บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อเห็ดนางฟ้าและเห็ดนางฟ้าภูฐานได้รับเชื้อเห็ดจากศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร เชื้อเห็ดนางฟ้ามีลักษณะดอกหนาใหญ่น้ำหนักดี สีน้ำตาลอมเทา ต้องการอุณหภูมิต่ำในการออกดอก สำหรับเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน มีดอก ขนาดปานกลาง น้ำหนักดีพอควร ดอกสีครีม ทนต่อสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงได้กว้าง ออกดอกได้ตลอดทั้งปี

อุปกรณ์

1. เส้นใยเห็ดนางฟ้าและเส้นใยเห็ดนางฟ้าภูฐาน
2. เครื่องแก้วต่างๆ เช่น หลอดทดลอง บีเกอร์ จานเลี้ยงเชื้อ ฯลฯ
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
5. ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina airflow)
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. แอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ (Ethyl alcohol)
8. แอลกอฮอล์จุดไฟ (Methyl alcohol)
9. เข็มเขี่ย มีดผ่าตัด คีม
10. กระจกสไลด์และcover slip
11. กล้องจุลทรรศน์ microscope
12. สีย้อมเส้นใย phloxine B
13. มันฝรั่ง
14. น้ำตาลกลูโคส
15. ผงวุ้น
16. กระดาษสำหรับดักสปอร์

17. หม้อนึ่งแบบลูกทุ่ง
18. ขวดกลม
19. เมล็ดข้าวฟ่าง
20. สำลี
21. ถุงพลาสติกทนร้อน
22. คอขวดพลาสติก
23. ยางรัด และกระดาษ
24. ขี้เลื่อย รำละเอียด ปูนขาว แมกนีเซียมซัลเฟต ยิปซั่ม

วิธีการ

1. การเตรียมอาหารวุ้นพีดีเอ (Potato Dextrose Agar, PDA)

สูตร

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
ผงวุ้น	13	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

นำมันฝรั่งปลอกเปลือกและหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปต้มจนสุก กรองน้ำต้มมันฝรั่งและปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ต้มและใส่น้ำตาลกลูโคส และผงวุ้น คนจนละลายหมด จากนั้น นำใส่หลอดทดลองประมาณ 15 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและปิดกระดาษทับรัดด้วยยางรัด นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 45 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา รอจนความดันลดลงถึงศูนย์ จึงเปิดและนำหลอดอาหารมาเอียง ทิ้งไว้ให้เย็น

2. การเตรียมหัวเชื้อจากเมล็ดข้าวฟ่าง

นำเมล็ดข้าวฟ่างมาล้างทำความสะอาด และนำแช่น้ำนานประมาณ 12 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้สุกง่ายเมื่อนำไปต้ม เมื่อต้มจนเมล็ดข้าวฟ่างสุก เมล็ดเริ่มแตก นำไปกรองและผึ่งให้แห้ง ผสมขี้เลื่อยเล็กน้อย เพื่อป้องกันการติดกันของเมล็ดข้าวฟ่าง บรรจุลงขวดกลมประมาณครึ่งขวด

ทำความสะอาดปากขวดและปิดด้วยจุกสำลี ปิดกระดาษและรัดด้วยยางรัด นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้เวลา 45 นาที

3. การเขี่ยเชื้อเห็ดลงในขวดเมล็ดข้าวฟ่าง

นำเข็มเขี่ยจุ่มแอลกอฮอล์นำไปลนไฟ รอให้เย็น ตัดเส้นใยในหลอดอาหารวุ้น เป็นชิ้นเหลี่ยม ขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ใช้เข็มเขี่ยจิกชิ้นส่วนที่ตัดออกมาใส่ลงในขวดเมล็ดข้าวฟ่าง วางตรงกลางขวด นำเก็บไว้ประมาณ 10 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มขวด

4. เตรียมก้อนเชื้อเห็ด

สูตร

ขี้เลื่อย	100	กิโลกรัม
รำละเอียด	10	กิโลกรัม
ปูนขาว	1	กิโลกรัม
ยิปซั่ม	0.5	กิโลกรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	200	กรัม

ผสมส่วนประกอบตามสูตรให้เข้ากัน ให้ความชื้นโดยรดน้ำ ผสมให้ทั่ว ให้ได้ความชื้นประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบโดยใช้มือกำขี้เลื่อยที่ผสมแล้ว บีบให้แน่นจะมีน้ำออกมาตามง่ามมือ นำขี้เลื่อยที่ผสมแล้วบรรจุลงถุงพลาสติกทนร้อน ถุงละประมาณ 800 กรัม นำไปอัดถุงให้แน่น ใส่คอขวดพลาสติก ดึงถุงพลาสติกให้ตึง รัดด้วยยางรัด ปิดกระดาษ 2 ชั้นและรัดด้วยยางรัด นำก้อนเชื้อเห็ดไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งลูกทุ่งที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำไปต่อเชื้อต่อไป

5. การต่อเชื้อเห็ดจากเมล็ดข้าวฟ่างลงก้อนเชื้อ

นำเข็มเขี่ยจุ่มแอลกอฮอล์นำไปลนไฟ รอให้เย็น และตีเมล็ดข้าวฟ่างในขวดให้ร่วนเทเมล็ดข้าวฟ่างลงถุง ประมาณ 10-20 เมล็ดต่อหนึ่งถุงก้อนเชื้อ นำไปบ่มในห้องบ่มเชื้อ บ่มไว้ประมาณ 30 วัน เชื้อจะเจริญเต็มถุง

การทดลองที่ 1 การผสมข้ามแบบมอน-มอน (mon-mon crossing) ระหว่างเห็ดนางฟ้ากับเห็ดนางฟ้า

ภูฐาน

วิธีการการเตรียมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Monokaryons)

1. การดักสปอร์เห็ด (ดักสปอร์ฤดูหนาว ราวเดือนธันวาคม)

นำดอกเห็ดเช็ดทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ 70% ใช้มีดผ่าตัด ตัดก้านดอกและใช้คีมคีบเอาดอกวางในจานเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาด 15x14.5 เซนติเมตร โดยมีกระดาษรองอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ และมีกระดาษชิ้นเล็กๆเป็นรูปวงกลมอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันปิดฝาให้มีการระบายอากาศเล็กน้อยเพื่อไม่ให้มีความชื้นมากเกิน ทิ้งไว้ในตู้ต่อเชื้อ ชนิดกรองอากาศ (lamina airflow) ประมาณ 24 ชั่วโมง สปอร์เห็ดจะตกลงสู่กระดาษชิ้นเล็กๆนำไปใช้ต่อไป

2. การลดความหนาแน่นของสปอร์ ใช้เข็มเขี่ยลนไฟ จิ้มลงไปบนกระดาษที่มีสปอร์ใส่กระดาษลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้เวลา 30 นาที ในหลอดมีน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ทำอย่างนี้ประมาณ 3 ครั้ง

3. การเพาะสปอร์และการแยกเส้นใยใช้ปลายเข็มเขี่ยเชื้อแบบห่วงหรือหลูป (loop)จุ่มลงในหลอดที่มีน้ำละลายสปอร์ครั้งสุดท้ายอยู่ น้ำละลายสปอร์จะติดที่ปลายหลูป จากนั้นนำปลายหลูปไปลากไปมาบนอาหารวุ้น พีดีเอ ทิ้งไว้ประมาณ 4-5 วัน สปอร์จะเริ่มงอก ตัดแยกสปอร์ใส่หลอดอาหารวุ้นพีดีเอ ทิ้งไว้ประมาณ 5-7 วัน

4. การตรวจเส้นใย นำเส้นใยมาย้อมสี phloxine B ผสมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 2% ตรวจสอบการเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าไม่พบข้อยึดระหว่างเซลล์แสดงว่าอาจเป็นเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryons) หากพบข้อยึดระหว่างเซลล์ แสดงว่าอาจเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryons)

5. การผสมพันธุ์ โดยตัดเส้นใยจากอาหารวุ้นพีดีเอที่ตรวจเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้ว โดยผสมในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นพีดีเอ วางคู่ผสมห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร จากนั้นประมาณ 5-7 วัน ก็สามารถตรวจสอบการผสมที่เข้าคู่กันได้ โดยการตรวจหาข้อยึดระหว่างเซลล์ เส้นใยที่ใช้ตรวจเอาจากบริเวณจุดต่อเชื่อมประสานระหว่างเส้นใย 2 สายเชื้อ ถ้าตรวจพบข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) แสดงว่าคู่ผสมนั้นอาจผสมกันได้

6. การวัดการเจริญเติบโตของเส้นใย เตรียมอาหารวุ้นพีดีเอใส่ขวดแบน โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใย

7. นำไปเพาะลงหลอดทดลองที่บรรจุขี้เลื่อยที่ปลอดเชื้อ โดยเอาเฉพาะที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์

8. นำไปเพาะลงถุง โดยเอาเฉพาะที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์

เริ่มเพาะลงถุง เดือน มีนาคม 2543

การบันทึกผล

1. ตรวจหาคู่ผสม โดยดูข้อยึดระหว่างเซลล์ภายภายใต้กล้องจุลทรรศน์
2. ความสามารถในการเกิดดอก เมื่อทดสอบโดยใช้ขี้เลื่อยบรรจุหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อตัดเส้นใยลงไป
3. อายุตอนที่ออกดอกครั้งแรกนับจากต่อเชื้อ
4. ลักษณะดอก
5. ผลผลิตน้ำหนักสด
6. เส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใย
7. คัดเลือกเห็ดลูกผสมที่มีลักษณะดอกที่ต้องการและให้ผลผลิตสูง นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 2 การผสมข้ามแบบได-มอน (di-mon crossing) ระหว่าเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryon) ของเห็ดนางฟ้ากับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryon) ของเห็ดนางฟ้าภูฐาน และระหว่างเส้นใยนิวเคลียสคู่ ของเห็ดนางฟ้าภูฐานกับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ของเห็ดนางฟ้า

อุปกรณ์

เหมือนการทดลองที่ 1

เริ่มเพาะลงถุง เดือน มีนาคม 2543

บันทึกผล

1. ตรวจคู่ผสม โดยข้อยึดระหว่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
2. ความสามารถในการเกิดดอกเมื่อทดสอบโดยใช้ขี้เลื่อยบรรจุหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อตัดเส้นใยใส่ลงไป
3. อายุตอนที่ออกดอกครั้งแรกนับจากต่อเชื้อ
4. ลักษณะดอก
5. ผลผลิตน้ำหนักสด
6. จำนวนวันที่เก็บเกี่ยว โดยเริ่มนับจากวันที่เก็บดอกแรก เก็บเกี่ยว 35 และ 60วัน
7. เส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใย
8. คัดเลือกเห็ดลูกผสม ที่มีลักษณะดอกที่ต้องการและให้ผลผลิตสูง นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 3 การผสมกลับแบบได-มอน (di-mon backcrossing)

ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย

ผสมเส้นใยนิวเคลียสคู่ของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐาน และของเห็ดลูกผสม กับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ที่ได้จากการทดลองที่ 1 และที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

เหมือนการทดลองที่ 1

เริ่มเพาะลงถุง เดือน พฤษภาคม 2543

บันทึกผล

1. ตรวจคู่ผสม โดยข้อยึดระหว่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
2. ความสามารถในการเกิดดอกเมื่อทดสอบโดยใช้ขี้เลื่อยบรรจุหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อตัดเส้นใยใส่ลงไป
3. อายุตอนที่ออกดอกครั้งแรกนับจากต่อเชื้อ
4. ลักษณะดอก
5. ผลผลิตน้ำหนักสด

6. คัดเลือกเห็ดลูกผสม ที่มีลักษณะดอกที่ต้องการและให้ผลผลิตสูงกลุ่มละ 1 สายเชื้อ นำไปใช้ในการทดลองต่อไป ส่วนกลุ่มที่เห็ดลูกผสมไม่มีลักษณะดอกที่ต้องการหรือให้ผลผลิตต่ำจะคัดทิ้ง
7. เส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใย
8. zymogram

วัสดุอุปกรณ์สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

1. ตัวอย่างเส้นใยเห็ด
2. เครื่องชั่งอย่างละเอียด
3. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
4. เครื่องหมุนเวี่ยงตัวอย่าง (centrifuge)
5. โกร่งบด
6. eppendrop tube ขนาด 1.5 มิลลิเมตร
7. ชุดสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ slab gel
8. เครื่องจ่ายไฟฟ้า
9. เครื่องทำความเย็น (cooling unit)
10. ตู้แช่ที่อุณหภูมิ 0 และ –20 องศาเซลเซียส
11. ถุงมือยาง
12. เครื่องแก้วต่างๆ
13. กระดาษกรอง
14. extraction buffer
15. ส่วนประกอบของเจล
16. electrode buffer
17. สีย้อม

วิธีการเตรียมสารเคมีในข้อ 14-18 แสดงไว้ในภาคผนวก ก.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

1. การเตรียมอาหารเหลวเพื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ด

วิธีการเหมือนการเตรียมอาหารพีดีเอแต่ไม่ใส่ผงวุ้น บรรจุใส่ขวดกลมประมาณ 150 มิลลิลิตรนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้เวลานาน 45 นามี ตัดเส้นใยใส่ขวด โดยนำชิ้นส่วนจากเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่อยู่ในจานแก้ว (petridish)

2. วิธีการทำเทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำเส้นใยเห็ดหนัก 3 กรัม ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 30 วัน เก็บไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน หลังจากนั้นนำมาบดในโกร่งพร้อมเติม extraction buffer 3 มิลลิลิตร นำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่ RCF = 10285.60 g. ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ดูดของเหลวที่ลอยอยู่ (supernatant) ในหลอด eppendrop ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การคำนวณค่า RCF ทำได้ดังนี้

$RCF = (n/1000)^2 \times r \times 1.118$, r = 92 mm , n = 10000 rpm (RCF = Relative Centrifugal Force มีหน่วยเป็น g = gravity.)

2. การประกอบชุดอิเล็กโตรโฟรีซีส

ประกอบชุดอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยเติม electrode buffer ลงใน chamber

3. การเตรียมเจล

3.1 ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับเจล (gel mould) เช็ดด้วย acetone นำแผ่นกระจกที่ใช้ 2 แผ่น ซึ่งมีความสูงของแผ่นกระจกไม่เท่ากัน นำมาประกบกัน ใช้แผ่นยางขั้นระหว่างแผ่นกระจกทั้งสอง นำไปตั้งบน stand ให้ตั้งฉากกับฐานของ stand ยึดให้แน่นด้วยตัวยึดเพื่อให้กระจกประกับกันสนิท

3.2 ใส่ running gel ที่เตรียมไว้สูงประมาณ 12 เซนติเมตร แล้วใส่น้ำกลั่นเพื่อให้ผิวหน้าเรียบ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เกิด polymerization ใส่ stacking gel พร้อมกับ comb ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำ comb ออกล้างผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น

4. การหยอดตัวอย่าง

หยอดตัวอย่างลงบนเจลแต่ละช่วง ช่วงละหนึ่งตัวอย่าง จำนวน 90 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย

5. การผ่านกระแสไฟฟ้า

ผ่านกระแสไฟฟ้าประมาณ 70 มิลลิแอมแปร์ โดยควบคุมความต่างศักย์คงที่ ที่ 190 โวลต์และควบคุมอุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียส โดยการควบคุมของเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบน้ำเย็นหมุนเวียนเข้าออก chamber ใช้เวลานาน 4 $^{1}/_{2}$ ชั่วโมง จนกระทั่งระดับของ maker solution อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล 1 นิ้ว

6. การย้อมสี

แกะแผ่นกระจกที่ประกบกันออก ตัดขอบล่างทางซ้ายของแผ่นเจล เพื่อให้ทราบลำดับของหมายเลขตัวอย่างที่หยอด นำเจลลงแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย substrate coenzyme และสีย้อม (dye) ที่มีความเจาะจงกับเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบหลังสิ้นสุดปฏิกริยา นำแผ่นเจลล้างน้ำไหลช้าๆ แช่ในสารละลาย acetic acid 7% ที่ผสมด้วย glycerol 10% เพื่อหยุดปฏิกริยาและละลายสีส่วนเกินออก

การบันทึกข้อมูล

บันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์โดยถ่ายภาพ และวาดภาพ zymogram แสดงตำแหน่ง จำนวนและขนาดของแถบสี วัดค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสี

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

การทดลองที่ 4 การทดสอบผลผลิต

นำเห็ดลูกผสม ที่ได้จากการคัดเลือก จากการทดลองที่ 1, 2 และ 3 เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางฟ้าภูฐาน มาทดสอบผลผลิต โดยเพาะ 12 ถุง ต่อ 1 สายเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

เหมือนการทดลองที่ 1.1 – 1.5 เมื่อต่อเชื้อข้าวฟ่างลง นำถุงเห็ดใส่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ เริ่มเพาะลงถุง เดือน มกราคม 2544

บันทึกผล

ผลผลิตน้ำหนักสด

สถานที่

1. โรงปฏิบัติการเห็ดของภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการเห็ดของภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ตั้งแต่ พฤศจิกายน 2541 – เมษายน 2544

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University