บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

สำหรับเห็ดฟางที่ใช้มีสองสายพันธุ์คือพันธุ์ V1 และ V6 ซึ่งเป็นพันธุ์เห็ดฟางของกรมวิชาการเกษตร โดยพันธุ์ V1 มีลักษณะดอกใหญ่สีเทา ให้ผลผลิตดีเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำเล็กน้อย สำหรับพันธุ์ V6 จะให้ผลผลิตสูงแต่ขนาดดอกจะเล็กกว่าพันธุ์ V1 ดอกบานช้า ให้ผลผลิตดีในช่วงฤดูร้อน

การทดลองที่ 1 การเจริญของเส้นใยที่เลี้ยงในระยะเวลาต่าง ๆ กัน

ศึกษาหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยของเห็ดฟางพันธุ์มาตรฐาน V1จากกรมวิชาการเกษตรโดยใช้ระยะเวลาการเจริญต่างๆกัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ มี 4 กรรมวิธี คือ เลี้ยงเส้นใยที่ระยะเวลา 8, 14, 20 และ 26 วัน มี 6 บล็อก ซึ่งแต่ละบล็อกจะแตกต่างกันที่การเตรียมอาหารเหลว โดยเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด นำเส้นใยเห็ดมากรอง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักของเส้นใย

อุปกรณ์

1. เส้นใยเห็ดฟางพันธุ์ V1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว
2. ขวดแก้วกลม
3. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น หลอดทดลอง จานเลี้ยงเชื้อ บีกเกอร์ ฯลฯ
4. กระดาษกรอง whatman No.5
5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. ตู้อบ
7. หม้อนึ่งความดัน
8. ตู้ต่อเชื้อ
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. แอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ (Ethyl alcohol)
11. แอลกอฮอล์จุดไฟ (Methyl alcohol)
12. เข็มเขี่ย
13. มันฝรั่ง
14. น้ำตาลกลูโคสและผงวุ้น

วิธีการ

1.1 การเตรียมเส้นใยเห็ดเพื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น

1. การเตรียมอาหารวุ้น

อาหารวุ้นเตรียมได้จาก

มันฝรั่งปอกเปลือกหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยม	200 กรัม
กลูโคส	20 กรัม
ผงวุ้นทำขนม	13 กรัม
น้ำ	1 ลิตร

โดยนำมันฝรั่งมาปอกเปลือก หั่นให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ ขนาดประมาณ 1×1×1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มจนมันฝรั่งสุก กรองเอาแต่น้ำ นำไปต้มอีกครั้งหนึ่งพร้อมกับเติมกลูโคสและผงวุ้นลงไป ต้มจนกระทั่งผงวุ้นละลาย แล้วเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ประมาณจานละ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา รอจนความดันลดลงถึงศูนย์ แล้วจึงเปิดหม้อนึ่งความดัน นำจานเลี้ยงเชื้อ ออกมาข้างนอกทิ้งไว้ให้เย็น

2. การเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวุ้น

นำเส้นใยเห็ดพันธุ์ V1 ที่ได้จากกรมวิชาการเกษตร มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น โดยใช้เข็มเขี่ยลนไฟให้ร้อน ทิ้งไว้สักครู่จนเย็นจึงตัดเส้นใยเห็ดจากอาหารวุ้นเป็นชิ้นเล็กๆ วางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหารวุ้นอยู่ โดยทั้งหมดนี้ทำในสภาพปลอดเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเดินเต็มจาน ใช้เวลาประมาณ 7 วัน แล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว

1.2 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลว

ตัดเส้นใยเห็ดให้มีขนาดเท่าๆกัน โดยใช้บล็อกวงกลมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร กดลงไปบนอาหารวุ้น แล้วใช้เข็มเขี่ยเอาชิ้นส่วนนั้นไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วกลม โดยแต่ละขวดบรรจุอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร (ภาพที่ 1) ซึ่งอาหารเหลวเตรียมจาก

มันฝรั่งปอกเปลือกหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยม	200 กรัม
กลูโคส	20 กรัม
น้ำ	1 ลิตร

นำเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงในอาหารเหลวไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8, 14, 20 และ 26 วัน

1.3 การกรอง อบ และชั่งเส้นใยเห็ด

เมื่อครบกำหนดระยะเวลาในแต่ละ treatment นำเส้นใยเห็ดมากรองโดยใช้กระดาษกรอง whatman No. 5 นำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงชั่งหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ด

การบันทึกข้อมูล

น้ำหนักแห้งของเส้นใย(กรัม)

ภาพ 1 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลว

การทดลองที่2 การเจริญของเส้นใยและการให้ผลผลิตเมื่อ sub culture จำนวนครั้งต่างๆกัน

ศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดฟางเมื่อ sub culture จำนวนครั้งต่างๆกันที่จะส่งผลต่อผลผลิตของเห็ดฟาง โดยนำเส้นใยพันธุ์ V1 มาขยายพันธุ์หลายๆครั้งต่อเนื่องกัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ มี 4 กรรมวิธี คือ sub culture ครั้งที่ 0, 4, 8 และ 12 มี 6 บล็อก แต่ละบล็อกแตกต่างกันที่การเตรียมอาหารเหลว นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนด นำเส้นใยเห็ดมากรอง อบ และชั่งน้ำหนัก เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แล้วนำมาเพาะให้เกิดดอกเห็ดโดยใช้วิธีการเพาะแบบกองสูง (มีวิธีการเพาะในหน้า 16) พร้อมกับหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเส้นใยและผลผลิตของเห็ดฟางที่ sub culture ครั้งต่าง ๆ กัน

อุปกรณ์

1. เหมือนการทดลองที่ 1
2. หัวเชื้อเห็ดฟางพันธุ์ V1
3. เมล็ดข้าวฟ่าง
4. หม้อนึ่งลูกทุ่ง
5. ถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 6×9 นิ้ว
6. ขี้ฝ้าย
7. เปลือกถั่วเขียว
8. ฟางข้าว
9. เครื่องตัดฟาง
10. แป้งข้าวจ้าว
11. ผ้าพลาสติกคลุมแปลง

วิธีการ

2.1 การเตรียมเส้นใยเห็ด

1. การตัดเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดเลี้ยงบนอาหารวุ้น

นำดอกเห็ดพันธุ์ V1 มาตัดเนื้อเยื่อ โดยใช้แอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ 70% เช็ดให้ทั่วดอกเห็ด ใช้มีดผ่าตัดเบอร์ 11 แบ่งดอกเห็ดออกเป็นสองส่วนตามยาว กรีดเนื้อเยื่อดอกเห็ดที่อยู่ภายในเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วใช้เข็มเขี่ยจิกเนื้อเยื่อนั้นมาใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นอยู่ รอประมาณ 7 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มหลอด เรียกเส้นใยนี้ว่า sub culture ครั้งที่ 0 (S0)

2. การต่อเส้นใยเห็ดจากอาหารวุ้นเลี้ยงบนอาหารวุ้น

เมื่อเส้นใย S0 เจริญเต็มหลอดแล้ว ใช้เข็มเขี่ยสอดเข้าไปในหลอดอาหารวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ และใช้เข็มเขี่ยตัดอาหารวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร แล้วใช้ปลายเข็มจิกชิ้นส่วนนี้ขึ้นมาใส่ในหลอดอาหารวุ้นใหม่ รอประมาณ 7 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มหลอดเรียกเส้นใยนี้ว่า sub culture ครั้งที่ 1(S1) ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนถึง sub culture ครั้งที่ 12 (S12)

2.2 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวุ้น

นำเส้นใยเห็ดที่ผ่านการ sub culture ครั้งที่ 0, 4, 8 และ 12 มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น ซึ่งวิธีการทำเหมือนการทดลองที่ 1 ขั้นตอนที่ 1.1 เชื้อเห็ดที่ได้แต่ละจานใช้เป็น inoculum ของขั้นตอนที่ 2.3

2.3 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลว

เหมือนขั้นตอนที่ 1.2 โดยเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลวที่ระยะเวลา 20 วัน

2.4 การกรอง อบ และชั่งเส้นใยเห็ด

เหมือนขั้นตอนที่ 1.3

2.5 การเลี้ยงเชื้อเห็ดบนเมล็ดข้าวฟ่าง

1. การเตรียมเมล็ดข้าวฟ่าง

นำเมล็ดข้าวฟ่างมาทำความสะอาดโดยการล้างหลายๆ ครั้ง แช่น้ำทิ้งไว้ 12-18 ชั่วโมงเพื่อให้เมล็ดข้าวฟ่างนิ่ม และต้มสุกได้ง่าย หลังจากนั้นนำไปต้มจนสุกพอดีเมื่อใช้มือบีบจะรู้สึกว่าเมล็ดข้าวฟ่างนิ่ม นำมาเทลงบนตะแกรงพร้อมกับผสมขี้เลื่อยลงไปเล็กน้อยเพื่อไม่ให้เมล็ดข้าวฟ่างติดกันเกินไป แล้วบรรจุลงในขวดแก้วกลมประมาณครึ่งขวด นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

2. การเขี่ยเชื้อเห็ดลงในขวดเมล็ดข้าวฟ่าง

ใช้เข็มเขี่ยสอดเข้าไปในหลอดอาหารวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ และใช้เข็มเขี่ยตัดอาหารวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร แล้วใช้ปลายเข็มจิกชิ้นส่วนนี้ขึ้นมาใส่ในขวดเมล็ดข้าวฟ่าง โดยวางไว้ตรงกลางขวดเพื่อไม่ให้ชิ้นส่วนแห้งจนเกินไป นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 วันเส้นใยจะเจริญเต็มขวด

2.6 การผลิตก้อนเชื้อเห็ดฟาง

1. การเตรียมก้อนเชื้อเห็ดฟาง

นำขี้ฝ้าย 5 ส่วนโดยปริมาตร และเปลือกถั่วเขียว 1 ส่วนโดยปริมาตร มาแช่น้ำจนอิ่มตัว ผสมให้เข้ากัน ผึ่งให้แห้งพอหมาดๆ บรรจุใส่ถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 6×9 นิ้ว นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งลูกทุ่งเป็นเวลา 3 ชั่วโมงนับจากน้ำเดือด ทิ้งไว้จนเย็นจึงสามารถต่อเชื้อลงไปได้

2. การต่อเชื้อเห็ดจากข้าวฟ่างลงในก้อนเชื้อ

ทำการปฏิบัติในตู้เขี่ยเชื้อ โดยใช้ลวดแข็งๆ ที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อแล้วสอดเข้าไปในขวดเมล็ดข้าวฟ่าง ตีเมล็ดข้าวฟ่างให้ร่วน แล้วเทเชื้อเห็ดที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างลงในถุงก้อนเชื้อ โดยใส่เชื้อเห็ดจากเมล็ดข้าวฟ่างประมาณ 10 – 20 เมล็ดต่อหนึ่งถุงก้อนเชื้อ นำไปบ่มไว้ 7-10 วัน เชื้อเห็ดฟางจะเจริญเต็มถุงก้อนเชื้อ

2.7 การเพาะเห็ดฟางแบบกองสูง

1. มัดและตัดฟางให้แต่ละท่อนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-12 นิ้ว มีความยาว 40 เซนติเมตร
2. แช่ฟางทิ้งไว้ประมาณหนึ่งคืนเพื่อให้ฟางดูดซึมน้ำเข้าไปเต็มที่

3. นำฟางมาเรียงในบล็อกขนาด 40×75 เซนติเมตร แกะฟางออกจากมัด หนึ่งชั้นเรียงได้สามมัด โรยเชื้อเห็ดที่ผสมกับแป้งข้าวจ้าว(แป้งข้าวจ้าว 40 กรัมต่อเชื้อเห็ดฟาง 300 กรัม) ลงไปบริเวณขอบแปลง โดยโรยเป็นแถวบางๆ ใช้เชื้อเห็ดประมาณ 50 กรัมต่อหนึ่งชั้นฟาง

4. ทำชั้นที่สองต่อโดยนำฟางมาเรียงทับชั้นที่หนึ่ง ให้มีความหนาของชั้นเท่าเดิม แล้วโรยเชื้อเห็ดลงไปคล้ายกับชั้นแรก ทำเช่นนี้ประมาณ 5-6 ชั้น

5. รดน้ำให้ทั่วแปลงแล้วคลุมด้วยผ้าพลาสติก ทิ้งไว้ 7-10 วัน เห็ดฟางจะเริ่มออกดอก

การบันทึกข้อมูล

1. น้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัม)
2. ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยในอาหารวุ้นโดยดูว่ามีการเจริญเร็วหรือไม่
3. ความผิดปกติของเส้นใย โดยเส้นใยปกติเมื่อเลี้ยงในอาหารวุ้นประมาณ 2 อาทิตย์จะมีคลามิโดสปอร์เกิดขึ้น
4. ผลผลิตของเห็ดฟางในแต่ละ sub culture
5. ลักษณะทางด้านคุณภาพของดอกเห็ด

การทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยพันธุ์ V1 และ V6

ใช้เส้นใยพันธุ์ V1 และ V6 ซึ่งเป็นพันธุ์มาตรฐานจากกรมวิชาการเกษตร โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ มี 2 กรรมวิธี คือเส้นใยพันธุ์ V1 และ V6 มี 6 บล็อก แต่ละบล็อกแตกต่างกันที่การเตรียมอาหารเหลว นำเส้นใยทั้งสองพันธุ์เลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 วัน เมื่อครบกำหนด นำเส้นใยเห็ดมากรอง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักของเส้นใย เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยทั้ง 2 พันธุ์หลังจากนั้นนำมาเพาะให้เกิดดอกเห็ดเพื่อเปรียบเทียบผลผลิต

อุปกรณ์และวิธีการ

เหมือนการทดลองที่ 2

การบันทึกข้อมูล

1. น้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัม)
2. ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใย
3. ผลผลิตและคุณภาพของดอกเห็ด

การทดลองที่ 4 การแยกและคัดเลือกสปอร์เดี่ยวของเส้นใย

นำดอกเห็ดฟางพันธุ์ V1 และ V6 มาดักสปอร์ แล้วนำสปอร์ที่ได้ไปเจือจางและนำไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร PDA เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่เป็นโมโนคาริออน หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในขวดแบนที่มีอาหารวุ้นอยู่ วัดรัศมีของการเจริญเติบโตและแบ่งการเจริญออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่เส้นใยเจริญเร็ว เจริญปานกลาง และเจริญช้า คัดเลือกตัวแทนกลุ่มที่เส้นใยเจริญเร็ว และเจริญช้าอย่างละ 4 สายพันธุ์ ศึกษาคุณภาพของเส้นใยเพื่อนำไปใช้ในการผสมพันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์

เหมือนการทดลองที่ 1

วิธีการ

4.1 การเตรียมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Monokaryon)

1. การเก็บสปอร์

นำดอกเห็ดฟางพันธุ์ V1 และ V6 มาทำความสะอาด โดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ 70% เช็ดให้ทั่วดอกเห็ด วางดอกเห็ดลงในจานเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาด 15× 14.5 เซนติเมตร โดยมีกระดาษชิ้นเล็กๆ เป็นรูปวงกลมกระจายอยู่ในจาน ซึ่งจานเลี้ยงเชื้อและกระดาษนั้นต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้บีกเกอร์ขนาดหนึ่งลิตรครอบดอกเห็ดไว้และให้มีการระบายอากาศเล็กน้อยเพื่อไม่ให้ความชื้นมากเกินไป ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง สปอร์เห็ดจะตกลงสู่กระดาษชิ้นเล็กๆ นั้น โดยเห็ดทั้งสองพันธุ์จะปฏิบัติแยกจากกัน (ภาพที่ 2)

ภาพ 2 การดักสปอร์ของเห็ดฟาง

2. การเพาะสปอร์

ใช้เข็มเขี่ยลนไฟให้ร้อน จิ้มลงไปบนกระดาษที่มีสปอร์อยู่ ใส่กระดาษลงไปในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ใส่ 1-2 ชิ้น เขย่าให้สปอร์หลุดจากกระดาษกระจายทั่วไปในน้ำ ใช้ปลายเข็มเขี่ยเชื้อแบบห่วง หรือหลูป (loop) จุ่มลงในหลอดที่มีน้ำละลายสปอร์อยู่ น้ำละลายสปอร์จะติดที่ปลายหลูป จากนั้นนำปลายหลูปลากไปมาบนอาหารวุ้นที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง ซึ่งทั้งหมดนี้ทำในสภาพปลอดเชื้อ

3. การแยกเส้นใยที่งอกจากสปอร์มาเลี้ยง

หลังจากทิ้งไว้ประมาณ 6-7 วัน สปอร์จะเริ่มงอก นำสปอร์ที่งอกมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นอยู่ แล้วนำไปเลี้ยงในขวดแบนขนาดบรรจุ 375 มิลลิลิตร โดยจะนับถึงวันที่ 5 นับจากวันเลี้ยงเชื้อ

4. การวัดและการจำแนกการเจริญเติบโตของเส้นใย

วัดการเจริญของเส้นใยในแต่ละขวดโดยวัด 4 จุด แล้วมาหาค่าเฉลี่ยของแต่ละขวด จากนั้นจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยของการเจริญ และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยคิดคำนวณแยกเห็ดทั้งสองพันธุ์ออกจากกัน ซึ่งสามารถแบ่งการเจริญของเส้นใยออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ "1" คือเส้นใยเจริญเร็ว "2" คือเส้นใยเจริญปานกลาง และ "3" คือเส้นใยเจริญช้า

4.2 การคัดเลือกเส้นใยเพื่อใช้ในการผสมพันธุ์

คัดเลือกตัวแทนกลุ่มที่เส้นใยเจริญเร็วโดยคัดเส้นใยที่เจริญเร็วที่สุด 4 สายพันธุ์ของพันธุ์ V1 และ 4 สายพันธุ์ของพันธุ์ V6 พร้อมทั้งคัดเส้นใยที่เจริญช้าที่สุด 4 สายพันธุ์ของพันธุ์ V1 และ 4 สายพันธุ์ของพันธุ์ V6 เพื่อใช้ในการผสมพันธุ์ต่อไป

การทดลองที่ 5 ศึกษาลักษณะแถบเอนไซม์ในเส้นใยเห็ดโดยใช้เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิส

เพื่อใช้เป็นหลักในการคัดเลือกหาลักษณะดีเด่นเพื่อใช้ในการผลิตลูกผสมจากสปอร์เดี่ยวของพันธุ์ V1 และ V6

วัสดุอุปกรณ์

1. ตัวอย่างเส้นใยเห็ดฟาง 34 สายพันธุ์ ได้แก่พันธุ์ V1, V6, พันธุ์การค้า(จักรพันธุ์), สปอร์เดี่ยวของพันธุ์ V1 จำนวน 7 สายพันธุ์, สปอร์เดี่ยวของพันธุ์ V6 จำนวน 6 สายพันธุ์ และ ลูกผสม 18 สายพันธุ์
2. เครื่องชั่งอย่างละเอียด
3. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตัวอย่าง (centrifuge)

5. โกร่งบด
6. eppendrop tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. ชุดสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ slab gel
8. เครื่องจ่ายกระแสไฟ
9. เครื่องทำความเย็น (cooling unit)
10. ตู้แช่ที่อุณหภูมิ 4 และ –20 องศาเซลเซียส
11. ถุงมือ
12. เครื่องแก้วต่างๆ
13. กระดาษกรอง
14. extraction buffer
15. ส่วนประกอบของเจล
16. electrode buffer
17. สีย้อม
18. marker

วิธีการเตรียมสารเคมีในข้อ 14-18 แสดงไว้ในภาคผนวก ก

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 20 วัน มาชั่งน้ำหนัก 3 กรัม แล้วเก็บไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาบดในโกร่งพร้อมกับเติม extraction buffer 5 มิลลิลิตร นำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ดูด supernatant ที่ได้เก็บไว้ในหลอด eppendrop แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เมื่อจะทำการวิเคราะห์จึงผสม supernatant 90% กับ marker 10% เขย่าให้เข้ากัน

2. การเตรียมเจล

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ใส่ running gel ที่เตรียมไว้สูงประมาณ 12 เซนติเมตร แล้วใส่น้ำกลั่นเพื่อทำให้ผิวหน้าของเจลเรียบ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เจลเกิด polymerization แล้วใส่ stacking gel พร้อมกับ comb ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อรอให้เจลเกิด polymerization อีกครั้ง จึงนำ comb ออก แล้วล้างผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น

3. การประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเติม electrode buffer ลงใน chamber (ภาพที่ 3)

4. การหยอดตัวอย่าง

หยอดตัวอย่างลงบนเจลแต่ละช่อง ช่องละหนึ่งตัวอย่าง จำนวน 70 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย

5. การผ่านกระแสไฟฟ้า

ผ่านกระแสไฟฟ้า โดยควบคุมค่าความต่างศักย์ที่ 200 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่มี marker จะเคลื่อนที่ลงมาจนระดับของ marker อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจลประมาณ 1 นิ้ว ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง จึงหยุดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

6. การย้อมสี

นำแผ่นเจลไปกระตุ้นให้เกิดสี โดยนำไปทำปฏิกิริยากับ substrate ของเอนไซม์แต่ละชนิด

ภาพ 3 การประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

การบันทึกข้อมูล

บันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์แต่ละชนิดของสายพันธุ์เห็ดที่ได้เป็นภาพถ่ายของแถบสี และวาดภาพ zymogram ของไอโซไซม์ดังกล่าว แสดงตำแหน่ง จำนวน และขนาดของแถบสี วัดค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสี ตามสมการต่อไปนี้

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (rf)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker}}$$

การทดลองที่ 6 ลักษณะทางพันธุกรรมของลูกผสมที่ได้จากสปอร์เดี่ยว

คัดเอาโมโนคาริออน ที่ได้จากการเลี้ยงสปอร์เดี่ยวที่มีลักษณะตามต้องการแล้วจับคู่ผสมพันธุ์ นำลูกผสมทั้งหมดมาทดสอบลักษณะแถบเอนไซม์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 5

อุปกรณ์

เหมือนการทดลองที่ 4 และ 5

วิธีการ

1. การผสมพันธุ์

ผสมพันธุ์สปอร์เดี่ยวของเห็ดฟางพันธุ์ V1 ทั้ง 8 สายพันธุ์ กับพันธุ์ V6 ทั้ง 8 สายพันธุ์ ได้ลูกผสมทั้งหมด 64 คู่ โดยผสมในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นพีดีเอ วางคู่ผสมห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร (ภาพที่ 4) จากนั้นประมาณ 5-7 วัน เส้นใยทั้งสองสายพันธุ์จะประสานกัน ตัดชิ้นส่วนตรงส่วนที่ประสานกันนี้มาเลี้ยงในอาหารวุ้นใหม่ ประมาณ 7 วัน เส้นใยลูกผสมจะเจริญเต็มหลอด

ภาพ 4 การผสมพันธุ์เห็ด

2. การคัดเลือกลูกผสม

คัดเลือกลูกผสมทั้งหมด 64 คู่ผสม โดยดูจากการเกิด primodia คัดเอาเฉพาะตัวที่สามารถเกิด primodia ได้

3. การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

เหมือนการทดลองที่ 5

การทดลองที่ 7 ทดสอบผลผลิตของลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือก

คัดลูกผสมที่ได้จากการทดลองที่ 6 มาทดสอบผลผลิต พร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตกับข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการทดลองที่ 6 โดยบันทึกข้อมูลเป็นน้ำหนักสดของดอกเห็ดฟางและคุณภาพของดอกเห็ดฟาง

อุปกรณ์และวิธีการ

เหมือนการทดลองที่ 2 หัวข้อ 2.5 – 2.7

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. โรงปฏิบัติการเห็ดของภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ตั้งแต่ พฤศจิกายน 2541 – กุมภาพันธ์ 2543

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University