บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1 ผลของอัตราส่วนขี้เลื่อยไม้ฉำฉาและขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่มีผลต่อผลผลิตเห็ดนางรมชนิดสีเทา พันธุ์ C.M. 5

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 10 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1 ใช้ขี้เลื่อยไม้ฉำฉาอย่างเดียว กรรมวิธีที่ 2 ถึง กรรมวิธีที่ 4 อัตราส่วนระหว่างขี้เลื่อยไม้ฉำฉาและขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็น 3:1 1:1 และ 1:3 ตามลำดับ และกรรมวิธีที่ 5 ใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพาราอย่างเดียว โดยหนึ่งหน่วยการทดลองใช้ถุงเพาะเห็ด 10 ถุง

อุปกรณ์

1. ขี้เลื่อยไม้ฉำฉา และขี้เลื่อยไม้ยางพารา (น้ำหนักสด)
2. รำละเอียด
3. ปูนขาว
4. แมกนีเซียมซัลเฟต
5. ถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 6.5 นิ้ว X 13 นิ้ว
6. คอขวดพลาสติก
7. หม้อนึ่งความดัน
8. หม้อนึ่งลูกทุ่ง
9. หัวเชื้อเห็ดนางรมชนิดสีเทาพันธุ์ CM. 5 ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่าง

วิธีการ

1. วิธีการผสม

กรรมวิธีที่ 1 ขี้เลื่อยไม้ฉำฉา 35 กิโลกรัม
กรรมวิธีที่ 2 ขี้เลื่อยไม้ฉำฉา 26.25 กิโลกรัม ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 8.75 กิโลกรัม
กรรมวิธีที่ 3 ขี้เลื่อยไม้ฉำฉาและ ขี้เลื่อยไม้ยางพาราอย่างละ 17.5 กิโลกรัม
กรรมวิธีที่ 4 ขี้เลื่อยไม้ฉำฉา 8.75 กิโลกรัม ไม้ยางพารา 26.25 กิโลกรัม
กรรมวิธีที่ 5 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 35 กิโลกรัม

ในแต่ละกรรมวิธีผสมคลุกเคล้าส่วนผสมให้เข้ากัน เติมรำละเอียด 3.5 กิโลกรัม ปูนขาว 350 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 70 กรัม ส่วนผสมต่าง ๆ ได้มาจากสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเห็ดนางรมของโรงปฏิบัติการเห็ด ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มีดังนี้

ขี้เลื่อย 100 กิโลกรัม

รำละเอียด 10 กิโลกรัม

ปูนขาว 1 กิโลกรัม

แมกนีเซียมซัลเฟต 200 กรัม

(สูตรอาหารนี้สามารถบรรจุถุงได้ 300 ถุง แต่ละถุงหนัก 850 กรัม) จากนั้นเติมน้ำลงไปในส่วนผสมเพื่อปรับความชื้นให้ได้ 65 เปอร์เซนต์ ผสมคลุกเคล้าให้ความชื้นกระจายไปทั่ว สูตรในการปรับความชื้น คือ

$$D = (100 - A) B / 100 - C$$

A = เปอร์เซนต์ความชื้นที่ต้องการ

B = น้ำหนักขี้เลื่อยที่ต้องการใช้ (ผสมแล้ว)

C = ความชื้นที่มีอยู่ในขี้เลื่อยเดิม

D = ขี้เลื่อยที่ต้องใช้

2. บรรจุส่วนผสมดังกล่าวลงในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 6.5 นิ้ว X 13 นิ้ว โดยใส่ถุงละ 850 กรัม จากนั้นอัดส่วนผสมด้วยเครื่องอัด และใส่คอขวดรัดด้วยยางรัด หุ้มคอขวดด้วยกระดาษใช้ยางรัด

3. ทำเครื่องหมายที่ข้างถุงของแต่ละกรรมวิธี

4. จากนั้นนำถุงวัสดุเพาะทั้งหมดไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งลูกทุ่ง ซึ่งเป็นถังน้ำ 200 ลิตร นึ่งนานประมาณ 3 ชั่วโมง นับจากน้ำเดือด

5. เมื่อครบเวลาเอาถุงวัสดุเพาะออกจากถัง ทิ้งไว้ให้เย็น

6. ทำการต่อเชื้อโดยใช้หัวเชื้อเห็ดนางรมชนิดสีเทา พันธุ์ C.M. 5 ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่าง ใส่ลงไปในถุงวัสดุเพาะ ประมาณ 5-10 เมล็ด วิธีการนี้ทำในห้องต่อเชื้อ

7. ย้ายถุงวัสดุเพาะไปบ่มในห้องบ่มเชื้อจนกว่าเชื้อจะเดินเต็มถุง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 วัน

8. เมื่อเชื้อเดินเต็มถุงแล้วย้ายถุงเพาะไปห้องเปิดดอกเห็ดซึ่งเป็นห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ

9. ภายใน 14 วัน เริ่มเก็บดอกเห็ด และบันทึกข้อมูล

10. การหาจำนวนหน่วยการทดลองที่เหมาะสมนั้น จะนำน้ำหนักเฉลี่ยของเห็ดนางรมชนิดสีเทา พันธุ์ CM.5 (ยกเว้นหน่วยการทดลอง 1 ถุง ที่ไม่ต้องเฉลี่ย) ของแต่ละถุง เช่น หน่วยการทดลอง 2 ถุง ก็เฉลี่ยจาก 2 ถุง โดยให้อัตราส่วนขี้เลื่อยเป็นทรีตเม้นแล้วคำนวณหาค่า CV (%)

การบันทึกข้อมูล

1. จำนวนหน่วยการทดลองที่เหมาะสม

2. น้ำหนักสด (กรัม)

3. วิเคราะห์ข้อมูลโดยการใช้โปรแกรม statistix vertion 3.5 ของ NH analytical software โดยการวิเคราะห์ test of AOV assumtion analysis of variance ANOVA CV. และ LSD.

การทดลองที่ 2 ผลของความชื้นของวัสดุเพาะที่มีผลต่อผลผลิตเห็ดนางรมชนิดสีเทาพันธุ์ C.M. 5

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 12 ซ้ำ 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1 2 และ 3 ระดับความชื้น 60 65 และ 70 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ โดยหนึ่งหน่วยการทดลอง ใช้ถุงเพาะเห็ด 5 ถุง

อุปกรณ์

เหมือนการทดลองที่ 1

วิธีการ

1. ทุกกรรมวิธีใช้ขี้เลื่อยไม้ฉำฉาและขี้เลื่อยไม้ยางพารา อย่างละ 12 กิโลกรัม

2. ใส่รำละเอียด 2.4 กิโลกรัม ปูนขาว 240 กรัม และ แมกนีเซียมซัลเฟต 48 กรัม ในทุกกรรมวิธี

3. ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน ปรับความชื้นของแต่ละกรรมวิธีเป็น 60 65 และ 70 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

4. ขั้นตอนต่อไปเหมือนขั้นตอนที่ 2 ถึง ขั้นตอนที่ 9 ในการทดลองที่ 1

การบันทึกข้อมูล

1. น้ำหนักสดของดอกเห็ด (กรัม)

2. วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ โปรแกรม statistix vertion 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AVO assumtion analysis of variance ANOVA CV. และ LSD. Polynomial contrast

การทดลองที่ 3 ผลของรูรั่วที่ก้นถุงเพาะเห็ด ที่มีต่อผลผลิตเห็ดนางรมชนิดสีเทาพันธุ์ C.M. 5

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 12 ซ้ำ 4 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1 ไม่มีรูรั่วที่ก้นถุง กรรมวิธีที่ 2 ถึงกรรมวิธีที่ 4 รูรั่วที่ก้นถุง 1 2 และ 3 รู ตามลำดับ โดยหนึ่งหน่วยการทดลองใช้ถุงเพาะเห็ด 5 ถุง

อุปกรณ์

เหมือนการทดลองที่ 1

วิธีการ

1. คัดเลือกถุงพลาสติกที่ไม่มีรูรั่วก้นถุง ทดสอบโดยใส่น้ำลงไปในถุงเพื่อตรวจสอบการรั่วของถุงเพาะเห็ด

2. ผสมขี้เลื่อยไม้ยางพารา และขี้เลื่อยไม้ฉำฉาให้เข้ากันโดยใช้อย่างละ 43 กิโลกรัม ใส่รำละเอียด 8.6 กิโลกรัม ปูนขาว 860 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 172 กรัม ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน เติมน้ำให้ความชื้นของส่วนผสมอยู่ที่ระดับ 70 เปอร์เซนต์ คลุกเคล้าให้ความชื้นของส่วนผสมกระจายสม่ำเสมอ

3. นำส่วนผสมดังกล่าวบรรจุลงในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 6.5 นิ้ว X 13 นิ้ว โดยใส่ถุงละ 850 กิโลกรัม จากนั้นอัดส่วนผสมด้วยเครื่องอัด พร้อมกับสวมคอขวดใช้ยางรัด หุ้มด้วยกระดาษใช้ยางรัด

4. ใช้เข็มหมุดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร เจาะที่ก้นถุงตามกรรมวิธี 2 3 และ 4 คือรูรั่วที่กันถุง 1 2 และ 3 ตามลำดับ

5. ขั้นตอนต่อไปเหมือนวิธีการที่ 3 ถึงวิธีการที่ 9 ของการทดลองที่ 1

การบันทึกผล

1. น้ำหนักสดของดอกเห็ด (กรัม)

2. เปอร์เซนต์การปนเปื้อน (contaminate)

3. วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม statistix vertion 3.5 ของ NH analytical softwore โดยวิเคราะห์ test of AOV assumtion analysis of variance ANOVA CV. และ LSD.

การทดลองที่4 ผลของน้ำหนักวัสดุเพาะต่อถุงที่เหมาะสมต่อผลผลิตเห็ดนางรมชนิดสีเทาพันธุ์ C.M. 5

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 12 ซ้ำ มี 3 กรรมวิธี คือกรรมวิธีที่ 1 น้ำหนักวัสดุเพาะ 500 กรัมต่อถุง กรรมวิธีที่ 2 675 กรัมต่อถุง กรรมวิธีที่ 3 850 กรัมต่อถุง โดยหนึ่งหน่วยการทดลองใช้ถุงเพาะเห็ด 5 ถุง

อุปกรณ์

เหมือนการทดลองที่ 1

วิธีการ

1. ผสมขี้เลื่อยไม้ฉำฉาและขี้เลื่อยไม้ยางพารา อย่างละ 26.5 กิโลกรัม ใส่รำละเอียด 5.3 กิโลกรัม ปูนขาว 530 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 106 กรัม ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน เติมน้ำให้ความชื้นของส่วนผสมอยู่ที่ระดับ 70 เปอร์เซนต์ คลุกเคล้าให้ความชื้นกระจายสม่ำเสมอ

2. นำส่วนผสมบรรจุลงในถุงพลาสติกขนาด 6.5 นิ้ว X 13 นิ้ว โดยกรรมวิธีที่ 1 ใส่ 500 กรัม กรรมวิธีที่ 2 675 กรัม และกรรมวิธีที่ 3 850 กรัม อัดส่วนผสมด้วยเครื่องอัด สวมคอขวดรัดด้วยยางรัด และหุ้มด้วยกระดาษรัดด้วยยางรัด

3. กรรมวิธีต่อไปทำเหมือนวิธีการที่ 3 ถึง วิธีการที่ 9 ของการทดลองที่ 1

การบันทึกผล

1. จำนวนวันในบ่มเชื้อ (วัน)

2. น้ำหนักสด (กรัม)

3. วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม statistix vertion 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumtion analysis of variance ANOVA CV. และ LSD.

การทดลองที่ 5 การประเมินความสามารถของเส้นใยลูกผสม ในด้านการเจริญเติบโตของเส้นใย และการให้ผลผลิตของเห็ด โดยการวิเคราะห์เอนไซม์ acid phosphatase, esterase และโปรตีน

อุปกรณ์

1. เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Monokaryon=เส้นใยขั้นที่ 1) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยว 20 สายพันธุ์
2. โกร่งสำหรับบดตัวอย่างพืช
3. เครื่องเหวี่ยง (centrifuge)
4. ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง - 20° ซ
5. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
6. เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบ vertical gel rod
7. เครื่องจ่ายกระแสไฟ (power supply)
8. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น บิกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ ฯลฯ
9. วัสดุอื่น ๆ เช่น ถุงมือ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร ฯลฯ
10. อุปกรณ์ในการเพาะเห็ดเหมือนการทดลองที่ 1

วิธีการ

1. การเตรียมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Monokaryons)

1.1 นำดอกเห็ดนางรมชนิดสีเทา พันธุ์ C.M. 5 ตัดก้านออกให้ก้านติดดอกเห็ดเล็กน้อย จากนั้นทำความสะอาดโดยเช็ดด้วยแอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซนต์ เช็ดให้ทั่วดอกเห็ด วางดอกเห็ดลงในจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาด 15 x 14.5 ซ.ม. โดยมีกระดาษชิ้นเล็ก ๆ กระจายอยู่ในจาน จานเลี้ยงเชื้อและกระดาษนั้นต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาจานโดยแง้มฝาจานไว้เล็กน้อย เพื่อไม่ให้ความชื้นมากเกินไป ดังภาพที่ 2 ทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง สปอร์เห็ดก็จะตกลงสู่กระดาษชิ้นเล็ก ๆ นั้น ดังภาพที่ 3

1.2 ใช้เข็มเขี่ยลนไฟให้ร้อน จิ้มลงไปบนกระดาษที่มีสปอร์อยู่ ใส่กระดาษลงไปในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 มล. ใส่ 2 ชิ้น เขย่าให้สปอร์หลุดจากกระดาษกระจายทั่วไปในน้ำ ซึ่งเรียกว่าน้ำละลายสปอร์ (ดีพร้อม, 2523)

1.3 เอาน้ำละลายสปอร์มา 1 มล. ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 ซี.ซี. เขย่าให้เข้ากัน ทำอย่างนี้อีกติดต่อกัน 3 ครั้ง รวมเป็น 4 ครั้ง

1.4 ใช้ปลายหลูป (loop) จุ่มลงในหลอดที่มีน้ำละลายสปอร์ครั้งสุดท้ายอยู่ น้ำละลายสปอร์จะติดที่ปลายหลูป จากนั้นนำปลายหลูปไปลากไปมาบนอาหารวุ้นพีดีเอ (potato detose agar) ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง วิธีการนี้ทำในสภาพปลอดเชื้อ

อาหารวุ้น พีดีเอเตรียมจาก

มันฝรั่งปลอกเปลือกหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยม 200 กรัม

กลูโคส 20 กรัม

ผงวุ้นทำขนม 13-15 กรัม

น้ำ 1 ลิตร

1.5 ทิ้งไว้ประมาณ 5 วันสปอร์จะเริ่มงอก นำสปอร์ที่งอกมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้น พีดีเอ อยู่ 2 สปอร์ต่อ 1 หลอดโดยวางห่างกันประมาณ 3 ซม.

1.6 ประมาณ 3 วัน ตรวจสอบว่าสปอร์ที่งอกนั้นเกิดจากสปอร์เดี่ยวหรือไม่ (monokaryons) โดยการนำเส้นใยมาย้อมสี Lectophenol cotton blue ที่เตรียมจาก

Phenol	10	gm
Lactic acid	10	gm
Glycerine	10	gm
Aniline blue	0.02	gm
น้ำกลั่น	100	มล. (วิชชา, 2524)

ตรวจสอบการเกิดข้อยืดระหว่างเซล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าไม่พบข้อยืดระหว่างเซลแสดงว่าเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryons) ซึ่งจากหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นพีดีเอ ที่เลี้ยงสปอร์ทั้งหมด 120 หลอด หรือ 240 สปอร์ พบเส้นใยที่ไม่มีข้อยืดระหว่างเซล 42 สายพันธุ์ (strain)

1.7 ตัดเส้นใยที่ไม่มีข้อยืดระหว่างเซล ทั้ง 42 สายพันธุ์ไปวัดการเจริญของเส้นใย โดยการนำไปเพาะเลี้ยงในขวดแบนขนาดบรรจุ 375 มล. (ภาพที่ 4) การวัดการเจริญของเส้นใย จะวัดถึงวันที่ 9 นับจากวันเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากมีเส้นใยที่ไม่มีข้อยืดระหว่างเซล บางสายพันธุ์จะเจริญเต็มขวดในวันที่ 9 นับจากวันต่อเชื้อ

1.8 วัดการเจริญของเส้นใยในแต่ละขวดโดยวัด 4 จุด จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ยของแต่ละสายพันธุ์ นำค่าเฉลี่ยของการเจริญ ทั้ง 42 สายพันธุ์ ไปหาค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน (standard deviation =SD) ซึ่งสามารถแบ่งการเจริญของเส้นใยได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ A คือ เส้นใยเจริญเร็วมาก B คือ เส้นใยเจริญเร็ว C คือ เส้นใยเจริญช้า D คือ เส้นใยเจริญช้ามาก โดยเลือกมากลุ่มละ 5 สายพันธุ์ รวมเป็น 20 สายพันธุ์

1.9 ตัดเส้นใยทั้ง 20 สายพันธุ์ ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาดบรรจุ 250 มล. อาหารเหลวประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม กลูโคส 20 กรัม น้ำ 1 ลิตร โดยใส่อาหารขวดละ 100 มล. ใส่เส้นใย 1 สายพันธุ์ ต่อ 1 ขวด เลี้ยงไปประมาณ 30 วัน เส้นใยก็จะเดินเต็มผิวหน้าอาหารเหลว

1.10 เมื่อเส้นใยเดินเต็มผิวหน้าอาหารเหลวแล้ว นำเส้นใยมาล้างทำความสะอาด แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษ What man No.1 ซึ่งจะได้เส้นใยหนัก 3-5 กรัม ต่อขวดรูปชมพู่ 1 ขวด

2. การบดเส้นใยเพื่อสกัด ไอโซไซม์

2.1 นำเส้นใยที่ได้มาบดในโกร่งบด (โกร่งบดเส้นใยเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20° ซ) สายพันธุ์ละ 3 กรัม ในขณะที่บดเติม Tris-buffer 0.1 M pH 8.2 5 มล. บดเส้นใยและสารละลายให้เข้ากัน

2.2 เมื่อบดเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว กรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น

2.3 ใส่หลอดเหวี่ยง เข้าเครื่องเหวี่ยง หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ ดูดน้ำใสที่อยู่ตอนบนของหลอดเหวี่ยง ใส่ในขวด vial ซึ่งใส่ glycerine 0.1 มล. เขย่าให้เข้ากันเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง - 20° ซ เพื่อนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซีสต่อไป

3. การเตรียม vertical gel rod

3.1 การเตรียมหลอดสำหรับใส่เจล (gel tube)

ใช้หลอดแก้วกลวงโปร่งใส รูปร่างทรงกระบอก ความยาว 8 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 0.7 ซม. หลอดแก้วนี้จะล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด ทิ้งให้แห้ง แล้วอบในตู้อบอุณหภูมิ 80° ซ นาน 12 ชั่วโมง หลอดแก้วที่อบแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นใช้แผ่น parafilm พันปิดท้ายหลอดด้านหนึ่งไว้ให้แน่น นำไปวางบน stand ที่เตรียมไว้ โดยให้แต่ละหลอดตั้งฉากกับ stand

3.2 สารละลายสำหรับการเตรียมเจล

stock solution

A (pH 8.9)	เตรียมจาก	1N-HCl	48.00	ml
		Tris-buffer *	36.60	gm
		TEMED **	0.23	ml
		น้ำกลั่น	100.00	ml
B (pH 6.7)	เตรียมจาก	1N-HCl	48.00	ml
		Tris-buffer	5.98	gm
		TEMED	0.46	ml
		น้ำกลั่น	100.00	ml
C	เตรียมจาก	Acrylamide	28.00	gm
		BIS-acrylamide	0.735	gm
		น้ำกลั่น	100.00	ml

stock solution

D	เตรียมจาก	Acrylamide	15.00	gm
		BIS-acrylamide	2.5	gm
		น้ำกลั่น	100.00	ml
E	เตรียมจาก	Riboflavin	4.00	mg
		น้ำกลั่น	100.00	ml
F	เตรียมจาก	Ammonium persulphate	0.1	gm
		น้ำกลั่น	100.00	ml

* = Tris-hydroxymethyl aminomethane

** = N,N,N,ʹ N, Nʹ - Tetramethylnediamine

4. การผสม stock solution สำหรับการเตรียมเจล

stock solution	separating gel 7 %
A	1 ส่วน
C	2 ส่วน
น้ำกลั่น	1 ส่วน
F	4 ส่วน
stock solution	**spacer gel 3.75 %**
B	1 ส่วน
D	2 ส่วน
E	1 ส่วน
sucrose 40 %	4 ส่วน

5. การเตรียม separating gel : 7 % polyacrylamide gel

5.1 ผสมสารละลาย stock solution ต่าง ๆ โดยเตรียมเจลปริมาณทั้งหมด 40 มล. สำหรับใส่หลอดเจล (gel tube) จำนวน 20 หลอด

5.2 กวนส่วนผสมต่าง ๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน หยดเจลที่ได้ลงไปในหลอดอย่างช้า ๆ โดยใช้หลอดหยด (dropper) โดยให้ความสูงของเจลเป็น 6 ซม. เท่ากันทุกหลอด (ใช้เวลาทั้งหมดไม่ควรเกิน 5 นาที มิฉะนั้นเจลจะแข็งตัว)

5.3 ทำให้ผิวหน้าเจลเรียบโดยใช้เข็มฉีดยา ดูดน้ำกลั่นหยดบนผิวหน้าเจลอย่างช้า ๆ โดยใส่สูงประมาณ 0.5 ซม. เหนือผิวเจล เพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ประมาณ 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

6. การเตรียม spacer gel : 3.75 % polyacryamide gel

6.1 ผสม stock solution ต่าง ๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

6.2 เทน้ำกลั่นที่ล้างผิวหน้าเจลทิ้ง แล้วหยดสารละลาย spacer gel ลงไปแล้วเททิ้งเพื่อล้างน้ำกลั่น หยดสารละลาย spacer gel ลงไปอีกครั้งหนึ่งให้สูงจากผิวหน้าเจล 0.5 ซม. แล้วหยดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าของ spacer gei เพื่อปรับผิวหน้าเจลให้เรียบทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

7. การทำอิเล็กโตรโฟรีซีส

7.1 นำหลอดที่มีเจลอยู่ ดึง parafilm ที่อยู่ด้านล่างทิ้งไป

7.2 ล้างหน้าเจล 2 ครั้ง ด้วย electrode buffer (Tris-buffer 6 กรัม Glycine 28.8 กรัม น้ำกลั่น 500 ซี.ซี. ทำให้เจือจาง 10 เท่า

7.3 ติดตั้ง หลอดเจลเข้ากับช่องของ upper chamber โดยยึดหลอดให้ตรง

7.4 เท electrode buffer ลงไปให้ท่วมเจลและเทลงใน lower chamber ประมาณ 5000 ซี.ซี.

7.5 ไล่ฟองอากาศออกจากหลอดเจล (ถ้ามี)

7.6 ปิดฝา upper chamber แล้วต่อสายไฟจาก power supply มาที่ electrophoresis cell

7.7 เดินเครื่อง prerun โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 3 mA/ หลอด นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4-5° ซ

7.8 หยดสารตัวอย่างที่สกัดจากเส้นใยลงในบนหลอดเจล โดยใช้ micropipette โดยหยดประมาณ 100 µl / หลอด ในการหยดจะต้องหยดอย่างช้า ๆ เพื่อมิให้ตัวอย่างฟุ้งออกมา

7.9 หยดสีที่ใช้เป็นเครื่องหมาย (marker) คือ bromophenol blue (0.02 %) โดยใช้ micropipette ประมาณ 20 µl / หลอด

7.10 เดินเครื่องอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้กระแสไฟฟ้าเท่าเดิม

7.11 ปิดเครื่องเมื่อสี bromophenol blue ห่างจากท้ายเจลประมาณ 1 ซม. ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

7.12 นำเจลออกจากหลอด โดยใช้ปลายเข็มฉีดยา (syringe) ใส่น้ำฉีดดันเจลออกอย่างช้า ๆ ทั้งด้านล่างและด้านบน สลับกันจนกระทั่งเจลหลุดออกมา

7.13 นำเจลไปย้อมสี

8. การย้อมสี

นำเจลที่ได้มาทำการย้อมสี (สีย้อมแสดงในภาคผนวก) เพื่อตรวจจับการเคลื่อนที่ของเอนไซม์บนเจล โดยทำการย้อมสีไอโซไซม์ เอสเทอเรส, แอสิด ฟอสเฟเตส และ โปรตีน

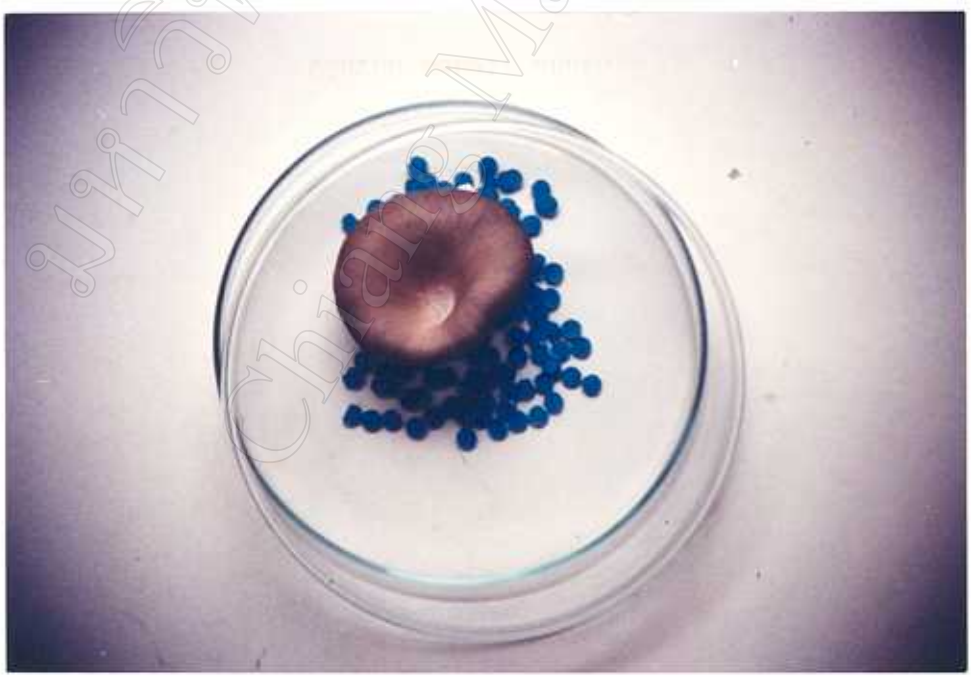
9. การผสมพันธุ์เห็ด

การผสมพันธุ์สายพันธุ์แม่ทั้ง 20 สายพันธุ์ ซึ่งจะได้คู่ผสมทั้งหมด 190 คู่ โดยทำการผสมในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้น พีดีเอ วางคู่ผสมห่างกันประมาณ 3 ซม. จากนั้น 7 วัน ก็สามารถตรวจสอบความสามารถในการผสมกันได้โดยการตรวจการเกิดข้อยึดระหว่างเซลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าตรวจพบข้อยึดระหว่างเซล (ภาพที่ 5) แสดงว่าคู่ผสมนั้นผสมกันแล้ว ซึ่งส่วนใหญ่ผสมกันสมบูรณ์ แต่ยังมีบางส่วนที่ผสมกันไม่สมบูรณ์

จากการตรวจสอบความสามารถในการผสมกันได้นั้น พบว่าได้ลูกผสมทั้งหมด 40 พันธุ์ จากนั้นเลี้ยงเส้นใยของลูกผสมในอาหารเหลวเพื่อนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซีส เลี้ยงเส้นใยในขวดแบนที่บรรจุอาหารวุ้น พีดีเอ เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเส้นใย และเลี้ยงเส้นใยในเมล็ดข้าวฟ่างเพื่อตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ของลูกผสม ได้แก่ ผลผลิต และลักษณะของดอกโดยการเพาะเลี้ยงโดยวิธีปกติ

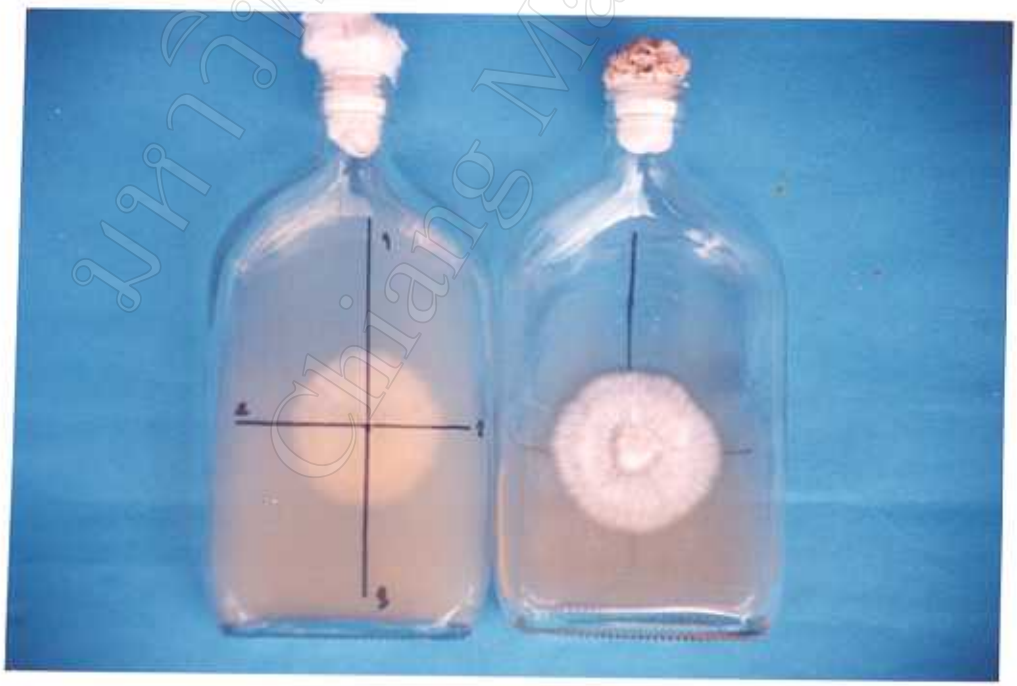
การบันทึกผลการทดลอง

1. การเจริญของเส้นใยขั้นที่ 1 และของลูกผสม
2. ลักษณะแถบเอนไซม์ (Zymogram) ของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (เส้นใยขั้นที่ 1) และของลูกผสม
3. ลักษณะต่าง ๆ ของลูกผสม ได้แก่ ผลผลิต (กรัม) และจำนวนวันในการบ่มเชื้อ



ภาพที่ 2 การดักสปอร์ของดอกเห็ด

ภาพที่ 3 สปอร์เห็ดที่ตกลงสู่ชิ้นกระดาษ



ภาพที่ 4 การวัดการเจริญของเส้นใย

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาพที่ 5 ข้อยึดระหว่างเซลของเส้นใยเห็ด

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University