสมแล้ว MU2 และ MU12 มีแอคติวิตี

รูปที่ 12.1

Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of intracellular laccases (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes*

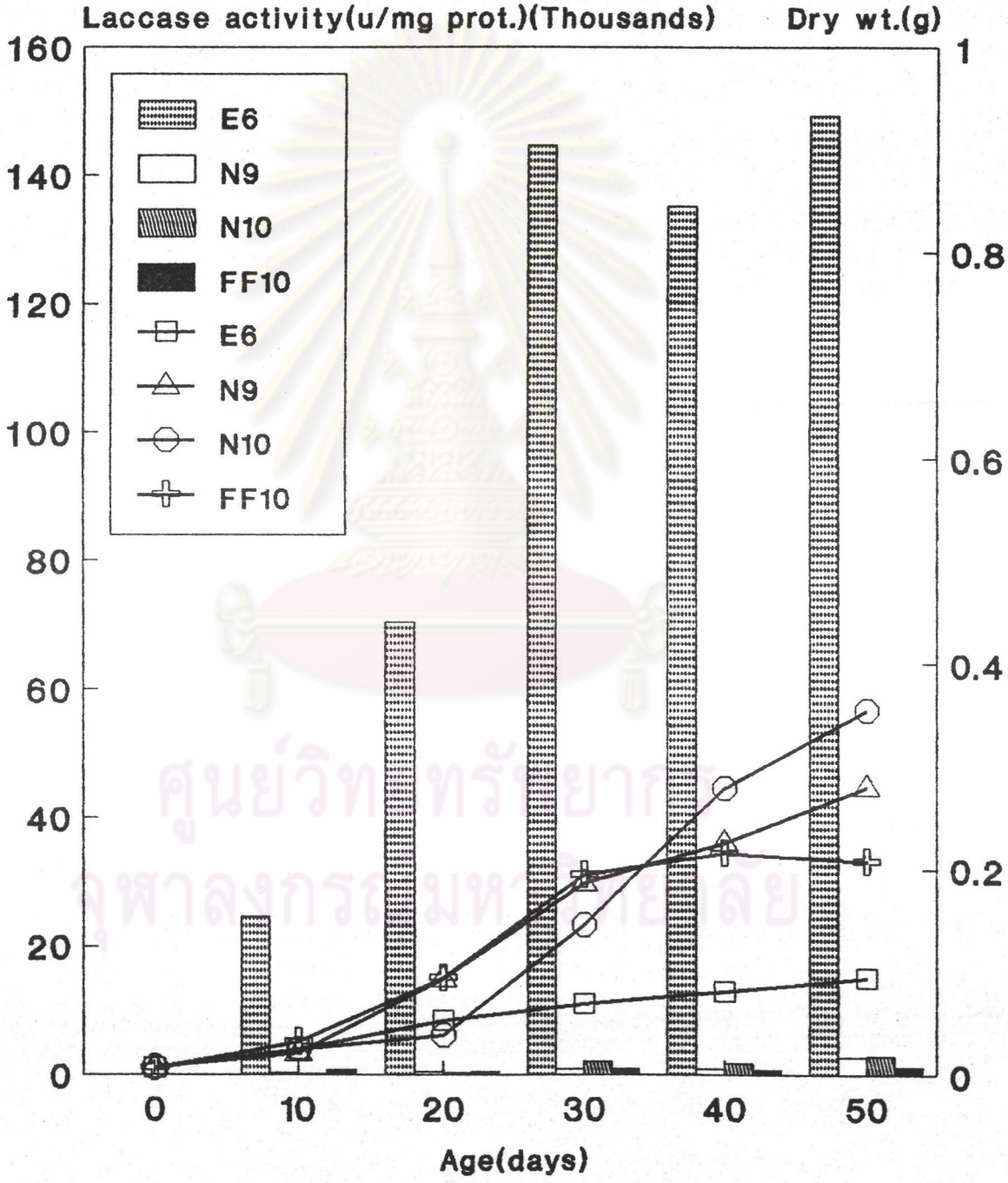
dikaryotic culture : parents (MU2, MU12, MU4) and hybrid (C359)



รูปที่ 12.2

Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of intracellular laccases (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes*

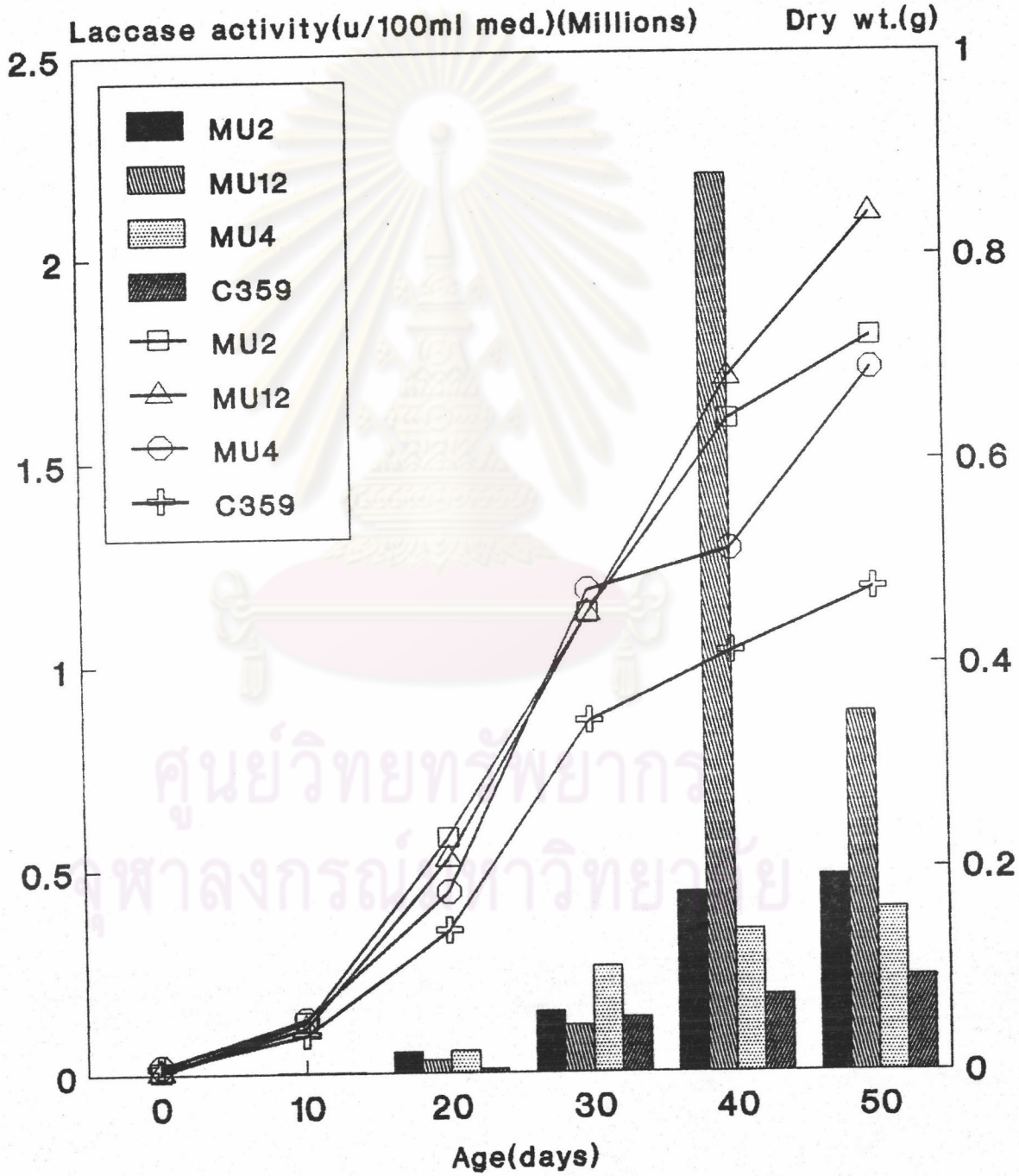
monokaryotic culture (E6, N9, N10, FF10)



รูปที่ 13.1

Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of extracellular laccases (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes*

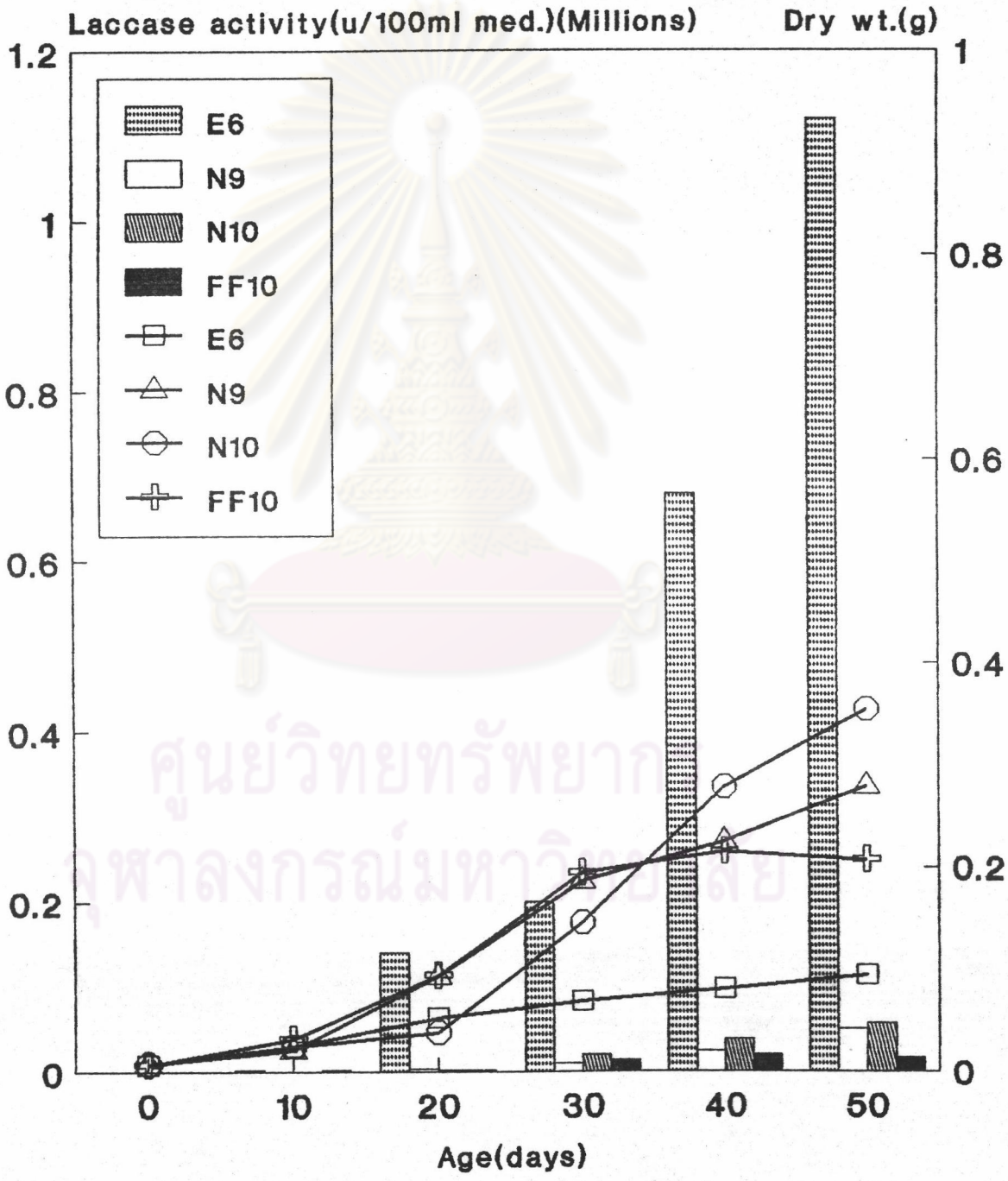
dikaryotic culture : parents (MU2, MU12, MU4) and hybrid (C359)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13.2

Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of extracellular laccases (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes* monokaryotic culture (E6, N9, N10, FF10)

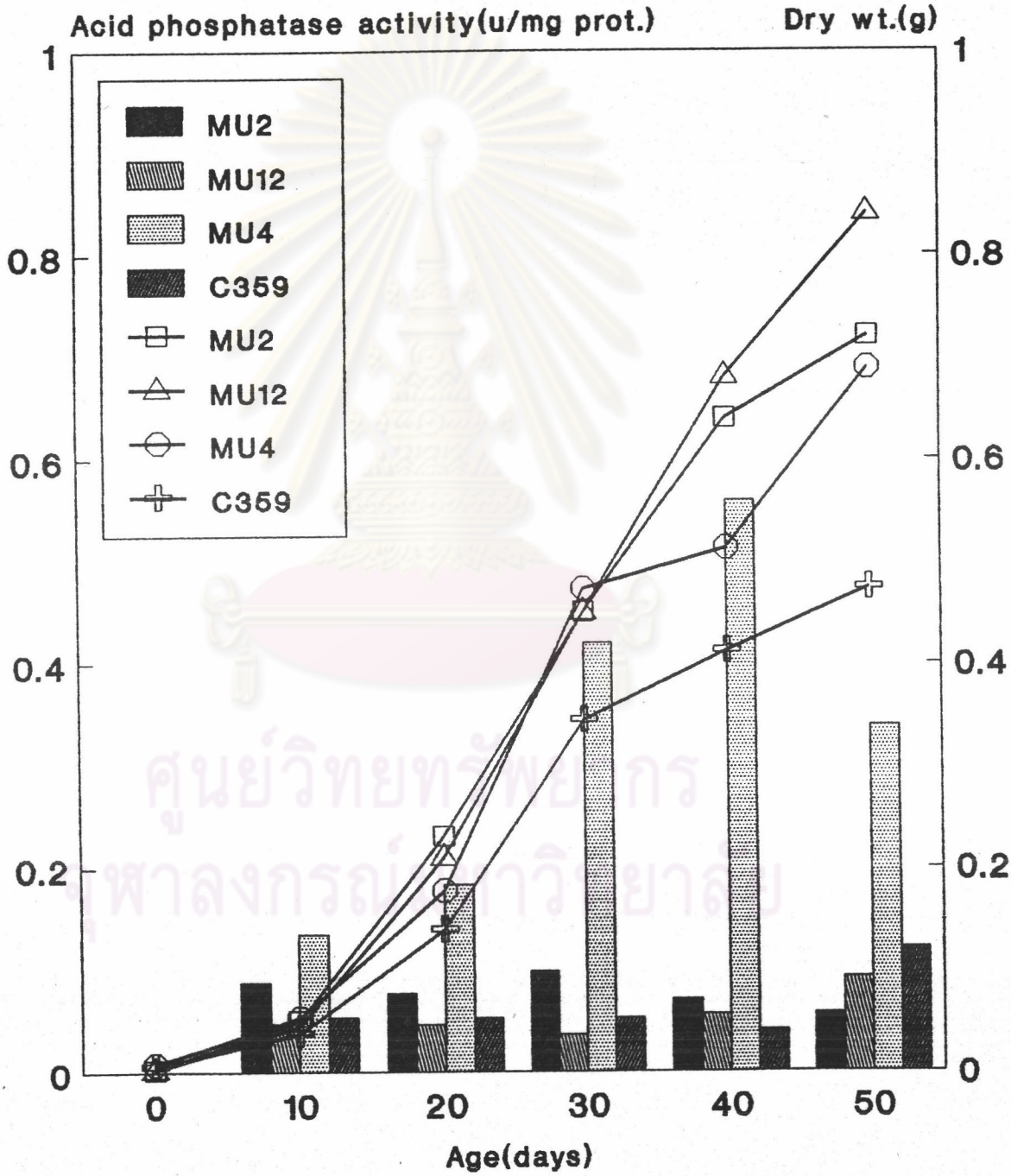


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14.1

Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of acid phosphatase (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes*

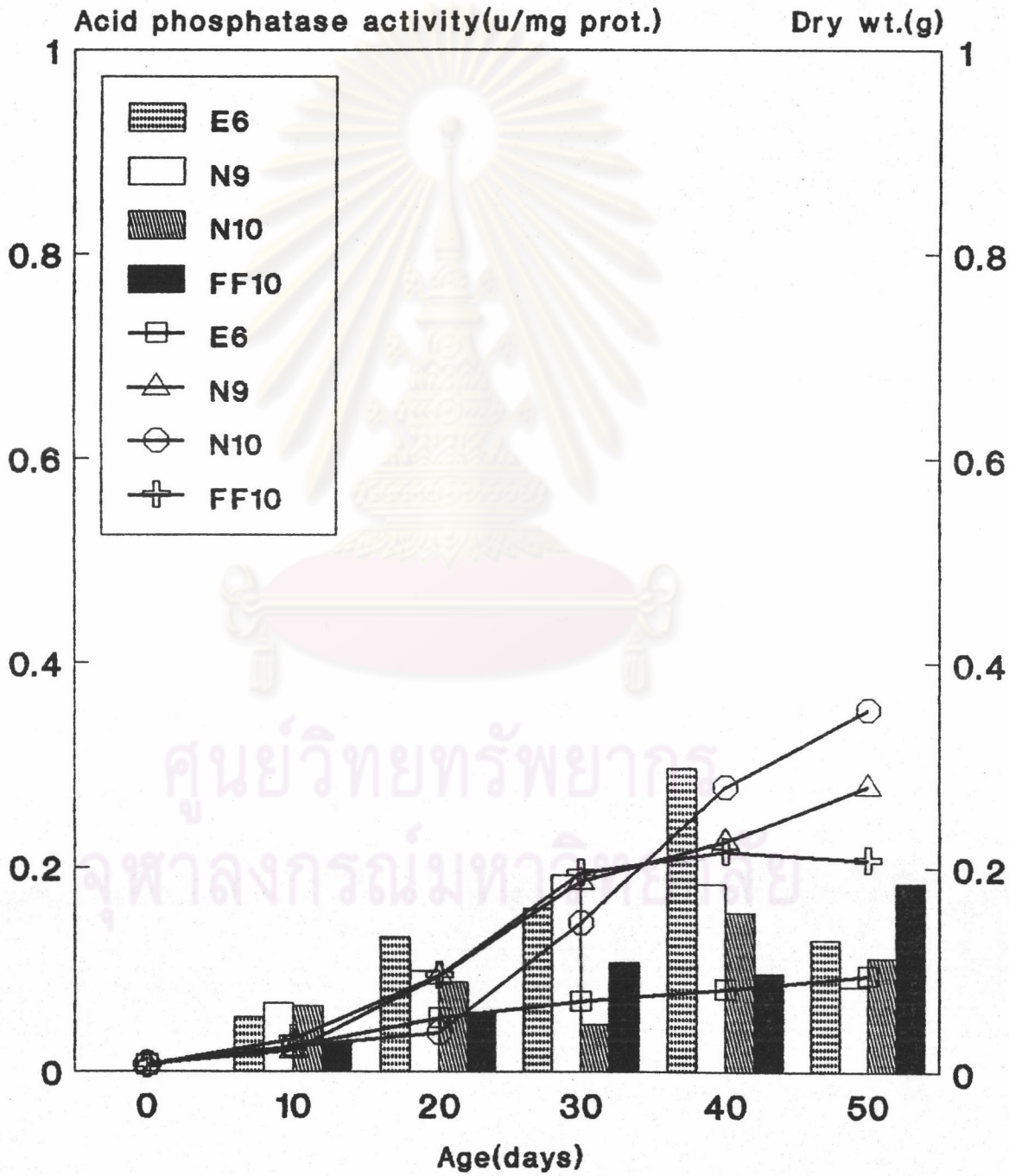
dikaryotic culture : parents (MU2, MU12, MU4) and hybrid (C359)



รูปที่ 14.2

Typical relationship between dry weight of mycelia (lines) and activity of acid phosphatase (bars) as function of time in PDYB static culture of *L. edodes*

monokaryotic culture (E6, N9, N10, FF10)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต่ำกว่า C366 และ C377 ในระหว่างสายพันธุ์ลูกผสมด้วยกัน C366 และ C377 มีแอคติวิตีสูงกว่าตัวอื่น ๆ มากกว่า 10 เท่า C377 มีแอคติวิตีสูงสุดที่อายุ 50 วัน และสูงกว่าที่อายุ 40 วัน ประมาณหนึ่งเท่า C373 ที่อายุ 30-40 วัน แอคติวิตีค่อนข้างต่ำ แต่สูงมากขึ้นจนเกือบเท่า C377 ที่อายุ 50 วัน (รูปที่ 15.1 A) สำหรับเส้นใย monokaryon ที่ได้จาก MU2 มีรหัสเป็น E- นั้น E6 และ E8 มีแอคติวิตี สูงกว่าเส้นใย monokaryon ตัวอื่น ๆ มากกว่า 50 เท่า และสูงใกล้เคียงกับ C366 และ C377 ส่วนเส้นใย monokaryon ที่เหลือคือ E1, E6, E9, และเส้นใย monokaryon ที่ได้จาก MU12 คือ N9 และ N10 มีแอคติวิตีต่ำมาก (รูปที่ 15.1 B)

ในการทดลองชุด ที่มี MU4 และ MU12 เป็นสายพันธุ์ พ่อ-แม่ ที่มีลูกผสมรหัส C5- นั้น MU4 และ MU12 มีแอคติวิตีต่ำกว่า C508 ลูกผสมตัวอื่น ๆ มีแอคติวิตีต่ำมาก ยกเว้น C507 ที่อายุ 50 วัน มีแอคติวิตีเพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 15.2 A) ส่วนในเส้นใย monokaryon จาก MU4 มีรหัส FF- นั้น มี FF7 เท่านั้นที่แอคติวิตีสูงมาก แต่จะสูงสุดที่อายุ 30 วัน และลดต่ำลงเมื่ออายุ 40-50 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 15.2 B)

3.6.2 เอนไซม์ laccase ที่ปล่อยออกมานอกเซล (Extracellular laccase)

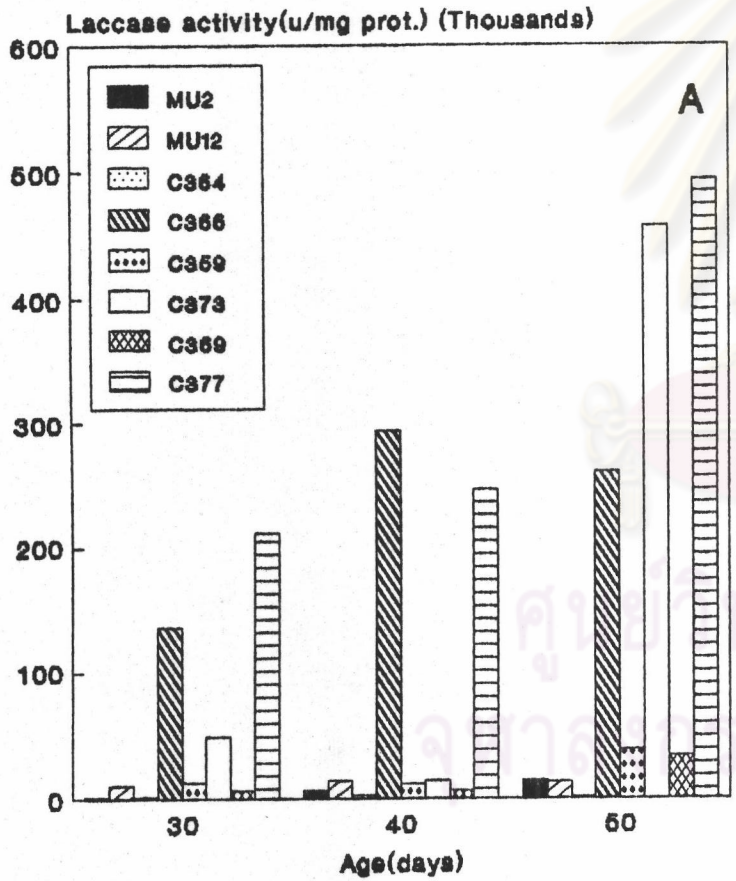
เป็นการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ laccase ที่ถูกปล่อยออกมานอกเซล วัดได้จากอาหารที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเมื่อกรองเอาเส้นใยออกแล้ว

ในการทดลองชุด ที่มี MU2 และ MU12 เป็นสายพันธุ์ พ่อ-แม่ MU4 มีแอคติวิตีสูงใกล้เคียงกับ MU12 แต่ต่ำกว่า C366 และ C377 ประมาณเท่าตัว C366 และ C377 มีแอคติวิตีสูงกว่าลูกผสมตัวอื่น ๆ 3-4 เท่า (รูปที่ 16.1 A) ในเส้นใย monokaryon E6 และ E8 มีแอคติวิตีสูงกว่าเส้นใย monokaryon ตัวอื่น ๆ กว่า 30 เท่า (รูปที่ 16.1 B)

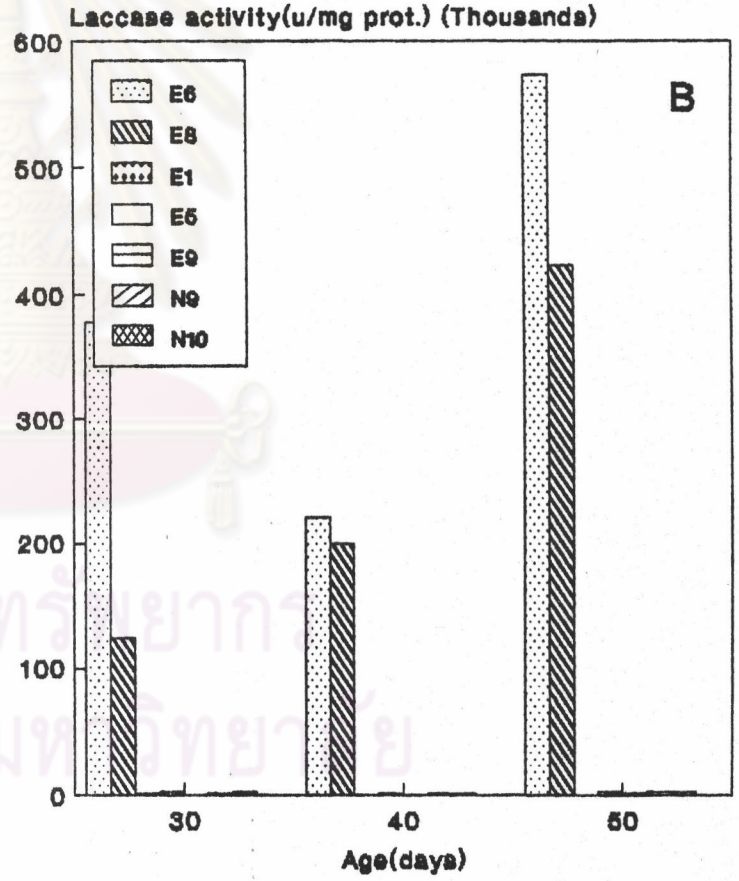
ในการทดลองชุด ที่มี MU4 และ MU12 เป็นสายพันธุ์ พ่อ-แม่นั้น MU4 มีแอคติวิตีต่ำกว่า C508 ส่วน MU12 ในการทดลองนี้ มีแอคติวิตีสูงกว่าลูกผสม C508 ที่อายุ 40 วันเป็นสองเท่า C507 มีแอคติวิตีเพิ่มสูงสุดที่ 50 วัน ลูกผสม C513, C516 และ C504 มีแอคติวิตีต่ำมาก (รูปที่ 16.2 A) ส่วนเส้นใย monokaryon นั้น FF9 และ FF7 มีแอคติวิตีสูงกว่าเส้นใย dikaryon ตัวอื่น ๆ มาก FF7 มีแอคติวิตีใกล้เคียงกับ FF9 เมื่ออายุ 30 วัน แต่เมื่ออายุ 40-50 วัน FF7 มีแอคติวิตีสูงเป็นสองเท่าของ FF9 (รูปที่ 16.2 B)

รูปที่ 15.1 Changes in intracellular laccases activity during the growth period of *L. edodes* mycelia

15.1 A
Dikaryotic culture : parents (MU2, MU12) and hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377)



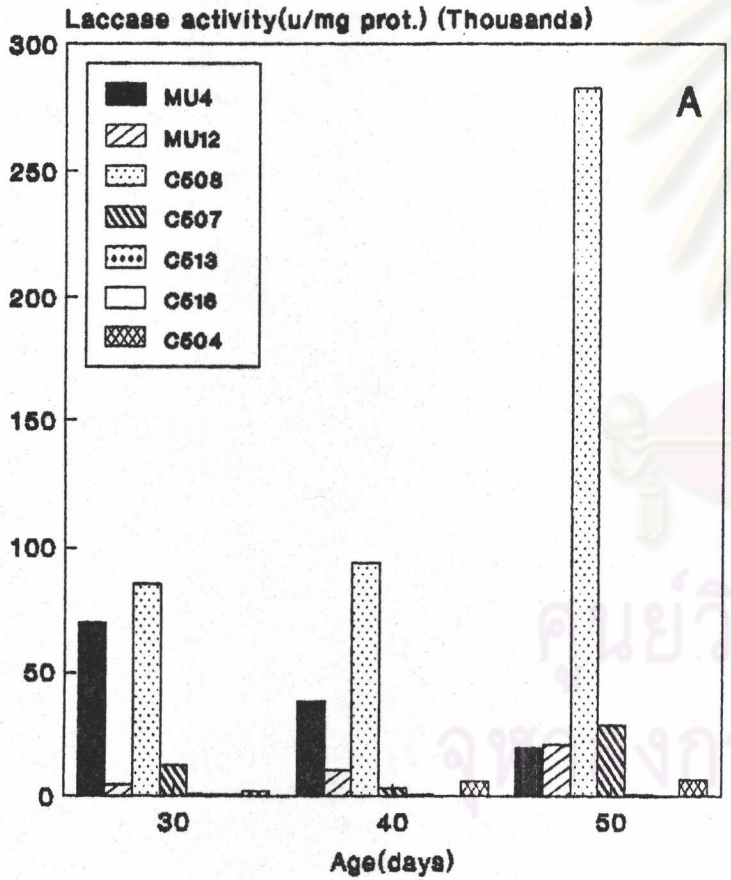
15.1 B
Monokaryotic culture (E6, E8, E1, E5, E9 and N9, N10)



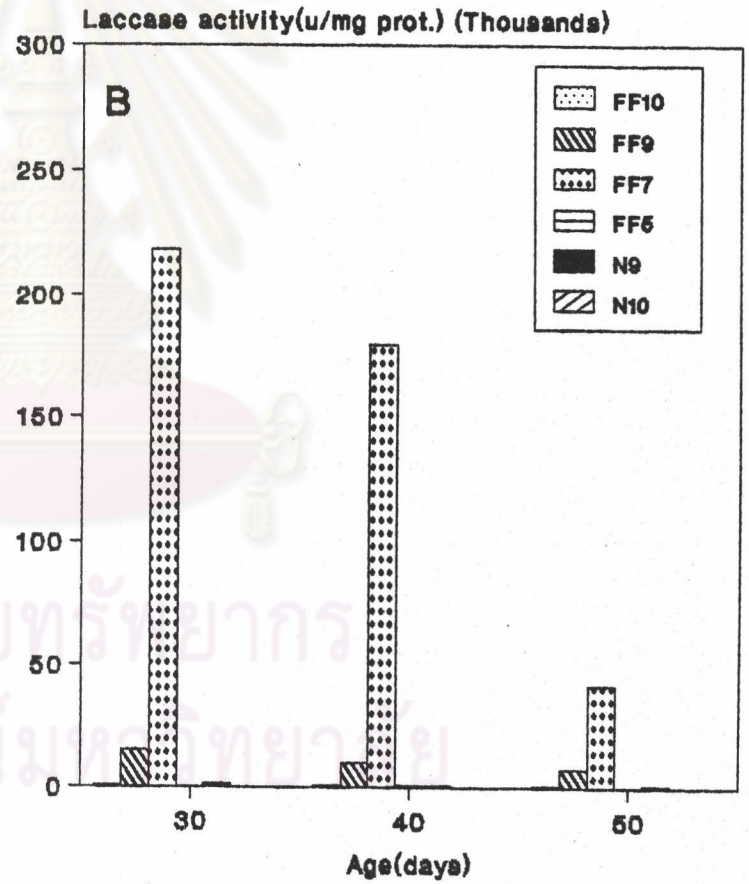
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15.2 Changes in intracellular laccases activity during the growth period of *L. edodes* mycelia

15.2 A
Dikaryotic culture : parents (MU4, MU12)
and hybrids (C508, C507, C513, C516, C504)



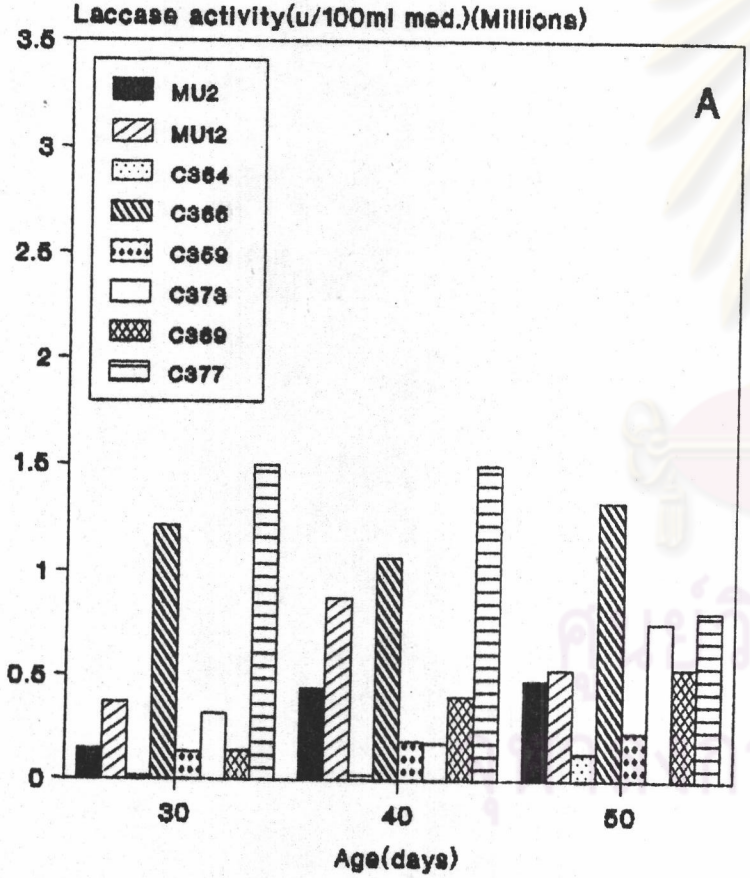
15.2 B
Monokaryotic culture (FF10, FF9, FF7, FF5
and N9, N10)



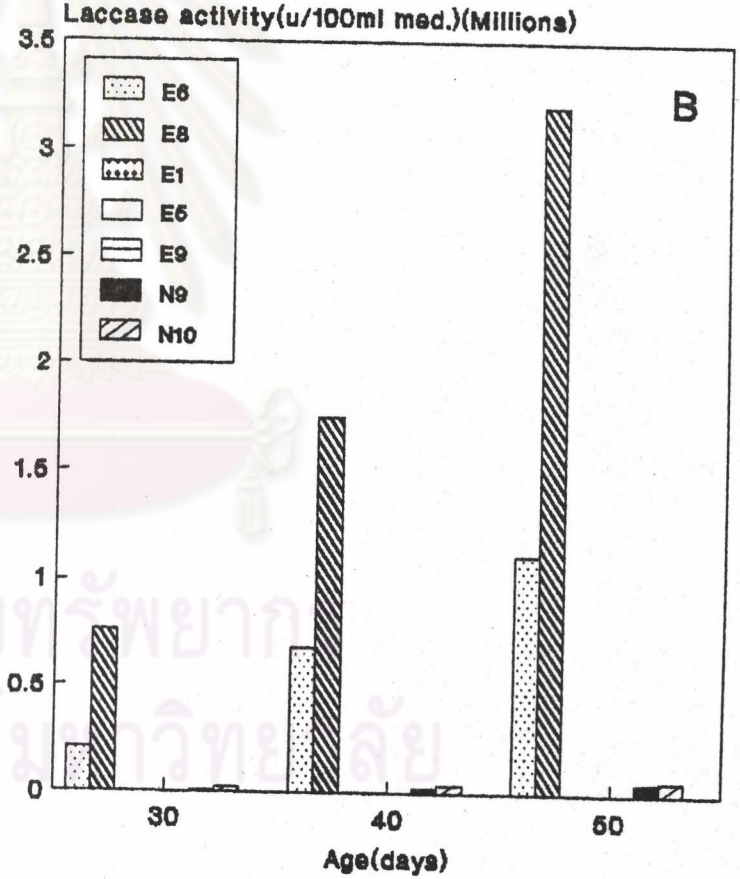
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 16.1 Changes in extracellular laccases activity during the growth period of *L. edodes* mycelia

16.1 A
Dikaryotic culture : parents (MU2, MU4) and hybrids (C364, C364, C359, C373, C369, C377)



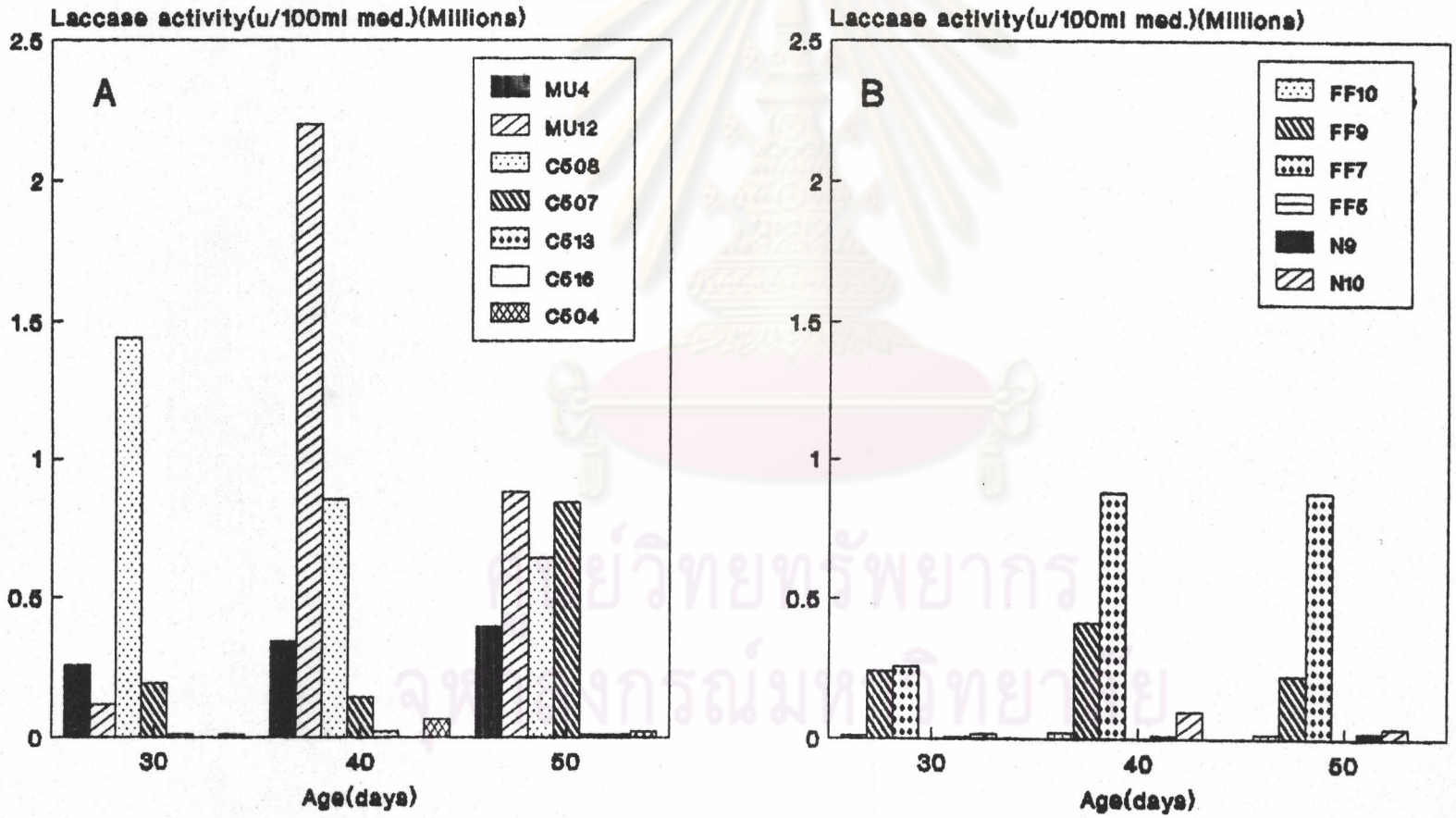
16.1 B
Monokaryotic culture (E6, E8, E1, E5, E9 and N9, N10)



รูปที่ 16.2 Changes in extracellular laccases activity during the growth period of *L. edodes* mycelia

16.2 A
Dikaryotic culture : parents (MU4, MU12)
and hybrids (C508, C507, C513, C516, C504)

16.2 B
Monokaryotic culture (FF10, FF9, FF7, FF5
and N9, N10)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 การผลิตเอนไซม์ acid phosphatase ใน *L. edodes*

การผลิตเอนไซม์ acid phosphatase ไม่มีการปล่อยออกมานอกเซล ตรวจไม่พบแอคติวิตีในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ ใช้สารละลายที่สกัดได้โดยการบด และการใช้เสียงความถี่สูงเช่นเดียวกับการวิเคราะห์เอนไซม์ laccase ภายในเซล

ในเส้นใย dikaryon สายพันธุ์พ่อ-แม่ คือ MU2, MU12 และ MU4 และลูกผสมทั้งหมดมีแอคติวิตีของเอนไซม์ acid phosphatase แตกต่างกันไม่มากนัก ส่วนในเส้นใย monokaryon E6, E8 และ E5 มีแอคติวิตีสูงกว่า ตัวอื่น ๆ (รูปที่ 17.1 A, B , 17.2 A, B)

3.8 ผลการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase, acid phosphatase, laccase และ esterase

3.8.1 Glutamate dehydrogenase

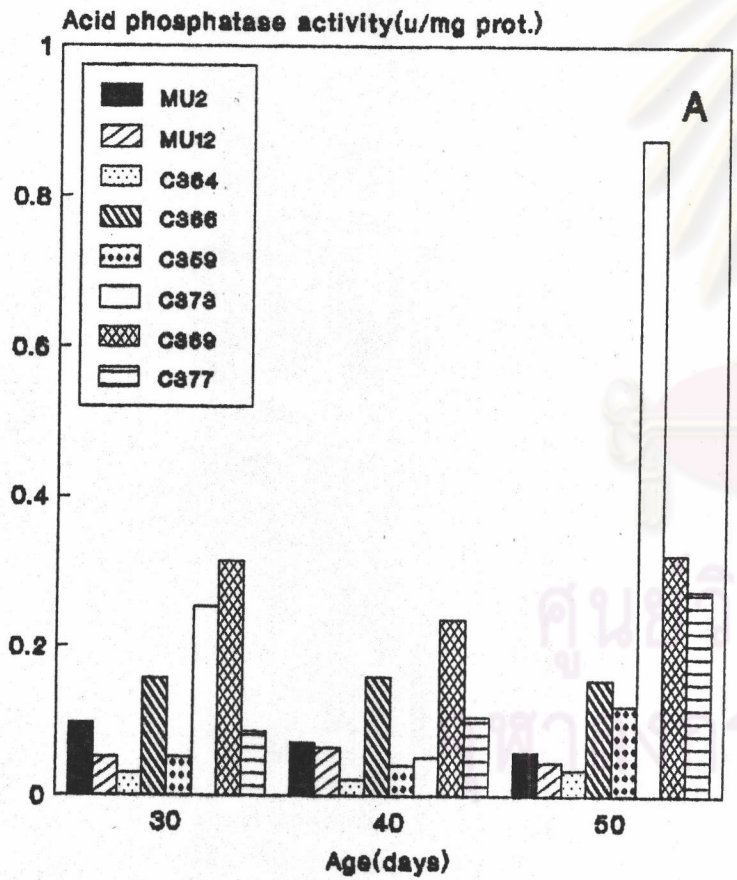
จากการศึกษาเพื่อตรวจสอบรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ต่าง ๆ ในเบื้องต้น พบว่า glutamate dehydrogenase ในสายพันธุ์ MU2 และ MU4 เมื่อเส้นใยมีอายุ 30 วัน มีรูปแบบไอโซไซม์ เหมือนกัน และมีเพียงแถบเดียว เป็นแถบกว้าง (รูปที่ 18)

3.8.2 Acid phosphatase

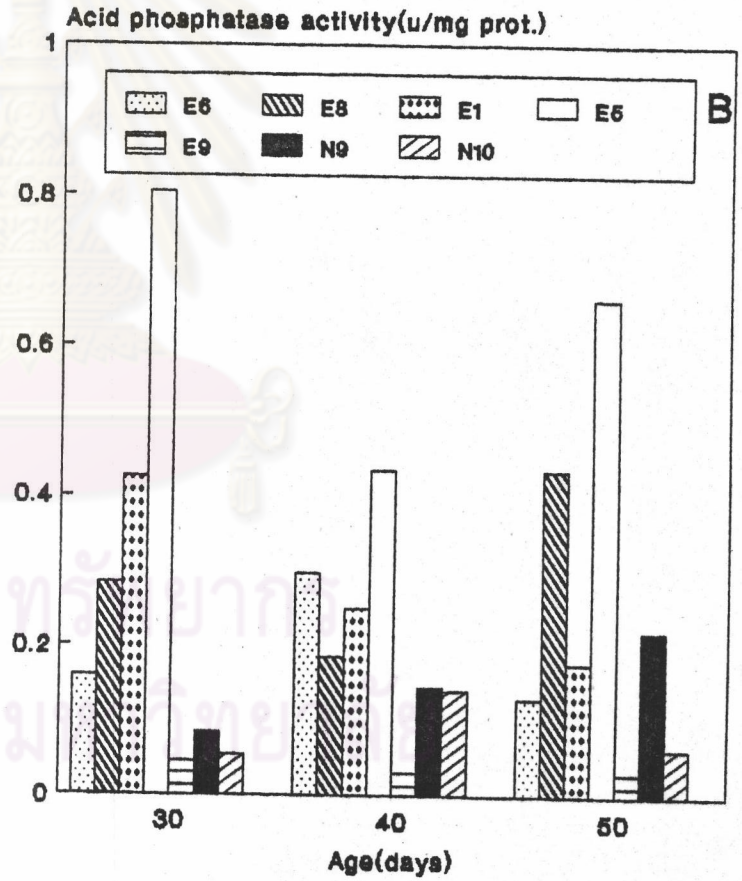
ผลการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของ acid phosphatase พบว่า มีเพียงแถบเดียว และมีรูปแบบเดียว (monomorphic pattern) ไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างสายพันธุ์ (ไม่ได้แสดงรูปไว้)

รูปที่ 17.1 Change in acid phosphatase activity during the growth period of *L. edodes* mycelia

17.1 A
Dikaryotic culture : parents (MU2, MU12) and hybrids (C364, C366, C359, C373, C369, C377)

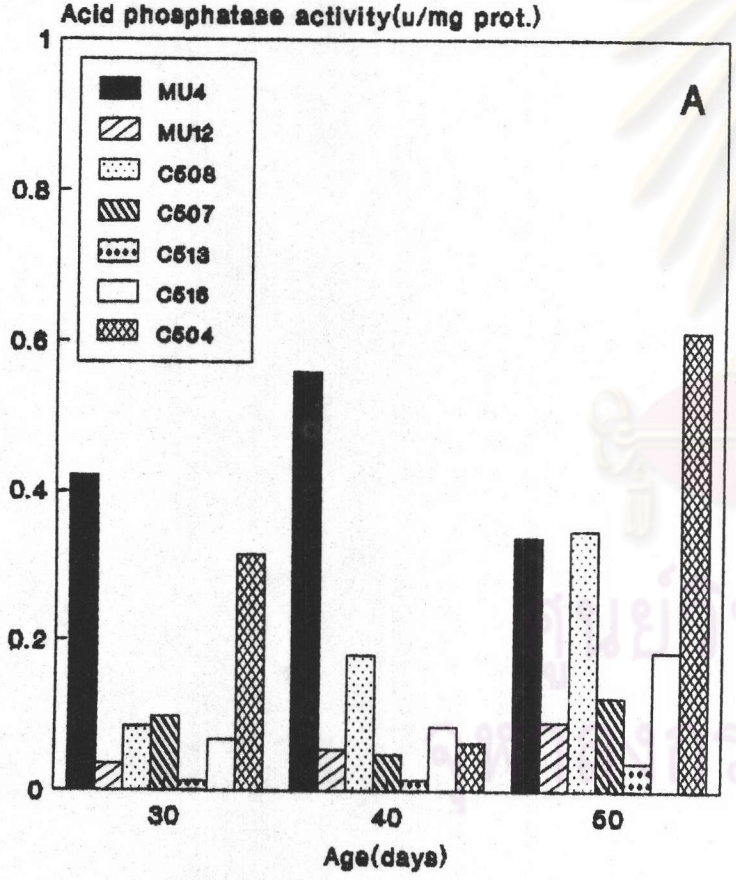


17.1 B
Monokaryotic culture (E6, E8, E1, E5, E9 and N9, N10)

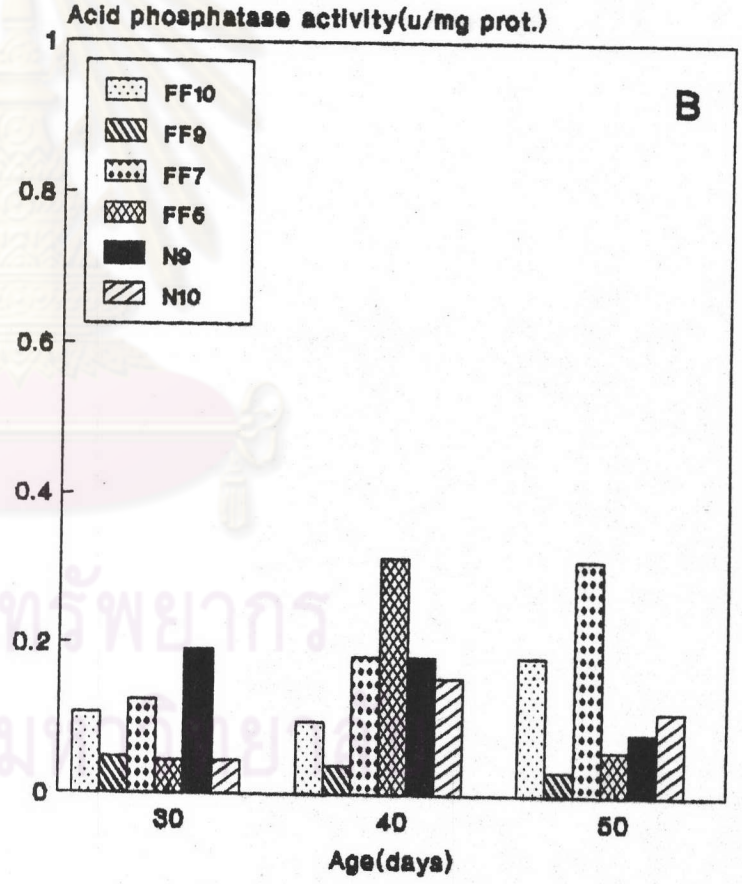


รูปที่ 17.2 Changes in acid phosphatase activity during the growth period of *L. edodes* mycelia

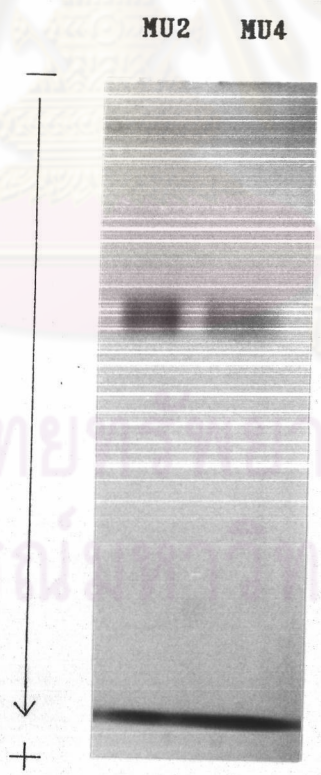
17.2 A
Dikaryotic culture : parents (MU4, MU12)
and hybrids (C508, C507, C513, C516, C504)



17.2 B
Monokaryotic culture (FF10, FF9, FF7, FF5
and N9, N10)



รูปที่ 18 Glutamate dehydrogenase isozyme pattern of *L. edodes*, MU2 and MU4. The assay was analysed at the period of 20 days of the growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with reaction mixture using L-glutamic acid as substrate. The protein was loaded with an amount of 100 µg per slot.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8.3 Laccase

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ laccase ภายในเซล ในช่วงอายุ 10-50 วัน ในเห็ดหอมสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า มีแถบบางแถบเปลี่ยนไปเมื่ออายุต่างกัน กล่าวคือความเข้มของแถบมากขึ้นหรือน้อยลง หรืออาจจะมีแถบบางแถบหายไปหรือเพิ่มขึ้นมาใหม่ ดังเช่น ในรูปที่ 19 MU4 ที่อายุ 30 วัน แถบบริเวณที่ตรงกับศรชี้หายไป MU12 ก็เช่นกัน ที่อายุ 30 วัน ความเข้มแถบมากกว่าที่อายุ 20 วัน และจากการการเปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์ระหว่างเส้นใย dikaryon ที่เป็นลูกผสมกับเส้นใย monokaryon คู่ที่ทำให้เกิดลูกผสมนั้น พบว่าเส้นใย dikaryon อาจมีรูปแบบไอโซไซม์คล้ายหรือต่างจากรูปแบบของเส้นใย monokaryon คู่ผสมมาก ดังเช่นในรูปที่ 20 รูปแบบไอโซไซม์ของ C373 มีรูปแบบไอโซไซม์ต่างจากของ E5 และ N10 รวมกัน ตรงบริเวณแถบที่ลูกศรชี้

เนื่องจากในช่วงอายุแรก ๆ ของการเลี้ยงเส้นใย คือ 10-20 วัน การสกัดสารละลายโปรตีนจากเส้นใยมักจะได้ปริมาณน้อย และแอคติวิตีของเอนไซม์ยังต่ำ การย้อมแอคติวิตีมักจะได้แถบที่ไม่ชัดเจน ฉะนั้นการเปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์จึงใช้ที่อายุ 30-50 วัน

ในการทดลองชุดที่ พ่อ-แม่ คือ MU2 และ MU12 (ลูกผสมได้แก่ C364, C366, C359, C373, C369 และ C377 เส้นใย monokaryon ได้แก่ E6, E8, E1, E5, E9, N9 และ N10) ผลจากความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ laccase เป็นดังนี้

1. laccase ภายในเซล ที่อายุ 30 วัน (รูปที่ 21.1) มีรูปแบบไอโซไซม์ที่ทำให้สามารถจำแนกเส้นใย dikaryon เป็นกลุ่มได้ ดังนี้

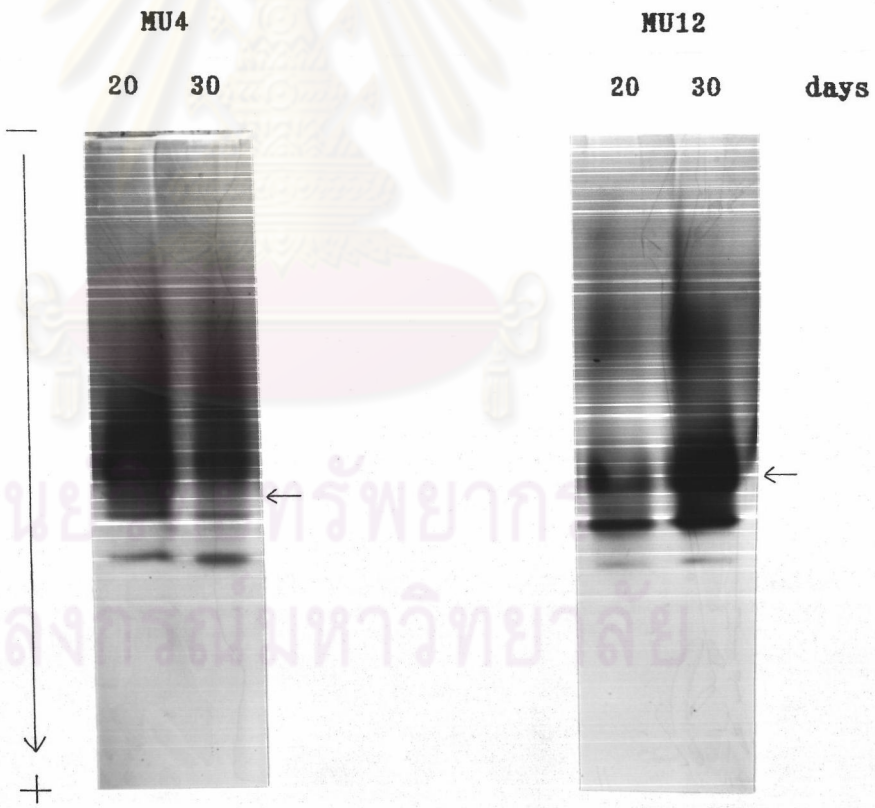
กลุ่มที่ 1. MU2, C366 และ C359 มีแถบที่ 7, 10, 12 (Rf = 0.71, 0.68, 0.63) เหมือนกัน

กลุ่มที่ 2. MU12 มีแถบที่ 14 (Rf = 0.61) ซึ่งไม่มีในสายพันธุ์อื่น

กลุ่มที่ 3. C364 และ C373 มีจำนวน 6 แถบเท่ากันและเป็นแถบ ที่มี Rf เท่ากัน ได้แก่ แถบที่ 7, 10, 12, 15, 19 และ 21
(Rf = 0.71, 0.68, 0.63, 0.55, 0.42 และ 0.38 ตามลำดับ)

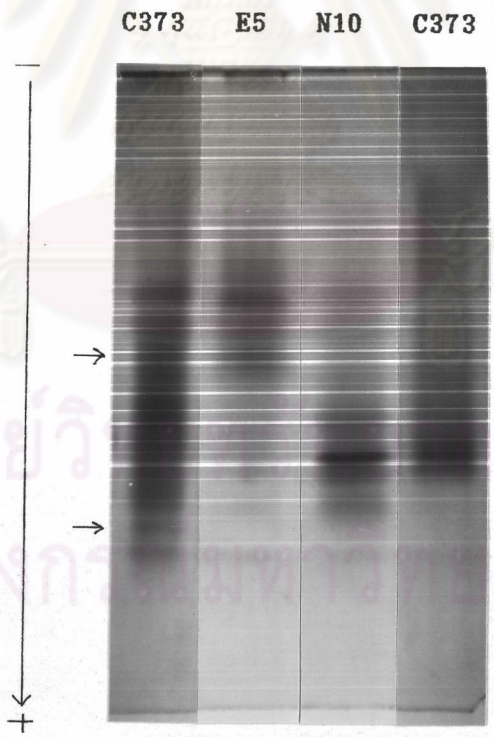
กลุ่มที่ 4. C369 และ C377 มีแถบที่เหมือนกัน 2 แถบ คือแถบที่ 12 และ 15
(Rf = 0.63 และ 0.55 ตามลำดับ)

รูปที่ 19 Laccase isozyme patterns of *L. edodes*, MU4 and MU12. The assay was analysed at the period of 20-30 days of the growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis(PAGE) after staining with *o*-tolidine. The enzyme was loaded with an amount of 500-1000 units per slot.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 Laccase isozyme patterns of *L. edodes*, hybrid : C373 and monokarytic mycelia : E5, N10. The assay was analysed at the period of 50 days of the growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with *o*-tolidine. The enzyme was loaded with an amount of 500-1000 units per slot.



สำหรับเส้นใย monokaryon สามารถจำแนกเป็นกลุ่มได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1. E6 และ E8 มีแถบเหมือนกัน 6 แถบ คือแถบที่ 10, 12, 15,18,19 และ 21 (Rf = 0.68, 0.63, 0.55, 0.45, 0.42 และ 0.38 ตามลำดับ) แต่ E8 มีแถบที่ 7 (Rf = 0.71) เพิ่มมาอีกหนึ่งแถบ

กลุ่มที่ 2. E9 มี 5 แถบ คือแถบที่ 7, 12, 15, 18 และ 19 (Rf = 0.71, 0.63, 0.55, 0.45 และ 0.42 ตามลำดับ)

กลุ่มที่ 3. E1 มีแถบที่ 2 และ 12 (Rf =0.77 และ 0.63 ตามลำดับ) เพียง 2 แถบเท่านั้น

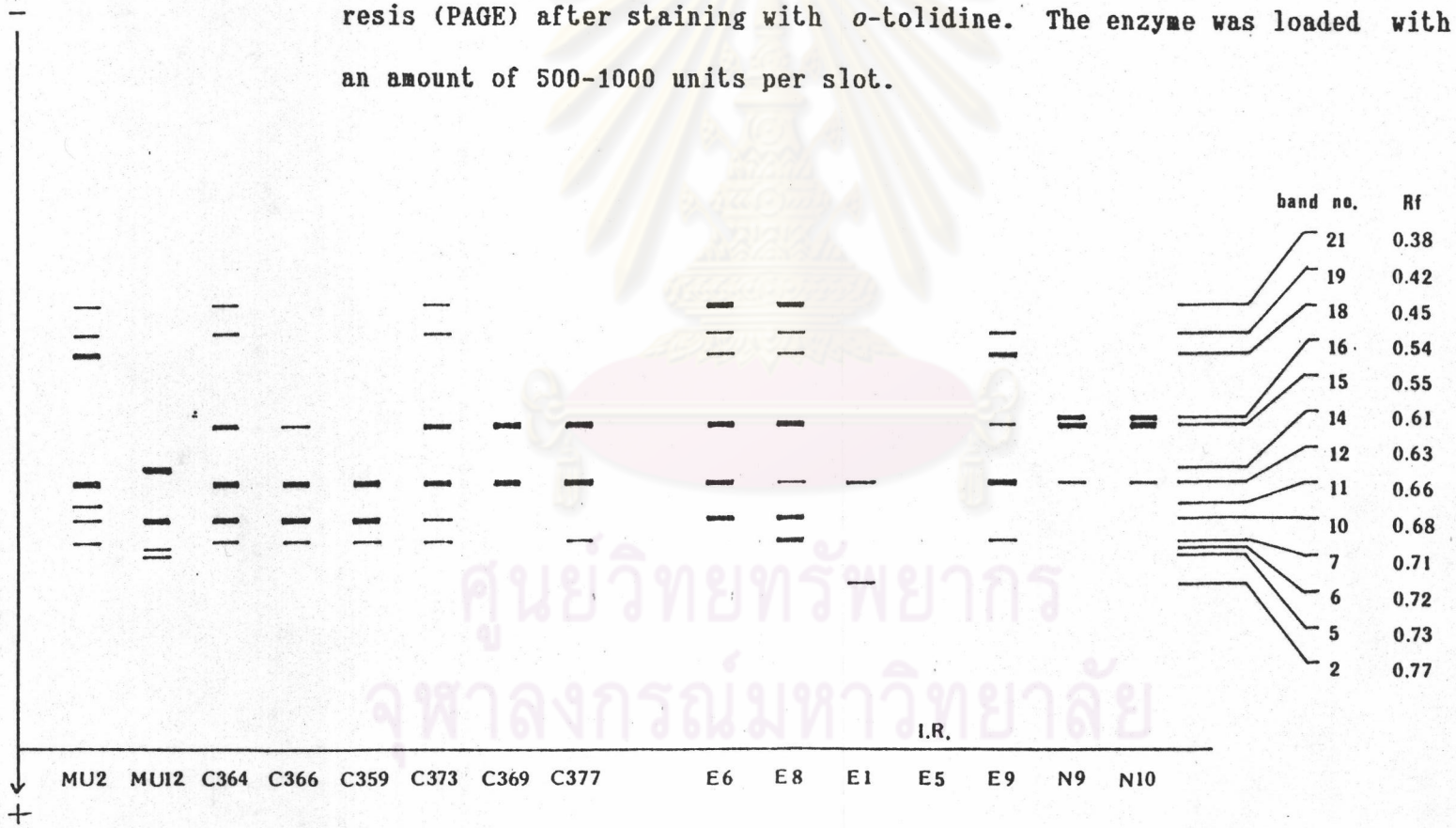
กลุ่มที่ 4. N9 และ N10 มีแถบทั้งสิ้น 3 แถบ คือ แถบที่ 12, 15 และ 16 (Rf = 0.63, 0.55 และ 0.54 ตามลำดับ)

2. laccase ที่ปล่อยออกมานอกเซล ที่อายุ 30 วัน มีรูปแบบไอโซไซม์ดังแสดงในรูปที่ 21.2 ซึ่งจะเห็นว่าแต่ละสายพันธุ์ของเส้นใย dikaryon และเส้นใย monokaryon มีจำนวนแถบน้อยเพียง 1-2 แถบเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถที่จะนำมาใช้ในการจัดกลุ่มได้ และแถบที่ปรากฏเป็นแถบที่มี Rf ตรงกับแถบหลัก (major band) ของรูปแบบไอโซไซม์ laccase ภายในเซล

3. รูปแบบไอโซไซม์ laccase ภายในเซล ที่อายุ 50 วัน (รูปที่ 22.1) พบว่า ในเส้นใย dikaryon ส่วนใหญ่นั้น แถบที่ 10 (Rf = 0.68) หายไป นอกจากนี้ เส้นใย dikaryon ทุกตัว ยกเว้น C359 และ C373 มีจำนวนแถบและความเข้มของแถบเปลี่ยนไปจากอายุ 30 วัน การจัดกลุ่มจึงทำไม่ได้ ส่วนในเส้นใย monokaryon ก็เช่นกัน มีจำนวนแถบและความเข้มของแถบเปลี่ยนไปจากอายุ 30 วัน อย่างไรก็ตาม ยังสามารถจัดกลุ่มได้เหมือนที่อายุ 30 วัน N9 และ N10 ยังคงมีรูปแบบไอโซไซม์เหมือนกัน แต่มีแถบที่ 7 (Rf = 0.71) เพิ่มขึ้นอีกหนึ่งแถบ

4. รูปแบบไอโซไซม์ laccase ที่ปล่อยออกมานอกเซล ที่อายุ 50 วัน มีลักษณะคล้ายกับที่อายุ 30 วัน คือมีแถบจำนวนน้อยเพียง 1-2 แถบเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถที่จะนำมาใช้ในการจัดกลุ่มได้ และแถบที่ปรากฏเป็นแถบที่มี Rf ตรงกับ major bandในรูปแบบไอโซไซม์ของ laccase ภายในเซล (รูปที่ 22.2)

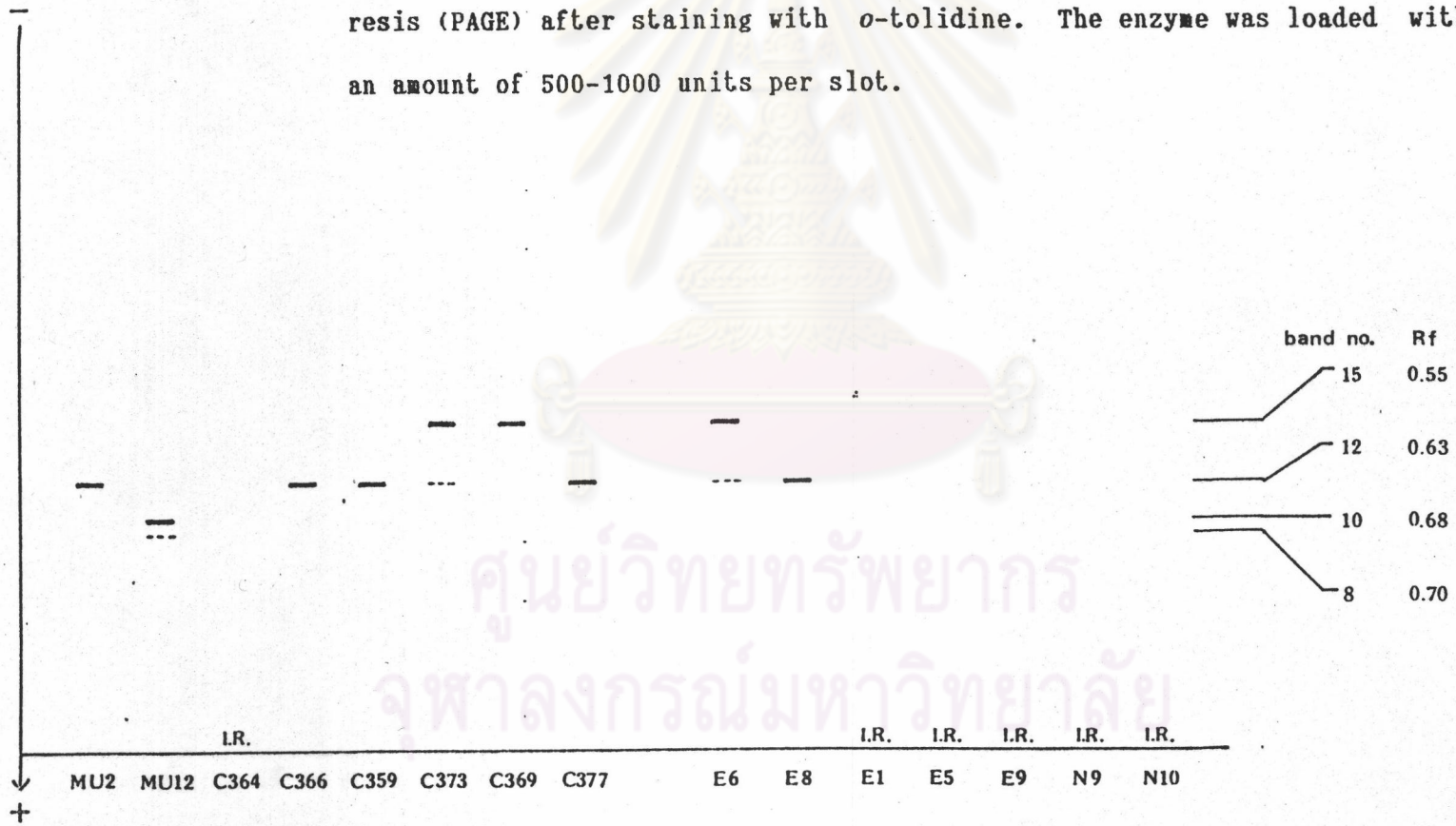
รูปที่ 21.1 The pattern of intracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU2,MU12) ; hybrids (C364,C366,C359,C373,C369,C377) and monokaryotic mycelia (E6,E8,E1,E5,E9,N9,N10). The assay was analysed at the period of 30 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with *o*-tolidine. The enzyme was loaded with an amount of 500-1000 units per slot.



I.R. : insufficient resolution

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

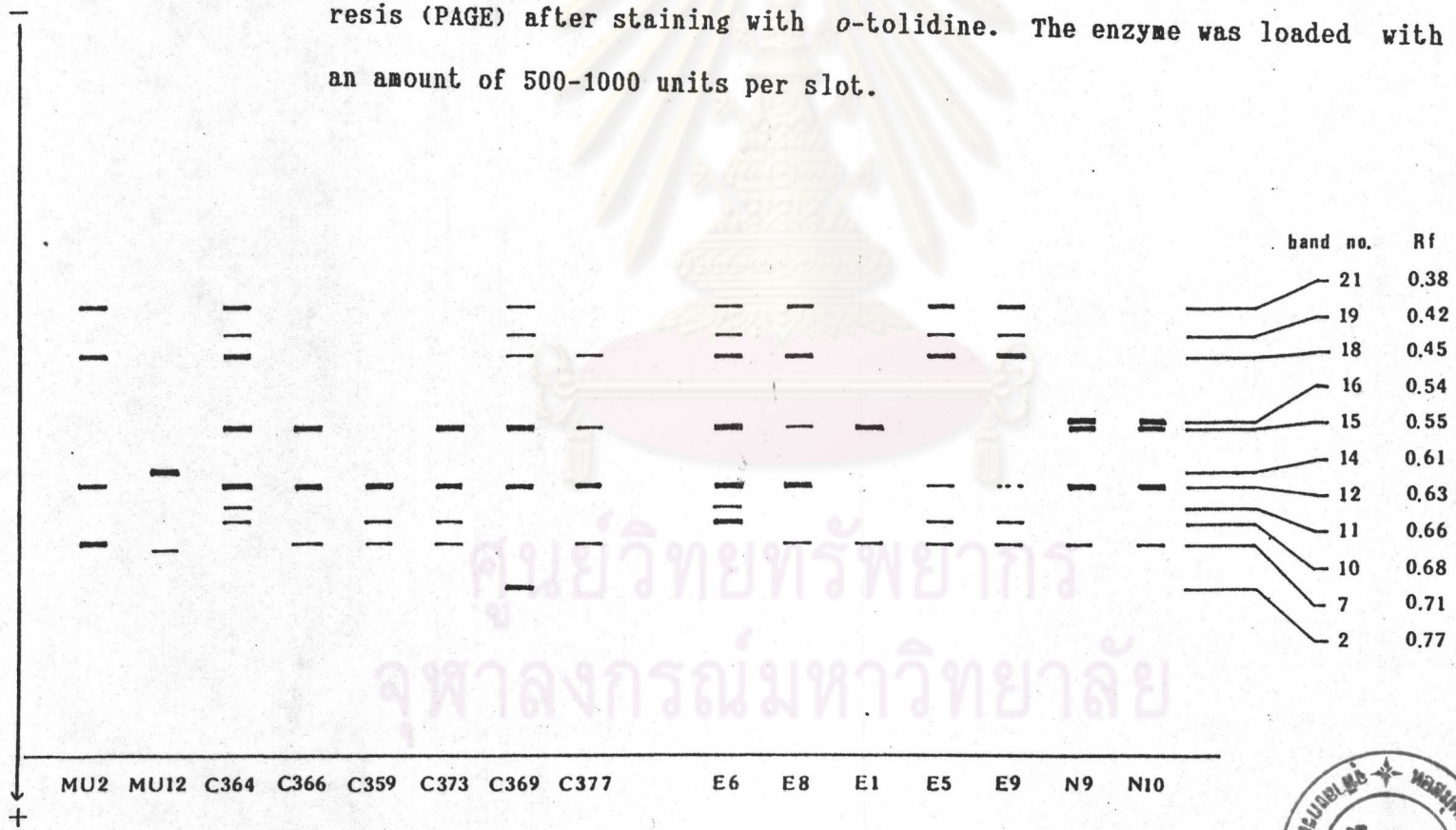
รูปที่ 21.2 The pattern of extracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU2,MU12) ; hybrids (C364,C366,C359,C373,C369,C377) and monokaryotic mycelia (E6,E8,E1,E5,E9,N9,N10). The assay was analysed at the period of 30 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with *o*-tolidine. The enzyme was loaded with an amount of 500-1000 units per slot.



I.R. : insufficient resolution

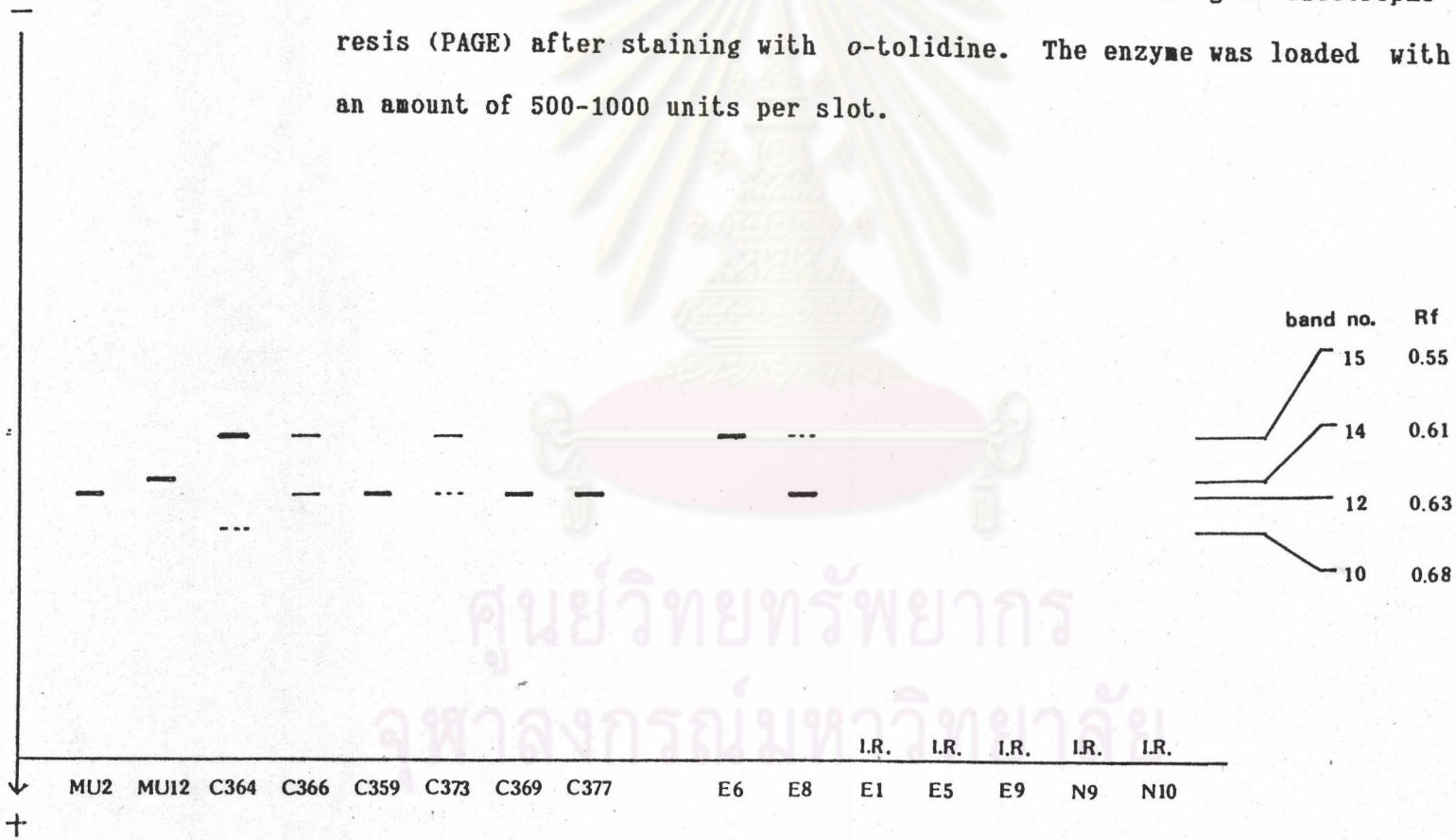
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22.1 The pattern of intracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU2,MU12) ; hybrids (C364,C366,C359,C373,C369,C377) and monokaryotic mycelia (E6,E8,E1,E5,E9,N9,N10). The assay was analysed at the period of 50 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with *o*-tolidine. The enzyme was loaded with an amount of 500-1000 units per slot.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22.2 The pattern of extracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU2,MU12) ; hybrids (C364,C366,C359,C373,C369,C377) and monokaryotic mycelia (E6,E8,E1,E5,E9,N9,N10). The assay was analysed at the period of 50 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with *o*-tolidine. The enzyme was loaded with an amount of 500-1000 units per slot.



I.R. : insufficient resolution

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการทดลองชุดที่ พ่อ-แม่ คือ MU4 และ MU12 (ลูกผสม ได้แก่ C508, C507, C513, C502, C516 และ C504 เส้นใย monokaryon ได่แก่ FF10, FF9, FF7, FF2, FF5, N9 และ N10) ผลจากความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ของ laccase ทำให้สามารถจำแนกเส้นใย dikaryon เป็นกลุ่มได้ ดังนี้

1. laccase ภายในเซล ที่อายุ 30 วัน (รูปที่ 23.1)

กลุ่มที่ 1. MU4 มี 6 แถบ คือแถบที่ 7, 10 , 12, 18, 19 และ 21 (Rf = 0.71, 0.68, 0.63, 0.45, 0.42 และ 0.38 ตามลำดับ)

กลุ่มที่ 2. MU12 มีแถบที่ 14 (Rf = 0.61) ซึ่งไม่มีในสายพันธุ์อื่น

กลุ่มที่ 3. C508, C507, C513 และ C502 มีแถบที่เหมือนกัน 3 แถบ คือ แถบที่ 8, 12 และ 14 (Rf = 0.70, 0.63 และ 0.61 ตามลำดับ)

กลุ่มที่ 4. C516 มี 3 แถบคือ แถบที่ 15, 20 และ 23 (Rf = 0.55, 0.40 และ 0.34 ตามลำดับ)

กลุ่มที่ 5. C504 มี 4 แถบ คือ แถบที่ 9, 12, 17 และ 21 (Rf = 0.69, 0.63, 0.47 และ 0.38 ตามลำดับ)

สำหรับเส้นใย monokaryon สามารถจำแนกเป็นกลุ่มได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1. FF10 มีไอโซไซม์เหมือน C516 มี 3 แถบคือ แถบที่ 15, 20 และ 23 (Rf = 0.55, 0.40 และ 0.34 ตามลำดับ)

กลุ่มที่ 2. FF9 และ FF2 มี 3 แถบที่เหมือนกัน คือแถบที่ 8, 12 และ 15 (Rf = 0.70, 0.63 และ 0.55 ตามลำดับ) แต่ FF9 มี แถบที่ 16 (Rf = 0.54) เพิ่มอีกหนึ่งแถบ

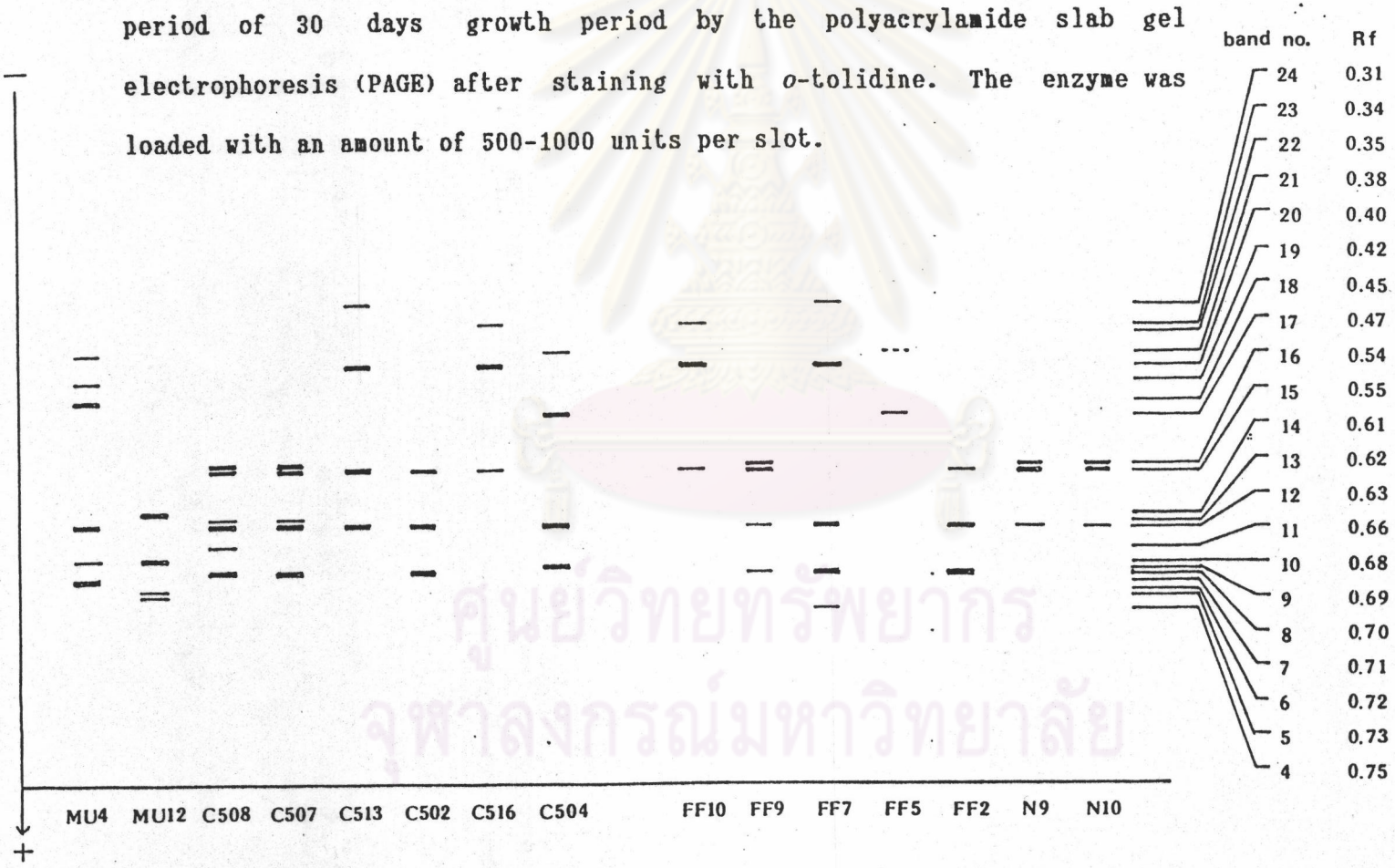
กลุ่มที่ 3. FF7 มี 5 แถบคือ แถบที่ 4, 8, 12, 20 และ 24 (Rf = 0.75 0.70, 0.63, 0.40 และ 0.31)

กลุ่มที่ 4. FF5 มี 2 แถบ คือแถบที่ 17 และ 21 (Rf = 0.47 และ 0.38)

กลุ่มที่ 5. N9 และ N10 มีแถบ ทั้งสิ้น 3 แถบ คือ แถบที่ 12, 15 และ 16 (Rf = 0.63, 0.55 และ 0.54 ตามลำดับ)

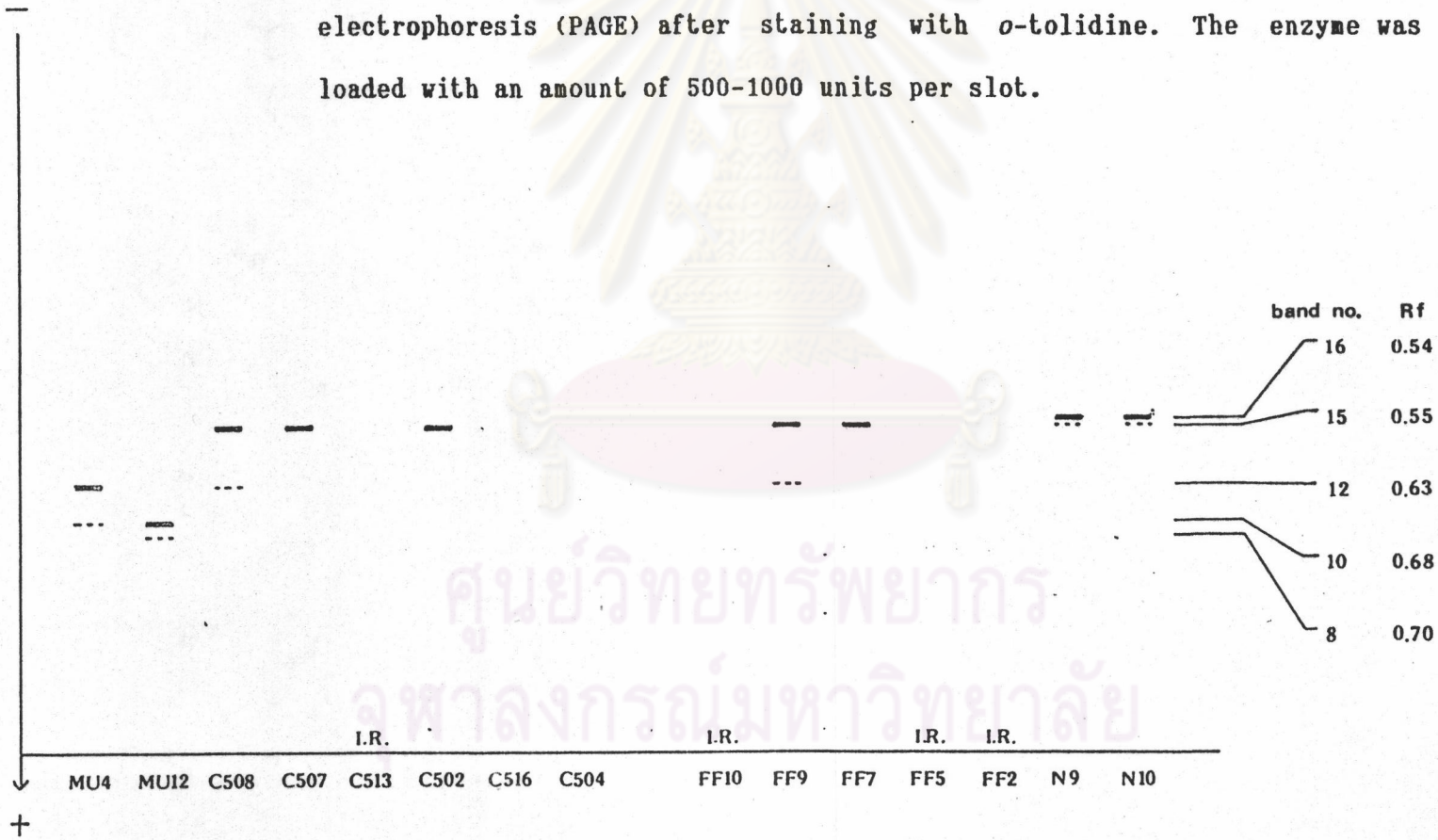
2. laccase ที่ปล่อยออกมานอกเซล ที่อายุ 30 วัน มีรูปแบบไอโซไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 23.2 ซึ่งจะเห็นว่าแต่ละสายพันธุ์ของเส้นใย dikaryon และเส้นใย monokaryon มีจำนวนแถบน้อยเพียง 1-2 แถบ เท่านั้น ไม่สามารถที่จะนำมาใช้ในการจัดกลุ่มได้ และแถบ

รูปที่ 23.1 The pattern of extracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU4,MU12) ; hybrids (C508,C507,C513,C502,C516,C504) and monokaryotic mycelia (FF10,FF9,FF7,FF2,FF5,N9,N10). The assay was analysed at the period of 30 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with *o*-tolidine. The enzyme was loaded with an amount of 500-1000 units per slot.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23.2 The pattern of intracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU4,MU12) ; hybrids (C508,C507,C513,C502,C516,C504) and monokaryotic mycelia (FF10,FF9,FF7,FF2,FF5,N9,N10). The assay was analysed at the period of 30 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with *o*-tolidine. The enzyme was loaded with an amount of 500-1000 units per slot.



I.R. : insufficient resolution

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่ปรากฏเป็นแถบที่มี Rf ตรงกับ major band ใน laccase ภายในเซล

3. รูปแบบไอโซไซม์laccase ภายในเซล ที่อายุ 50 วัน (รูปที่ 24.1) พบว่า ในเส้นใย dikaryon ที่ย้อมแล้วเห็นแถบได้ชัด คือ MU4, MU12, C504, C516 นั้น แต่ละสายพันธุ์มีรูปแบบที่ต่างไปจากที่อายุ 30 วัน บางแถบหายไปและมีบางแถบความเข้มเปลี่ยนไปจากที่อายุ 30 วัน การจัดกลุ่มจึงทำไม่ได้ ส่วนเส้นใย monokaryon ที่ย้อมแล้วเห็นแถบได้ชัด คือ FF10, FF9, N9 และ N10 ก็จัดกลุ่มไม่ได้เช่นกัน

4. laccase ที่ปล่อยออกมานอกเซล (รูปที่ 24.2) ก็มีลักษณะคล้ายกับที่อายุ 30 วัน คือมีแถบจำนวน น้อยเพียง 1-2 แถบ เท่านั้น และแถบที่ปรากฏเป็น แถบที่มี Rf ตรงกับ major band ในlaccase ภายในเซล ไม่สามารถที่จะนำมาใช้ในการจัดกลุ่มได้

3.8.4 Esterase

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ esterase ในช่วงอายุ 10-50 วัน ในเห็ดหอมสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า esterase มีจำนวนไอโซไซม์มาก ทำให้โอกาสที่จะพบความผันแปรในรูปแบบมีมากเช่นกัน มีแถบบางแถบเปลี่ยนไปเมื่ออายุต่างกัน กล่าวคือความเข้มของแถบมากขึ้นหรือน้อยลง หรืออาจจะมีแถบบางแถบหายไปหรือเพิ่มขึ้นมาใหม่ ดังเช่น ในรูปที่ 25 MU4 ที่อายุ 10-50 วัน มีแถบปรากฏเพิ่มขึ้น หรือความเข้มเพิ่มขึ้น (ศรชี้) และจากการการเปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์ระหว่างเส้นใย dikaryon ที่เป็นลูกผสมกับเส้นใย monokaryon คู่ที่ทำให้เกิดลูกผสมนั้น ดังเช่นในรูปที่ 26 พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ของ C373 ไม่ได้มีรูปแบบของ E5 และ N10 รวมกัน ซึ่งในลูกผสมอื่น ๆ ก็เช่นเดียวกัน

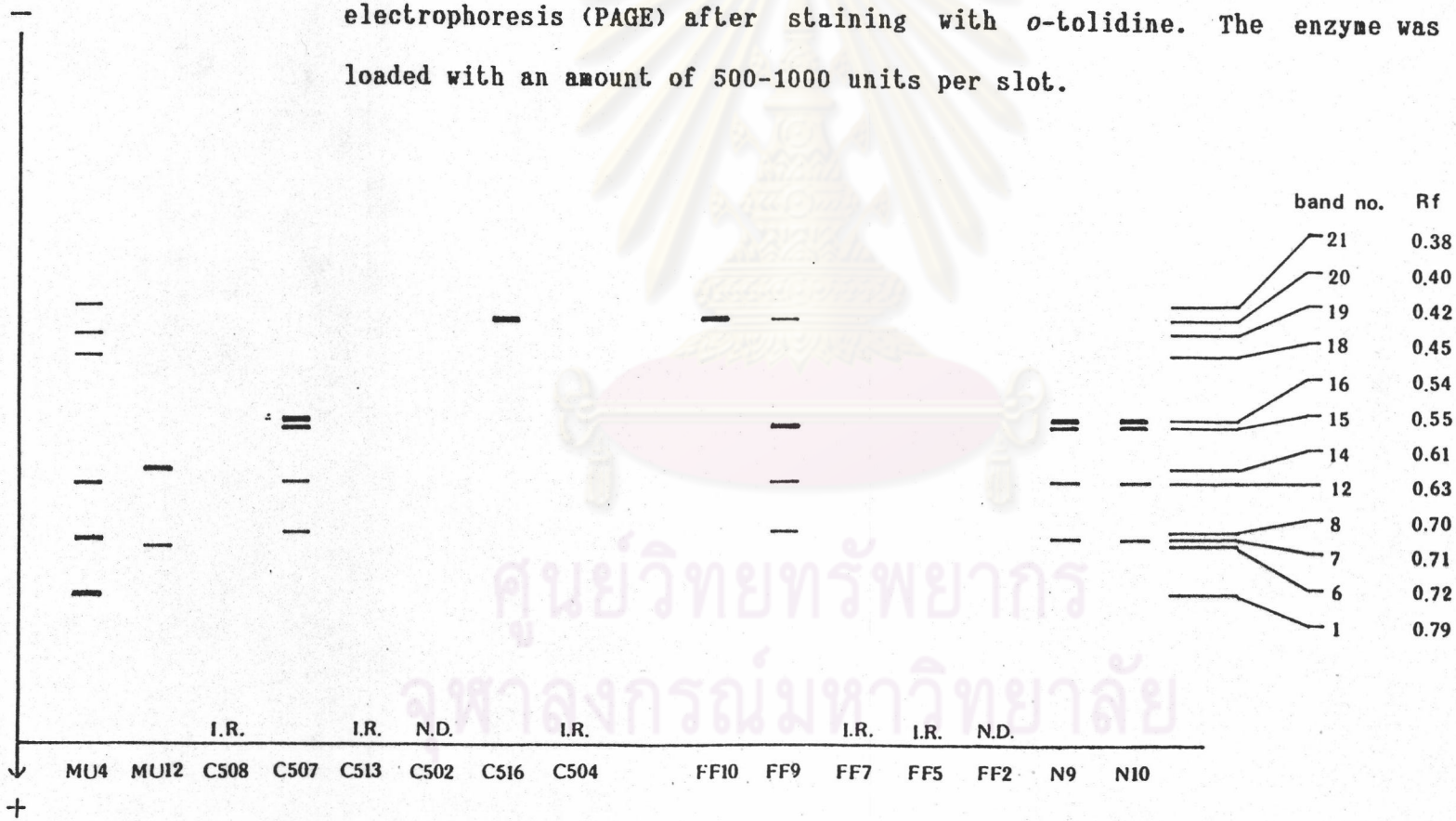
ในการทดลองชุดที่ พ่อ-แม่ คือ MU2 และ MU12 (ลูกผสมได้แก่ C364, C366, C359, C373, C369 และ C377, monokaryons ได้แก่ E6, E8, E1, E5, E9, N9 และ N10) ผลจากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase สามารถจำแนกเส้นใย dikaryon เป็นกลุ่มได้ ดังนี้

1. esterase ที่อายุ 30 วัน (รูปที่ 27)

กลุ่มที่ 1. MU2 และ C369 มีแถบที่เหมือนกันคือ แถบที่ 5, 6, 8, 11, 12 และ 13(Rf = 0.79, 0.77, 0.74, 0.69, 0.67 และ 0.65 ตามลำดับ)

กลุ่มที่ 2. MU12 มี 12 แถบ และแถบส่วนใหญ่จะมี Rf ต่างจากตัวอื่น

รูปที่ 24.1 The pattern of intracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU4,MU12) ; hybrids (C508,C507,C513,C502,C516,C504) and monokaryotic mycelia (FF10,FF9,FF7,FF2,FF5,N9,N10). The assay was analysed at the period of 50 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with *o*-tolidine. The enzyme was loaded with an amount of 500-1000 units per slot.

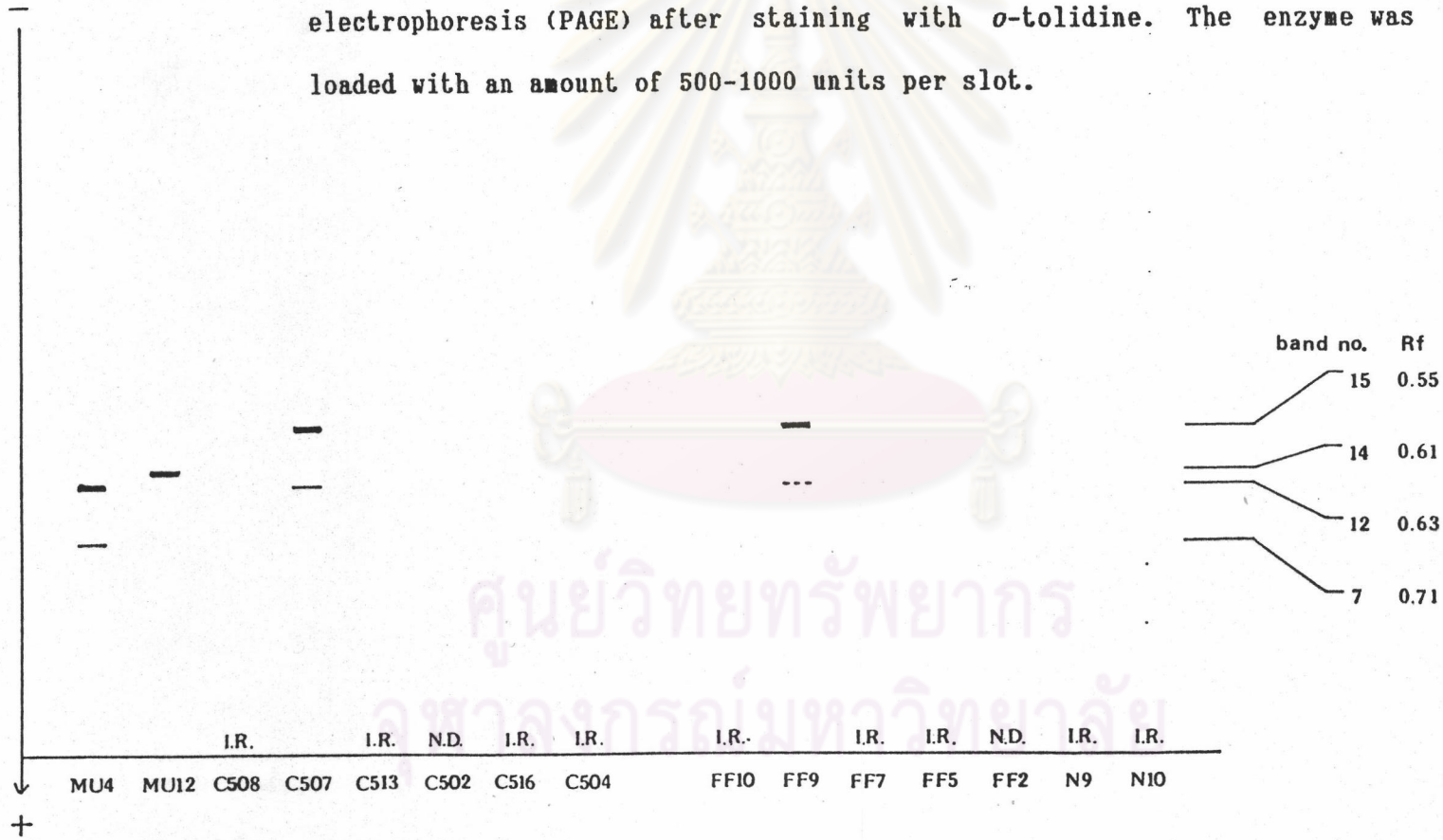


I.R. : insufficient resolution

N.D. : not determined

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

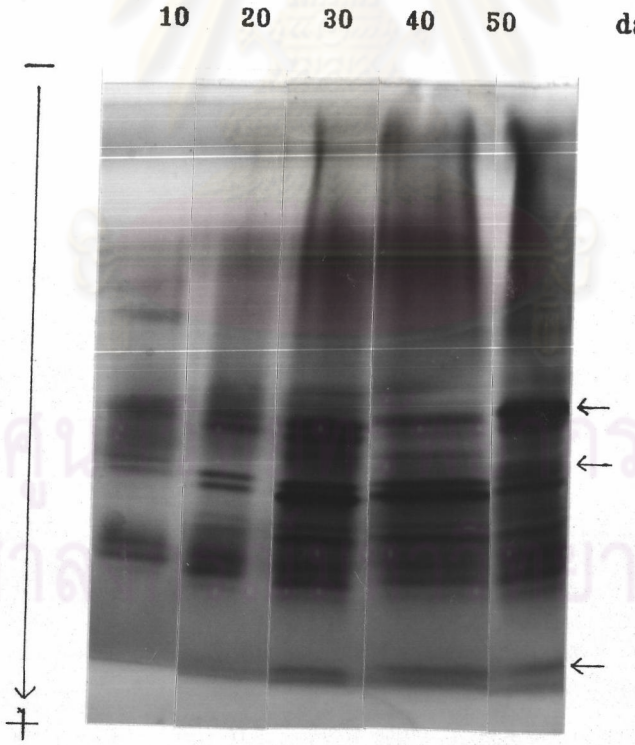
รูปที่ 24.2 The pattern of extracellular laccase isozymes of *L. edodes* parents (MU4,MU12) ; hybrids (C508,C507,C513,C502,C516,C504) and monokaryotic mycelia (FF10,FF9,FF7,FF2,FF5,N9,N10). The assay was analysed at the period of 50 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with *o*-tolidine. The enzyme was loaded with an amount of 500-1000 units per slot.



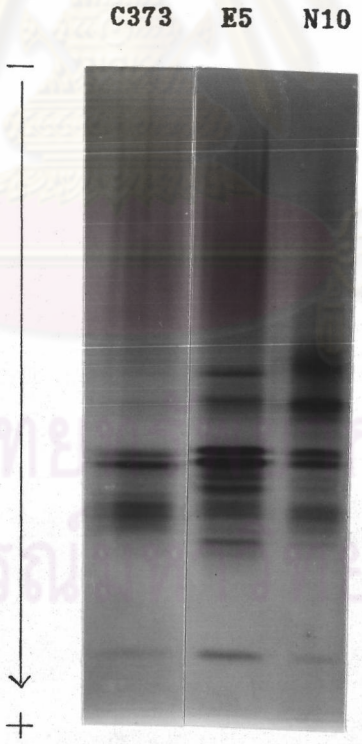
I.R. : insufficient resolution

N.D. : not determined

รูปที่ 25 Esterase isozyme patterns of *L. edodes*, MU4. The assay was analysed at the period of 10, 20, 30, 40 and 50 days of the growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with reaction mixture using α-naphthyl acetate as substrate. The protein was loaded with an amount of 50-100 µg per slot.



รูปที่ 26 Esterase isozyme patterns of *L. edodes*, hybrid : C373 and monokarytic mycelia : E5, N10. The assay was analysed at the period of 50 days of the growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with reaction mixture using α-naphthyl acetate as substrate. The protein was loaded with an amount of 50-100 µg per slot.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 3. C364, C359, C373 และ C377 มีแถบที่เหมือนกันคือ แถบที่ 8, 10 (Rf = 0.77, 0.74, 0.71 ตามลำดับ)

กลุ่มที่ 4. C366 มี 9 แถบ ต่างจากกลุ่มที่ 3 คือ ไม่มีแถบที่ 10 และต่างจากกลุ่มที่ 1 คือ ไม่มีแถบที่ 11

สำหรับเส้นใย monokaryon นั้น ในแต่ละตัวมีรูปแบบไอโซไซม์ต่างกัน โดยไม่มีแถบใดเป็นที่สังเกตที่จะสามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่มได้

2. esterase ที่อายุ 50 วัน (รูปที่ 28) มีรูปแบบไอโซไซม์ต่างจากที่อายุ 30วัน คือจำนวน แถบ, Rf และความเข้มของแถบเปลี่ยนไป ทั้งในเส้นใย dikaryon และเส้นใย monokaryon ไม่สามารถจัดเป็นกลุ่มได้

ในการทดลองชุดที่ พ่อ-แม่ คือ MU4 และ MU12 (ลูกผสม ได้แก่ C508, C507, C513, C502, C516 และ C504 เส้นใย monokaryon ได้แก่ FF10, FF9, FF7, FF2, FF5, N9 และ N10) ผลจากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase สามารถจำแนกเส้นใย dikaryon เป็นกลุ่มได้ ดังนี้

1. esterase ที่อายุ 30 วัน (รูปที่ 29)

กลุ่มที่ 1. MU4 มี 18 แถบ คือ แถบที่ 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 21, 24, 26, 27, 28, 29 และ 30 (Rf = 0.94, 0.79, 0.77, 0.74, 0.73, 0.69, 0.67, 0.65, 0.62,0.60, 0.57, 0.54, 0.51, 0.49, 0.46, 0.41, 0.39 และ 0.37 ตามลำดับ)

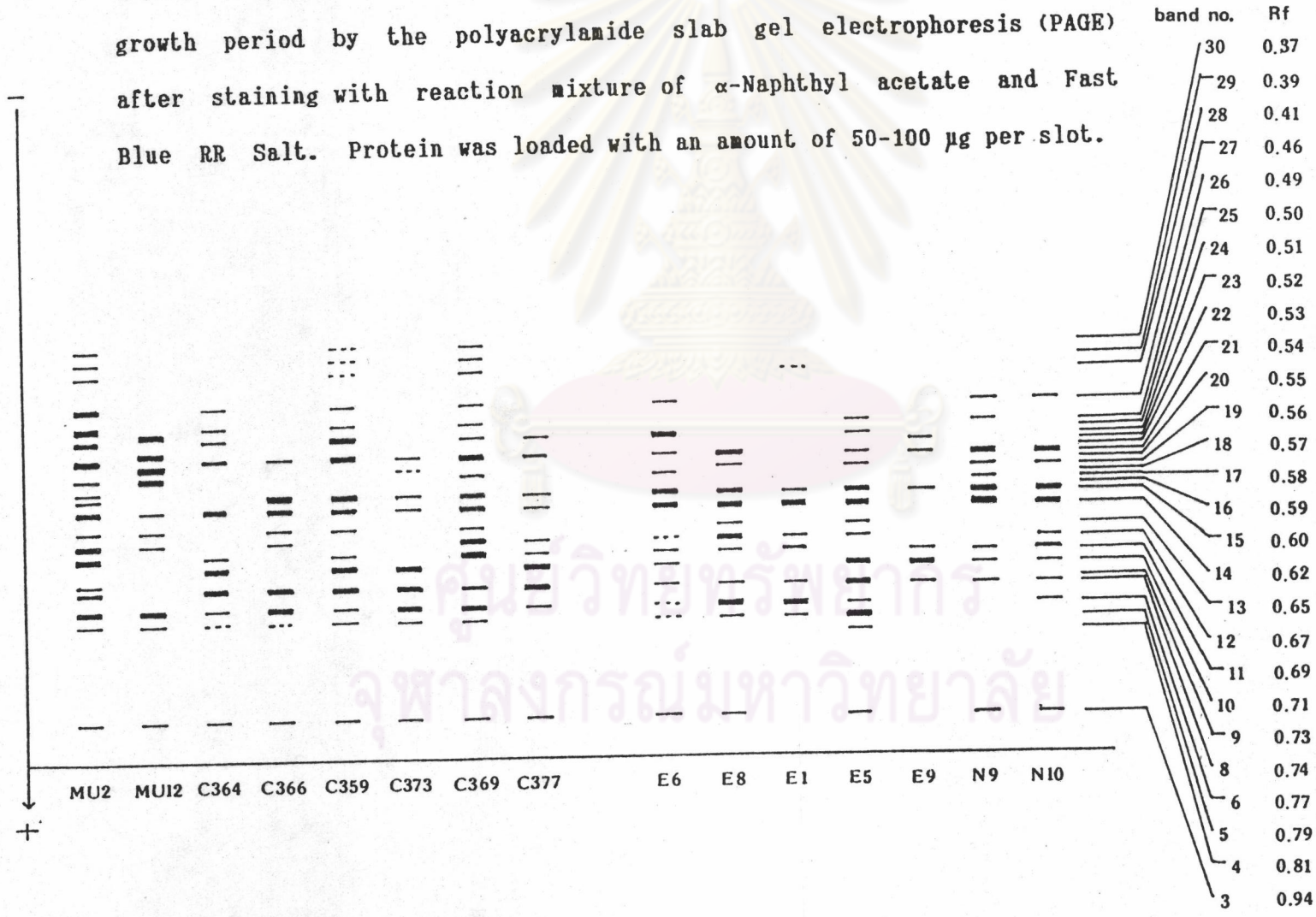
กลุ่มที่ 2. MU12 มี 12 แถบ และแถบส่วนใหญ่จะมี Rf ต่างจากตัวอื่น

กลุ่มที่ 3. C508, C507, C513, C502 มีแถบที่เหมือนกันคือแถบที่ 10, 11, 12, 14 และ 15 (Rf = 0.71, 0.69, 0.67, 0.62 และ 0.60 ตามลำดับ)

กลุ่มที่ 4. C516 มีแถบที่ 27 (Rf = 0.46) เป็นแถบหนา และมีอีก 3 แถบ คือ แถบที่ 10, 11 และ 12 (Rf = 0.71,0.69 และ 0.67 ตามลำดับ) ซึ่งเป็นรูปแบบที่เหมือนกับ FF10

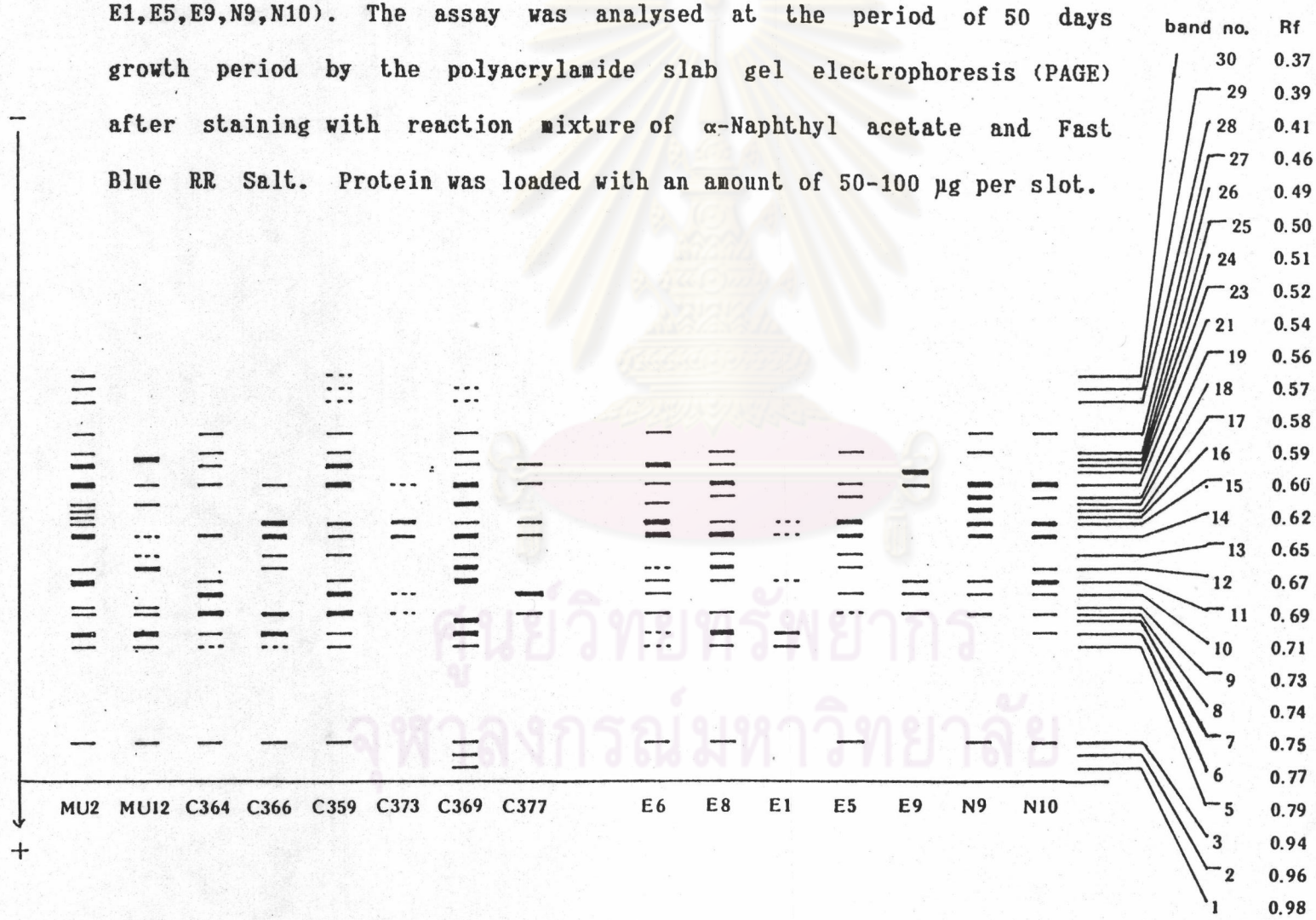
กลุ่มที่ 5. C504 มีไอโซไซม์เป็นแบบผสมระหว่าง FF5 และ N10

รูปที่ 27 The pattern of esterase isozymes of *L. edodes* parents (MU2, MU12); hybrids (C364,C366,C359,C373,C369,C377) and monokaryotic mycelia (E6,E8, E1,E5,E9,N9,N10). The assay was analysed at the period of 30 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with reaction mixture of α-Naphthyl acetate and Fast Blue RR Salt. Protein was loaded with an amount of 50-100 µg per slot.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 28 The pattern of esterase isozymes of *L. edodes* parents (MU2, MU12); hybrids (C364,C366,C359,C373,C369,C377) and monokaryotic mycelia (E6,E8, E1,E5,E9,N9,N10). The assay was analysed at the period of 50 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with reaction mixture of α-Naphthyl acetate and Fast Blue RR Salt. Protein was loaded with an amount of 50-100 µg per slot.



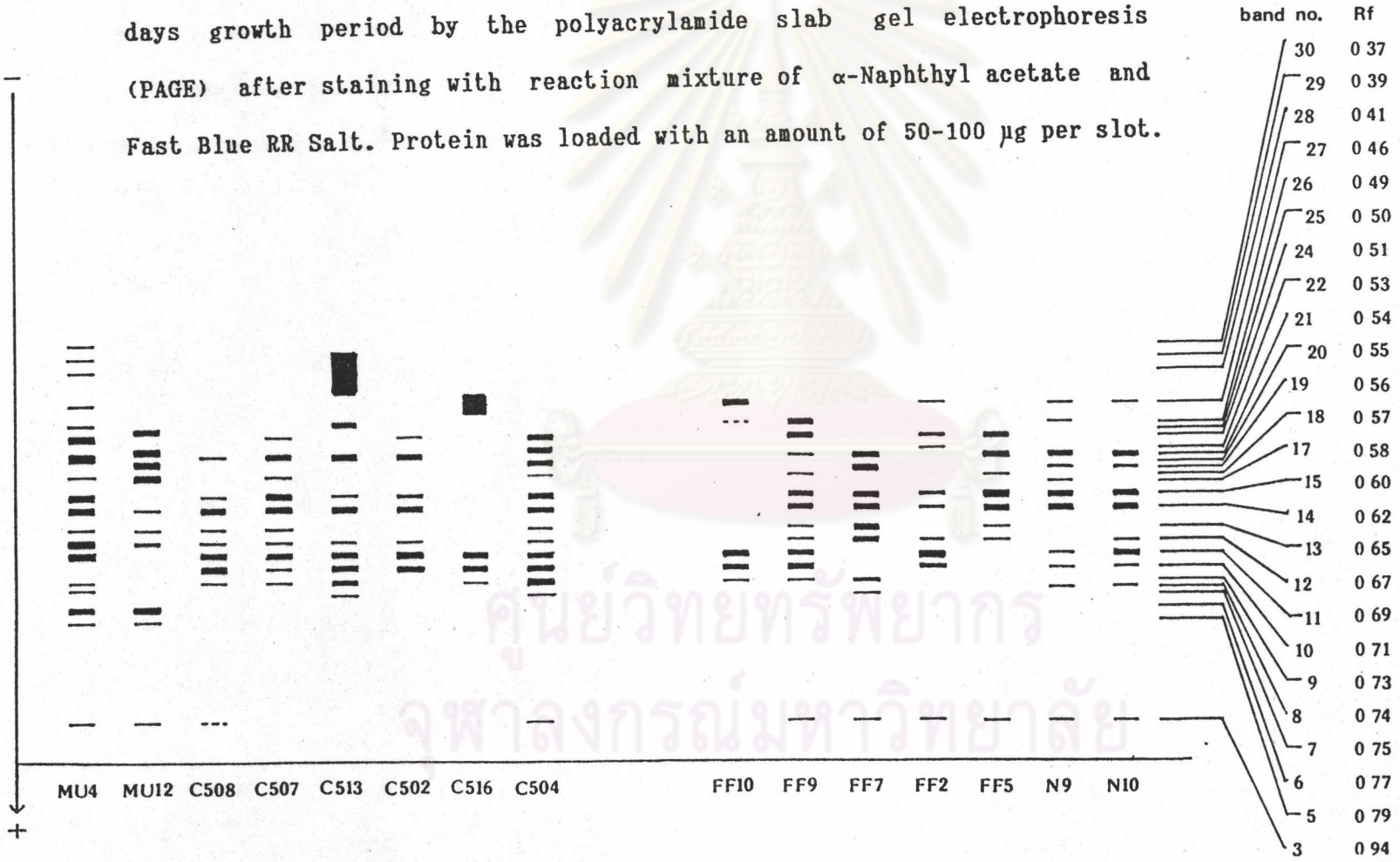
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับเส้นใย monokaryon มีรูปแบบการสังเคราะห์เอนไซม์ต่างกันทุกตัว จัดกลุ่มไม่ได้

2. esterase ที่อายุ 50 วัน (รูปที่ 30) ในเส้นใย dikaryon มีไอโซไซม์เปลี่ยนไปบ้าง แต่ยังสามารถจัดกลุ่มได้เหมือนที่อายุ 30 วัน ส่วนเส้นใย monokaryon มีไอโซไซม์เปลี่ยนไปจากที่อายุ 30 วัน เล็กน้อย

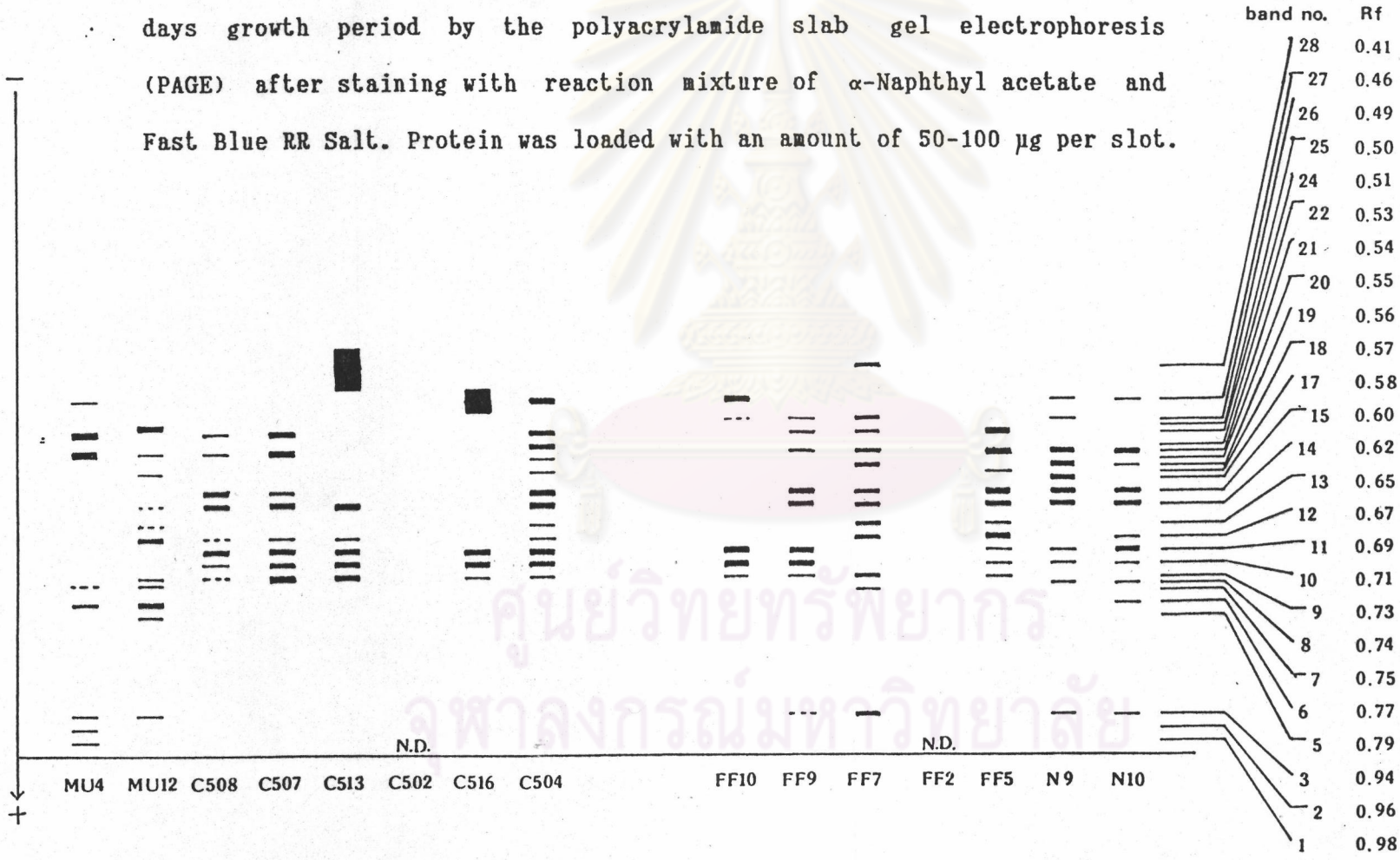
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 29 The pattern of esterase isozymes of *L. edodes* parents (MU4, MU12); hybrids (C508,C507,C513,C502,C516,C504) and monokaryotic mycelia (FF10, FF9,FF7,FF2,FF5,N9,N10). The assay was analysed at the period of 30 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with reaction mixture of α-Naphthyl acetate and Fast Blue RR Salt. Protein was loaded with an amount of 50-100 µg per slot.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 30 The pattern of esterase isozymes of *L. edodes* parents (MU4, MU12); hybrids (C508,C507,C513,C502,C516,C504) and monokaryotic mycelia (FF10, FF9,FF7,FF2,FF5,N9,N10). The assay was analysed at the period of 50 days growth period by the polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) after staining with reaction mixture of α-Naphthyl acetate and Fast Blue RR Salt. Protein was loaded with an amount of 50-100 µg per slot.



N.D. : not determined

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย