ภาคผนวก ก

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหารวุ้นพีดีเอ (Potato Dextrose Agar, PDA)

อาหารวุ้นเตรียมได้จาก

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

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ ขนาดประมาณ 1×1×1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มจนมันฝรั่งสุกกรองเอาแต่น้ำ นำไปต้มอีกครั้งพร้อมกับเติมน้ำตาลกลูโคสและผงวุ้นลงไปต้มจนกระทั่งผงวุ้นละลายแล้วเทลงในหลอดทดลอง ประมาณ 10 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยสำลีหลังจากนั้นนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 45 นาที เมื่อครบกำหนดเวลารอความดันลดลงจนเป็นศูนย์ จึงเปิดหม้อนึ่งความดัน จากนั้นนำหลอดทดลองมาวางตั้งเอียงประมาณ 45 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็น

2. การเตรียมอาหารเหลว

อาหารวุ้นเตรียมได้จาก

มันฝรั่งปอกเปลือกหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยม	200 กรัม
กลูโคส	20 กรัม
น้ำ	1 ลิตร

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ ขนาดประมาณ 1×1×1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มจนมันฝรั่งสุกกรองเอาแต่น้ำ นำไปต้มอีกครั้งพร้อมกับเติมน้ำตาลกลูโคสลงไป ต้มจนกระทั่งน้ำเดือด จากนั้นเทอาหารเหลวใส่ลงไปในขวดกลมประมาณ 50 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยสำลีหลังจากนั้นนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 45 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา รอความดันลดลงจนเป็นศูนย์ จึงเปิดหม้อนึ่งความดัน ทิ้งไว้ให้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเลี้ยงเส้นใยในอาหารวุ้น

นำดอกเห็ดที่มีลักษณะสมบูรณ์มาทำความสะอาดโดยใช้แอลกอฮอล์ฉีดพ่นบริเวณดอกเห็ด และใช้สำลีเช็ดโดยรอบ ใช้มีดผ่าตัดที่ลนไฟแล้วแบ่งดอกเห็ดออกเป็น 2 ซีก จากนั้นตัดเนื้อเยื่อเห็ดให้ได้ขนาด 0.3 × 0.3 ตารางเซนติเมตร ใช้เข็มเขี่ยจุ่มแอลกอฮอล์นำไปลนไฟรอให้เย็น ใช้ปลายเข็มจิกชิ้นส่วนนี้ขึ้นมาใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นพีดีเอ วางไว้ตรงกึ่งกลางของอาหาร นานประมาณ 3-4 วัน ใช้เข็มเขี่ยจุ่มแอลกอฮอล์นำไปลนไฟรอให้เย็น ตัดเส้นใยเห็ดที่เดินบนอาหารวุ้นพีดีเอให้ได้ขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นพีดีเอ โดยวางบนอาหารวุ้นเพื่อวัดการเจริญเติบโตของเส้นใย

4. การเตรียมหัวเชื้อจากเมล็ดข้าวฟ่าง

นำเมล็ดข้าวฟ่างมาล้างทำความสะอาดโดยการล้างหลายๆ ครั้ง แช่น้ำทิ้งไว้ประมาณ 12-18 ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดข้าวฟ่างนิ่มและต้มสุกง่าย หลังจากนั้นนำไปต้มจนเมล็ดปริเล็กน้อย นำมาเทลงบนตะแกรงทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นบรรจุลงในขวดแก้วกลมประมาณครึ่งขวด นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 45 นาที

5. การเขี่ยเชื้อเห็ดลงในขวดเมล็ดข้าวฟ่าง

ใช้เข็มเขี่ยจุ่มแอลกอฮอล์นำไปลนไฟ รอให้เย็นสอดเข้าไปในอาหารวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ และใช้เข็มเขี่ยตัดอาหารวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร แล้วใช้ปลายเข็มจิกชิ้นส่วนนี้ขึ้นมาใส่ในขวดเมล็ดข้างฟ่าง โดยวางไว้ตรงกึ่งกลางให้ติดด้านข้างของขวด นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 วันเส้นใยจะเจริญเต็มขวด

6. การทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

1. การเตรียม extraction buffer

Tris-buffer 0.2, pH 8.3

Stock solutions

A : Solution of tris (hydroxymethy) aminomethane 0.2 M	2.42 g/100 ml
B : HCL 0.2 M	1.66 ml/100 ml

วิธีการเตรียม

นำ Stock A 50 มิลลิลิตร ผสมกับ Stock B 21.9 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.3 บรรจุในขวดสีชาเก็บไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การเตรียม electrod buffer

Tris-buffer ,pH 8.3 (×10)

Tris	6.0 g
Glycine	28.8 g
H_2O adjust	1,000 ml

ปรับ pH โดยใช้ NaOH 0.1 M ให้เป็น pH 8.3

3. การเตรียมส่วนประกอบของเจล

Stock A : Acrylamine/Bis 100 ml

Acrylamine	29.2 g
H_2O adjust	100 ml

Stock B : Tris- HCL 1.5 M, pH 8.8

Tris base	18.15 g
H_2O adjust	50 ml

ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วย HCL 0.1 M เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Stock C : Tris- HCL 0.5 M , pH 6.8

Tris base	18.15 g
H_2O adjust	60 ml

ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วย HCL 0.1 M เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Stock D : 10 % ammonium persulfate (fresh prepare)

$(NH_4)_2S_2O_8$	6 g
H_2O	1 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ก ที่ 1 อัตราส่วนที่ใช้ในการเตรียมเจล

	Running gel			Stracking gel
	7.5%	10%	12%	4%
Stock A(ml)	25.0	33.3	40.0	2.6
Stock B (ml)	25.0	25.0	25.0	-
Stock C (ml)	-	-	-	5.0
Stock D (µl)	700	700	700	200
H_2O (ml)	48.5	40.2	33.5	42.2
TEMED (ml)	50	50	50	25
Total (ml)	100	100	100	100

4. การเตรียมสี Esterase

- Phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0) 100 ml
- Fast bule B salt 150 ml
- α-naphthyl acetate 3 ml

(dilute 0.1 g in absolute alcohol 10 ml)

นำ Phosphate buffer ละลายให้เข้ากับ Fast bule- B salt กรองในที่มืด เติม α-naphthyl acetate ลงไป

การเตรียม Phosphate buffer pH 6.0

Stock A : monosodium phosphate ($NaH_2PO_4 H_2O$) 13.9 g/1000 ml

Stock B : disodium phosphate (Na_2HPO_4) 53.65 g/1000 ml

Stock A 88.7 มิลลิลิตร ผสมกับ Stock B 12.3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นพร้อมปรับ pH ให้ได้ 6.0 ที่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

5. การเตรียมสีย้อม peroxidase

Stock A : 3 amino- 9 ethylcarbazole 420 mg

β- napthol 290 mg

acetone 200 ml

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Stock B : Tris buffer 0.1 M, pH 4.0

Tris-hydroxymethyl aminomethane 3.78 g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Acetic acid 4.05 ml

ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับ pH ให้ได้ 4.0 ที่ปริมาตร 2.5 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Stock C : H_2O_2 3 %

H_2O_2 30 % 10.0 ml

เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

นำ Stock A: Stock B: Stock C ในอัตราส่วน 20 : 80 : 1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ก ที่ 2 จำนวนแถบและอัตราการเคลื่อนที่ของรูปแบบไอโซไซม์ esterase ของเส้นใยเห็ดโคนน้อยพันธุ์ C6, C8 และสายพันธุ์สปอร์เดี่ยว C6 16 สายเชื้อ

สายเชื้อ	จำนวนแถบ	อัตราการเคลื่อนที่ (Rf)
C6	3	0.18 0.23 0.29
C8	3	0.18 0.23 0.29
A1	-	-
A2	1	0.28
A3	1	0.21
A4	-	-
A5	1	0.32
A6	2	0.25
A7	-	-
A8	2	0.25
A9	2	0.26
A10	2	0.21 0.26
A11	1	0.25 0.29
A12	2	0.21 0.26
A13	-	0.21 0.26
A14	2	0.21 0.25
A15	2	0.21 0.26
A16	2	0.21 0.26

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ก ที่ 3 จำนวนแถบและอัตราการเคลื่อนที่ของรูปแบบไอโซไซม์ esterase ของเส้นใยเห็ดโคนน้อยพันธุ์ C6, C8 และสายพันธุ์สปอร์เดี่ยว C8 16 สายเชื้อ

สายเชื้อ	จำนวนแถบ	อัตราการเคลื่อนที่ (Rf)
C6	3	0.18 0.23 0.29
C8	3	0.18 0.23 0.29
B1	1	0.30
B2	1	0.30
B3	3	0.18 0.23 0.28
B4	3	0.18 0.23 0.28
B5	3	0.18 0.23 0.28
B6	3	0.18 0.23 0.28
B7	3	0.18 0.23 0.28
B8	3	0.18 0.23 0.28
B9	3	0.18 0.23 0.28
B10	3	0.18 0.23 0.28
B11	3	0.18 0.23 0.28
B12	3	0.18 0.23 0.28
B13	3	0.19 0.25 0.27
B14	3	0.19 0.25 0.27
B15	3	0.19 0.25 0.29
B16	3	0.19 0.25 0.29

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ก ที่ 4 จำนวนแถบและอัตราการเคลื่อนที่ของรูปแบบไอโซไซม์ peroxidase ของเส้นใยเห็ดโคนน้อยน้อยพันธุ์ C6, C8 และสายพันธุ์สปอร์เดี่ยว 16 สายเชื้อ

สายเชื้อ	จำนวนแถบ	อัตราการเคลื่อนที่ (Rf)
C6	1	0.32
C8	2	0.19 0.30
A1	1	0.32
A2	2	0.33 0.36
A3	1	0.32
A4	1	0.32
A5	2	0.30 0.34
A6	1	0.32
A7	2	0.24 0.32
A8	1	0.34
A9	1	0.34
A10	1	0.34
A11	3	0.23 0.31 0.36
A12	2	0.23 0.31 0.36
A13	2	0.34 0.36
A14	-	-
A15	1	0.34
A16	1	0.34

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ก ที่ 5 จำนวนแถบและอัตราการเคลื่อนที่ของรูปแบบไอโซไซม์ peroxidase ของเส้นใยเห็ดโคนน้อยพันธุ์ C6, C8 และสายพันธุ์สปอร์เดี่ยว 16 สายเชื้อ

สายเชื้อ	จำนวนแถบ	อัตราการเคลื่อนที่ (Rf)
C6	1	0.32
C8	2	0.19 0.30
B1	2	0.28 0.32
B2	1	0.19
B3	-	-
B4	-	-
B5	1	0.33
B6	1	0.32
B7	2	0.31
B8	2	0.31
B9	2	0.31
B10	2	0.33
B11	1	0.30
B12	1	0.30
B13	1	0.30
B14	2	0.28
B15	1	0.31
B16	1	0.31

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ก ที่ 6 จำนวนแถบและอัตราการเคลื่อนที่ของรูปแบบไอโซไซม์ esterase ของเส้นใยเห็ดโคนน้อยพันธุ์ C6, C8 และลูกผสม 10 สายพันธุ์

สายเชื้อ	จำนวนแถบ	อัตราการเคลื่อนที่ (Rf)
C6	3	0.28 0.32 0.34
C8	3	0.27 0.32 0.40
H1	3	0.29 0.33 0.41
H2	3	0.29 0.33 0.41
H3	3	0.30 0.33 0.41
H4	3	0.30 0.33 0.41
H5	3	0.30 0.36 0.41
H6	3	0.30 0.36 0.41
H7	3	0.30 0.35 0.40
H8	3	0.30 0.35 0.40
H9	1	0.36
H10	1	0.36

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ก ที่ 7 จำนวนแถบและอัตราการเคลื่อนที่ของรูปแบบไอโซไซม์ peroxidase ของเส้นใยเห็ดโคนน้อยพันธุ์ C6, C8 และลูกผสม 10 สายพันธุ์

สายพันธุ์	จำนวนแถบ	อัตราการเคลื่อนที่ (Rf)
C6	2	0.36
C8	2	0.28 0.33
H1	2	0.34 0.38
H2	1	0.26 0.37 0.41
H3	1	0.33 0.37
H4	1	0.38
H5	1	0.38
H6	-	-
H7	-	-
H8	1	0.38
H9	2	0.32 0.38
H10	3	0.32 0.38 0.40

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ก ที่ 8 แสดงอุณหภูมิสูงสุดและต่ำสุด ภายในโรงเพาะเห็ดตลอดช่วงการทดลอง เดือน กุมภาพันธ์ 2550

วัน/เดือน/ปี	อุณหภูมิ (°c)		อุณหภูมิเฉลี่ย
	สูงสุด	ต่ำสุด	(°c)
1/02/2550	27.2	12.55	19.1
2/02/2550	27.3	14.9	20.2
3/02/2550	25.5	13.2	19.0
4/02/2550	27.3	12.0	18.4
5/02/2550	29.1	12.5	19.7
6/02/2550	29.1	12.2	19.9
7/02/2550	30.6	13.7	20.4
8/02/2550	30.8	14.0	21.1
9/02/2550	33.3	16.0	22.8
10/02/2550	33.4	15.1	23.4
11/02/2550	32.1	15.8	23.3
12/02/2550	33.1	15.9	24.3
13/02/2550	33.9	16.6	24.3
14/02/2550	34.1	14.8	24.3
15/02/2550	32.6	17.6	25.5
16/02/2550	32.6	17.1	24.5
17/02/2550	32.5	17.7	25.0
18/02/2550	32.5	16.0	23.6
19/02/2550	33.3	15.9	24.0
20/02/2550	33.1	15.9	23.3
21/02/2550	34.5	14.0	23.9
22/02/2550	33.9	14.0	24.1
23/02/2550	34.6	14.9	24.5
24/02/2550	36.3	17.0	26.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ก ที่ 8 (ต่อ) แสดงอุณหภูมิสูงสุดและต่ำสุด ภายในโรงเพาะเห็ดตลอดช่วงการทดลองเดือนกุมภาพันธ์ 2550

วัน/เดือน/ปี	อุณหภูมิ (°c)		อุณหภูมิเฉลี่ย (°c)
	สูงสุด	ต่ำสุด	
25/02/2550	36.5	18.6	27.1
26/02/2550	36.5	19.6	28.0
27/02/2550	36.0	19.9	28.3
28/02/2550	34.0	18.5	26.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ข ที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดโคนน้อยทั้ง 8 แห่ง

ANOVA

SOURCE	DF	SS	MS	F	Sig.
BETWIN	7	22.340	3.191	319.137	0.000
WITHIN	16	0.160	0.010		
TOTAL	23	22.500			

ตารางภาคผนวก ข ที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนผลผลิตของเห็ดโคนน้อยทั้ง 8 แห่ง

ANOVA

SOURCE	DF	SS	MS	F	Sig.
BETWIN	7	305155.292	43593.613	1559.235	0.000
WITHIN	16	447.333	27.958		
TOTAL	23	305602.625			

ตารางภาคผนวก ข ที่ 3 ผลการตรวจสอบ Regression ของการเจริญเติบโตของเส้นใยกับผลผลิตของเห็ดโคนน้อยทั้ง 8 แห่ง

ANOVA(b)

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
1	Regression	305858.292	1	80908.525	7.914	0.010(a)
	Residual	224925.975	22	10223.908		
	Total	305834.500	23			

a Predictors: (Constant), GROWTH

b Dependent Variable: PRODUC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ข ที่ 4 ผลการวิเคราะห์ One-Sample Test เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดโคนน้อย พันธุ์ C6 และ C8 สายพันธุ์ละ 30 สายเชื้อ

One-Sample Test

TYPE	N	Mean	SD	Std. Error Mean
C6	30	4.1750	0.93345	0.17042
C8	30	2.2000	1.03057	0.18815

ตารางภาคผนวก ข ที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนผลผลิตของเห็ดโคนน้อยพันธุ์ลูกผสม 10 สายพันธุ์, พันธุ์ C6, C8 และ พันธุ์การค้า 3 พันธุ์ ที่ 15 วัน เพาะในช่วงฤดูหนาว (กุมภาพันธ์, 2550)

ANOVA

SOURCE	DF	SS	MS	F	Sig.
BETWIN	14	352258.57778	2516.3270	6.5615	0.000
WITHIN	30	115040.6667	3834.6889		
TOTAL	44	467299.2444			

ตารางภาคผนวก ข ที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนผลผลิตของเห็ดโคนน้อยพันธุ์ลูกผสม 10 สายพันธุ์, พันธุ์ C6, C8 และ พันธุ์การค้า 3 พันธุ์ ที่ 20 วัน เพาะในช่วงฤดูหนาว (กุมภาพันธ์, 2550)

ANOVA

SOURCE	DF	SS	MS	F	Sig.
BETWIN	14	327936.800	2342.0571	5.6105	0.000
WITHIN	30	125252.000	4175.0667		
TOTAL	44	453188.800			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล	นางสาวงามจิตร ดวงดี
วัน เดือน ปี เกิด	18 มิถุนายน 2522
ประวัติผู้เขียน	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนฮอดพิทยาคม ปีการศึกษา 2540 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันราชภัฏเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2544

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved