การแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมฮังการีและเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Protoplast Isolation from the Mycelium of *Pleurotus ostreatus* and *Cordyceps militaris*

เพ็ญแข รุ่งเรือง[1] สนธิชัย จันทร์เปรม[2] และเสริมศิริ จันทร์เปรม[3*]

Penkhae Rungrueng[1], Sontichai Chanprame[2] and Sermsiri Chanprame[3*]

Received: July 17, 2024
Revised: July 26, 2024
Accepted: July 30, 2024

Abstract: This study aimed to investigate the optimal conditions for the protoplast isolation of Pleurotus ostreatus and *Cordyceps militaris*. The factors that were optimized included mycelium age, formula of mixed enzymes solution, mannitol concentration for osmotic stabilization, digestion temperature and duration. The results demonstrated that the optimal conditions for *P. ostreatus* were 4-day-old mycelium, digested for 6 hours at 25±2 °C with an enzyme solution consisting of 1.0% Cellulase Onozuka R-10, 1.5% driselase 1.5% lysing enzyme, and 1.0% Macerozme R-10 dissolved in 0.6 M mannitol. These conditions yielded the highest number of protoplasts, with 6.25x10^5 cells/mL. For *C. militaris*, a similar enzyme solution was suitable for the digestion of 5-day-old mycelium at 30 °C for 3 hours, yielding the highest number of protoplasts at 6.25x105 cells/mL.

Keywords: Medicinal mushroom, Oyster mushroom, Protoplast

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดนางรมฮังการี และเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ อายุเส้นใย ส่วนผสมของสารละลายเอนไซม์ ความเข้มข้นของ mannitol ที่ใช้รักษาแรงดันออสโมติกของเซลล์ ระยะเวลาและอุณหภูมิในการย่อย ผลการทดลอง พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรมฮังการี คือ ใช้เส้นใยอายุ 4 วัน ย่อยด้วยเอนไซม์ที่ส่วนผสมประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ driselase 1.5 เปอร์เซ็นต์ lysing enzyme 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ Macerozyme R-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน mannitol 0.6 โมลาร์ โดยใช้ระยะเวลาการย่อย 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ 6.25x105 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับเห็ดถั่งเช่าสีทอง เอนไซม์ที่เหมาะสมคือส่วนผสมเดียวกันกับที่ใช้สำหรับเห็ดนางรมฮังการี แต่ใช้เส้นใยอายุ 5 วัน ย่อยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ 6.0x105 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ: เห็ดสมุนไพร, เห็ดนางรม, โปรโตพลาสต์

---

[1] สาขาวิจัยและพัฒนาการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Research and Development Program, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

[2] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

[3] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[3] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

*Corresponding author: agrsrc@ku.ac.th

คำนำ

เห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.ex.Fr.) Kumn; Basidiomycota) เป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางอาหารสูง เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนคุณภาพสูง มีไขมันและแคลอรีต่ำ และมีกากใยอาหาร (Chang and Miles, 2004; Regula and Siwulski, 2007) เห็ดชนิดนี้สามารถเพาะเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน มีวงจรชีวิตสั้น จึงมีต้นทุนการผลิตที่ค่อนข้างต่ำ ส่วนเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris* (L.) Fr.; Ascomycota) เป็นเชื้อราที่จัดเป็นปรสิตของแมลง (entomofungus) อยู่ในสกุลเดียวกับเห็ดถั่งเช่าธิเบต (C. *sinensis*) ชาวจีนเชื่อว่าเห็ดถั่งเช่าเป็นยาอายุวัฒนะ ใช้รักษาโรคได้หลายชนิด (Winkler, 2008; Das *et al*., 2010) ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นการค้ามากในประเทศจีน เกาหลี และญี่ปุ่น เนื่องจากความต้องการบริโภคเห็ดถั่งเช่ามีมากขึ้น ทั้งในรูปของการใช้เป็นยาสมุนไพร อาหารเสริม และใช้ประกอบอาหาร แต่การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองต้องใช้อุณหภูมิต่ำเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างดอก (ธัญญา และคณะ, 2561) การผลิตเห็ดชนิดนี้ในประเทศไทยจึงมีต้นทุนการผลิตสูงเนื่องจากต้องเพาะเลี้ยงในห้องปรับอากาศ ดังนั้นหากสามารถนำลักษณะที่เติบโตง่ายของเห็ดนางรมมาผสมผสานกับคุณสมบัติทางสมุนไพรของเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ก็จะเกิดประโยชน์แก่ผู้ผลิตและผู้บริโภค แต่เนื่องจากเห็ดทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก เนื่องจากอยู่ใน Phylum ที่ต่างกัน จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับวิธีการผสมพันธุ์แบบมาตรฐาน อย่างไรก็ตาม ในกรณีนี้สามารถใช้เทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ช่วยในการแก้ปัญหาได้

เทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) เป็นเทคนิคสำคัญที่ใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์ลูกผสมที่พ่อและแม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงที่มักประสบปัญหาความเข้ากันไม่ได้ของการผสมโดยอาศัยเพศ (sexual incompatibility) เทคนิคนี้มีรายงานว่าสามารถนำมาช่วยในการผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization) หรือแม้กระทั่งการผสมข้ามสกุล (intergeneric hybridization) ซึ่งการผสมพันธุ์แบบธรรมชาติเป็นไปได้ยากหรืออาจเป็นไปไม่ได้เลยถ้าหากสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันมาก (Aswini, *et al*., 2014) โปรโตพลาสต์คือเซลล์ที่ถูกกำจัดผนังเซลล์ (cell wall) ออกเหลือเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ห่อหุ้มองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ มีคุณสมบัติที่สามารถชักนำให้เกิดการหลอมรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมโปรโตพลาสต์ก็สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ได้ (คำนูณ, 2545; Davey *et al*., 2005)

ขั้นตอนที่สำคัญก่อนการรวมโปรโตพลาสต์คือการแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation) ซึ่งเป็นการเตรียมเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่ปราศจากผนังเซลล์ โดยทำลายหรือแยกเอาผนังเซลล์ออกให้เหลือเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ การลอกผนังเซลล์ออกได้อย่างสมบูรณ์จะทำให้ได้โปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ แต่ถ้าลอกออกได้เพียงบางส่วนและยังคงมีส่วนของผนังเซลล์ติดอยู่จะได้เซลล์ที่เรียกว่าสเฟียโรพลาสต์ (sphearoplast) ซึ่งไม่เหมาะสำหรับการรวมโปรโตพลาสต์ เนื่องจากผนังเซลล์ที่เหลืออยู่จะไปขัดขวางการเชื่อมต่อกันของเยื่อหุ้มเซลล์ (คำนูณ, 2545) โครงสร้างของโปรโตพลาสต์มีลักษณะบอบบางมากจึงทำให้เซลล์แตกได้ง่าย และยังไวต่อการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมซิสจากภายนอกอีกด้วย ดังนั้น ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จึงต้องมีการเติมสาร osmotic stabilizer ที่ช่วยรักษาสภาพแรงดันภายนอกให้เหมาะสม ทำให้เซลล์ไม่แตกหรือแฟบมากเกินไป (Fox, 1991) นอกจากนี้ การแยกโปรโตพลาสต์ให้ได้จำนวนมากและคุณภาพดีนั้นยังมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย เช่น ชนิดของพืชหรือเชื้อ อายุของเนื้อเยื่อเริ่มต้นหรืออายุเส้นใย ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลาและอุณหภูมิในการย่อย (สาวิตรี, 2549; สกุลรัตน์, 2553)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรมฮังการีและเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ อายุของเส้นใยเห็ดแต่ละชนิด ความเข้มข้นของ mannitol ที่ช่วยรักษาสภาพแรงดันภายนอกให้เหมาะสม ส่วนผสมของเอนไซม์ที่ทำให้ย่อยผนังเซลล์ออกได้ดี

รวมทั้งอุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสม เพื่อให้ทราบปัจจัยที่หมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดแต่ละชนิดให้ได้ปริมาณมากและคุณภาพดี สำหรับนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดทั้งสองชนิดนี้ด้วยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาอายุเส้นใย ความเข้มข้นของ mannitol และระยะเวลาการย่อย

เตรียมเส้นใยเห็ดนางรมฮังการีและเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยนำเส้นใยเห็ดนางรมฮังการี (เชื้อพันธุกรรมจากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร) และเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง (เชื้อพันธุกรรมจากบริษัท ที เอส ทวิน จำกัด) เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA อายุประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นตัดวุ้นบริเวณปลายวงที่มีเส้นใยเจริญอยู่ให้เป็นแผ่นขนาด 1x1 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 4 และ 5 วัน เมื่อได้อายุเส้นใยที่ต้องการแล้วจึงนำอาหารที่มีเส้นใยแต่ละอายุมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเส้นใยจากอาหาร ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง และล้างด้วยสารละลาย mannitol ที่ปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.6 0.7 และ 0.8 โมลาร์ จำนวน 2 ครั้ง

นำเส้นใยที่แยกได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีส่วนผสมตามรายงานของ Djajanegara and Masduki (2010) ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์สองชนิด คือ cellulase 1.0 เปอร์เซ็นต์ [Cellulase Onozuka R-10 ที่ได้จาก *Trichoderma viride* (Yakult Pharmaceutical IND. Co., Ltd.) และ driselase 1.0 เปอร์เซ็นต์ [Driselase™ (Sigma-Aldrich, Co., Ltd.) ที่ได้จาก *Basidiomycetes* sp.] ที่ละลายใน mannitol ความเข้มข้น 0.6 0.7 หรือ 0.8 โมลาร์ โดยในการย่อยใช้เส้นใย 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร และวางบนเครื่องเขย่าแบบ orbital shaker ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสารละลายเอนไซม์มาแยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเซลล์ด้วยสารละลายซูโครสความเข้มข้น 19 เปอร์เซ็นต์ โดยหยอดโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายเอนไซม์ลงในสารละลายซูโครสซึ่งบรรจุในหลอดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 750 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่บริเวณส่วนกลางของสารละลายใสในหลอดใหม่ เติมสารละลาย mannitol ความเข้มข้น 0.6 0.7 หรือ 0.8 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์โดยใช้สไลด์นับเซลล์ (hemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณเป็นจำนวนเซลล์ไร้ผนังต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้สูตร

$$\text{จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อช่อง}}{(0.25)\ (0.25)\ (0.1)\times10^{-3}}$$

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ตำรับทดลองละ 3 ซ้ำ จัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล (3x3x4 Factorial in CRD) ประกอบด้วย 3 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A = อายุเส้นใยเห็ด 3 ระยะ คือ 3 4 และ 5 วัน

ปัจจัย B = ความเข้มข้น mannitol 3 ระดับ คือ 0.6 0.7 และ 0.8 โมลาร์

ปัจจัย C = ระยะเวลาการย่อย 4 ระดับ คือ 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

การทดลองที่ 2 การศึกษาสูตรของสารละลายเอนไซม์ผสม และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยผนังเซลล์

เตรียมเส้นใยเห็ดตามผลการทดลองที่ดีที่สุดของการทดลองที่ 1 โดยเห็ดนางรมฮังการีใช้เส้นใยอายุ 4 วัน และเห็ดถั่งเช่าสีทองใช้เส้นใยอายุ 5 วัน

แยกเส้นใยจากอาหารโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเส้นใยที่ได้ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง และล้างด้วยสารละลาย mannitol ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ที่ปลอดเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง นำเส้นใยที่ได้มาย่อยเอาผนังเซลล์ออกโดยใช้สารละลายเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วย 1) cellulase [(Cellulase Onozuka R-10 (Yakult Pharmaceutical IND. Co., Ltd.) ที่ได้จาก *Trichoderma viride*] 2) driselase [Driselase™ (Sigma-Aldrich, Co., Ltd.) ที่ได้จาก *Basidiomycetes* sp.] 3) lysing enzyme (*Lysing enzyme* (Sigma-Aldrich, Co., Ltd.) ที่ได้จาก *Trichoderma harzianum*) และ 4) macerozyme [Macerozyme® R-10 (Yakult Pharmaceutical IND. Co., Ltd) ที่ได้จาก *Rhizopus* sp.] โดยมีส่วนผสมของเอนไซม์ 5 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรละลายในสารละลาย mannitol ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ดังนี้

1) cellulase 1.0 เปอร์เซ็นต์ driselase 1.5 เปอร์เซ็นต์ lysing enzyme 1.5 เปอร์เซ็นต์ macerozyme 1.0 เปอร์เซ็นต์

2) cellulase 1.0 เปอร์เซ็นต์ driselase 1.0 เปอร์เซ็นต์

3) cellulase 0.8 เปอร์เซ็นต์ driselase 1.0 เปอร์เซ็นต์

4) cellulase 0.8 เปอร์เซ็นต์ driselase 1.0 เปอร์เซ็นต์ lysing enzyme 1.0 เปอร์เซ็นต์ macerozyme 1.0 เปอร์เซ็นต์

5) driselase 1.0 เปอร์เซ็นต์ lysing enzyme 1.0 เปอร์เซ็นต์

โดยใช้เส้นใยเห็ด 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร สำหรับการย่อยที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ใช้เครื่องเขย่าแบบ linear motion ความเร็ว 50 รอบต่อนาที ส่วนการย่อยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมโดย water bath shaker โดยเห็ดนางรมฮังการีใช้เวลาย่อย 6 ชั่วโมง ส่วนเห็ดถั่งเช่าสีทองใช้เวลาย่อย 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเซลล์ และตรวจนับและคำนวณจำนวนโปรโตพลาสต์ ตามวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ตำรับทดลองละ 3 ซ้ำ จัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล (5x2 Factorial in CRD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ส่วนผสมของเอนไซม์ 5 สูตร และอุณหภูมิในการย่อย 2 ระดับ คือ 25±2 และ 30 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาอายุเส้นใย ความเข้มข้นของ mannitol และระยะเวลาในการย่อยผนังเซลล์

จากการศึกษาอายุของเส้นใย ความเข้มข้น mannitol และระยะเวลาการย่อยที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรมฮังการีและเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยใช้ส่วนผสมของเอนไซม์ที่ประกอบด้วย driselase 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ cellulase 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ทั้งสามปัจจัยดังกล่าวให้จำนวนโปรโตพลาสต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) โดยในเห็ดนางรมฮังการี พบว่า การใช้เส้นใยอายุ 4 วัน ความเข้มข้น mannitol 0.6 โมลาร์ และระยะเวลาการย่อย 6 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด เท่ากับ 5.13×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ การใช้เส้นใยที่อายุเท่ากันและความเข้มข้นของ mannitol เดียวกัน แต่ย่อยเพียง 5 ชั่วโมง ที่ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 5.00×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Table 1) สำหรับเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่า ตำรับทดลองที่ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ การใช้เส้นใยอายุ 5 วัน ความเข้มข้น mannitol 0.6 โมลาร์ และระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 3.8×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ เส้นใยอายุ 4 วัน ความเข้มข้น mannitol 0.6 โมลาร์ และระยะเวลาการย่อย 6 ชั่วโมง ที่ให้จำนวนโปรโตพลาสต์เท่ากับ 3.65×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Table 2)

เมื่อพิจารณาแยกรายปัจจัย พบว่าอายุเส้นใยที่ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดของเห็ดทั้งสองชนิด คือที่อายุ 4 วัน โดยเห็ดนางรมฮังการีให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 2.11×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเห็ดถั่งเช่าสีทองให้จำนวนโปรโตพลาสต์

$1.39x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Table 3) ทั้งนี้ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนั้น มีรายงานว่า ผลผลิตของโปรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับอายุของเส้นใย อายุเส้นใยเห็ดที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบและมีความหนาของผนังเซลล์มากขึ้น จึงทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ลดลง (Zhao and Chang, 1993) โดยในเห็ดหลายชนิดมีรายงานว่าการใช้อายุเส้นใยในช่วง 3-6 วัน ทำให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมาก (Kim *et al*., 2000) และจากการศึกษาของ Eyini *et al*. (2006) พบว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดนางรมและเห็ดนางฟ้าภูฏานที่มีอายุ 3 วัน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด

สำหรับระดับความเข้มข้น mannitol ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ พบว่า ความเข้มข้น mannitol ที่ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด คือ 0.6 โมลาร์ โดยในเห็ดนางรมฮังการีให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.74x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และในเห็ดถั่งเช่าสีทองให้จำนวนโปรโตพลาสต์ $1.58x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Table 3) ทั้งนี้การย่อยโปรโตพลาสต์ให้ออกมาอยู่ในสารละลายอาหารนั้น เซลล์จะบอบบางและแตกได้ง่ายเนื่องจากไม่มีผนังเซลล์ปกป้อง ดังนั้นในสารละลายจึงจำเป็นต้องมีสารที่ทำหน้าที่เป็น osmotic stabilizer ที่ทำให้เกิดสมดุลระหว่างแรงดันภายในและภายนอกเซลล์ เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ดูดน้ำเข้าไปมากจนเซลล์แตก หรือสูญเสียน้ำมากจนเกิดการเหี่ยวแฟบจนเซลล์เสียสภาพ สารที่นิยมใช้มากที่สุดในการควบคุมสภาวะออสโมติกในการใช้แยกโปรโตพลาสต์คือ mannitol ซึ่งเป็นสารในกลุ่มน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ช้า ความเข้มข้นของ mannitol ที่นิยมใช้อยู่ในช่วงประมาณ 0.23-0.90 โมลาร์ (คำนูณ, 2545) ซึ่งจากการทดลองนี้ พบว่า mannitol ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดทั้งสองชนิด เนื่องจากให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด และโปรโตพลาสต์ที่ได้มีลักษณะสมบูรณ์ (Figure 1) ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับงานทดลองของ Zhao and Chang (1993) ที่รายงานว่าในการแยกโปรโตพลาสต์ เห็ดหอม เห็ดนางรม และเห็ดนางฟ้า การใช้ mannitol ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ส่งผลให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด

สำหรับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยนั้น พบว่า การปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรมฮังการีใช้เวลานานกว่าในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ระยะเวลาการย่อยที่เหมาะสมสำหรับเห็ดนางรมฮังการีคือ 5 ชั่วโมง และในเห็ดถั่งเช่าสีทองคือ 3 ชั่วโมง โดยให้จำนวนโปรโตพลาสต์เท่ากับ $1.86x10^6$ และ $1.66x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 3)

ทั้งนี้ เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการย่อยผนังเซลล์นั้นอาจแสดงการเป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ ดังนั้นเมื่อเซลล์แช่อยู่ในสารละลายเอนไซม์เป็นเวลานานเกินไปจึงมีผลทำให้โปรโตพลาสต์ตาย (สกุลรัตน์, 2553) จากการทดลองของ Eyini *et al.* (2006) ที่ทดลองในเห็ดนางรมและเห็ดนางฟ้าภูฏาน พบว่า ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดโดยให้จำนวนโปรโตพลาสต์ของเห็ดทั้งสองชนิดอยู่ในช่วง $5.40\text{-}5.8x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และพบว่าเมื่อระยะเวลาการย่อยมากขึ้นส่งผลให้มีจำนวนโปรโตพลาสต์ลดลง โดยทั่วไประยะเวลาในการย่อยผนังเซลล์ของเส้นใยเห็ดจะอยู่ในช่วงประมาณ 2-3 ชั่วโมง แต่ในเห็ดบางชนิดมีรายงานว่าใช้ระยะเวลาในการย่อยมากกว่า 3 ชั่วโมง เช่น *Lentinus lepideuse* มีระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสมคือ 6 ชั่วโมง (Kim *et al*., 2000) อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการย่อยจะแตกต่างกันตามชนิดของเห็ด อายุเส้นใย ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ด้วย

Table 1 The effects of mycelium age, concentration of mannitol and digestion duration on number of isolated protoplasts of *Pleurotus ostreatus*. The emzyme solution consisted of 1.0 % Cellulase Onozuka R-10 and 1.0 % Driselase.

Mycelium age (days)	Concentration of mannitol (M)	Protoplasts yield (x10^6 cells/ml) of each digestion duration[1/]			
		3 hr	4 hr	5 hr	6 hr
3	0.6	1.20±0.00f-h	0.63±0.10h-l	0.93±0.04k-l	0.63±0.04h-l
	0.7	0.58±0.04h-l	0.33±0.04l	0.60±0.07h-l	0.45±0.00j-l
	0.8	0.80±0.35g-l	0.40±0.00kl	0.63±0.04h-l	1.18±0.10f-i
4	0.6	2.13±0.24cd	0.75±0.28g-l	5.00±0.35a	5.13±0.38a
	0.7	1.08±0.10f-k	2.45±0.63c	3.15±0.63b	1.10±0.07f-k
	0.8	0.85±0.49g-l	1.78±0.24de	0.88±0.17g-l	1.03±0.17g-l
5	0.6	0.73±0.17g-l	0.53±0.10i-l	2.48±0.31c	0.75±0.14g-l
	0.7	1.13±0.10f-j	0.40±0.14kl	1.90±0.21de	1.78±0.10de
	0.8	1.50±0.07ef	1.23±0.31fg	1.20±0.14f-h	1.50±0.00ef
F-test (AxBxC)		**			
CV (%)		83.38			

** significant difference ($P \leq 0.01$); A = mycelium age, B = concentration of mannitol, C = digestion duration

[1/] Means followed by different letters represent a significant difference according to DMRT.

Table 2 The effects of mycelium age, concentration of mannitol and digestion duration on number of isolated protoplasts of *Cordyceps militaris*. The emzyme solution consisted of 1.0 % Cellulase Onozuka R-10 and 1.0 % Driselase.

Mycelium age (days)	Concentration of mannitol (M)	Protoplasts yield (x10^6 cells/ml) of each digestion duration[1/]			
		3 hr	4 hr	5 hr	6 hr
3	0.6	2.60±0.00bc	0.33±0.04l-n	0.28±0.04mn	0.88±0.17i-m
	0.7	1.20±0.00f-i	2.13±0.45cd	0.45±0.07j-n	0.38±0.10k-n
	0.8	0.73±0.24i-n	0.30±0.07l-n	0.98±0.45h-l	0.30±0.00l-n
4	0.6	1.85±0.28de	1.80±0.21def	0.70±0.21i-n	3.65±0.63a
	0.7	1.03±0.10g-k	2.83±0.38b	0.83±0.04i-m	0.80±0.35i-m
	0.8	0.58±0.24i-n	0.98±0.31h-l	1.23±0.31e-i	0.45±0.00j-n
5	0.6	3.80±0.35a	0.05±0.00n	2.68±0.53bc	0.33±0.04l-n
	0.7	1.55±0.35d-h	0.28±0.17mn	1.13±0.17g-j	0.38±0.04k-n
	0.8	1.65±0.56d-g	0.73±0.38i-n	0.93±0.31h-m	0.83±0.17i-m
F-test (AxBxC)		**			
CV (%)		84.06			

** significant difference ($P \leq 0.01$); A = mycelium age, B = concentration of mannitol, C = digestion duration

[1/] Means followed by different letters represent a significant difference according to DMRT.

Table 3 The effects of certain factors on number of isolated protoplast (x10^6 cells/mL) of *Pleurotus ostreatus* and *Cordyceps militaris*. The emzyme solution consisted of 1.0 % Cellulase Onozuka R-10 and 1.0 % Driselase.

Factors	Protoplasts yield (x10^6 cells/mL)[1/]	
	Pleurotus ostreatus	*Cordyceps militaris*
Mycelium age (days)		
3	0.69±0.28c	0.88±0.76c
4	2.11±1.55a	1.39±0.98a
5	1.26±0.61b	1.19±1.10b
F-test	**	**
Concentration of mannitol (M)		
0.60	1.74±1.64a	1.58±1.33a
0.70	1.24±0.90b	1.07±0.77a
0.80	1.08±0.42c	0.80±0.44b
F-test	**	**
Incubation time (hours)		
3	1.11±0.48c	1.66±1.00a
4	0.94±0.74d	1.04±0.97b
5	1.86±1.44a	1.02±0.70b
6	1.50±1.38b	0.89±1.04b
F-test	**	**
CV (%)	83.38	84.06

** significant difference ($P \leq 0.01$)

[1/] Means followed by different letters within a column of each factor represent a significant difference according to DMRT.

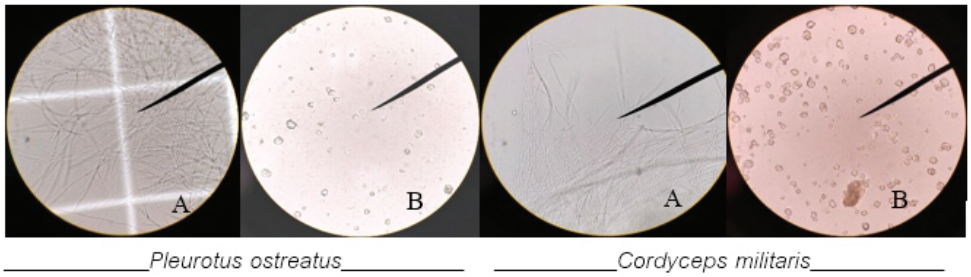

Figure 1 Mycelium (A) and protoplast (B) characteristics of *Pleurotus ostreatus* and *Cordyceps militaris* observed with binocular microscope using 40x objective lens.

การศึกษาสูตรของสารละลายเอนไซม์ผสมและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยผนังเซลล์

ในการศึกษาสูตรของสารละลายเอนไซม์ผสมและอุณหภูมิระหว่างการย่อยผนังเซลล์ ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรมฮังการีและเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยอ้างอิงอายุเส้นใย ความเข้มข้นของ mannitol และระยะเวลาในการย่อยที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองแรกผลการทดลองพบว่าสูตรของสารละลายเอนไซม์ผสมและอุณหภูมิระหว่างการย่อยผนังเซลล์มีผลต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในเห็ดนางรมฮังการี พบว่าการใช้ส่วนผสมของเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase 1.0 เปอร์เซ็นต์ lysing enzyme 1.5 เปอร์เซ็นต์ macerozyme 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ driselase 1.5 เปอร์เซ็นต์ ย่อยเส้นใยเห็ดอายุ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ 6.25 x10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Table 4) สำหรับเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่าการใช้ส่วนผสมของเอนไซม์เช่นเดียวกัน แต่ย่อยเส้นใยเห็ดอายุ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ 6.0 x10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Table 5)

ในปี 2006 Eyini *et al*. รายงานว่าการใช้เอนไซม์ 3 ชนิดผสมกัน คือ cellulase chitinase และ pectinase สามารถแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรมและนางฟ้าภูฏาน ได้ดีกว่าการใช้เอนไซม์ชนิดเดียว ซึ่งอาจเป็นเพราะเห็ดมีสารในกลุ่ม polysaccharide เป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ ซึ่งชนิดของ polysaccharide ที่พบนั้นแตกต่างกันตามชนิดของเห็ด และที่พบส่วนใหญ่มีหลายชนิด เช่น β-D glucan chitin mannan และ cellulose เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดในการย่อยผนังเซลล์ เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ต่างกัน เช่น cellulase ย่อยสลายเซลลูโลส ส่วน driselase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตในผนังเซลล์ macerozyme ทำหน้าที่ย่อย pectin (สมปอง, 2536) ดังนั้นในการแยกโปรโตพลาสต์จึงมักใช้เอนไซม์หลายชนิดรวมกัน เช่น รายงานของ Lalithakumari (1996) ที่รายงานว่าการใช้ส่วนผสมของเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase chitinase pectinase และ β-glucuronidase สามารถแยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา *Venturia inaequalis* ได้ดี และ Ramamoorthy *et al*., (2015) พบว่า การใช้ driselase 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ lysing enzyme 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ของ *Fusarium verticillioides* มากที่สุด และในปี 2018 Ren *et al*. รายงานว่าการใช้เอนไซม์ cellulase ร่วมกับ driselase และ glusulase ทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์ของ *Geomyces* sp. มากกว่าการใช้เอนไซม์ชนิดเดียว

สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้น พบว่าการย่อยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ยมากกว่าที่ 25±2 องศาเซลเซียส แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งในเห็ดนางรมฮังการีและเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยพบว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้จำนวนโปรโตพลาสต์เฉลี่ย 3.60x10^5 และ 3.8x10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 4 และ 5) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Feng *et al*. (2012) ที่พบว่า อุณหภูมิในช่วง 28-35 องศาเซลเซียส สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของ *Rhizoctonia solani* ได้ไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าจำนวนโปรโตพลาสต์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่สูงเกินกว่าจุดที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ จึงทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยลดลง

Table 4 The effects of lytic enzymes mixture and digestion temperature on the protoplast yield (x10^5 cells/mL) of *Pleurotus ostreatus*. The mycelium age of 4 days, mannitol concentration of 0.6 M and digestion time of 6 hours were applied.

Enzymes mixture	Temperature (°C)		Mean[1/]
	25±2	30	
1.0% cellulase +1.5% driselase +1.5% lysing enzyme+1.0% macerozyme	6.25±2.78	3.63±2.35	4.90±2.77a
1.0% cellulase +1.0% driselase	2.50±1.08	2.87±1.25	2.60±1.09b
0.8% cellulase +1.0% driselase	1.75±0.86	3.37±1.08	2.50±1.26b
0.8% cellulase +1.0% driselase +1.0% lysing enzyme+1.0% macerozyme	3.37±1.08	3.33±1.55	3.30±1.25a
1.0% driselase + 1.0% lysing enzyme	1.62±0.25	5.0±1.22	3.30±1.98a
Mean	3.10±2.18	3.60±158	
F-test (enzyme)		*	
F-test (temperature)		ns	
F-test (enzyme* temperature)		**	
CV (%)		56	

ns = non-significant difference; * and ** = significant difference at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$ respectively
[1/] Means followed by different letters within a column represent a significant difference according to DMRT.

Table 5 The effects of lytic enzyme mixture and digestion temperature on the protoplast yield (x10^5 cells/mL) of *Cordyceps militaris*. The mycelium age of 5 days, mannitol concentration of 0.6 M and digestion time of 3 hours were applied.

Enzymes mixture	Temperature (°C)		Mean[1/]
	25±2	30	
1.0% cellulase +1.5% driselase +1.5% lysing enzyme+1.0% macerozyme	4.75±1.71	6.00±1.35	5.37±1.57a
1.0% cellulase +1.0% driselase	3.37±2.09	2.25±0.86	2.80±1.60b
0.8% cellulase +1.0% driselase	5.38±1.31	3.63±1.79	4.50±1.73a
0.8% cellulase +1.0% driselase +1.0% lysing enzyme+1.0% macerozyme	2.05±0.91	3.50 ±1.22	3.00±1.13b
1.0% driselase + 1.0% lysing enzyme	1.50 ±0.71	4.00±0.91	2.70±1.53b
Mean	3.50±1.93	3.80±1.68	
F-test (enzyme)		**	
F-test (temperature)		ns	
F-test (enzyme* temperature)		*	
CV (%)		48	

ns = non-significant difference; * and ** = significant difference at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$ respectively
[1/] Means followed by different letters within a column represent a significant difference according to DMRT.

สรุป

สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ของเห็ดนางรมฮังการี คือ ใช้เส้นใยอายุ 4 วัน ย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีส่วนผสมประกอบด้วย Cellulase Onozuka R-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ driselase 1.5 เปอร์เซ็นต์ lysing enzyme 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ Macerozyme R-10 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน mannitol 0.6 โมลาร์ โดยใช้ระยะเวลาการย่อย 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ $6.25x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับเห็ดถั่งเช่าสีทอง เอนไซม์ที่เหมาะสมคือส่วนผสมเดียวกัน แต่ใช้เส้นใยอายุ 5 วัน ย่อยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ $6.0x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเกษตรและเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (AG-BIO/MHESI)

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2545. เทคโนโลยีโปรโตพลาสต์ของพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

ธัญญา ทะพิงค์แก, มงคล ยะไชย และ วรรณพร ทะพิงค์แก. 2561. ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อผลผลิต และปริมาณสารคอร์ดิซิปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 49: 172-174.

สกุลรัตน์ สุวรรณโณ. 2553. การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 65 หน้า.

สมปอง เตชะโต. 2536. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 201 หน้า.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ 611 หน้า.

Aswini, L., N. Arunagirinathan and M. Kavitha. 2014. Strain improvement of *Pleurotus* species by protoplast fusion. International Journal of Advancements in Research & Technology 3: 32-38.

Chang, S.T. and P.G. Miles. 2004. Mushrooms-Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact. 2nd Edition. CRC Press. Boca Raton. 480 p.

Das, S.K., M. Masuda, A. Sakurai and M. Sakukabara. 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. Fitoterapia 81: 961-968.

Davey, M.R., P. Anthony, J.B. Power and K.C. Lowe. 2005. Plant protoplast: status and biotechnological perspectives. Biotechnology Advances 23: 131-171.

Djajanegara, I. and A. Masduki. 2010. Protoplast fusion between white and brown oyster mushrooms. The Indonesian Journal of Agricultural Science 11:16-23.

Eyini, M., K. Rajkumar and P. Balaji 2006. Isolation, regeneration and PEG-induced fusion of protoplasts of *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus florida*. Mycobiology 34: 73-78.

Feng, H., Z. Sun, H. Li, P. Qin, C. Tang, R. Fu, Y. Liu, P. Li and A. Zheng. 2012. Preparation, purification and regeneration optimizing research of protoplasts from *Rhizoctonia solani.* African Journal of Microbiology Research 6: 3222-3230.

Fox, H.M. 1991. Genetic studies on the edible mushrooms *Lentinula edodes* and *Pleurotus* species. Ph.D. Thesis. University of Nottingham. Nottingham. 217 p.

Kim, B. K., J. H. Kang, M. Jin, H. N. Kim, M. J. Shim and E. C. Choi. 2000. Mycelial protoplast isolation and regeneration in *Lentinus lepideus*. Life Sciences 66: 1359-1367.

Lalithakumari, D. 1996. Protoplasts - A biotechnological tool for plant pathological studies. Indian Phytopathology 49: 199-212.

Ramamoorthy, V., L. Govindaraj, M. Dhanasekaran, S. Vetrivel, K.K. Kumar and E. Ebenezar. 2015. Combination of driselase and lysing enzyme in one molar potassium chloride is effective for the production of protoplasts from germinated conidia of *Fusarium verticillioides*. Journal of Microbiological Methods 111: 127-134.

Regula, J. and M. Siwulski. 2007. Dried Shitake (*Lentinulla edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms as a good source of nutrient. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria 6: 135-142.

Ren, N., J. Liu, D. Yanga, X. Liu, J. Zhou and Y. Peng. 2018. Preparation and regeneration of protoplasts from the ethylvincamine producing fungus CH1 (*Geomyces* sp.). Natural Product Communications 13: 145-148.

Winkler, D. 2008. Yartsa Gunbu (*Cordyceps sinensis*) and the fungal commodification of Tibet's rural economy. Economic Botany 62: 291-305.

Zhao, J. and S. T. Chang. 1993. Monokaryotization by protoplasting heterothallic species of edible mushrooms. World Journal Microbiology Biotechnology 9: 538-543.