บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สายพันธุ์เห็ดหอม

เห็ดหอมสายพันธุ์ L1 (ดอกบาง, เพาะได้ในฤดูฝนและหนาว ผลผลิตเฉลี่ย 150-200 กรัม/ถุง ดอกสีค่อนข้างคล้ำ) กับเห็ดหอมสายพันธุ์ L2 (ดอกหนา, เพาะได้ในฤดูหนาว ผลผลิตเฉลี่ย 100-150 กรัม/ถุง ดอกสีน้ำตาล) เห็ดหอมทั้งสองสายพันธุ์ได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2. เครื่องมือและวิธีการที่ใช้ในการวิจัย

2.1 หม้อนึ่งความดัน (autoclave) การนึ่งฆ่าเชื้อสำหรับอาหารวุ้นจะนึ่งที่ความดัน 12-15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที ส่วนการนึ่งเมล็ดข้าวฟ่างจะใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 45 นาที

2.2 หม้อนึ่งลูกทุ่งใช้สำหรับนึ่งถุงขี้เลื่อย อุณหภูมิประมาณ 95-98 °C นึ่งนาน 4 ชั่วโมง

2.3 ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina airflow) และอุปกรณ์ที่ใช้ในการเขี่ยเชื้อ คือ เข็มเขี่ยเชื้อแบบจิกเนื้อเยื่อ, เข็มเขี่ยแบบห่วง, ตะเกียงแอลกอฮอล์, เอทธิลแอลกอฮอล์ 70% สำหรับฆ่าเชื้อและเมทธิลแอลกอฮอล์สำหรับจุดตะเกียง

2.4 อาหารวุ้นพีดีเอ (Potato Dextrose Agar, PDA) มีส่วนประกอบดังนี้

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
ผงวุ้นทำขนม	13	กรัม
น้ำ	1,000	ซีซี

2.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสปอร์ และการแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation)

2.5.1 จานเพาะเลี้ยง (petri dish)

2.5.2 กระดาษสีเข้มตัดให้พอดีกับจานเพาะเลี้ยง, กระดาษสีเข้มที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆกว้างยาวประมาณ 0.5 ซ.ม

2.5.3 อุปกรณ์ที่ใช้เขี่ยเชื้อ

2.5.4 ดอกเห็ดหอม

2.5.5 น้ำกลั่น

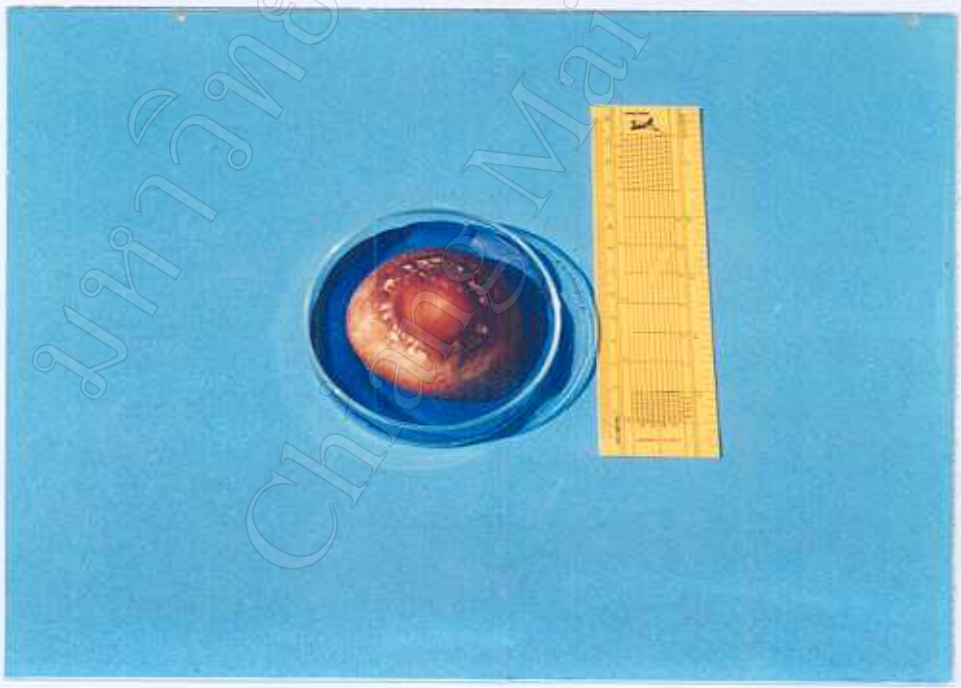
2.5.6 อาหารวุ้นพีดีเอ

2.5.7 กล้องจุลทรรศน์

2.5.8 สีย้อมฟรีอกซิน B , โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์, สไลด์และ cover slip

โดยจะมีวิธีการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยวและแยกสปอร์เดี่ยว ดังนี้

- นำกระดาษสีเข้มที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ วางลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีกระดาษสีเข้มรองอยู่ให้กระจาย ปิดฝาจาน ห่อด้วยกระดาษให้มิดชิดและเรียบร้อย รัดด้วยยางรัด, เตรียมน้ำกลั่นใส่ขวดชมพู่ 250 ซีซี และหลอดทดลอง (test tube) เปล่า นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30-40 นาที
- นำเห็ดหอมทั้งสองสายพันธุ์นำมาทำความสะอาด เช็ดหมวกและก้านดอกด้านนอกด้วยแอลกอฮอล์ นำเข้าตู้เขี่ยเชื้อ จากนั้นใช้มีดที่เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ตัดก้านดอกให้ชิดตัวดอกเหลือก้านไว้ประมาณ 1 ซม แล้วนำดอกเห็ดดังกล่าววางลงในจานเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้สำหรับการดักสปอร์ แล้วปิดฝาให้มีอากาศถ่ายเทบ้างเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ในตู้เขี่ยเชื้อ แล้วเปิดสวิตซ์เพื่อให้ตู้ทำงานทำให้เกิดการถ่ายเทอากาศ



ภาพที่ 4 ภาพการดักสปอร์ของเห็ดหอม

- เมื่อสปอร์ร่วงลงบนชิ้นกระดาษ นำชิ้นกระดาษมาใส่ในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ 10 ซีซีในหลอดทดลองจำนวน 1 ชิ้น ทำให้ได้สารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension)
- ใช้เข็มเขี่ยแบบห่วง แตะสารแขวนลอยสปอร์จากหลอดดังกล่าว มาลากบนผิววุ้นเอียง ทิ้งไว้รอให้สปอร์งอก
- เมื่อสปอร์งอกแล้ว ตัดสปอร์ที่งอกเดี่ยวๆ นำไปเลี้ยงในอาหารวุ้นใหม่ ทิ้งไว้จนเจริญเติบโตให้ได้เส้นใยจำนวนมากพอสำหรับการตรวจดูเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว
- การตรวจสอบเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ทำได้โดยนำเส้นใยที่ต้องการตรวจสอบมาย้อมสีแล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าไม่พบข้อยึดระหว่างเซลล์ ในขั้นนี้ถือว่าเป็นสปอร์เดี่ยว

2.6 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการที่ใช้ในการผสมพันธุ์เห็ดหอมแบบ dimon-crossing

2.6.1 อุปกรณ์ที่ใช้ ได้แก่ หลอดอาหารวุ้นเอียง, อุปกรณ์ในการเขี่ยเชื้อ, สีย้อม, สไลด์, cover slip , และกล้องจุลทรรศน์

2.6.2 วิธีการผสมพันธุ์ นำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่แยกได้ นำไปผสมพันธุ์เส้นใยนิวเคลียสคู่ที่ได้จากเนื้อเยื่อของเห็ดทั้งสองสายพันธุ์ โดยนำเส้นใยแต่ละชนิดตัดวางคนละด้านของผิววุ้นเอียง รอจนเส้นใยเจริญชนกันเป็นขอบหนา จากนั้นนำเส้นใยที่บริเวณจุดต่อด้านเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวมาย้อมสีและตรวจข้อยึดระหว่างเซลล์ โดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบว่ามีข้อยึดระหว่างเซลล์ เป็นตัวบ่งบอกได้ว่าคู่ผสมดังกล่าวสามารถผสมเข้ากันได้ คู่ผสมที่เข้ากันได้ให้ตัดชิ้นส่วนตรงบริเวณที่นำเส้นใยไปตรวจเช็คนำไปเลี้ยงในอาหารวุ้นเอียงหลอดใหม่ เส้นใยที่ได้จะเป็นเส้นใยลูกผสม

2.6.3 การตรวจสอบข้อยึดระหว่างเซลล์ เขี่ยเส้นใยจำนวนเล็กน้อยแตะลงบนสไลด์ที่มีโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และฟรอกซิน B อย่างละ 1 หยด แล้วใช้ปลายที่ด้านด้ามจับของเข็มเขี่ยค่อยๆทุบให้เส้นใยแตกกระจาย จึงปิดด้วย cover slip แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x ถ้าหากพบข้อยึดระหว่างเซลล์แสดงว่าเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ ถ้าไม่พบข้อยึดระหว่างเซลล์ ในขั้นนี้ถือว่าเป็นเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ในการผสมพันธุ์หากตรวจพบว่าเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่แสดงว่าคู่ผสมดังกล่าวสามารถผสมเข้ากันได้

2.7 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการที่ใช้ในการเพาะเห็ดในถุง

2.7.1 สูตรอาหารสำหรับวัสดุเพาะเห็ดหอม ประกอบด้วย

ขี้เลื่อยไม้ยางพารา	100	ก.ก

รำละเอียด	15	ก.ก
ปูนขาว	0.5	ก.ก
ยิปซั่ม	0.5	ก.ก
แมกนีเซียมซัลเฟต	200	กรัม
น้ำตาลทราย	300	กรัม

2.7.2 ถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 6 ½ x 12 นิ้ว

2.7.3 คอขวดพลาสติก

2.7.4 กระดาษปิดคอขวด

2.7.5 เครื่องอัดขี้เลื่อยใส่ถุง

2.7.6 สำลี

2.7.7 หม้อนึ่งแบบลูกทุ่ง

2.7.8 เมล็ดข้าวฟ่าง

2.7.9 โรงเรือน

การเตรียมหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่าง

ล้างเมล็ดข้าวฟ่างด้วยน้ำสะอาดประมาณ 3 ครั้ง และคัดเมล็ดที่ลอยทิ้ง แช่เมล็ดข้าวฟ่างดังกล่าวไว้ 1 คืนเพื่อให้เมล็ดนิ่ม จากนั้นนำไปต้มให้สุกแบบไม่เละ (นานครึ่งชั่วโมง) เทน้ำออกให้หมาดโดยการผึ่งในตระแกรง จึงไปบรรจุขวดโซดา ประมาณ 2 ใน 3 ของขวด ปิดขวดด้วยจุกสำลีหุ้มด้วยกระดาษอีกชั้น นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 45 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำไปต่อเชื้อเห็ดหอมได้ทันที เห็ดหอมจะเจริญเต็มขวดภายใน 14-20 วัน ก็สามารถนำไปต่อเชื้อในถุงขี้เลื่อยต่อไปได้

การเตรียมวัสดุเพาะสำหรับใส่ในถุงพลาสติกและการต่อเชื้อ

ผสมสูตรอาหารทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นจึงเติมน้ำเพื่อให้ได้ความชื้นในวัสดุเพาะประมาณ 70% นำบรรจุในถุงพลาสติกถุงละ 1 กิโลกรัม อัดถุงด้วยเครื่องอัด ใส่คอขวด รัดด้วยยางรัด ปิดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งลูกทุ่ง นาน 4 ชั่วโมง เมื่อถุงเย็น ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างถุงในห้องสะอาด หรือในตู้ต่อเชื้อ ปิดถุงด้วยกระดาษ 2 ชั้น รัดด้วยยางรัดให้แน่น จากนั้นเส้นใยเห็ดหอมจะเริ่มเดินและใช้เวลาประมาณ 2 เดือนจึงเต็มถุง การเปิดดอกเพื่อให้เกิดดอกแล้วแต่การจัดการ

3. การบันทึกข้อมูล

3.1 การบันทึกข้อมูลผลผลิตเป็นน้ำหนักสด ก่อนและหลังตัดแต่ง โดยมีหน่วยเป็นกรัม การเก็บดอกเห็ด ในแต่ละสายพันธุ์จะเก็บ 4 ซ้ำ

3.2 การบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด จะเก็บข้อมูลเกี่ยวกับ สีดอก ลักษณะดอก เส้นผ่าศูนย์กลางดอก ความยาวก้านดอก หน่วยวัดที่ใช้เป็นเซนติเมตร

3.3 การบันทึกผลการเจริญเติบโตของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวและเส้นใยนิวเคลียสคู่ โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางหน่วยเป็นเซนติเมตร 2 จุด จากนั้นแบ่งการเจริญเติบโตออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตช้ามาก , เจริญช้า, เจริญเร็ว และเจริญเร็วมาก โดยใช้วิธีทางสถิติ

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS version 10.05 for Windows

4. สถานที่ทำการวิจัย

1. โรงปฏิบัติการเพาะเห็ด ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

5. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ระหว่างเดือน กรกฎาคม 2542 ถึง เดือน มกราคม 2544

การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2

อุปกรณ์

1. เห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเขี่ยเชื้อ
3. อาหารวุ้น พีดีเอ
4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสปอร์และแยกสปอร์เดี่ยว
5. อุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบข้อชิดระหว่างเซลล์
6. วัสดุที่ใช้ในการเพาะเห็ดลงถุงขี้เลื่อย

วิธีการทดลอง

1. เพาะเห็ดหอมทั้งสองสายพันธุ์ลงถุงเพาะ (ถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 6 ½ x12 นิ้ว) สายพันธุ์ละ 30 ถุง จากนั้นปล่อยให้เจริญเติบโตจนเต็มถุง แล้วทิ้งไว้จนเส้นใยเริ่มรัดตัวเกิดเป็นสีน้ำตาล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 เดือน จึงเปิดถุง แล้วกระตุ้นให้เกิดดอกโดยการใช้น้ำเย็นรดวันละ 3 เวลา (เช้า กลางวัน เย็น) รักษาสภาพความชื้นในโรงเรือนให้ชุ่มชื้นตลอดเวลา ภายในระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ เห็ดจะเริ่มออกดอกจากนั้นอีกประมาณ 2 วัน จึงทำการเก็บเกี่ยวดอกเห็ดของทั้งสองสายพันธุ์มาดักสปอร์

2. การศึกษาระยะของดอกเห็ดที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการดักสปอร์ โดยการเก็บดอกเห็ดทั้งหมด 3 ระยะ ดังภาพที่ 5 มาศึกษาเวลาที่เริ่มการปลดปล่อยสปอร์ และเวลาที่ใช้ในการงอกของสปอร์

ภาพที่ 5 เห็ดหอมระยะต่างๆ 3 ระยะที่ใช้ทดสอบการดักสปอร์

3. การตรวจสอบเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดหอมทั้งสองสายพันธุ์ โดยการแยกเส้นใยที่งอกจากสปอร์สายพันธุ์ละ 100 สปอร์ นำมาเลี้ยงประมาณ 7 วัน จึงนำมาตรวจสอบเพื่อหาเส้นใยที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ของแต่ละสายพันธุ์ แล้วนำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ได้นำไปเลี้ยงในอาหารวุ้นใหม่

การบันทึกผล

1. ลักษณะดอกของเห็ดหอมที่ใช้ในการดักสปอร์
2. ระยะเวลาที่ใช้ในการเริ่มปลดปล่อยสปอร์ และเวลาในการงอกของสปอร์
3. ระยะเวลาที่ใช้ในการในการเพาะก่อนที่จะพบการงอกของสปอร์
4. จำนวนเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวจากการตรวจที่ไม่พบข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection)

การทดลองที่ 2 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารวุ้น

อุปกรณ์

1. เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดหอม L1 และ L2
2. ขวดแบนขนาดบรรจุ 375 มิลลิลิตร
3. วัสดุสำหรับเตรียมอาหารพีดีเอ
4. หม้อนึ่งความดัน
5. กระบอกตวง
6. จุกสำลี
7. กระดาษ

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอาหารพีดีเอตามสูตร ใส่อาหารพีดีเอลงในขวดแบนขวดละ 40 มิลลิลิตร นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ นาน 45 นาที เมื่อจากนั้นนำไปเอียงเพื่อเพิ่มพื้นที่ของผิววุ้น
2. เมื่อวุ้นเย็นและแข็งตัวแล้ว จึงนำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงตรงขุดกึ่งกลางของเส้นที่ขีดเป็นแนวกากบาท (ทั้งแนวตั้งและแนวนอน) เลี้ยงเส้นใยเป็นระยะเวลา 2 วัน ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางทั้งแนวตั้งและแนวนอนแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นรอจนเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวตัวใดตัวหนึ่งชนขอบวุ้นก่อน(วันที่ 9) จึงเริ่มวัดเส้นผ่าศูนย์กลางทั้งแนวตั้งและแนวนอนอีกครั้ง แล้วคิดค่าเฉลี่ย นำค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของวันที่ 9 ลบด้วยค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของวันที่ 2 ซึ่งเป็นระยะเวลา 7 วัน ค่าที่ได้จึงเป็นการเติบโตของเส้นใยใน 7 วันในหน่วยเซนติเมตร นำมาคิดเป็นอัตราการเติบโตต่อวันโดยหารด้วย 7
3. เมื่อได้ค่าอัตราการเติบโตของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวแล้วจึงแบ่งเส้นใย ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มเจริญเติบโตช้ามาก , ช้า, เร็ว และเร็วมาก โดยแบ่งกลุ่มตามค่าเฉลี่ยและ 1 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย

- ถ้าน้อยกว่า –1SD = กลุ่มเจริญเติบโตช้ามาก
- อยู่ระหว่างค่าเฉลี่ยกับ –1SD = กลุ่มเจริญเติบโตช้า
- อยู่ระหว่างค่าเฉลี่ยกับ 1SD = กลุ่มเจริญเติบโตเร็ว
- ถ้ามากกว่า 1SD = กลุ่มเจริญเติบโตเร็วมาก

การบันทึกผล

1. วัดการเติบโตของเส้นใย
2. แบ่งกลุ่มตามอัตราการเติบโตของเส้นใย
3. ลักษณะของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว

การทดลองที่ 3 ผสมพันธุ์แบบไดมอน (di-mon crossing) ระหว่างเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2 และศึกษาอัตราการเติบโตของลูกผสม

อุปกรณ์

1. เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดหอม L1 และL2 ที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาผสมกับเห็ดหอม L1 และ L2
2. หลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร
3. วัสดุสำหรับเตรียมอาหารพีดีเอ
4. จุกสำลี
5. อุปกรณ์สำหรับตรวจข้อขัดระหว่างเซลล์

วิธีการ

1. เตรียมอาหารพีดีเอ ใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกสำลี นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 45 นาที หลังจากนั้นนำหลอดมาเอียงเพื่อเพิ่มพื้นผิววุ้น
2. เมื่อวุ้นเย็นและแข็งตัวแล้วให้นำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวกับเส้นใยนิวเคลียสคู่มาเลี้ยงคู่กัน โดยวางไว้คนละตำแหน่งห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วปล่อยให้เส้นใยเดินชนกันเพื่อให้เกิดการรวมตัวหรือผสมกัน ดังภาพที่ 6 โดยจะมีจำนวนคู่ผสมทั้งหมด 104 คู่ผสม

ภาพที่ 6 การผสมพันธุ์แบบเส้นใยนิวเคลียสคู่ผสมกับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว

3. ตรวจสอบการผสมเข้ากันได้ โดยวิธีการตรวจดูข้อยึดระหว่างเซลล์
4. เมื่อได้ลูกผสมตัวใหม่ ซึ่งมีข้อยึดระหว่างเซลล์ ให้ตัดไปเลี้ยงในหลอดวุ้นหลอดใหม่
5. นำลูกผสมที่ได้ ไปวัดการเติบโตของเส้นใยของลูกผสม ซึ่งทำเช่นเดียวกับการวัดการเติบโตของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว แต่เนื่องจากเส้นใยนิวเคลียสคู่เจริญเติมโตได้เร็วกว่า จึงใช้เวลาเพียง 7 วัน ก็เดินชนขอบวุ้น

การบันทึกผล

1. ความสามารถในการผสมเข้ากันได้โดยดูจากการปรากฏข้อยึดระหว่างเซลล์
2. ลักษณะการชนกันของเส้นใยคู่ผสมต่างๆ
3. วัดการเติบโตของลูกผสม เฉพาะที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์

การทดลองที่ 4 ความสามารถในการเกิดปุ่มดอกของลูกผสม เปรียบเทียบกับเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2 ในสภาพอาหารวุ้น

อุปกรณ์

1. เห็ดหอมลูกผสมที่ได้จากการทดลองที่ 3 จำนวน 28 ตัว และเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2
2. อาหารวุ้นเอียงปริมาตร 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร ที่นึ่งในหม้อนึ่งความดันเรียบร้อยแล้ว
3. ลูกสำลี

วิธีการ

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมลูกผสมและเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2 ในหลอดทดลองที่มีอาหาร พีดีเอดังกล่าว

การบันทึกผล

1. ความสามารถในการเกิดปุ่มดอก
2. ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปุ่มดอก
3. จำนวนปุ่มดอกที่ปรากฏ

การทดลองที่ 5 ลักษณะของแถบไอโซไซม์เอสเทอเรส (esterase isozyme)

อุปกรณ์

1. เส้นใยเห็ดหอมลูกผสมและสายพันธุ์พ่อแม่ (L1 และ L2)
2. โกร่งสำหรับบดตัวอย่างพืช

3. เครื่องเหวี่ยง (centrifuge)
4. ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง –20° ซ
5. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
6. eppendrop tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. ชุดทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ slab gel
8. เครื่องจ่ายกระแสไฟ
9. ถุงมือ
10. เครื่องแก้วต่างๆ
11. กระดาษกรอง
12. extraction buffer
13. ส่วนประกอบของเจล
14. electrode buffer
15. สีย้อมเอนไซม์
16. marker

วิธีการ

1. การเตรียมเส้นใย

นำเส้นใยเลี้ยงในอาหารเหลวที่บรรจุในขวดโซดาขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 150 มิลลิลิตร ในสภาพปลอดเชื้อ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน จึงนำเส้นใยมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วเก็บไว้ในถุงพลาสติก แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการสกัดเอนไซม์ต่อไป

2. การเตรียมสารเคมีให้ดูที่ภาคผนวก
3. การสกัดเอนไซม์

นำเส้นใยเห็ดลูกผสมแต่ละตัวที่แช่แข็งมาบดให้ละเอียดในโกร่งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยก่อนทำการบดเส้นใย ให้นำโกร่งที่จะบดไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส ก่อน ในการบดให้เติม 0.1 M Tris-buffer pH 8.2 โดยใช้ในสัดส่วนจำนวน 5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักของเส้นใย 3 กรัม แล้วทำการบดเพื่อให้เส้นใยและสารละลายเข้ากัน จากนั้นนำเส้นใยที่บดได้ร่วมกับสารดังกล่าวใส่ใน eppendrop tube เพื่อไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที (10,248.48 g) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นำสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ใส่ใน eppendrop tube ซึ่งมี glycerine 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำเก็บเข้าตู้แช่

4. การเตรียมเจล

การเตรียม running gel หรือ separating gel 8.5% โดยทำการเตรียมชุดแผ่นแก้วให้เรียบร้อย ใช้ spacers เป็นตัวปรับความหนาของเจล โดยปรับให้ความหนาอยู่ในช่วง 0.75-1.00 มิลลิเมตร ผสมสารละลายจาก stock solution สำหรับการเตรียมเจลตามสูตร (ดูภาคผนวก) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) แล้วจึงเทเจลใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ค่อยๆหยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งให้เจลแข็งตัว (polymerization) ใช้เวลาประมาณ 60-90 นาที

การเตรียม stacking gel ผสม stock solution ตามสูตรการเตรียมเจล ผสมส่วนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ใส่สารละลาย stacking gel ที่ผสมแล้วลงบน separating gel ที่ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้ว ระวังอย่าให้ stacking gel ที่ใส่ลงไปมีฟองอากาศ สอดหวี (comb) ลงในเจล ทิ้งให้เจลแข็งตัวใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที ดึงหวีออกจนเห็นช่องว่าง (well) สำหรับใส่ตัวอย่างเห็ดที่ต้องการแยก ล้างช่องดังกล่าวด้วยน้ำกลั่นก่อนจึงหยดสารตัวอย่าง

5. การแยกเอนไซม์

ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสทั้งหมดให้ครบ เติม running buffer ลงใน chamber แล้วจึงใส่สารตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในช่องของ stacking gel โดยใช้เข็มสำหรับ Loading (50 µl) ค่อยๆหยดตัวอย่างเห็ดผ่านบัฟเฟอร์ลงในช่องเจล หยด bromophenol blue ประมาณ 20 µl ต่อช่อง เพื่อใช้เป็นเครื่องหมาย ต่อขั้วบวกเข้ากับ chamber ล่าง และขั้วลบเข้ากับ chamber บน เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสคงที่ 22-26 mA 250 โวลล์ เปิดเครื่องควบคุม electode buffer ที่ 4 องศาเซลเซียส ปล่อยให้ชุดอุปกรณ์อิเล็กโตรโฟรีซีสดำเนินต่อไปประมาณ 4-6 ชั่วโมง จนเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนลงส่วนล่างของเจลจึงหยุดการทำงาน แล้วนำเจลที่ได้ออกจากแผ่นแก้วที่ประกบ เพื่อนำมาทำการย้อมสีของเอนไซม์เอสเทอเรสต่อไป

6. การย้อมสี

เตรียมน้ำยาย้อมสีของเอนไซม์เอสเทอเรส (ดังภาคผนวก) นำเจลที่ต้องการย้อมสีใส่ในถาดพลาสติกที่มีน้ำยาย้อมอยู่ เพื่อย้อมไอโซเอนไซม์ โดยนำไปวางในที่มืดประมาณ 15-60 นาที จนปรากฏแถบสี

การบันทึกข้อมูล

1. ลักษณะแถบไอโซไซม์เอสเทอเรส
2. ค่า R_f

การทดลองที่ 6 ทดสอบความสามารถในการเกิดดอกของเห็ดลูกผสมที่ผ่านการเลี้ยงเส้นใยในถุงเพาะในระยะที่ต่างกัน 3 ระยะเวลา ศึกษาลักษณะดอกและผลผลิตในถุงเพาะเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ (L1 และ L2)

อุปกรณ์

1. เห็ดลูกผสมจำนวน 28 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ L1 และ L2 (พ่อแม่)
2. เครื่องชั่งละเอียด
3. ไม้บรรทัด
4. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการเพาะเห็ดหอมในถุงขี้เลื่อย
5. มีด

วิธีการทดลอง

1. วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) มี 4 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือสายพันธุ์เห็ดหอม ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเส้นใย ซึ่งมี 3 ระดับ คือ 60 , 100 และ 140 วัน
2. นำเห็ดหอมเพาะลงในถุงพลาสติกโดยใช้สูตรอาหารมาตราฐานสำหรับการเพาะเห็ดหอมของภาควิชาพืชสวน โดยจะเตรียมการเพาะของ 140 วันก่อน ต่อจากนั้นอีก 40 วัน จึงเพาะของ 100 วัน และอีก 40 วันหลังจากนั้นเพาะของ 60 วัน
3. เมื่อครบเวลาการบ่มเส้นใย 140 , 100 และ 60 วัน จึงเริ่มทำการเปิดดอกเห็ดหอมโดยจะทำการวางก้อนของทุกสายพันธุ์บนพื้นในโรงเรือน ซึ่งมีการให้ความชื้นโดยการรดน้ำวันละ 3 เวลาคือ ตอนเช้า กลางวัน และเย็น

การบันทึกผล

1. ความสามารถในการเกิดดอก
2. ผลผลิตน้ำหนักสดก่อนและหลังการตัดแต่ง (กรัม)
3. ลักษณะและคุณภาพดอก (สี ขนาด ความยาวก้านดอก และรูปร่างดอก)