บทที่ 2
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-10 แบบ Rotary ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., U.S.A.
2. ตู้เขย่าและตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., U.S.A.
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น H-103 N ของบริษัท Kokusan, Japan.
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.
5. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น SP-5A ของบริษัท Suntex, U.S.A.
6. เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-3D ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.
7. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH-C01-764604 ของบริษัท Olympus, Japan.
8. กล้องสเตอริโอสองตา รุ่น VM-205157 ของบริษัท Olympus, Japan.
9. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Germany.
10. เครื่องลามินาร์โฟลว์ (Laminar Flow) รุ่น BV-124 ของบริษัท International Scientific Supply Co., Thailand.
11. อ่างปรับอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W-760 ของบริษัท Kottermann, Germany.
12. ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan.
13. Sintered glass filters หมายเลข 2 เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.50 ไมโครเมตร
14. Glass bead รุ่น 1721-0003 เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.30 ซม.
15. เทอร์โมมิเตอร์ ของบริษัท Nikkei, Japan.
16. เครื่องวัดความชื้น ของบริษัท Nikkei, Japan.
17. อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ของบริษัท Bocco, Germany.
18. ไมโครมิเตอร์ รุ่น WF-10 ของบริษัท Olympus, Japan.

เคมีภัณฑ์

1. เคมีภัณฑ์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารสำหรับการกลับคืนสู่สภาพเซลล์ปกติ (Protoplast regeneration)

มันฝรั่ง
น้ำตาลกลูโคส (Glucose) ของ Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.
น้ำตาลซอร์บิทอล (Sorbitol) ของ Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.
วุ้นผง (Bacto Agar) ของ Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.
ผงสกัดยีสต์ (Yeast extract) ของ Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.
เปปโตน (Peptone) ของ Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ของ Farmitalia Carlo Erba, Milano, U.S.A.
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของ BDH Laboratory Chemical division Poole, England.
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของ E.MERCK, Darmstadt, Germany.

2. เคมีภัณฑ์สำหรับเตรียมโปรโตพลาสต์ (Protoplast preparation)

เอนไซม์ไซโมไลเอส (Zymolyase-20 T) จาก Arthrobacter luteus ของ Seikagaku Kogyo Co., Japan. 20,000 U/g (อยู่ในรูปผง-ของแข็ง)
เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) จาก Trichoderma reesei ของ Novo Industries, Denmark. 1,500 U/g (อยู่ในรูปสารละลาย-ของเหลว)
เอนไซม์โนโวไซม์ (Novozyme) จาก Trichoderma harzianum ของ Novo Industries, Denmark. 250 U/g (อยู่ในรูปสารละลาย-ของเหลว)
2-เมอแคปโตเอธานอล (2-Mercaptoethanol) ของ J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.
โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของ May and Baker Laboratory Chemical, England.

3. <u>เคมีภัณฑ์สำหรับรวมโปรโตพลาสต์</u> (Protoplast fusion)

โพลีเอทธิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol-8000; PEG) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของ E.MERCK Darmstadt, Germany.

4. <u>เคมีภัณฑ์สำหรับหาปริมาณดีเอนเอ</u>

ดีเอนเอมาตรฐาน (Deoxyribonucleic acid from Calf Thymus Type I) ของ Sigma, Chemical Co., U.S.A.

ไดเฟนีลามีน (Diphenylamine) ของ Riedel-de Haen A.G. Seelze - Hannover, U.S.A.

กรดน้ำส้ม (Glacial acetic acid) ของ Riedel-de Haen A.G. Seelze - Hannover, U.S.A.

อเซทาลดีไฮด์ (Acetaldehyde) ของ BDH Laboratory Chemicals division Poole, England.

กรดเพอคลอริค (Perchloric acid 70%) ของ Riedel-De Haen A.G. Seelze - Hannover, U.S.A.

เอธานอล (Ethanol) ของ E.MERCK, Darmstadt, Germany.

ไดเอธิล อีเธอร์ (Diethyl ether) ของ May and Baker Laboratory Ltd. Dagenham, England.

5. <u>เคมีภัณฑ์สำหรับการย้อมนิวเคลียสด้วยจิมซา รีเอเจนต์</u> (Giemsa reagent)

เมอคูริคคลอไรด์ ($HgCl_2$) ของ Farmitalia Carlo Erba, Milano, U.S.A.

โปแตสเซียมไดโครเมท ($K_2Cr_2O_7$) ของ BDH Laboratory Chemical division Poole, England.

ฟอร์มาลิน (Formalin) ของ E.MERCK, Darmstadt, Germany.

เกลือแกง (NaCl) ของ Farmitalia, Carlo Erba, Milano, U.S.A.

โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ของ BDH Laboratory Chemical division Poole, England.

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของ BDH Laboratory Chemical devision Poole, England.

เมธานอล (Methanol) ของ E.MERCK, Darmstadt, Germany.

กลีเซอรอล (Glycerol) ของ E.MERCK, Darmstadt, Germany.

6. <u>เคมีภัณฑ์และวัสดุสำหรับการเพาะเห็ด</u> (Spawning and Cultivation)

แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) ของ Riedel-De Haen A.G. Seelze-Hannover, U.S.A.

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของ BDH Laboratory Chemicals division Poole, England.

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ของ E.MERCK Darmstadt, Germany.

ฟางแห้งสำหรับเพาะเห็ด จากอำเภอรังสิต จังหวัดปทุมธานี

นุ่น

<u>วัตถุประสงค์</u>

สร้างเห็ดฟางลูกผสมที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากเดิมแบบเป็นชุด คือจากดิพพลอยด์ (diploid) เพิ่มเป็น 2 เท่า หรือ 3 เท่า โดยวิธีหลอมโปรโตพลาสต์ แล้วคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดฟางที่มีคุณลักษณะที่ดีกว่าสายพันธุ์ต้นแบบเพื่อเพิ่มผลผลิตในระดับอุตสาหกรรมการเกษตรต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการวิจัย

1. หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงสายพันธุ์เห็ดฟาง 3 สายพันธุ์คือ เห็ดฟางสายพันธุ์ไทยครีบน้ำตาล เห็ดฟางสายพันธุ์ไทยครีบขาว และเห็ดฟางสายพันธุ์ไต้หวัน ให้เจริญดี

2. หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดฟางทั้งสามสายพันธุ์

3. รวมโปรโตพลาสต์ที่เตรียมจากเส้นใยเห็ดฟางทั้งสามสายพันธุ์เข้าด้วยกันเป็นคู่ ๆ ทั้งหมดสามคู่ คือเห็ดฟางสายพันธุ์ไทยครีบน้ำตาล กับเห็ดฟางสายพันธุ์ไทยครีบขาว เห็ดฟางสายพันธุ์ไทยครีบน้ำตาลกับเห็ดฟางสายพันธุ์ไต้หวัน เห็ดฟางสายพันธุ์ไทยครีบขาวกับเห็ดฟางสายพันธุ์ไต้หวัน

4. ตรวจสภาพของเซลล์และเส้นใยที่เกิดจากการรวมตัว (Fusants) ในเบื้องต้นเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ (Parental strains) ในด้านสัณฐานวิทยาของเส้นใยและปริมาณดีเอนเอทั้งหมด

5. ตรวจการเกิดตุ่มดอก (Fruiting primordia) ของเส้นใยจากสายพันธุ์ที่คัดได้บนอาหารวุ้นสังเคราะห์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

6. ตรวจสภาพและจำนวนนิวเคลียสของสายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่ได้โดยวิธีการย้อมนิวเคลียสด้วยสีจิมซา (Giemsa's stain)

7. เปรียบเทียบลักษณะฟีโนไทพ์ระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบ และสายพันธุ์ฟิวแสนท์

8. เปรียบเทียบผลผลิตที่ได้จากการเพาะเชื้อเห็ดฟางบนแปลงเพาะระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบและสายพันธุ์ฟิวแสนท์

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้กระบวนการที่เหมาะสมสำหรับเตรียมโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟาง
2. ได้วิธีการสร้างลูกผสมของเห็ดฟางโดยการรวมโปรโตพลาสต์
3. ได้สายพันธุ์เห็ดฟางฟิวแสนท์ที่อาจให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์ต้นแบบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018934

วิธีการวิจัย

1. สายพันธุ์เห็ดฟางที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ลักษณะที่แตกต่างกันของสายพันธุ์เห็ดฟางที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์เห็ดฟางที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ Volvariella volvacea ซึ่งมีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) แตกต่างกันดังนี้

1.1.1 สายพันธุ์ไทยครีบสีน้ำตาล (TH) หมวกเห็ดมีสีขาว ตรงกลางหมวกเป็นสีเทา สปอร์มีสีน้ำตาลแดงเมื่อแก่ ออกดอกสม่ำเสมอ ผลผลิตสูง

1.1.2 สายพันธุ์ไทยครีบสีขาว (WG) หมวกเห็ดมีสีขาว สปอร์มีสีขาวเมื่อแก่ ออกดอกไม่สม่ำเสมอ ผลผลิตต่ำ หรือไม่ออกดอก

1.1.3 สายพันธุ์ไต้หวันครีบสีน้ำตาล (TA) หมวกเห็ดมีสีน้ำตาลดำ เมื่อสปอร์อ่อนมีสีขาว สปอร์มีสีน้ำตาลแดงเมื่อแก่ ออกดอกสม่ำเสมอ ผลผลิตสูง

1.2 การเก็บและรักษาสายพันธุ์

เลี้ยงเส้นใยของเชื้อเห็ดฟางบนหลอดอาหารวุ้นแข็งเอียงที่มีพีดีเอ สูตร 1 (ภาคผนวก ค. 1) บ่มเส้นใยที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) นาน 5-7 วัน เมื่อเส้นใยเจริญเต็มหลอดแล้วจึงนำไปเก็บรักษาในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25°ซ.

2. การเตรียมเส้นใยในอาหารเหลว

เพื่อเตรียมเส้นใยให้ได้ปริมาณมากพอ และทำให้เส้นใยกระจายตัวดีในอาหารเหลวพีดีบี สูตร 2 (ภาคผนวก ค. 1) สำหรับนำไปใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ต่อไป

2.1 อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม

เพื่อหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ให้เจริญดีในอาหารเหลว สูตร 2

โดยเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 10 มล. ลงไปในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยซึ่งเลี้ยงไว้เป็นเวลา 5-7 วัน ใช้เข็มเขี่ยลากไปบนผิวหน้าของอาหารให้เส้นใยของเชื้อเห็ดฟางหลุดจากผิววุ้น เทเส้นใยที่ได้ใส่ในอาหารเหลว 50 มล. ที่บรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. นำขวดทรงกรวยที่มีเส้นใยกระจายอยู่ขวดละ 1 สายพันธุ์ ไปไว้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ ที่ 25°ซ. 30°ซ. อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) และ 35°ซ. บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ชั่งหาน้ำหนักสดของเส้นใยเป็นเวลา 1-7 วัน โดยชั่งทุกวัน

2.2 <u>สภาวะที่ทำให้เส้นใยกระจายตัว</u>

จากข้อ 2.1 พบว่า เส้นใยเห็ดฟางทั้ง 3 สายพันธุ์ เจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) เป็นเวลา 4 วัน แต่เส้นใยเห็ดฟางดังกล่าวยังไม่กระจายตัวและแตกเป็นชิ้น ๆ ในอาหารเหลวดีพอ จึงต้องทดลองหาสภาวะที่ทำให้เส้นใยเห็ดฟางกระจายตัวได้ดีในอาหารเหลวต่อไป

เตรียมอาหารเหลวสูตร 2 ที่มีการใส่อุปกรณ์ที่ช่วยทำให้เส้นใยกระจายตัวคือ ชุดแรกใส่ลูกแก้วที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 ซม. จำนวน 20 ลูก ลงไปเพียงอย่างเดียว ชุดที่สองใส่ขดลวดแบบสปริงที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของขดเท่ากับ 0.5 ซม. ยาว 20 ซม. ลงไปเพียงขดเดียว ชุดที่สามใส่ทั้งลูกแก้วจำนวน 20 ลูก และขดลวด 1 ขด ลงไปในอาหารเหลว เลี้ยงเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตร 2 ตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

เปรียบเทียบลักษณะการกระจายตัวของเส้นใยเห็ดฟาง อายุ 4 วัน ในอาหารเหลว โดยดูว่าอุปกรณ์ชนิดใด สามารถช่วยทำให้เส้นใยเห็ดฟางกระจายตัว และแตกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ได้มากที่สุด

3. <u>การเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใย</u>

เพื่อหาว่าต้องใช้สภาวะอย่างไร จึงจะเหมาะสำหรับการทำให้เกิดโปรโตพลาสต์จากเส้นใยได้จำนวนมากที่สุด โดยแปรผันอายุของเส้นใย อุณหภูมิ ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 อายุ

หาอายุของเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ ที่เหมาะสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์ให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด

เตรียมอาหารเหลวสูตร 2 ที่ใส่ลูกแก้วลงไป 20 ลูก เลี้ยงเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวสูตร 2 ตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 4 6 8 และ 10 วัน ตามลำดับ เก็บเส้นใยโดยปั่นแยกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 30 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ล้างเส้นใยที่ได้ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นเติม 50 มล. ของสารละลายเอนไซม์ (ภาคผนวก ค.2.2) ลงไปในขวดทรงกรวยที่มีเส้นใยอยู่ บ่มที่ 30°ซ. ใช้ไมโครปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ แล้วนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นโดยใช้อุปกรณ์นับเม็ดเลือด เป็นเวลา 1-10 ชม. โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ทุก ๆ 1 ชม.

3.2 อุณหภูมิ

เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการบ่มเส้นใยด้วยเอนไซม์เพื่อทำให้เกิดโปรโตพลาสต์จากเส้นใยได้มากที่สุด

เตรียมอาหารเหลวสูตร 2 และใส่ลูกแก้ว เลี้ยงเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวดังกล่าว ตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เก็บเส้นใยเหมือนข้อ 3.1 เติม 50 มล. ของสารละลายเอนไซม์ (ภาคผนวก ค.2.2) ลงไปในขวดทรงกรวยที่มีเส้นใยอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 35 40 และ 45°ซ. ใช้ไมโครปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ และนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้น ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือดที่เวลา 2 4 และ 6 ชม. ตามลำดับ

3.3 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (Lytic enzyme)

3.3.1 ชนิดของเอนไซม์

เพื่อหาชนิดของเอนไซม์ย่อยสลายที่เหมาะสมสำหรับสลายผนังเซลล์ของเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์

เตรียมอาหารเหลวสูตร 2 (ภาคผนวก ค.1) เลี้ยงเส้นใยเห็ดแต่ละชนิดในอาหารเหลวดังกล่าว ตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 4 วัน เก็บและล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง

3.3.1.1 <u>เอนไซม์ไซโมไลเอส</u> (Zymolyase)

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไซโมไลเอส ซึ่งประกอบด้วย 1.5 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์ 20 มล. 0.1 โมลาร์ 2-เมอแคปโตเอทธานอล 5 มล. 1.0 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มล. pH 6.5 (ภาคผนวก ค. 2) และเอนไซม์ไซโมไลเอส 5 มล. ใน 1.0 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 โดยมีความเข้มข้นดังนี้ 0.01 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มก./มล. จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ แต่ละความเข้มข้น 50 มล. ลงในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. ที่มีเส้นใยเห็ดฟางที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 4 วันอยู่ นำไปบ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชม. ใช้ไมโครปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ และนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.1.2 <u>เอนไซม์เซลลูเลส</u> (Cellulase)

เตรียมสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ตามภาคผนวก ค.2 และเอนไซม์เซลลูเลส 5 มล. ใน 1.0 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 โดยมีความเข้มข้น 1% และ 2% จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์แต่ละความเข้มข้น 50 มล. ลงในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. ที่มีเส้นใยเห็ดฟางที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 4 วัน อยู่ นำไปบ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชม. ใช้ไมโครปิเปตดูดโปรโตพลาสต์และนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.1.3 <u>เอนไซม์โนโวไซม์</u> (Novozyme)

เตรียมสารละลายเอนไซม์โนโวไซม์ซึ่งประกอบด้วย สารละลายเอนไซม์ตามภาคผนวก ค.2 และเอนไซม์โนโวไซม์ 5 มล. ใน 1.0 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 โดยมีความเข้มข้น 1% และ 2% จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์แต่ละความเข้มข้น 50 มล. ลงในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. ที่มีเส้นใยเห็ดฟางที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 4 วัน อยู่ นำไปบ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชม. ใช้ไมโครปิเปตดูดโปรโตพลาสต์และนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.2 <u>เอนไซม์ผสม</u>

เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ผสมกัน 2 ชนิด ที่สามารถใช้เตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดฟางให้ได้จำนวนมากขึ้น โดยนำผลการทดลองจากข้อ 3.3.1

มาใช้ในหัวข้อนี้ให้เอนไซม์ไซโมไลเอสมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.20 มก./มล. แล้วแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส และโนโวไซม์

เตรียมอาหารเหลวสูตร 2 (ภาคผนวก ค.1) เลี้ยงเส้นใยเห็ดฟางแต่ละชนิดในอาหารเหลวดังกล่าว ตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 4 วัน เก็บและล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

3.3.2.1 <u>เอนไซม์ผสมระหว่างไซโมไลเอสและเซลลูเลส</u>

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไซโมไลเอส และเซลลูเลส ซึ่งประกอบด้วย 1.5 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์ 20 มล. 0.1 โมลาร์ 2-เมอแคปโตเอทธานอล 5 มล. 1.0 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มล. pH 6.5 (ภาคผนวก ค.2) ใช้เอนไซม์ไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. 2.5 มล. ผสมกับ 1% เซลลูเลส 2.5 มล. ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1.0 โมลาร์ pH 6.5 และใช้เอนไซม์ไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. 2.5 มล. ผสมกับ 2% เซลลูเลส 2.5 มล. ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1.0 โมลาร์ pH 6.5 จากนั้นเติมสารละลายดังกล่าวลงในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. ที่มีเส้นใยเห็ดฟางอายุ 4 วัน อยู่ นำไปบ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชม. ใช้ไมโครปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ และนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.2.2 <u>เอนไซม์ผสมระหว่างไซโมไลเอสและโนโวไซม์</u>

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไซโมไลเอส และโนโวไซม์ ซึ่งประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ตามภาคผนวก ค.2 ใช้เอนไซม์ไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. 2.5 มล. ผสมกับ 1% โนโวไซม์ 2.5 มล. ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1.0 โมลาร์ pH 6.5 และใช้เอนไซม์ไซโมไลเอส 0.20 มก./มล. 2.5 มล. ผสมกับ 2% โนโวไซม์ 2.5 มล. ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1.0 โมลาร์ pH 6.5 จากนั้นเติมสารละลายดังกล่าวลงในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. ที่มีเส้นใยเห็ดฟางอายุ 4 วันอยู่ นำไปบ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชม. ใช้ไมโครปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ และนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4 <u>ระยะเวลาที่บ่มเอนไซม์</u>

เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเส้นใยด้วยสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายที่ความเข้มข้นที่ทำให้โปรโตพลาสต์เกิดจากเส้นใย

เลี้ยงเส้นใยเห็ดฟางแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลวสูตร 2 ตามวิธีในข้อ 2.1 ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 4 วัน ล้างและเก็บ

เส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เติม 50 มล. ของสารละลายเอนไซม์ (ภาคผนวก ค. 2.2) ลงไปในขวดทรงกรวยที่มีเส้นใยอยู่ บ่มที่ 30°ซ. ใช้ไมโครปิเปตดูดโปรโตพลาสต์และนับจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด ที่เวลา 1/2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ

4. สภาพที่เหมาะสมสำหรับการคืนสภาพของผนังเซลล์

หลังจากที่เตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดฟางได้แล้ว นำโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้ไปเลี้ยงให้เจริญและคืนสภาพโคโลนีที่มีผนังเซลล์เหมือนเซลล์ตามปกติ เพื่อศึกษาจำนวนของโปรโตพลาสต์ที่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิม

เพื่อหาองค์ประกอบของอาหารที่ทำให้โปรโตพลาสต์สามารถเจริญ และสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ได้

นำโปรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายเอนไซม์ไปปั่นให้ตกตะกอนที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 1.0 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 1.0 โมลาร์ สารละลายซอร์บิทอล 5 มล. แล้วล้างอีกครั้งด้วย 1.0 โมลาร์ สารละลายซอร์บิทอล 5 มล. กระจายเซลล์ที่ล้างแล้วใน 1.0 โมลาร์ สารละลายซอร์บิทอล 5 มล. ใช้ปิเปตดูดสารละลายโปรโตพลาสต์ที่ได้ 1.0 มล. ใส่ลงบนอาหารแข็งสูตร 3 ใช้แท่งแก้วปลายรูปสามเหลี่ยมที่ฆ่าเชื้อแล้ว กระจายเซลล์ให้ทั่วจานแก้ว

4.1 องค์ประกอบของอาหารสำหรับการสังเคราะห์ผนังเซลล์สูตร 3

มันฝรั่งหั่นเป็นชิ้นเล็ก	250.00	กรัม
กลูโคส	20.00	กรัม
วุ้นผงชนิดแบคโตอะก้าร์ (Bacto-agar)	30.00	กรัม
น้ำตาลซอร์บิทอล	2.00	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.50	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.50	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.00	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.00	กรัม
เปปโตน	2.00	กรัม

ปอกเปลือกมันฝรั่ง ล้างน้ำให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปชั่งจนครบ 250 กรัม นำไปต้มกับน้ำกลั่น 1 ลิตร นาน 15-20 นาที กรองเอาส่วนที่เป็นน้ำออกมาเติมส่วนประกอบที่

เหลือละลายให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ. นาน 15 นาที

4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการคืนสู่สภาพเซลล์ของโปรโตพลาสต์

หาอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดฟาง

นำจานอาหารที่มีโปรโตพลาสต์จากข้อ 4.1 ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ ที่อุณหภูมิ 25°ซ. 30°ซ. 35°ซ. และอุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) โดยแบ่งเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่มีอาหารแข็งเททับโดยเททับผิวหน้าอาหารด้วยอาหารชนิดเดิมแต่เพิ่มความเข้มข้นของวุ้นเป็นร้อยละ 3 และชุดที่ไม่เททับผิวหน้าอาหาร ตรวจการกลับคืนสู่สภาพปกติของโปรโตพลาสต์บนผิวหน้าอาหารแข็งทุกวัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

4.3 เปอร์เซนต์ของการคืนสู่สภาพเซลล์ของโปรโตพลาสต์

เพื่อคำนวณหาเปอร์เซนต์การคืนสภาพเซลล์ของโปรโตพลาสต์ โดยคำนวณจากจำนวนโปรโตพลาสต์ที่กรองแยกออกจากเส้นใย และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

กรองแยกโปรโตพลาสต์ออกจากเส้นใยจนได้โปรโตพลาสต์ประมาณ 10^4 เซลล์ต่อ มล. ใน 1.0 โมลาร์สารละลายซอร์บิทอล 5 มล. เจือจางให้ได้โปรโตพลาสต์ 10^3 10^2 และ 10^1 เซลล์ต่อ มล. ตามลำดับ ใช้ปิเปตดูดสารละลายโปรโตพลาสต์ที่ได้ 1.0 มล. ใส่ลงบนอาหารแข็งสูตร 3 ใช้แท่งแก้วปลายรูปสามเหลี่ยมที่ฆ่าเชื้อแล้ว กระจายเซลล์ให้ทั่วจานแก้ว ทำสายพันธุ์ละ 2 ซ้ำ นำจานอาหารไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 10-20 วัน โดยไม่ต้องเททับผิวหน้าอาหารแข็ง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร คำนวณหาเปอร์เซนต์ของการคืนสู่สภาพเซลล์ปกติของโปรโตพลาสต์

5. การรวมโปรโตพลาสต์

การรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ โดยทำการรวมเป็นคู่ ๆ เลี้ยงเส้นใยเห็ดฟาง 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ไทยครีบน้ำตาลหมวกสีเทาขาว (TH) สายพันธุ์ไทยครีบขาวหมวกสีเทาขาว (WG) และสายพันธุ์ไต้หวันครีบน้ำตาลหมวกสีดำ (TA) ในอาหารเหลวสูตร 2 ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) นาน 4 วัน เตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยโดยใช้ 50 มล. สารละลายเอนไซม์ผสม 0.20 มก./มล.

ไซโมไลเอส กับเซลลูเลส 2% (ภาคผนวก ค. 2.2) กรองแยกโปรโตพลาสต์ออกจากเส้นใยด้วยกรวยกรอง (Sinter glass filter) นำส่วนน้ำไปปั่นให้โปรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ 3,000 รอบต่อนาที 20 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย 1.0 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 1.0 โมลาร์ สารละลายซอร์บิทอล 5 มล. แล้วล้างอีกครั้งด้วย 1.0 โมลาร์ สารละลายซอร์บิทอล 5 มล. กระจายเซลล์ที่ล้างแล้วใน 1.0 โมลาร์ สารละลายซอร์บิทอล 5 มล. โดยให้มีโปรโตพลาสต์ประมาณ 10^4 เซลล์ต่อ มล.

นำโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟางสายพันธุ์ TH TA และ WG ที่เตรียมแล้วหลอดละ 5 มล. นำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เพื่อเก็บเซลล์เป็นเวลา 5 นาที นำโปรโตพลาสต์ของคู่ที่จะผสมใส่ลงใน 4 มล. ของสารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอล (ภาคผนวก ค.3) บ่มที่ 37°ซ. 15 นาที ปั่นแยกสารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอลออกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กระจายโปรโตพลาสต์ที่รวมตัวได้ใน 1.0 โมลาร์ของสารละลายซอร์บิทอล 5 มล. และทำให้เจือจางจนได้ความเข้มข้นของโปรโตพลาสต์ประมาณ 10^4 เซลล์ต่อ มล. ใช้ปิเปตดูดสารละลายโปรโตพลาสต์ลูกผสม 1.0 มล. ใส่ลงบนอาหารแข็งสูตร 3 ใช้แท่งแก้วกระจายเซลล์ให้ทั่วจานแก้ว นำไปบ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 10-20 วัน เก็บโคโลนีที่ขึ้นกระจายไม่ซ้อนกันบนผิวหน้าอาหารแข็งไว้บนอาหารวุ้นเอียงชนิดเดียวกัน 1 โคโลนีต่อ 1 หลอด หลังจากนั้นถ่ายเชื้อไว้บนอาหารแข็งสูตร 1 ทุก 2 สัปดาห์

6. <u>ตรวจลักษณะของฟิวแสนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ</u>

นำแต่ละโคโลนีที่เก็บได้ทั้งหมด 104 โคโลนี ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็งสูตร 3 มาตรวจดูขนาดของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ นำมาคัดเลือกเก็บเฉพาะโคโลนีที่มีเส้นใยขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์แบบจำนวน 42 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงจนเจริญเต็มที่นำไปเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของฟิวแสนท์กับสายพันธุ์ต้นแบบ โดยตรวจสอบจากวิธีการดังนี้

6.1 <u>สกัดและหาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด</u>

6.1.1 <u>การสกัดดีเอนเอ</u>

การทดลองนี้ได้ทำตามวิธีของ Schneider (1956) เลี้ยงเส้นใยสายพันธุ์ต้นแบบ จำนวน 3 โคโลนี และฟิวแสนท์ที่คัดเลือกแล้วจำนวน 42 โคโลนี ในอาหารเหลว 50 มล. สูตร 2 ที่บรรจุในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. ขวดละ 1 เชื้อ นำไปเลี้ยง

ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) เป็นเวลา 4 วัน โดยใส่ลูกแก้วลงไปในขวดทรงกรวยด้วย เพื่อให้เส้นใยกระจายตัวได้ดี โดยใช้เส้นใยสด อายุ 4 วัน น้ำหนัก 5.0 กรัม ปั่นแยกเส้นใยที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 30 นาที ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง เติม 5 มล. ของ 95% เอธานอลต่อน้ำ ในอัตราส่วน 4 : 1 (ภาคผนวก ค. 4.1.4) ปั่นแยกอีกครั้งเอาเฉพาะเส้นใยมาเติมด้วย 5 มล. ของ 95% เอธานอลปั่นแยกครั้งที่สาม เอาเฉพาะเส้นใยมาเติมสารละลายอีเธอร์ต่อเอธานอล (ภาคผนวก ค. 4.1.5) ทำเช่นนี้ติดต่อกัน 3 ครั้ง แยกเส้นใยที่ได้ครั้งสุดท้ายออกมา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เติม 5 มล. ของกรดเพอคลอริค (ภาคผนวก ค. 4.1.3) นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90°ซ. นาน 20 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณดีเอนเอทั้งหมด การทดลองทำซ้ำ 5 ชุด

6.1.2 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด</u>

ทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอนเอทั้งหมดตามวิธีของ Burton (1956) และ Stumpf (1947) โดยใช้ไดเฟนีลามีน รีเอเจนต์ (ภาคผนวก ค. 4.1.1) วัดสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และใช้คาล์ฟ ไทมัส ดีเอนเอ เป็นดีเอนเอมาตรฐาน เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด

นำ 1 มล. ของส่วนน้ำใสที่สกัดได้จากข้อ 6.1.1 มาเติม 2 มล. ของสารละลายไดเฟนีลามีน และเติม 0.1 มล. ของสารละลายอะเซทาลดีไฮด์ (ภาคผนวก ค. 4.1.2) เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง ทำ 3 ซ้ำ

วัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปอ่านค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค. 4.2) เพื่อหาค่าของปริมาณดีเอนเอทั้งหมด โดยใช้คาล์ฟ ไทมัส ดีเอนเอเป็นดีเอนเอมาตรฐาน (กราฟที่ 18)

6.2 การเกิดตุ่มดอก (Fruiting primordia) บนอาหารวุ้นสังเคราะห์ (Synthetic medium)

คัดเลือกฟิวแสนท์ที่มีการเพิ่มของปริมาณดีเอนเอเป็น 2 เท่า และ 3 เท่าของสายพันธุ์ต้นแบบได้ 23 โคโลนี จากฟิวแสนท์จำนวน 42 โคโลนี นำมาทดสอบความสามารถในการเกิดตุ่มดอก โดยตัดเส้นใยที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร 1 ให้เป็นชิ้นขนาด 1 ซม.^{2} นำเส้นใยดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสังเคราะห์สูตร 4.1 (ภาคผนวก ค. 1) เปรียบเทียบกับเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสังเคราะห์สูตร 4.2 (ภาคผนวก ค. 1) เปรียบเทียบผลดูว่าระหว่างอาหารวุ้นสูตร 4.1 และสูตร 4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรใดสามารถทำให้เส้นใยสร้างตุ่มดอกได้ดีกว่ากัน

บันทึกจำนวนตุ่มดอกที่เกิดขึ้นบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ และระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดตุ่มดอก

6.3 ตรวจหาจำนวนนิวเคลียสในเส้นใยโดยวิธีการย้อมนิวเคลียสด้วยสีจิมซา

ตรวจสภาพของนิวเคลียสด้วยสีจิมซาตามวิธีของ Sherman และคณะ (1983) โดยเลี้ยงเส้นใยอายุ 4 วัน บนอาหารแข็งสูตร 5 (ภาคผนวก ค. 1) อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) ด้วยวิธี slide culture จุ่มสไลด์ที่เส้นใยติดแน่นแล้วในสารละลายเฮลลี (ภาคผนวก ค. 5.1) เพื่อตรึงเซลล์เป็นเวลา 10 นาที แช่สไลด์ลงใน 1% โซเดียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ค. 5.2) ที่ 60°ซ. 1 ซม. ล้างด้วยน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 (ภาคผนวก ค. 5.3) ใช้กรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์แมล ไฮโดรไลซ์ที่ 60°ซ. 10 นาที ย้อมด้วยสีจิมซา (ภาคผนวก ค. 5.4) 60 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น pH 6.9 ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นส่วนที่เป็นนิวเคลียสติดสีม่วงแดงเข้ม

6.4 ขนาดของเส้นใยและลักษณะของแคลมิโดสปอร์ในเส้นใย (Chlamydospores)

คัดเลือกฟิวแสนท์ที่มีการสร้างตุ่มดอกบนอาหารวุ้นสังเคราะห์ได้เป็นจำนวนมากและรวดเร็วคือกลุ่มสายพันธุ์ที่สร้างตุ่มดอกได้มากในเวลา 7-12 วัน ได้ 6 โคโลนี จากฟิวแสนท์จำนวน 23 โคโลนี นำมาตรวจดูขนาดของเส้นใย และลักษณะการเกิดแคลมิโดสปอร์ในเส้นใย โดยการเพาะเส้นใยเห็ดฟางบนสไลด์ (ภาคผนวก ค. 7)

วัดขนาดของเส้นใยของฟิวแสนท์ 6 สายพันธุ์ คือ F(TH-TA 17) F(TH-TA 39) F(TH-WG 9) F(TH-WG 15) F(TA-WG 6) และ F(TA-WG 20) เปรียบเทียบกับขนาดของเส้นใยของสายพันธุ์ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ โดยวัดความกว้างและความยาวของแต่ละเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์ (x40) จำนวน 20 เซลล์ต่อ 1 สายพันธุ์ ด้วยออคคูลาร์ไมโครมิเตอร์ที่เทียบอัตราส่วนแล้ว (ภาคผนวก ค. 9) รวมทั้งบันทึกลักษณะและระยะเวลาในการเกิดแคลมิโดสปอร์ของฟิวแสนท์เปรียบเทียบกับลักษณะแคลมิโดสปอร์ของสายพันธุ์ต้นแบบ

6.5 การเจริญเติบโตของเส้นใยก่อนการเพาะ

เลี้ยงเชื้อ TH TA WG และฟิวแสนท์ F(TH-TA 17) F(TH-TA 39) F(TH-WG 9) F(TH-WG 15) F(TA-WG 6) F(TA-WG 20) ในอาหารเหลวสูตร 2 อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) เป็นเวลา 1-7 วัน เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ชั่งหาน้ำหนักสดของเส้นใย เป็นเวลา 1-7 วัน โดยชั่งทุกวัน เปรียบเทียบระหว่างฟิวแสนท์กับสายพันธุ์ต้นแบบ

7. สัณฐานวิทยาของดอกเห็ดฟาง (Basidiocarp) ที่เกิดจากสายพันธุ์ฟิวแสนท์

ทดลองเพาะสายพันธุ์เห็ดฟางฟิวแสนท์ที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ F(TH-TA 17) F(TH-TA 39) F(TH-WG 9) F(TH-WG 15) F(TA-WG 6) และ F(TA-WG 20) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ คือ TH TA และ WG โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized complete block design) แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 9 กลุ่ม ๆ ละ 2 ซ้ำ เพาะภายในโรงเพาะที่มีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 28-32°ซ. และความชื้นสัมพัทธ์ 75-85% เพาะในตะกร้าพลาสติกที่มีความกว้าง ความยาว และความสูง เท่ากับ 26x35x9 ซม. ใช้ฟางแห้ง 1.2 กก. ต่อตะกร้า ไส้นุ่นแห้ง 300 กรัมต่อตะกร้า

7.1 การวางแผนการปลูก

7.1.1 การเตรียมเชื้อเห็ดฟางและการขยายหัวเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดฟางสายพันธุ์ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ คือ TH TA WG และสายพันธุ์ฟิวแสนท์ 6 สายพันธุ์ คือ F(TH-TA 17) F(TH-TA 39) F(TH-WG 9) F(TH-WG 15) F(TA-WG 6) F(TA-WG 20) บนอาหารแข็งสูตร 1 อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) เป็นเวลา 5-7 วัน

ทำการขยายเชื้อบริสุทธิ์จากที่เพาะเลี้ยงบนวุ้นให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น และเพียงพอสำหรับการเพาะในตะกร้าขนาด 26x35x9 ซม. วัสดุที่นำมาทำหัวเชื้อ ได้แก่ ข้าวเปลือก และเมล็ดข้าวฟ่างในรูปสำเร็จรูป โดยใช้เข็มเขี่ยตัดเชื้อบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง ให้ได้ขนาด 1.0 ซม.^{2} ใส่เชื้อเห็ดลงไปอยู่กลางขวด ขวดละ 10 ชิ้น เขย่าให้ชิ้นวุ้นกระจายทั่วขวด นำขวดดังกล่าวไปเก็บในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25°ซ. ประมาณ 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มขวด พร้อมที่จะนำไปใส่ในตะกร้าเพาะเป็นดอกเห็ด ควรใช้ภายใน 1 อาทิตย์ หลังจากเชื้อเดินเต็มขวดแล้ว

7.1.2 การปลูกเพื่อให้ได้ดอกเห็ด

สับฟางแห้งให้ได้ขนาดยาวพอประมาณสำหรับใส่ในตะกร้าทดลองได้ ใช้ฟางแห้งหนัก 1.2 กก.ต่อตะกร้า นำฟางแห้งแช่น้ำ pH 6.5 ทิ้งไว้ 1 คืน นำฟางบรรจุลงถุงพลาสติกเพื่อนำไปอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 105°ซ. ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 30 นาที จากนั้นนำไส้นุ่นชุบสารละลาย (ภาคผนวก ค. 6) แล้วจึงนำไปอบไอน้ำภายใต้สภาวะเดียวกัน โดยใช้ไส้นุ่น 300 กรัมต่อตะกร้า

ใส่ฟางที่อิ่มน้ำ และผ่านการอบไอน้ำแล้ว (ฟางที่ใช้ในการทดลองมีความชื้นประมาณ 72.90%) ลงไปในตะกร้าพลาสติกขนาด 26x35x9 ซม. ให้มีความสูงประมาณ 3 ซม. ใช้มือกดให้แน่นพอสมควร โรยไส้นุ่นบาง ๆ ห่างจากขอบกองเข้าไปพอประมาณพร้อมกับใส่เชื้อเห็ดโดยโรยเชื้อบาง ๆ ลงบนไส้นุ่น ใส่ฟางคลุมอีกชั้นหนึ่ง ให้มีความสูงประมาณ 3 ซม. โรยไส้นุ่นและเชื้อเห็ดให้เต็มผิวหน้า โดยใช้หัวเชื้อเห็ดทั้งหมด 80 กรัมต่อตะกร้า ใช้ฟางปิดทับผิวหน้าอีกชั้น ให้มีความสูงประมาณ 3 ซม. รดน้ำบนฟางให้ชุ่ม ใส่ตะกร้าไว้ในถุงพลาสติก พร้อมกับอัดผิวหน้าให้แน่น เพื่อให้เส้นใยเดินเต็มตะกร้า

บันทึกอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ภายในโรงเพาะทดลอง

7.2 ขนาดและรูปร่างดอก

บันทึกรูปร่างดอกเห็ด สีของหมวกเห็ด เนื้อของดอกเห็ด ทั้งสายพันธุ์ต้นแบบและสายพันธุ์ฟิวแสนท์ บันทึกโดยการถ่ายภาพ

วัดความสูงของดอกเห็ด เส้นผ่าศูนย์กลางของหมวกเห็ด และเส้นผ่าศูนย์กลางของก้านเห็ด จำนวนสายพันธุ์ละ 10 ดอก

7.3 จำนวนดอก

นับจำนวนดอกที่เกิดขึ้นทั้งหมด นับตั้งแต่วันที่เห็ดเริ่มออกดอก เป็นเวลา 1 เดือน และบันทึกจำนวนดอกในแต่ละวัน

7.4 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด

นำดอกเห็ดที่เก็บได้ในแต่ละวันมาชั่งหาน้ำหนักสด แล้วนำดอกเห็ดดังกล่าวไปอบแห้งที่ 80°ซ. เป็นเวลา 24 ชม. ทิ้งไว้ให้เย็นใน dessicator นำไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง

หมายเหตุ ทำการเก็บทั้งดอกตูมและดอกบาน

7.5 ระยะเวลาของการเจริญของดอก

บันทึกระยะเวลาตั้งแต่เริ่มเพาะเห็ดจนเกิดตุ่มดอก และเริ่มออกดอก (fruiting body)

7.6 สกัด และหาปริมาณดีเอนเอของเส้นใยที่ได้จากดอกของสายพันธุ์ฟิวแสนท์และสายพันธุ์ต้นแบบ

ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อภายในก้านดอก โดยคัดเลือกดอกเห็ดที่ยังตูมอยู่ วางดอกเห็ดในจานแก้ว ใช้มีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ผ่าเห็ดออกเป็น 2 ซีก ใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้ว กรีดเนื้อเห็ดตรงกลางก้านออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.5 ซม.^{2} ตักชิ้นถ่ายไว้บนอาหารวุ้นแข็งสูตร 1 บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-7 วัน จะเห็นเส้นใยเห็ดเจริญอยู่รอบเนื้อเยื่อ แยกเส้นใยไปเพาะเลี้ยงให้เป็นเส้นใยบริสุทธิ์ต่อไป บนหลอดอาหารวุ้นเอียง

นำเส้นใยบริสุทธิ์ที่แยกได้มาสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด ตามวิธีในข้อ 6.1

7.7 ขนาดของเส้นใย การเกิดแคลมิโดสปอร์ในเส้นใยหลังการเพาะ และขนาดของเบสิดิโอสปอร์

บันทึกขนาดของเส้นใยของฟิวแสนท์ จำนวน 6 สายพันธุ์ ที่แยกจากดอก เปรียบเทียบกับขนาดของเส้นใยของสายพันธุ์ต้นแบบ 3 สายพันธุ์ ที่แยกจากดอกเช่นกัน บันทึกลักษณะและระยะเวลาในการเกิดแคลมิโดสปอร์ของฟิวแสนท์เปรียบเทียบกับลักษณะแคลมิโดสปอร์ของสายพันธุ์ต้นแบบ

ใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเบสิดิโอสปอร์ออกมาจากครีบดอกเห็ด ทำสไลด์แบบเปียก วัดความกว้าง และความยาวของเบสิดิโอสปอร์โดยใช้ออคคูลาร์ไมโครมิเตอร์ซึ่งเทียบอัตราส่วนแล้ว

7.8 การเจริญเติบโตของเส้นใยหลังการเพาะ

เลี้ยงเส้นใยของฟิวแสนท์ และสายพันธุ์ต้นแบบ ทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่แยกจากดอกในอาหารเหลวสูตร 2 อุณหภูมิห้อง (30 ± 2°ซ.) เป็นเวลา 1-7 วัน

ชั่งหาน้ำหนักเปียกของเส้นใย เป็นเวลา 1-7 วัน โดยชั่งทุกวัน เปรียบเทียบระหว่างฟิวแสนท์กับสายพันธุ์ต้นแบบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย