บทที่ 3

ผลการทดลอง

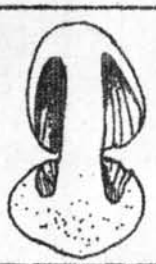
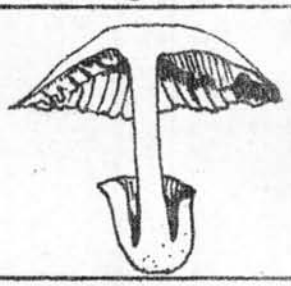
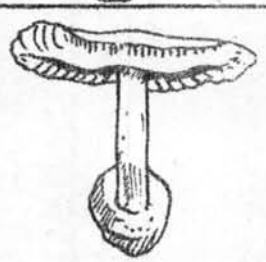
3.1 การเจริญเติบโตของเห็ดฟางในกองแปลงเห็ด

หลังจากปลูกเห็ดฟางไปประมาณ 7 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มที่และแผ่กระจายไปตลอดกองแปลงเห็ด ต่อมาอีกประมาณ 7 ถึง 8 วัน เส้นใยเหล่านี้จะรวมตัวกันแน่นเพื่อสร้าง fruiting body ในระยะแรกเส้นใยจะรวมตัวเป็นตุ่มเล็กๆ เรียกว่า primordium ซึ่งต่อไปจะขยายตัวใหญ่ขึ้นมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างตามลำดับจนเป็นดอกเห็ด ได้แบ่งการเจริญเติบโตของเห็ดฟางในกองแปลงเห็ดออกเป็น 5 ระยะ (ตารางภาพที่ 1) ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มปลูกจนกระทั่ง fruiting body เติบโตเต็มที่มีดังนี้

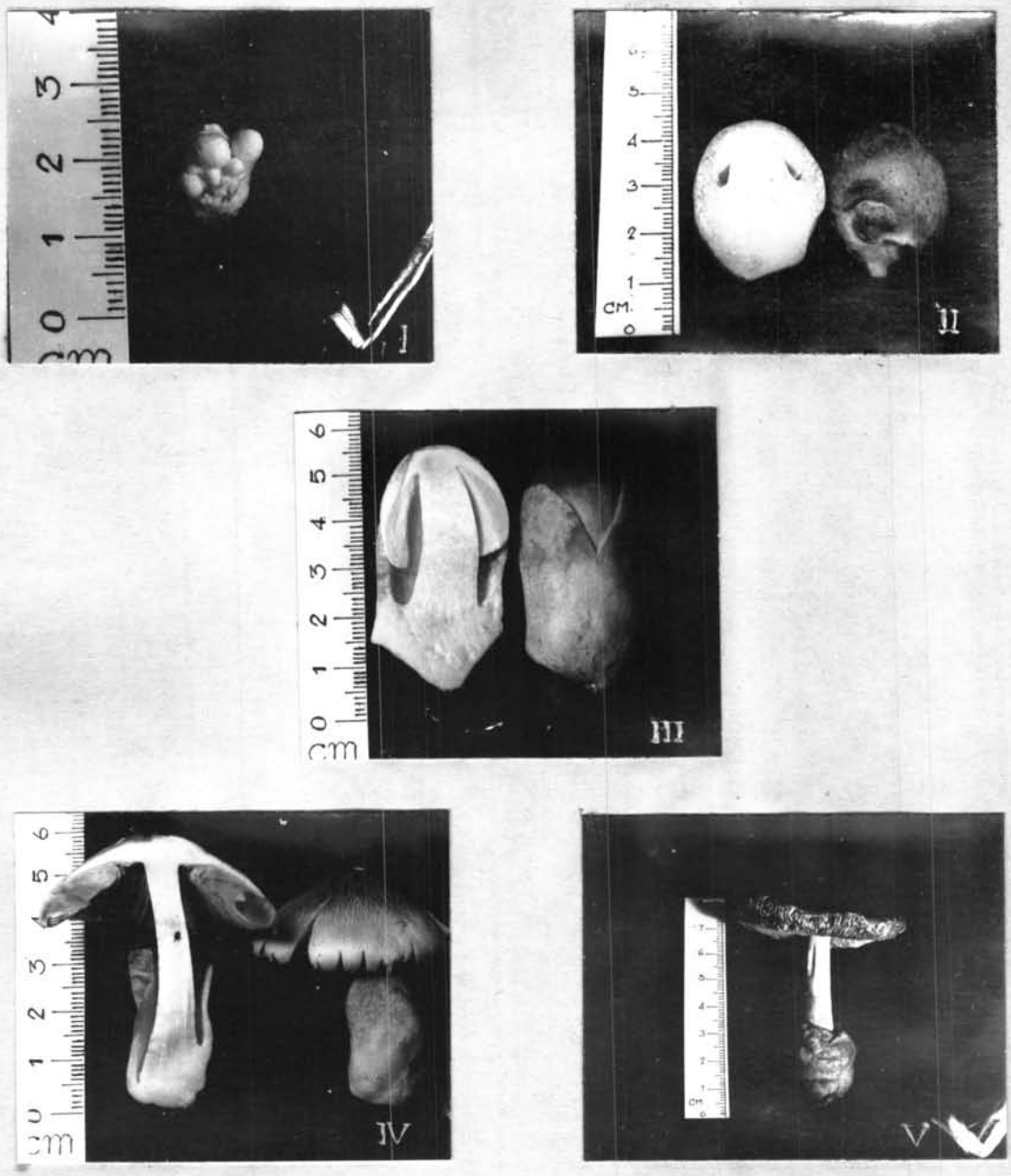
เริ่มต้นปลูกถึงระยะที่ I	เป็นเวลาประมาณ	14 - 15	วัน
ระยะที่ I ถึงระยะที่ II	เป็นเวลาประมาณ	5	วัน
ระยะที่ II ถึงระยะที่ III	เป็นเวลาประมาณ	3	วัน
ระยะที่ III ถึงระยะที่ IV	เป็นเวลาประมาณ	20 - 24	ชั่วโมง
ระยะที่ IV ถึงระยะที่ V	เป็นเวลาประมาณ	10 - 12	ชั่วโมง

ตารางภาพที่ 1

แสดงระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของเห็ดฟาง

ระยะที่	ลักษณะของเห็ด
I	fruiting body เป็นตุ่มเล็กๆ (primordium) ภายในยังไม่มี differentiation ขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร
II	มีก้าน หมวก และครีบเกิดขึ้นอยู่ภายในปลอกหุ้ม fruiting body สูงประมาณ 3.5 เซนติเมตร ความกว้างของหมวกประมาณ 1.8 เซนติเมตร
III 	ก้านยืดยาวมากขึ้น พร้อมกับส่วนหมวกโตขึ้น ดันปลอกเห็ดปริออก fruiting body สูงประมาณ 5.0 เซนติเมตร ความกว้างของหมวกประมาณ 2.5 เซนติเมตร
IV 	หมวกจะขยายใหญ่และกางออก ที่ครีบมีสปอร์สีชมพูนวล fruiting body สูงประมาณ 6.0 เซนติเมตร ความกว้างของหมวกประมาณ 5.0 เซนติเมตร
V 	fruiting body เจริญเติบโตเต็มที่ ส่วนหมวกตรงริมจะกระดกขึ้น สปอร์สีแดงน้ำตาล ขนาดสูงประมาณ 8.0 เซนติเมตร ความกว้างของหมวกประมาณ 6.0 เซนติเมตร

* คิดเฉลี่ยจากเห็ด 15 ดอก



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของเห็ดในระยะต่าง ๆ ทั้ง 5 ระยะ

3.2 กรีบควบคุมการเจริญเติบโตของก้านและหมวกของเห็ดฟาง

ชุดที่ 1 ภายหลังจากตัดหมวกและครีบของเห็ดฟางออกครั้งหนึ่ง และเอาส่วนครีบใต้หมวกของส่วนที่เหลือออกด้วย แล้วทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 30 ชั่วโมง พบว่าส่วนก้านเห็ดจะยืดตัวต่อไปได้อีกเล็กน้อย โดยสังเกตจากความยาวของก้านเห็ดที่เพิ่มขึ้นและไม่เกิดการเบนของก้านเห็กเลย ส่วนหมวกไม่เจริญก็อไม่ขยายหรือกางออก

ชุดที่ 2 เห็ดที่ตัดหมวกและครีบออกครั้งหนึ่ง แต่ไม่ได้เอาส่วนครีบใต้หมวกของส่วนที่เหลือออก พบว่าก้านเห็ดจะยืดตัวยาวขึ้น และโค้งไปทางด้านที่ไม่มีครีบ (ตารางที่ 1) หมวกส่วนที่เหลือจะขยายหรือกางออกตามปกติ

ตารางที่ 1

แสดงองศาของการเบนของก้านเห็ด

ดอกที่	การเบนของก้านเห็ด (องศา)
1	28
2	32
3	35
4	30
5	32
6	28
7	35
8	38
9	38
10	30

หมายเหตุ เห็ดที่ใช้ในการทดลองนี้ ก้านตรงทุกดอก

ภาพที่ 3 แสดงการ เบนของก้าน เห็ดเนื่องจากตัดหมวกและครีบออกครึ่งหนึ่ง

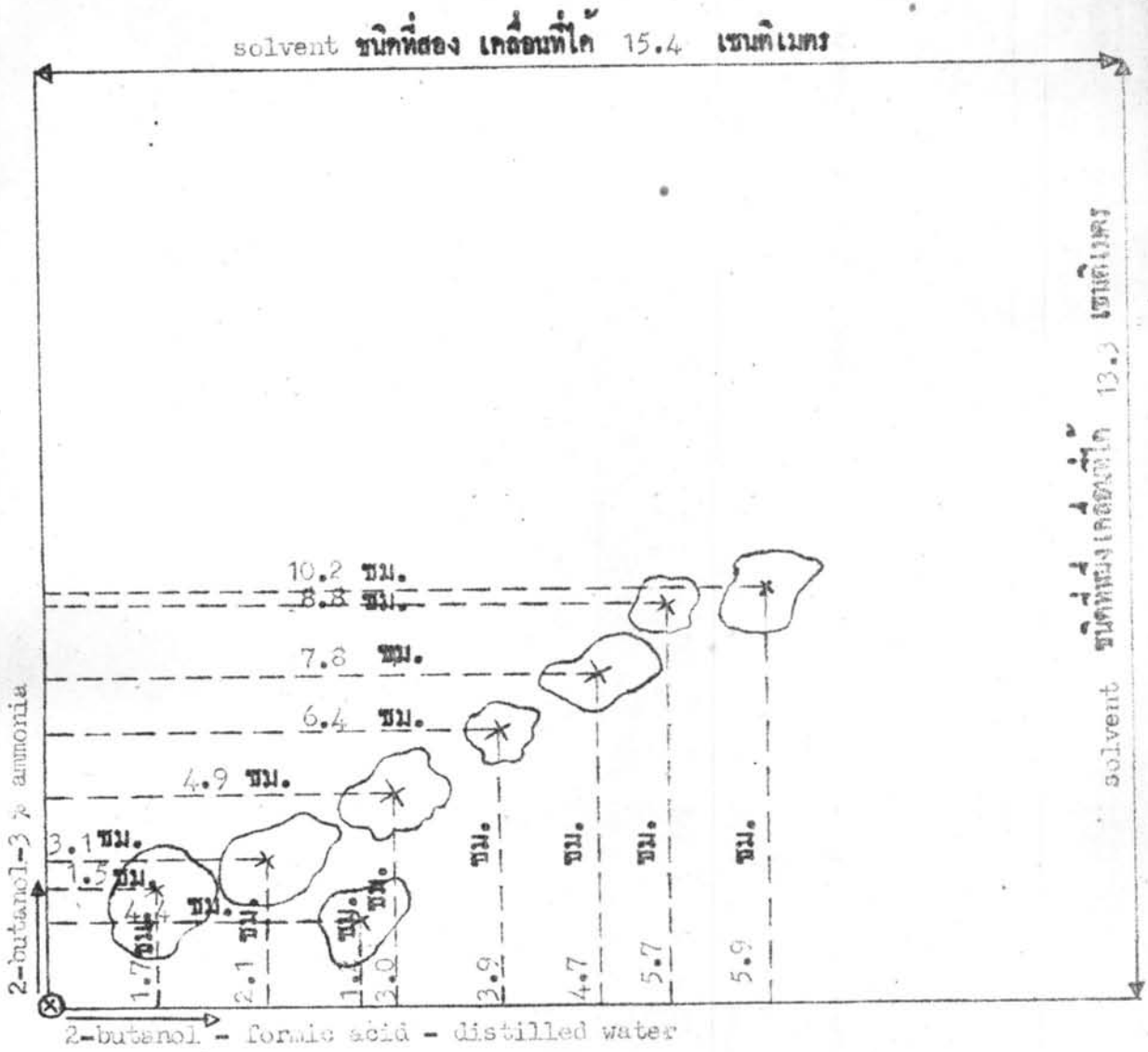
3.3 การวิเคราะห์ crude extract ในขั้นต้น

3.3.1 การวิเคราะห์สารใน crude extract โดยวิธี Infra red spectrophotometry และโดยปฏิกริยาเคมี

จากผลการวิเคราะห์ของ ดร.เพริศพรรณ คณาธารณา และอาจารย์สิทธิชัย ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ พบว่า IR spectra ของ crude extract แสดงลักษณะ peak ของ secondary amide (ca.1650 cm^{-1} และ 3300 - 3400 cm^{-1}) และไม่มี aromatic absorption peak ปรากฏใน spectra นี้ แสดงว่าควรมี secondary aliphatic amide อยู่ใน crude extract และพบว่า crude extract นี้ให้ผลตอกับ Biuret test คือได้สี violet อ่อน ๆ แสดงว่ามี $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH-\overset{}{C}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$ group อยู่ใน crude extract แต่ไม่ให้ผลตอ Xanthoproteic test แสดงว่า crude extract นี้อาจไม่มีสารพวก aromatic อยู่ และเนื่องจาก crude extract นี้ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกผลึกไม่ได้ เพราะว่าเกิดการรวมตัวเป็นก้อนขึ้น ซึ่งอาจเป็นการทำลายสารพวกโปรตีนที่มีอยู่ใน crude extractได้ ดังนั้น secondary aliphatic amide อาจจะเป็น aliphatic peptides สั้น ๆ ก็ได้ เนื่องจากถูกทำลายได้ง่ายเมื่อร้อนหรือเมื่อเติม methanol ลงไปบ้าง

3.3.2 การตรวจสอบสารใน crude extract โดยวิธี ascending two-dimensional paper chromatography

จากการ run สารละลาย crude extract ใน solvent ชนิดที่หนึ่งคือ 2 - butanol : 3% ammonia กับ solvent ชนิดที่สองคือ 2-butanol: formic acid : distilled water เมื่อ spray ด้วย 0.2 % ninhydrin พบว่าจะเกิดจุดสีม่วงขึ้น 8 จุด (ตารางภาพที่ 2)



ตารางภาพที่ 2 **แสดง** Two-dimensional chromatogram **ของสารใน** crude extract **ของเห็ดฟาง**

⊗ = **ตำแหน่งที่หยดสารละลาย** crude extract

3.4 การศึกษาผลของ crude extract และ indoleacetic acid (IAA) ที่มีต่อการยืดตัวของก้านเห็ดฟาง

จากการทดลองกับเห็ดในระยะที่ II 12 ดอกของแต่ละชุด พบว่า
ชุดที่ 1 หลังจากให้ crude extract แก่ก้านเห็ดข้างหนึ่งเป็นเวลา 2 วันจะเกิดการเบนของก้านเห็ดจากด้านที่ได้รับสารไปยังอีกด้านหนึ่ง (ตารางที่ 2)
ชุดที่ 2 หลังจากให้ IAA ความเข้มข้น 10 ppm แทน crude extract จะไม่เกิดการเบนของก้านเห็ด
ชุดที่ 3 เมื่อให้น้ำกลั่น ก้านเห็ดจะไม่เบน

ตารางที่ 2

แสดงองศาของการเบนของก้านเห็ดหลังจากได้รับ crude extract

ดอกที่	การเบนของก้านเห็ด (องศา)
1	10
2	8
3	15
4	10
5	10
6	17
7	15
8	8
9	13
10	15
11	10
12	17

เห็ดที่ใช้ก้านตรงทุกดอก

ภาพที่ 4 แสดงการเบนของก้านเห็ดหลังจากได้รับ crude extract เป็นตำแหน่งที่ให้ crude extract

3.5 ผลของ crude extract ที่มีต่อการยืดตัวของ coleoptile ของข้าวโพด เทียบกับ Indoleacetic acid (IAA)

การยืดตัวของ excised coleoptile ของข้าวโพดที่มีอายุ 72 ชั่วโมง หลังจากได้รับ crude extract และ IAA ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่า excised coleoptile ที่ได้รับ crude extract และ IAA จะยืดตัวได้มากกว่าเดิมประมาณ 0.05 และ 0.30 เซนติเมตรตามลำดับ ในขณะที่ excised coleoptile ของ control ยืดตัวได้มากกว่าเดิมประมาณ 0.1 เซนติเมตร โดยความยาวเริ่มต้นของ excised coleoptile เท่ากันหมด คือ 0.5 เซนติเมตร (ตารางที่ 3) แสดงว่า IAA ช่วยในการยืดตัวของ coleoptile เมื่อเทียบกับ control แต่ crude extract ไม่ช่วยในการยืดตัวของ coleoptile เมื่อเทียบกับ control เพราะถือว่าความยาวที่เพิ่มขึ้นของ control เป็นการเพิ่มปกติ

3.6 การตอบสนองของก้านเห็ดที่มีต่อแสง

ชุดที่ 1 หลังจากก้านของเห็ดฟางที่ไม่มีส่วนหมวกและครีบคลุม ได้รับแสงจากดวงไฟโดยให้ถูกแสงเพียงด้านเดียว เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าก้านทั้ง 15 ดอก เบนเข้าหาแสง (ตารางที่ 4)

ชุดที่ 2 หลังจากก้านของเห็ดฟางที่มีส่วนหมวกและครีบคลุม ได้รับแสงจากดวงไฟโดยให้ถูกแสงเพียงด้านเดียวเป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าก้านทั้ง 15 ดอก ไม่มีการเบนเข้าหาแสง

ตารางที่ 3

แสดงการยืดตัวของ excised coleoptile หลังจากได้รับ crude extract และ IAA

สาร \ ความเข้มข้น (ppm)	ความยาวครั้งสุดท้าย (เซนติเมตร)								
	0	.001	.01	.1	1	10	10^2	10^3	10^4
IAA	-	0.63±0.02	0.65±0.01	0.69±0.02	0.78±0.02	0.86±0.03	0.74±0.03	-	-
Crude extract	-	0.58±0.01	0.58±0.01	0.59±0.01	0.57±0.01	0.59±0.01	0.57±0.01	0.58±0.01	0.56±0.01
Control	0.62±0.02	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ความยาวเริ่มต้นเท่ากันหมด คือ 0.5 เซนติเมตร

ตารางที่ 4

แสดงองศาของการเบนเข้าหาแสงของก้านเห็ด

ดอกที่	มุมเบนเริ่มต้น* (องศา)	มุมเบนสุดท้าย (องศา)	มุมที่เบนเข้าหาแสง (องศา)
1	0	30	30
2	0	28	28
3	0	25	25
4	0	28	28
5	10	35	25
6	15	35	20
7	10	40	30
8	0	25	25
9	0	30	30
10	10	30	20
11	10	30	20
12	0	28	28
13	0	26	26
14	10	30	20
15	10	35	25

* ดอกเห็ดที่ใช้ในการทดลองนี้บางดอกไม่ตรงแต่โค้งเล็กน้อย จึงวัดมุมไว้เป็นมุมเบนเริ่มต้น

3.7 ผลของ crude extract ที่มีต่อการสร้าง fruiting body

การเจริญเติบโตในอาหาร Potato dextrose agar, Hay medium (- glucose) และ Hay medium (+ glucose)

ศึกษาการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสามชนิด โดยสังเกตความหนาแน่นของเส้นใย และนับจำนวน primordium ที่เกิดขึ้น หลังจาก incubate ไว้ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่า inoculum ที่อยู่ใน PDA และ Hay medium (- glucose) เจริญเป็นเส้นใยได้ดี และมี primordium เกิดขึ้น ส่วนใน Hay medium ที่ใส่ glucose ในปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร พบว่าเส้นใยจะเจริญได้น้อยมาก และไม่มี primordium เกิดขึ้นเลย (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5

แสดงค่าเปรียบเทียบความหนาแน่นของเส้นใยและจำนวน primordium ที่เกิดขึ้นใน PDA, Hay medium (- glucose) และ Hay medium (+ glucose)

อาหาร	ความหนาแน่นของเส้นใย*	จำนวน primordium* (ขนาด 1-3 มม.)
PDA	+ + +	30 ± 0.67
Hay medium (-glucose)	+ + +	36 ± 1.22
Hay medium (+ glucose 5 กรัมต่อลิตร)	+ +	-
Hay medium (+ glucose 10 กรัมต่อลิตร)	+ +	-
Hay medium (+ glucose 15 กรัมต่อลิตร)	+	-

* เฉลี่ยจากจำนวน 15 หลอด

ความหนาแน่นของเส้นใย + น้อย

+ + ปานกลาง

+ + + มาก

± : Standerd error of the mean คำนวนจากสูตร

$$\sigma\bar{x} = \sqrt{\frac{\Sigma(Xi-\bar{X})^2/n-1}{n}}$$

การเจริญเติบโตของ fruiting body ใน Hay medium (+ glucose) เมื่อให้ crude extract

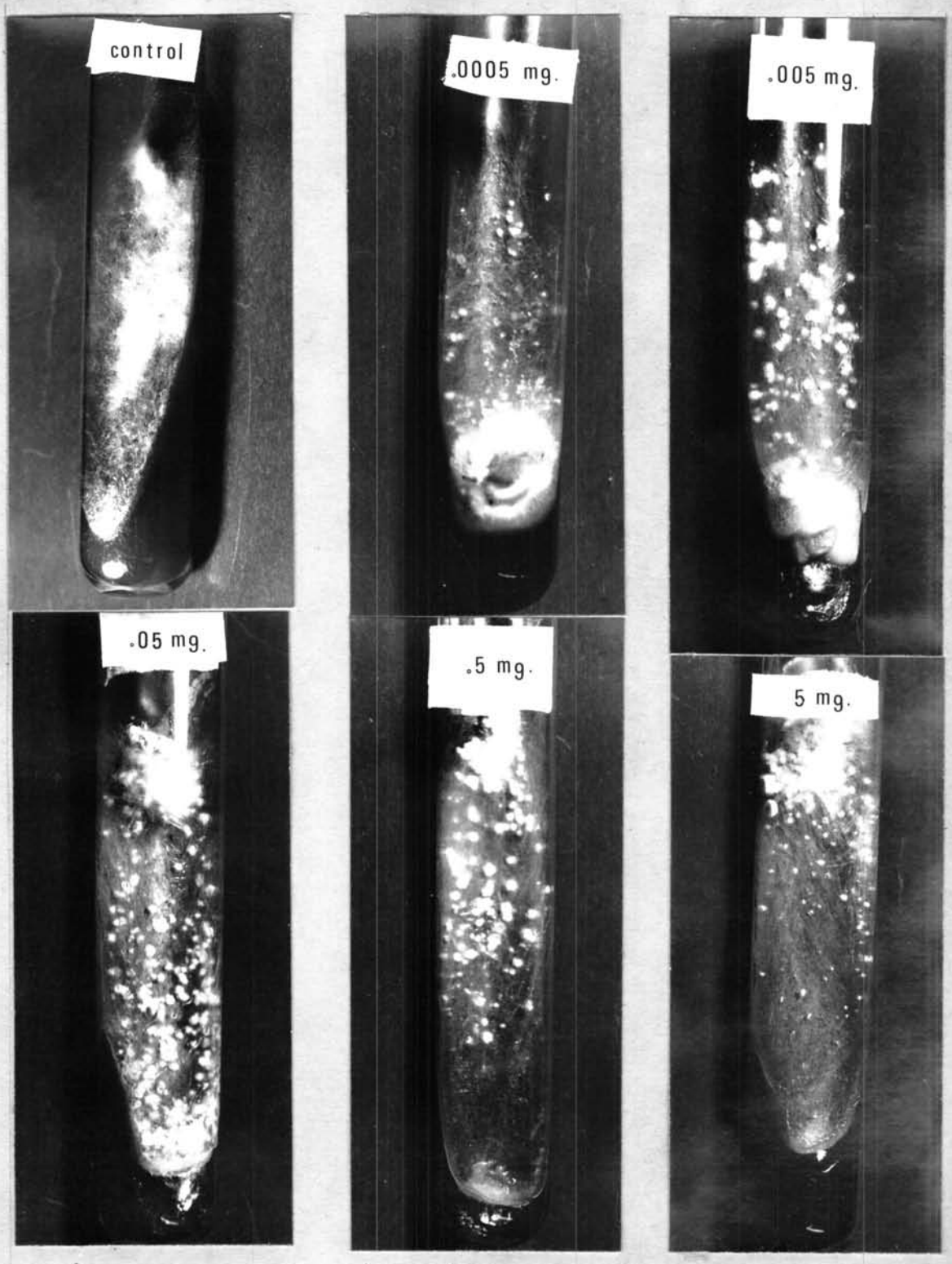
หลังจากฉีด crude extract ให้แก่เส้นใยอายุ 7 วัน ซึ่งเจริญบน Hay medium ที่ใส่ glucose 15 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ใน incubator ที่มีอุณหภูมิประมาณ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าการเกิด fruiting body ในหลอดทดลองที่ให้ crude extract ความเข้มข้นต่าง ๆ กันจะแตกต่างกัน (ตารางที่ 5 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 6

แสดงค่าเปรียบเทียบความหนาแน่นของเส้นใยและจำนวน primordium ที่เกิดขึ้นใน Hay medium (+ glucose) เมื่อได้รับ crude extract ความเข้มข้นต่างๆกัน

ปริมาณของ crude extract (มิลลิกรัมต่อหลอด)	ความหนาแน่นของเส้นใย*	จำนวน primordium* (ขนาด 1 - 3 มม.)
5	+ +	30 ± 0.70
.5	+ + +	40 ± 1.01
.05	+ +	80 ± 1.83
.005	+ +	35 ± 1.01
.0005	+ +	20 ± 0.72
0	+	-

* ค่าเฉลี่ยจาก 15 หลอด



ภาพที่ 5 แสดงความหนาแน่นของเส้นใยและการเกิด primordium ในหลอดทดลองที่ให้ crude extract ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

3.8 การเจริญเติบโตของเห็ดฟางใน Hay medium (+ glucose) เมื่อได้รับ yeast extract

หลังจากฉีด yeast extract ปริมาณต่าง ๆ กันให้แก่เส้นใยอายุ 7 วัน ที่เจริญอยู่บนอาหาร Hay medium ที่ใส่ glucose 15 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน พบว่าการเจริญของเส้นใยไม่แตกต่างกัน แต่จำนวน primordium ที่เกิดขึ้นไม่เท่ากัน (ตารางที่ 7) และขนาดของ primordium เล็กกว่าเมื่อได้รับ crude extract

ตารางที่ 7

แสดงค่าเปรียบเทียบความหนาแน่นของเส้นใยและจำนวน primordium ที่เกิดขึ้นใน Hay medium (+ glucose) เมื่อได้รับ yeast extract ในปริมาณต่าง ๆ กัน

ปริมาณของ yeast extract (มิลลิกรัมต่อหนึ่งหลอด)	ความหนาแน่นของเส้นใย*	จำนวน primordium* (ขนาดประมาณ 1 มม.)
.05	+ +	30 ± 1.67
.5	+ +	36 ± 2.56
5	+ +	17 ± 0.79

* ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 10 หลอด

I16564339.