

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. อุปกรณ์

เห็ดนางรมชนิดฟลอริดา และเห็ดลูกผสมต่าง ๆ คือ สายพันธุ์ KD1, KD3, ซึ่งได้จากมหาวิทยาลัยกินกิ (Kinki University) ประเทศญี่ปุ่น และสายพันธุ์ KDCM2, KDCM3, KDCM4 ซึ่งได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์จากญี่ปุ่น กับสายพันธุ์ที่ได้จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. เครื่องมือและวิธีการที่ใช้ในการวิจัย

2.1. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) การนึ่งฆ่าเชื้อสำหรับอาหารวุ้นจะนึ่งที่ความดัน 12 - 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว นาน 30 นาที ส่วนการนึ่งเมล็ดข้าวฟ่าง จะใช้ความดัน 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว นาน 45 นาที

2.2. หม้อนึ่งแบบลูกทุ่ง ใช้สำหรับนึ่งถุงเชื้อเดี่ยว อุณหภูมิประมาณ 95 - 98°C นาน 3 ชั่วโมง

2.3. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar airflow) และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเขี่ยเชื้อ คือ เข็มเขี่ยเชื้อแบบจิกเนื้อเยื่อ, เข็มเขี่ยแบบห่วง, ตะเกียงแอลกอฮอล์, เอทิลแอลกอฮอล์ และเมทิลแอลกอฮอล์

2.4. อาหารวุ้นพีดีเอ (Potato Dextrose Agar, PDA) มีส่วนประกอบดังนี้

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้นทำขนม	13	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	ซีซี

2.5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสปอร์ และการแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation)

2.5.1 จานเพาะเลี้ยง (petri dish)

2.5.2 กระจกยีสี่เข็มตัดให้พอดีกับจานเพาะเลี้ยง, กระจกยีสี่เข็มตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 ซม

2.5.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเขี่ยเชื้อ

2.5.4 เข็ม

2.5.5 น้ำกลั่น

2.5.6 อาหารวุ้นพีดีเอ

2.5.7 กล้องจุลทรรศน์

2.5.8 ลีข้อม, สไลด์ และ cover slip

โดยจะมีวิธีการเพาะเลี้ยงสปอร์ และการแยกสปอร์เดี่ยว ดังนี้

— นำกระดาษชิ้นเล็ก ๆ วางลงในจานเพาะเลี้ยงให้กระจาย ปิดฝาจาน ห่อด้วยกระดาษให้เรียบร้อย นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30-35 นาที แล้วปล่อยให้เย็นตัวลง

— นำเห็ดคนางรมชนิดฟลอริดา (หรือเห็ดลูกผสม KDCM4) มาทำความสะอาด โดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ที่บริเวณหมวกดอกและก้านดอก แล้วนำดอกเห็ดวางลงในจานเพาะเลี้ยง ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำดอกเห็ดออก นำจานเพาะเลี้ยงเข้าไปในตู้เขี่ยเชื้อ

— นำชิ้นกระดาษที่มีสปอร์ของเห็ด มาผสมกับน้ำกลั่น 10 ซีซี ในหลอดทดลองประมาณ 10 ชิ้น จะได้สารละลายสปอร์ (spore emulsion) ลดความหนาแน่นของสปอร์ลง โดยการเติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 5 หลอด ๆ ละ 9 ซีซี นำสารละลายสปอร์ 1 ซีซีจากหลอดที่ 1 มาใส่ในหลอดที่ 2 เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำแบบเดิมในหลอดน้ำกลั่นที่ 3, 4 และ 5 ถัดกันมา ตามลำดับจำนวนสปอร์ของเห็ดจะลดน้อยลงทุกที จนหลอดที่ 5 จะมีสปอร์เหลืออยู่น้อยที่สุด

— ใช้เข็มเขี่ยแบบห่วง แตะสารละลายสปอร์จากหลอดที่ 5 มาลากเป็นเส้นแบบจิกแซกบนผิววุ้นเอียง สปอร์เห็ดจะเจือจางลงเรื่อย ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 4-6 วัน สปอร์จะเริ่มงอก

— ใช้เข็มเขี่ยแบบจิกเนื้อเยื่อตัดอาหารวุ้นที่มีเส้นใยสปอร์ที่เพิ่งงอก ออกมาใส่ในหลอดอาหารวุ้นใหม่ ตัดจุดเส้นใยมาเลี้ยงในอาหารใหม่ให้ได้มากที่สุด ทิ้งไว้ 4-6 วัน เส้นใยจะเจริญเติบโตมากขึ้นจนสามารถเห็นเส้นใยได้อย่างชัดเจน

— ตรวจสอบเป็นสปอร์เดี่ยวของเส้นใย โดยการนำเส้นใยของเห็ดที่ต้องการตรวจ มาข้อมสิแล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าเป็นสปอร์เดี่ยวจะไม่พบข้อขีดระหว่างเซลล์ เมื่อตรวจสอบจนแน่ใจแล้วว่าเป็นสปอร์เดี่ยวให้เลี้ยงเส้นใยต่อไปจนกระทั่งเห็นเต็มผิวอาหารวุ้น

2.6. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการที่ใช้ในการผสมพันธุ์เห็ด

2.6.1 อุปกรณ์ที่ใช้ ได้แก่ หลอดอาหารวุ้นเอียง, อุปกรณ์ที่ใช้ในการเขี่ยเชื้อ, ลีซ้อม สไลด์ cover slip และกล้องจุลทรรศน์

2.6.2 วิธีการ คือ นำเส้นใยของเห็ดทั้ง 2 ชนิด ที่ต้องการให้มีการผสมพันธุ์กัน มาวางไว้คนละด้าน ของหลอดอาหารวุ้นเอียง โดยที่เส้นใยที่จะนำมาทำการผสมพันธุ์นั้น อาจเป็นเส้นใยที่เกิดจากสปอร์เดี่ยวทั้งคู่ (mono - mono crossing) หรืออาจเป็นเส้นใยที่เกิดจากสปอร์เดี่ยวกับเส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ (di - mon crossing) เมื่อวางเส้นใยทั้ง 2 ชนิดลงคนละด้านแล้ว ทิ้งไว้ 4 - 6 วัน เส้นใยจะเจริญมาชนกันเกิดเป็นขอบหนาขึ้น ตัดเอาบริเวณที่เป็นจุดต่อ มาข้อมสิ และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบว่ามีโครงสร้างข้อขีดระหว่างเซลล์ แสดงว่า เส้นใยของเห็ด

ทั้ง 2 ชนิดนั้น สามารถผสมเข้ากันได้ เมื่อพบว่าสามารถผสมเข้ากันได้ ก็ตัดเส้นใยบริเวณที่ชนกัน ไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ ปล่อยให้มีการเจริญต่อไปจนเต็มหลอด

2.7. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการที่ใช้ในการเพาะเห็ดลงถุงจี๋เลี้ยง

2.7.1 สูตรอาหาร ประกอบด้วย

จี๋เลี้ยงไม้อย่างพารา	50	กก
จี๋เลี้ยงไม้ฉำฉา	50	กก
รำละเอียด	10	กก
ปูนขาว	1	กก
แมกนีเซียมซัลเฟต	200	กรัม

2.7.2 ถุงพลาสติกทึบร้อน ขนาด 6 1/2 x 12 นิ้ว

2.7.3 คอกขวกพลาสติก

2.7.4 กระดาษตัดเป็นสี่เหลี่ยม ขนาด 4 x 4 นิ้ว

2.7.5 เครื่องอัดไล่อากาศ (เครื่องอัดถุง)

2.7.6 หม้อนึ่งแบบลูกทุ่ง

2.7.7 เมล็ดข้าวฟ่าง

2.7.8 โรงเพาะเห็ด

วิธีการเพาะเห็ดลงถุงจี๋เลี้ยง ทำได้ดังนี้

การเตรียมหัวเชื้อด้วยเมล็ดข้าวฟ่าง

ล้างเมล็ดข้าวฟ่างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้งจนสะอาด กัดเมล็ดที่ลอยทิ้ง แขน้ำทิ้งไว้ 1 คืนเพื่อให้เมล็ดน่ม จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างไปต้มจนสุกแต่ไม่ละ เมื่อสุกนำมาผสมกับจี๋เลี้ยงเล็กน้อยเพื่อให้เมล็ดไม่ติดกัน นำไปบรรจุในขวดกลมขนาด 250 ซีซี ประมาณ 2 ใน 3 ของขวด ปิดจุกสำลี หุ้มด้วยกระดาษอีกชั้น นำไปนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 45 นาที ปล่อยให้เย็นลง นำขึ้นรูนที่มีเส้นใยที่เกิดจากการผสมมาใส่ในขวดเมล็ดข้าวฟ่างทิ้งไว้ 7-10 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มขวดพร้อมที่จะนำไปถ่ายเชื้อลงถุงจี๋เลี้ยง

การเตรียมวัสดุเพาะ

ผสมส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดให้เข้ากัน เติมน้ำลงไป ให้มีความชื้นประมาณ 70% คลุกเคล้าให้เข้ากัน บรรจุในถุงพลาสติกให้แต่ละถุงหนักประมาณ 850 กรัม นำไปอัดไล่อากาศออกด้วยเครื่องอัดถุง สวมคอกขวกพลาสติก รัศยก หุ้มด้วยกระดาษอีกชั้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแบบลูกทุ่ง นาน 3-4 ชม เมื่อถุงเย็นลง ถ่ายเชื้อจากเมล็ดข้าวฟ่างลงไป พักถุงในห้องสำหรับบ่มเชื้อ ประมาณ 25-30 วัน เชื้อจะเจริญเต็มถุง นำถุงไปเปิดในโรงเรือนเพาะเห็ด

3. การบันทึกข้อมูล

3.1 การบันทึกผลผลิต เป็นน้ำหนักสด หน่วยเป็นกรัม โดยจะเก็บดอกเห็ด และชั่งน้ำหนักแยกแต่ละถุง ทุก ๆ วัน

3.2 การบันทึกระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด หน่วยเป็น วัน โดยจะเริ่มนับตั้งแต่วันถ่ายเชื้อ จนกระทั่งเชื้อเห็ดเดินเต็มถุง และให้ดอกเห็ดดอกแรก

3.3 การบันทึกลักษณะภายนอกของเห็ด ลักษณะที่ต้องการเก็บข้อมูล ได้แก่ สีของดอกเห็ด, พอร์มดอก, เส้นผ่าศูนย์กลางของหมวกดอกเห็ด เป็นเซนติเมตร, ความหนา บางของดอกเห็ด และความเปราะของหมวกดอก

3.4 การบันทึกการเจริญเติบโตของเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยว หน่วยเป็นเซนติเมตร โดยจะวัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเฉลี่ย 4 จุด ทั้งในแนวตั้ง และแนวนอน แบ่งการเจริญเติบโตออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการเจริญช้ามาก, เจริญช้า, เจริญเร็ว และเจริญเร็วมาก โดยใช้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าเฉลี่ยของรัศมีการเจริญของเส้นใย

3.5 บันทึกช่วงเวลาในการให้ผลผลิต มีหน่วยเป็น วัน โดยจะนับตั้งแต่วันที่เริ่มเก็บดอกเห็ดวันแรกจนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรม statistix version 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption analysis of variance ANOVA, CV. และ LSD

4. สถานที่ทำการวิจัย

โรงปฏิบัติการเห็ด ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ระหว่างเดือน เมษายน 2539 ถึงเดือน กรกฎาคม 2540

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมชนิดฟลอริดาและเห็ดลูกผสม KDCM4

1. อุปกรณ์

1.1 เห็ดนางรมชนิดฟลอริดา และเห็ดลูกผสม KDCM4

1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเขี่ยเชื้อ

1.2.2 อาหารรุ้น พีดีเอ

1.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสปอร์ และการแยกสปอร์เดี่ยว

1.2.4 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเห็ดลงถุงขี้เลื่อย

2. วิธีการทดลอง

2.1 เพาะเลี้ยงสปอร์ และการแยกสปอร์เดี่ยว ของเห็ดคนางรมชนิดฟลอริดาและเห็ดลูกผสม KDCM4 จากนั้นแบ่งการเจริญเติบโตออกเป็น 4 กลุ่ม โดยคัดเลือกออกมา กลุ่มละ 4 สายพันธุ์

2.2 นำสปอร์เดี่ยวของเห็ดทั้ง 2 ชนิด มาผสมกันจะได้กลุ่มผสมทั้งหมดจำนวน 256 คู่ผสม ตัดส่วนที่สามารถผสมกันได้มาเลี้ยงในหลอดอาหารรุ่นใหม่ ปล่อยให้มีการเจริญเติบโตต่อไปจนเต็มหลอด แล้วนำไปต่อเชื้อลงเมล็ดข้าวฟ่าง เพื่อเพาะลงถุงให้เกิดดอกเห็ดต่อไป

3. การวางแผนการทดลอง

เนื่องจากเป็นการทดลองเบื้องต้น จึงไม่มีการวางแผนการทดลอง มีลูกผสมทั้งหมด 233 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์ มี 3 ถุง

4. วิธีการศึกษา

ดำเนินการทดลอง ระหว่างเดือน เมษายน 2539 ถึง มิถุนายน 2539 โดยจะทำการบันทึกข้อมูลดังนี้

4.1 บันทึกลักษณะภายนอกของเห็ดลูกผสม

4.2 บันทึกระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด

จากข้อมูลที่ได้จะคัดลูกผสมออกมา 12 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการทดลองที่ 2 ต่อไป

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบผลผลิตในสองฤดูกาลของเห็ดลูกผสมของเห็ดคนางรมชนิดฟลอริดาและเห็ดลูกผสม KDCM4

1. อุปกรณ์

1.1 เห็ดลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดคนางรมชนิดฟลอริดาและเห็ดลูกผสม KDCM4 จำนวน 12 สายพันธุ์ จากทดลองที่ 1

1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1.2.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเห็ดลงถุงขี้เถ้า

1.2.2 เครื่องเทอร์โมไฮโกรกราฟ (Thermohygrograph)

1.2.3 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)

2. วิธีการทดลอง

เพาะเห็ดลูกผสมจำนวน 12 สายพันธุ์ ลงในถุงขี้เถ้า โดยทำการเพาะเห็ดลูกผสม 2 ครั้ง คือ ช่วงเดือนกรกฎาคม และช่วงเดือนพฤศจิกายน โดยจะปฏิบัติเหมือนกันทั้ง 2 ครั้ง

3. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มบล็อครวม (Factorial in Randomized Complete Block Design) มี 12 x 2 กรรมวิธี มีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 2 ปัจจัยคือ ปัจจัยที่ 1 ลูกผสมทั้ง 12 สายพันธุ์

คือสายพันธุ์ที่ 1 ถึง 12 ปีจับที่ 2 ฤดูกาลที่ทำการทดลอง คือฤดูฝน (ช่วงเดือนกรกฎาคม) และฤดูหนาว (ช่วงเดือนพฤศจิกายน) มี 6 ซ้ำ 1 หน่วยการทดลองมี 5 ถูง

4. วิธีการศึกษา

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน กรกฎาคม 2539 ถึง กันยายน 2539 และระหว่างเดือน ตุลาคม 2539 ถึง ธันวาคม 2539 โดยจะทำการบันทึกข้อมูลดังนี้

4.1 บันทึกผลผลิตเป็นน้ำหนักสด หน่วยเป็นกรัม

4.2 บันทึกระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด

นำข้อมูลผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อหาสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุด และสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตรองลงมาอีก 5 สายพันธุ์ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองที่ 3 ต่อไป

การทดลองที่ 3 การศึกษาการผสมกลับ (backcross) แบบ di - mon crossing ระหว่างเครือญาติของเห็ดนางรมชนิดฟลอริดาที่คัดไว้

1. อุปกรณ์

1.1 เห็ดลูกผสมที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 2 จำนวน 6 สายพันธุ์, เห็ดลูกผสม KD1, KD3 และสายพันธุ์ KDCM2, KDCM3, KDCM4

1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสปอร์ และการแยกสปอร์เดี่ยว

1.2.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเห็ดลงถุงขี้เลื่อย

2. วิธีการทดลอง

นำดอกเห็ดสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุดในการทดลองที่ 2 มาดักสปอร์แล้วแยกให้ได้อสปอร์เดี่ยว นำไปวัดการเจริญเติบโตในขวดอาหารวุ้นแบบ แบ่งการเจริญเติบโตออกเป็น 4 กลุ่ม คัดเลือกตัวแทนกลุ่มละ 5 สายพันธุ์มาผสมพันธุ์กับลูกผสม 11 สายพันธุ์ คือ KD1, KD3, KDCM2, KDCM3, KDCM4 และลูกผสมอีก 6 ตัวจากการทดลองที่ 2 ซึ่งทั้ง 11 สายพันธุ์นั้นจะเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ นำลูกผสมที่สามารถผสมได้ มาเพาะลงถุงขี้เลื่อย เพื่อให้เกิดดอกเห็ดต่อไป

3. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design) มี 220 กรรมวิธีแต่ละกรรมวิธีคือลูกผสมที่ได้จากแต่ละกลุ่มผสม มี 3 ซ้ำ 1 หน่วยการทดลองมี 1 ถูง

4. วิธีการศึกษา

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน มกราคม 2540 ถึง เมษายน 2540 โดยทำการบันทึกข้อมูลดังนี้

4.1 บันทึกผลผลิตเป็นน้ำหนักสด หน่วยเป็นกรัม

4.2 บันทึกลักษณะภายนอกของลูกผสม

4.3 บันทึกการเจริญเติบโตของเส้นใยชั้นที่ 1 หน่วยเป็นเซนติเมตร ของเห็ดลูกผสมที่ให้ผลผลิตสูงสุดในการทดลองที่ 2

นำข้อมูลผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อใช้ประกอบในการคัดเลือกลูกผสมจำนวน 9 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการทดลองที่ 4 ต่อไป

การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสายพันธุ์ลูกผสมที่คัดเลือกได้กับเห็ดนางรมชนิดฟลอริดา

1. อุปกรณ์

1.1 เห็ดลูกผสมจำนวน 9 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 และเห็ดนางรมชนิดฟลอริดา

1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1.2.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเห็ดลงถุงขี้เลื่อย

1.2.2 เทอร์โมไฮโกรกราฟ

1.2.3 เทอร์โมมิเตอร์

2. วิธีการทดลอง

เพาะเห็ดลูกผสมทั้ง 9 สายพันธุ์ และเห็ดนางรมชนิดฟลอริดา ลงในถุงขี้เลื่อย เพื่อให้เกิดดอกเห็ดต่อไป

3. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ โดยมี 10 กรรมวิธี กรรมวิธีที่ 1 ถึง 9 เป็นลูกผสมที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 กรรมวิธีที่ 10 เป็นเห็ดนางรมชนิดฟลอริดา มี 6 ซ้ำ ให้ 1 หน่วยการทดลองมี 8 ถุง

4. วิธีการศึกษา

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน พฤษภาคม 2540 ถึง กรกฎาคม 2540 โดยทำการบันทึกข้อมูลดังนี้

4.1 บันทึกผลผลิตเป็นน้ำหนักสด หน่วยเป็นกรัม

4.2 บันทึกระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเส้นใย

4.3 บันทึกช่วงเวลาในการให้ผลผลิต

นำข้อมูลผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ



ภาพที่ 4 การคัดสปอร์ของเห็ด



ภาพที่ 5 การวัดการเจริญของเส้นใย



ภาพที่ 6 การผสมพันธุ์เห็ดในหลอดทดลอง



ภาพที่ 7 เส้นใยของเห็ด 2 ชนิด ที่นำมาผสมพันธุ์กัน เจริญมาชนกัน เกิดเป็นขอบหนาขึ้น



ก



ข

ภาพที่ 8 ก. เส้นใยที่มีนิวเคลียสเดียว

ข. เส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ มีการสร้างช่องว่างระหว่างเซลล์เกิดขึ้น