บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เห็ดโคนน้อยที่ได้ทำการรวบรวมจากสถานที่ต่างๆ ซึ่งมีทั้งสายพันธุ์ที่ผลิตเป็นการค้าและสายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติรวม 8 สายพันธุ์ ได้จากจังหวัดเชียงใหม่ 7 สายพันธุ์ และจังหวัดลำปาง 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 สถานที่รวบรวมเชื้อเห็ดและลักษณะของเห็ดโคนน้อยทั้ง 8 แหล่ง

ลำดับ	สถานที่เก็บรวบรวมเชื้อเห็ด	ลักษณะของดอกเห็ด	ขนาดดอก (cm)
1	กรมวิชาการเกษตร 1	ดอกเห็ดขนาดเล็ก ก้านดอกยาว	0.5-1.0
2	กรมวิชาการเกษตร 2	ดอกเห็ดขนาดใหญ่ ก้านดอกสั้น	2.0-3.0
3	บ้านท่ากว้าง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่	ดอกเห็ดขนาดกลาง ก้านดอกยาว	1.5-2.0
4	บ้านโป่ง อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่	ดอกเห็ดขนาดกลาง ก้านดอกยาว	1.5-2.0
5	ฟาร์มเห็ดเจษฎา อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่	ดอกเห็ดขนาดกลาง ก้านดอกยาว	1.5-2.0
6	ศูนย์เห็ดล้านนา อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่	ดอกเห็ดขนาดกลาง ก้านดอกยาว	1.5-2.0
7	ฟาร์มเห็ดบ้านสวน อำเภอห้างฉัตร จังหวัดลำปาง	ดอกเห็ดขนาดกลาง ก้านดอกยาว	1.5-2.0
8	เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ดอกเห็ดขนาดกลาง ก้านดอกยาว	1.5-2.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์และสารเคมี

1. หม้อนึ่งความดัน
2. ตู้เขี่ยเชื้อ
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. แอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ (Ethyl alcohol)
5. แอลกอฮอล์สำหรับจุดไฟ (Methyl alcohol)
6. เข็มเขี่ย มีดผ่าตัด และปากคีบ
7. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
8. กล้องจุลทรรศน์
9. สีย้อม phoxin B
10. กระดาษสำหรับดักสปอร์
11. จานเลี้ยงเชื้อ
12. หลอดทดลอง
13. ขวดกลม
14. สำลี
15. มันฝรั่ง
16. น้ำตาลกลูโคสและผงวุ้น
17. เมล็ดข้าวฟ่าง
18. ฟาง
19. ปุ๋ยสูตร 15-0-0
20. รำละเอียด
21. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
22. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
23. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
24. ตู้แช่ที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส
25. เครื่องทำความเย็น (cooling unit)
26. ชุดสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ slab gel
27. เครื่องจ่ายกระแสไฟ
28. eppendrop tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
29. โกร่งบด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

30. เครื่องแก้วต่างๆ

31. ถุงมือ

32. กระดาษกรอง

33. ส่วนประกอบของเจล

34. extraction buffer

35. electrode buffer

36. สีย้อม

37. markerdye

38. น้ำแข็ง

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของเห็ดโคนน้อย

จากการเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนน้อยจากสถานที่ต่างๆ ซึ่งมีทั้งสายพันธุ์ที่ผลิตเป็นการค้าและสายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติรวม 8 สายพันธุ์ จากนั้นนำดอกเห็ดที่เก็บรวบรวมได้ ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยจากเนื้อเยื่อของดอกเห็ดในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นพีดีเอ เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเส้นใย จากนั้นนำเส้นใยของเห็ดโคนน้อยทั้งหมดไปทำเป็นหัวเชื้อในเมล็ดข้าวฟ่างแล้วนำไปเพาะในโรงเรือน เพื่อทดสอบผลผลิตใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 2 การแยกและการคัดเลือกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว

นำดอกเห็ดโคนน้อยที่ได้ทำการคัดเลือกจากการทดลองที่ 1 จำนวน 2 สายพันธุ์ มาดักสปอร์ นำสปอร์ที่ได้ไปเจือจางและนำไปเลี้ยงในอาหารวุ้นพีดีเอ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่เป็นโมโนคาริออน หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นพีดีเอ โดยทำการวัดการเจริญเติบโตและแบ่งการเจริญออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มเส้นใยที่เจริญเร็ว เจริญปานกลาง เจริญช้า และเจริญช้ามาก คัดเลือกตัวแทนกลุ่มการเจริญมาอย่างละ 4 สายพันธุ์ เพื่อนำไปใช้ในการผสมพันธุ์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการเตรียมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Monokaryons)

1. การดักสปอร์เห็ด นำดอกเห็ดโคนน้อยที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาทำความสะอาด โดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดให้ทั่วดอกเห็ด วางดอกเห็ดลงบนจานเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาด 15 × 14.5 เซนติเมตร โดยมีกระดาษชิ้นเล็กๆ ตัดเป็นรูปวงกลม กระจายอยู่ในจานเลี้ยง ซึ่ง

จานเลี้ยงเชื้อและกระดาษนั้นต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ในตู้ต่อเชื้อ ประมาณ 15 ชั่วโมง สปอร์เห็ดจะตกลงสู่กระดาษชิ้นเล็กๆ ภายในจานเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 การดักสปอร์ของเห็ดโคนน้อย

2. การลดความหนาแน่นของสปอร์ ใช้เข็มเขี่ยลนไฟรอให้เย็น จิ้มลงไปบนกระดาษที่มีสปอร์นำกระดาษใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ใช้เวลา 45 นาที เขย่าให้สปอร์ละลายลงไปในน้ำ ดูดน้ำละลายสปอร์จากหลอดที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 2 ที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และทำเจือจางต่อไปอีก 3 ครั้ง

3. การเพาะสปอร์และการแยกเส้นใย โดยใช้ปลายเข็มเขี่ยแบบหลูป (loop) จุ่มลงในหลอดที่มีน้ำละลายสปอร์ครั้งสุดท้าย น้ำละลายสปอร์จะติดที่ปลายหลูป จากนั้นนำปลายหลูปไปลากบนอาหารวุ้นพีดีเอ ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 วันสปอร์จะเริ่มงอก ตัดแยกสปอร์เดี่ยวใส่หลอดอาหารวุ้นพีดีเอ ทิ้งไว้ประมาณ 4-5 วัน

4. การตรวจเส้นใย นำเส้นใยมาย้อมสี phoxine B โดยใช้โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 Nให้เส้นใยกระจายตัวแล้วตรวจสอบการเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าหากไม่พบ (clamp connection) แสดงว่าจะเป็นเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryons) หากพบ (clamp connection) แสดงว่าจะเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryons)

5. การวัดและการจำแนกการเจริญเติบโตของเส้นใย จะทำการวัดการเจริญเติบโตของเส้นใยในแต่ละหลอด โดยจะเริ่มทำการวัดจากก้นหลอดไปจนถึงปลายหลอดที่มีเส้นใยเจริญอยู่ ซึ่งสามารถ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบ่งการเจริญของเส้นใยออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเส้นใยที่เจริญเร็ว เจริญปานกลาง เจริญช้า และเจริญช้าที่สุด

6. คัดเลือกตัวแทนกลุ่มการเจริญของเส้นใยของเห็ดโคนน้อยทั้งสองสายพันธุ์ โดยทำการคัดแต่ละกลุ่มการเจริญมาอย่างละ 4 สายเชื้อ เพื่อใช้ในการผสมพันธุ์ต่อไป

การทดลองที่ 3 การผสมพันธุ์จากสปอร์เดี่ยว

วิธีการ

1. ผสมพันธุ์สปอร์เดี่ยวของเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกจากการทดลองที่ 2 ซึ่งคัดเลือกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวจากพันธุ์ C6 และ C8 สายพันธุ์ละ16 สายเชื้อ ทำการผสมแบบพบกันหมด ได้ลูกผสมทั้งหมด 256 คู่ผสม ผสมในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นพีดีเอ โดยตัดเส้นใยมาวางเป็นคู่ห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร จากนั้นประมาณ 3-4 วัน เส้นใยทั้งสองสายพันธุ์จะประสานกัน ตัดชิ้นส่วนบริเวณที่ประสานกันนี้มาตรวจสอบการผสมได้ของเส้นใย โดยการตรวจสอบข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคัดเอาเฉพาะเส้นใยที่สามารถผสมกันได้มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นพีดีเอ (ภาพที่ 5)

2. นำเส้นใยที่สามารถผสมกันได้มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีเมล็ดข้างฟ่างเป็นอาหารเพื่อศึกษาความสามารถในการเกิดดอกในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 5 การผสมพันธุ์จากสปอร์เดี่ยว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 4 การคัดเลือกลูกผสม

นำลูกผสมที่ได้จากการทดลองที่ 4 มาทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีเมล็ดข้าวฟ่างเป็นอาหาร นำไปเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิที่ 15, 20 และ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน จากนั้นนำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาการออกดอกของเห็ดโคนน้อย โดยจะทำการคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมที่สามารถเกิดดอกได้ในสภาพอุณหภูมิที่ต่ำสุด และสามารถให้ผลผลิตที่สูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 5 การทดสอบผลผลิตของสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้รับการคัดเลือก

คัดเลือกลูกผสมที่ได้จากการทดลองที่ 5 มาทดสอบผลผลิตในช่วงฤดูหนาว โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์จำนวน 3 ซ้ำ เพาะเห็ดโคนน้อยในสภาพโรงเรือน โดยใช้วิธีเพาะด้วยฟางแบบมัดก้อน

วิธีการ

1. มัดและตัดฟางให้เป็นท่อน โดยแต่ละท่อนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-12 นิ้ว ยาว 40 เซนติเมตร

2. ต้มน้ำปุ๋ย โดยใช้ปุ๋ยสูตร 15-0-0 อัตราส่วน 2 กิโลกรัมต่อน้ำ 150 ลิตร ที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส

3. นำฟางที่ตัดเป็นท่อนๆ จุ่มลงไปในน้ำต้มปุ๋ย นาน 3-5 นาที นำขึ้นมาจากหม้อต้มจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น

4. นำเชื้อเห็ดมาคลุกกับรำละเอียดในอัตราส่วน เชื้อเห็ด 1 ถุงต่อรำละเอียด 1 กำมือ

5. นำฟางมาเรียงในบล็อกขนาด 30 × 45 เซนติเมตร ให้หนาประมาณ 3 เซนติเมตร โรยเชื้อเห็ดที่ผสมกับรำละเอียดแล้วโรยลงไปให้ทั่วฟาง ทำชั้นที่สองต่อโดยนำฟางมาเรียงทับชั้นที่หนึ่งให้มีความหนาประมาณ 5 เซนติเมตร โรยเชื้อเห็ดลงไปบริเวณขอบ การทำก้อนเชื้อจะทำประมาณสามชั้น โดยชั้นบนสุดจะโรยเชื้อเห็ดโคนน้อยให้ทั่วและปิดทับด้วยฟางหนาประมาณ 3 เซนติเมตร จากนั้นมัดก้อนเชื้อเห็ดด้วยเชือกฟาง

6. รดน้ำให้ทั่วก้อนจากนั้นยกก้อนเห็ดไปไว้ในโรงเรือน

การบันทึกผลการทดลอง

1. การเจริญเติบโตของเส้นใย
2. ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดดอก
3. ปริมาณผลผลิตของเห็ดโคนน้อย
4. อายุของการเก็บเกี่ยวผลผลิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 6 ศึกษาลักษณะแถบไอโซไซม์ในเส้นใยเห็ดโคนน้อยโดยใช้เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซีส

โดยนำเส้นใยสปอร์เดี่ยวจากสายพันธุ์ C6, C8 และลูกผสมที่ได้รวมทั้งพ่อแม่ (C6, C8) มาศึกษาไอโซไซม์ esterase และ peroxidase เพื่อนำมาเปรียบเทียบลักษณะของแถบสีที่เกิดขึ้น

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างเส้นใยเห็ดโคนน้อย 44 สายพันธุ์ ได้แก่พันธุ์ C6, C8 สปอร์เดี่ยวของพันธุ์ C6 จำนวน 16 สายเชื้อ , สปอร์เดี่ยวของพันธุ์ C8 จำนวน 16 สายเชื้อ และลูกผสม 10 สายพันธุ์

นำเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 10 วัน มาชั่งน้ำหนัก 3 กรัม แล้วเก็บไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเส้นใยมาบดในโกร่งพร้อมกับเติม extraction buffer 5 มิลลิลิตร นำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ดูด supernatant ที่ได้เก็บไว้ในหลอด eppendrop แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อจะทำการวิเคราะห์จึงผสม supernatant 90 เปอร์เซ็นต์ กับ marker 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน

2. การเตรียมเจล

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสใส่ running gel ที่เตรียมไว้สูงประมาณ 12 เซนติเมตร แล้วใส่น้ำกลั่นเพื่อทำให้ผิวหน้าของเจลเรียบ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เจลเกิด polymerization แล้วใส่ stacking gel พร้อมกับ comb ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อรอให้เจลเกิด polymerization อีกครั้งจึงนำ comb ออก แล้วล้างผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น

3. การประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส

ประกอบชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยเติม electrode buffer ลงใน chamber

4. หยดตัวอย่าง

หยดตัวอย่างลงไปในแต่ละช่องของเจล ช่องละหนึ่งตัวอย่าง จำนวน 20 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย

5. การผ่านกระแสไฟฟ้า

ผ่านกระแสไฟฟ้า โดยควบคุมค่าความต่างศักย์ที่ 200 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่มี maker จะเคลื่อนที่ลงมาจนระดับของ maker อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจลประมาณ 1 นิ้ว ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 20 นาที จึงหยุดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากชุด อิเล็กโทรโฟรีซีส

6. การย้อมสี

นำแผ่นเจลไปกระตุ้นให้เกิดสี โดยนำไปทำปฏิกิริยากับ substrate ของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยวิธีการเตรียมสารเคมีได้ (ภาคผนวก ก)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกข้อมูล

บันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์แต่ละชนิดของสายเชื้อเห็ดที่ได้เป็นภาพถ่ายของแถบสี และวาดภาพ zymogram ของไอโซไซม์ดังกล่าว แสดงตำแหน่ง จำนวน และขนาดของแถบสี วัดค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสี (ศิวาพร, 2547)

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของเอนไซม์จากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ maker dye จากจุดเริ่มต้น}}$$

สถานที่ใช้ในการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. โรงปฏิบัติการเห็ดภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. โรงเรือนเพาะเห็ดโคนน้อย ตำบลหางดง อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ตั้งแต่ เดือนพฤษภาคม 2549 ถึง เดือนมีนาคม 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved