บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ในการทดลอง

1. เชื้อเห็ดที่ใช้ในการทดลองมีสายพันธุ์ดังนี้
   1.1 เห็ดนางรมจากญี่ปุ่น (KD1)
   1.2 เห็ดนางรมฮังการีของภาควิชาพืชสวน ฯ (CM1)
   1.3 เห็ดนางรมลูกผสมสายพันธุ์ KDCM-1, KDCM-2 ,KDCM-3 ,KDCM-4 และ KDCM-5

2. อาหารที่ใช้ในการเพาะเชื้อ
   2.1 Potato Dextrose Agar (PDA)
   2.2 เมล็ดข้าวฟ่าง
   2.3 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา ไม้นุ่น และไม้จำฉา
   2.4 รำละเอียด
   2.5 ปูนขาว
   2.6 แมกนีเซียมซัลเฟต

3. อุปกรณ์ในการเพาะเห็ด
   3.1 หลอดทดลอง
   3.2 เข็มเขี่ยเชื้อ
   3.3 สำลี
   3.4 ตู้ถ่ายเชื้อ
   3.5 ตู้อบแห้ง
   3.6 ถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 6.5 นิ้ว x 13 นิ้ว
   3.7 คอขวดพลาสติก
   3.8 หม้อนึ่งความดัน
   3.9 หม้อนึ่งลูกทุ่ง

4. อุปกรณ์ในการทำอิเลคโตรโฟรีซิส

4.1 ชุดสำหรับอิเลคโตรโฟรีซิส แบบ Slab gel ประกอบด้วยแผ่นแก้ว spacer comb และ chamber สำหรับทำอิเลคโครโฟรีซิส

4.2 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply)

4.3 เครื่องทำความเย็น ตู้เย็น และตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

4.4 เครื่องเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้

4.5 เครื่องชั่งไฟฟ้า

4.6 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

4.7 หม้อนึ่งความดัน

4.8 โกร่งบดตัวอย่าง

4.9 เครื่องกวน

4.10 Eppendorf tube ขนาด 15 mL

4.11 เครื่องแก้วอื่น ๆ เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต แท่งคนแก้ว flask ฯลฯ

4.12 วัสดุอื่น ๆ เช่น ถุงมือ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร พลาสติกใส กล้องถ่ายรูป

5. สารเคมีที่ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟรีซิส

5.1 0.1 M Tris - buffer pH 8.2

5.2 Tris (hydroxymethyl) aminomethane

5.3 glycine

5.4 1 N HCL

5.5 TEMED (N,N,N,N - tetramethyl ethylendiamine)

5.6 Acrylamide

5.7 N,N - methylene bisacrylamide

5.8 $(NH_4)_2S_2O_8$

5.9 0.1 N phosphate buffer pH6.0

5.10 Fast blue B salt

5.11 α - napthyl acetate

5.12 absolute alcohol

5.13 3- amino - 9 - ethylcarbazole

5.14 β - naphthol

5.15 acetone

5.16 0.1 M Tris buffer pH 4.0

5.17 Hydrogenperoxide 3 %

5.18 0.5 M acetate buffer pH 4.8

5.19 1% napthyl acid phosphate

5.20 $MgCL_2$ 10 %

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อเห็ด การเตรียมเชื้อ (inoculum) ที่ใช้ในการทดลองนี้กระทำโดยย้ายเส้นใยเห็ดลูกผสมพันธุ์ KDCM-4 จาก stock culture ลงเลี้ยงบนอาหาร PDA (ตารางที่ 1) ในหลอดทดลอง ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 °ซ) เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วทำการตัดชิ้นส่วนของเส้นใยพร้อมทั้งอาหารวุ้นที่บริเวณรอบนอกของโคโลนี เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมด้วยเข็มเขี่ยให้มีขนาดประมาณ 0.5 * 0.5 ซม. สำหรับนำไปใช้เป็น inoculum ในการศึกษาครั้งต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงสูตรอาหาร PDA

มันฝรั่ง	200 กรัม
กลูโคส	20 กรัม
วุ้น	13 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

2. การเตรียมหัวเชื้อเห็ด (grain spawn)สำหรับเพาะลงถุงพลาสติก ที่ใช้ในการทดลองนี้กระทำโดยนำเมล็ดข้าวฟ่างแช่น้ำเป็นเวลาหนึ่งคืน ต้มให้สุกพอประมาณ สังเกตจากเมล็ดเริ่มสุกพอง มีลักษณะนิ่ม จึงกรองน้ำออก ผึ่งให้แห้งหมาด ๆ แล้วนำขี้เลื่อยไม้ยางพาราละเอียดมาผสมทีละน้อยจนได้ความชื้น 70 %ของน้ำหนักขี้เลื่อยแห้ง จากนั้นบรรจุเมล็ดข้าวฟ่างลงขวดกลมขนาด 350 ซีซี. ประมาณ 3ใน4 ของขวด จำนวน 10 ขวด ปิดปากขวดด้วยจุกสำลีแล้วหุ้มด้วยกระดาษ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 45นาที ทิ้งให้เย็นจึงตัด inoculum ขนาด 0.5*0.5 °ซ ใส่ลงในขวด โดยใช้เทคนิคสภาพปลอดเชื้อ โดยใส่ไว้ใต้เมล็ดข้าวฟ่าง

บริเวณกลางขวด นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 °ซ) จนกระทั่งเส้นใยเดินเต็มขวด จึงทำการเขย่าเมล็ดข้าวฟ่างให้ร่วน นำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการเพาะเห็ดต่อไป

3. การทำถุงก้อนเชื้อ ใช้ขี้เลื่อยเป็นวัสดุเพาะ โดยผสมขี้เลื่อยและอาหารเสริมตามกรรมวิธีที่กำหนดไว้ในการทดลองที่1-6 (วิธีการหาปริมาณความชื้นดูในภาคผนวก ก.) ผสมวัสดุทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วบรรจุในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 6*12 นิ้ว หนักถุงละ 850 กรัม อัดด้วยเครื่องอัดถุงแล้วสวมคอขวดปิดจุกกระดาษ รัดยาง เขียนป้ายระบุกรรมวิธี แล้วนึ่งฆ่าเชื้อในถังขนาด 200 ลิตร ที่อุณหภูมิ 96 °ซ นาน 3 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็น จากนั้นใส่หัวเชื้อลงถุงขี้เลื่อยที่เตรียมไว้แล้ว ปริมาณเมล็ดข้าวฟ่างประมาณ 20-30 เมล็ดต่อถุง นำถุงขี้เลื่อยทั้งหมดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 °ซ) จนกระทั่งเส้นใยเห็ดเจริญคลุมทั่ววัสดุเพาะ หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ จึงนำถุงเห็ดไปเปิดให้ออกดอกในโรงเพาะเห็ด รักษาความชื้นสัมพัทธ์ภายในโรงเรือนให้ได้ประมาณ 80-85 % โดยพ่นน้ำเช้าเย็น ตรวจวัดระดับความชื้นและอุณหภูมิด้วยเครื่อง Thermohygrograph เมื่อเห็ดออกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 4-5 ซม. จึงเก็บเกี่ยวผลผลิต

การบันทึกผลในการเพาะเห็ด

1.ช่วงเวลาและจำนวนครั้งของการเก็บเกี่ยวผลผลิต

2.ผลผลิตเป็นน้ำหนักสด (กรัมต่อถุง)

4. การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

การเตรียมตัวอย่างเห็ดโดยนำเชื้อเห็ดแต่ละสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษามาเตรียมเชื้อและเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ที่บรรจุใน flask ขนาด 250มิลลิลิตร จำนวน100มิลลิลิตรในสภาพปลอดเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(25-30°ซ) ประมาณ 30 วัน จึงกรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman หมายเลข 1 แล้วเก็บไว้ถุงพลาสติก เข้าตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -40 °ซ เพื่อนำไปสกัดหาเอนไซม์ต่อไป

การสกัดเอนไซม์ นำเส้นใยเห็ดแต่ละสายพันธุ์จากตู้แช่แข็งมาบดให้ละเอียดในโกร่งที่อุณหภูมิ 4 °ซ โดยก่อนทำการบดเส้นใยจะเก็บโกร่งในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -40 °ซ พร้อมทั้งเติม 0.1 M Tris-buffer pH8.2 จำนวน 5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักเส้นใย 3 กรัม ใช้แท่งแก้วบดเส้นใยเห็ดและสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 0 °ซ นำสารละลายที่ได้ใส่ eppendorf tube ซึ่งมี glycerine 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

การเตรียม running gel (separating gel) 8.5 % ต่อชุดแผ่นแก้วทำ slab gel ใช้ spacers เป็นตัวปรับความหนาของเจลตามต้องการ (0.75-1.00 มิลลิเมตร) ผสมสารละลาย

stock solution ตามสูตรการเตรียมเจล (ดูในภาคผนวก ก) กวนส่วนผสมต่าง ๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) แล้วเทเจลใส่ลงระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ จากนั้นค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที

การเตรียมสารละลาย stacking gel ผสม stock solution ต่าง ๆ ตามสูตรการเตรียมเจล (ภาคผนวก ก) กวนส่วนผสมต่าง ๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) จึงค่อย ๆล้างส่วน separating gelด้วยน้ำกลั่น และดูดน้ำออกให้แห้ง จึงใส่ stacking gel ที่ผสมแล้วลงบน separating gel ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น สอด comb ลงใน gel plate ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวจะใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที ดึง comb ออกจาก stacking gel จะเห็นช่อง (well) สำหรับใส่สารที่ต้องการแยกบนเจล หยอดน้ำกลั่นลงในช่องเพื่อล้างอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นดูดน้ำออกจนเห็นเป็นช่อง

การแยกเอนไซม์ โดยต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน Chamber แล้วจึงใส่ตัวอย่างเห็ดลงไปในช่อง stacking gel โดยใช้เข็มสำหรับ loading ค่อย ๆ หยอดผ่านบัฟเฟอร์ลงในช่องเจล ต่อขั้วบวกเข้ากับ Chamber ล่าง และขั้วลบเข้ากับ Chamber บน และเปิดสวิทซ์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสคงที่ 42 mA 250 V และปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาจนถึงปลายล่างของเจล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง จึงนำแผ่นแก้วออกจาก Chamber และนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาวางบนถาดเพื่อตรวจหาตำแหน่งของไอโซไซม์ต่อไป

การย้อมสีเอนไซม์ในเจล ขั้นแรกต้องเตรียมน้ำยาสำหรับย้อม (staining solution) ของไอโซไซม์แต่ละตัว (ภาคผนวก ก) แล้วนำเจลที่ได้มาใส่ใน plate ที่มีน้ำยาสำหรับย้อมอยู่ เพื่อย้อมไอโซไซม์ Esterase , Peroxidase และ Acid phosphatase โดยนำไป incubate ในที่มืด อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ประมาณ 15-60 นาที จนปรากฏแถบสี

การทดลองที่ 1 ศึกษาอัตราส่วนของวัสดุเพาะระหว่างขี้เลื่อยของไม้ยางพารา ไม้ฉำฉา และไม้นุ่นที่มีต่อผลผลิตเห็ดลูกผสมพันธุ์ KDCM-4 และศึกษาขนาดหน่วยทดลองที่เหมาะสม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ มี 6 กรรมวิธี คือ ใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพาราอย่างเดียว ขี้เลื่อยไม้นุ่นอย่างเดียว อัตราส่วนระหว่างขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อไม้นุ่น 3:1 , 1:1 , 1:3 และอัตราส่วนระหว่างขี้เลื่อยไม้ยางพาราต่อขี้เลื่อยไม้ฉำฉา 1:1 มี 12 ซ้ำ หนึ่งหน่วยการทดลองเท่ากับ 6 ถุง การศึกษาขนาดหน่วยทดลองที่เหมาะสม สามารถศึกษาได้จากวิธีการเขียนกราฟโดยนำข้อมูลน้ำหนักเห็ดสดมารวมกันเป็นขนาดถุงต่าง ๆ และหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (C.V.) หนึ่งหน่วยการทดลองมีขนาดเท่ากับผลที่ได้จากการศึกษาขนาดหน่วยทดลองที่เหมาะสมในการทดลองนี้จะนำไปใช้ในการทดลองที่ 2-6

การทดลองที่ 2 ศึกษาระดับปูนขาวและแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการผลิตเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ KDCM-4

วางแผนการทดลองแบบ ปัจจัยร่วมสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ โดยมีปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ 1.ระดับปูนขาว 3 ระดับ คือ 1,2 และ3 %ของน้ำหนักขี้เลื่อยแห้ง 2.ระดับแมกนีเซียมซัลเฟต 3 ระดับ คือ 1.5,3.0 และ4.5 %ของน้ำหนักขี้เลื่อยแห้ง รวม 10 กรรมวิธี รวมทั้งกรรมวิธีที่ไม่ใส่ทั้งปูนขาวและแมกนีเซียมซัลเฟต 12 ซ้ำ หนึ่งหน่วยการทดลองเท่ากับ ขนาดหน่วยทดลองที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 ศึกษาระดับรำข้าวที่เหมาะสมในการผลิตเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ KDCM-4

วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ รวม 5 กรรมวิธี คือระดับรำข้าว 8,14,20,26 และ 32 % ของน้ำหนักแห้ง 12 ซ้ำ หนึ่งหน่วยการทดลองเท่ากับ ขนาดหน่วยทดลองที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 4 ศึกษาระดับความชื้นที่เหมาะสมในการผลิตเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ KDCM-4

วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ รวม 3 กรรมวิธี คือระดับความชื้น 70,72 และ 74 %ของน้ำหนักขี้เลื่อยแห้ง 12 ซ้ำ หนึ่งหน่วยการทดลองเท่ากับ ขนาดหน่วยทดลองที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 5 ทดสอบสูตรวัสดุเพาะที่เหมาะสมในการผลิตเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ KDCM-4

วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ รวม 2 กรรมวิธี คือวัสดุเพาะสูตรที่ 1 เป็นการนำผลการทดลองที่ 1,2,3 และ 4 ใช้เป็นวัสดุร่วมกัน และสูตรที่ 2 เป็นวัสดุเพาะที่ใช้เพาะเห็ด KDCM-4 ตั้งแต่เริ่มการทดลอง มี 12 ซ้ำ หนึ่งหน่วยการทดลองเท่ากับ ขนาดหน่วยทดลองที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 6 ทดสอบผลผลิตสายพันธุ์เห็ดลูกผสมสกุลพลูโรตัสที่คัดไว้ได้ห้าสายพันธุ์เปรียบเทียบกับแม่พันธุ์จากญี่ปุ่น (KD1) และแม่พันธุ์นางรมฮังการีของภาควิชาพืชสวน ฯ (CM1)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อคสมบูรณ์ รวม 7 กรรมวิธี คือเห็ด KD1,CM1,KDCM-1,KDCM-2,KDCM-3,KDCM-4 และ KDCM-5 มี 12 ซ้ำ หนึ่งหน่วยการทดลองเท่ากับ ขนาดหน่วยทดลองที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 7 ศึกษาลักษณะไอโซไซม์ในเส้นใยเห็ด

โดยใช้เชื้อเห็ด 7 สายพันธุ์ที่เก็บไว้ใน stock culture มาวิเคราะห์ไอโซไซม์ 3 ชนิด คือ Esterase , Peroxidase และ Acid phosphatase รวม 2 ซ้ำ

สถานที่ทำการวิจัย

1.โรงเรือนเพาะเห็ดภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. ห้องปฏิบัติการกลางชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย ระหว่างเดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2538 ถึง เมษายน พ.ศ.2540

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University