อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จานเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร
2. หลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร
3. ขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิเมตร
4. แท่งแก้วกลมตันขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ยาว 5.5 เซนติเมตร
5. สไลด์ และกระจกปิด
6. Yeast - extract
7. D - glucose
8. Bacto - agar
9. สี giemsa (Azur - Eosin - Methylenblue - Losung) ของ Merck
10. Glacial acetic acid
11. Ethyl alcohol 70% และ 90%
12. 5N HCl
13. Monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4)
14. Dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4)
15. หินฝนเชื้อ
16. ยิบซั่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

17. ดีเกลือ

18. เข็มเขี่ยเชื้อ

19. กระดาษซับ

20. ผ้าขาวบาง

21. ใบมีดโกน

22. น้ำกลั่น

23. ที่เจาะจุกไม้คอรักขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร

24. เมล็ดข้าวฟ่าง

25. ถุงพลาสติกขนาด 7 นิ้ว คูณ 11 นิ้ว

26. ยี้เลื่อยตากแห้งร่อน

27. น้ำตาลทรายขาว

28. รำละเอียด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

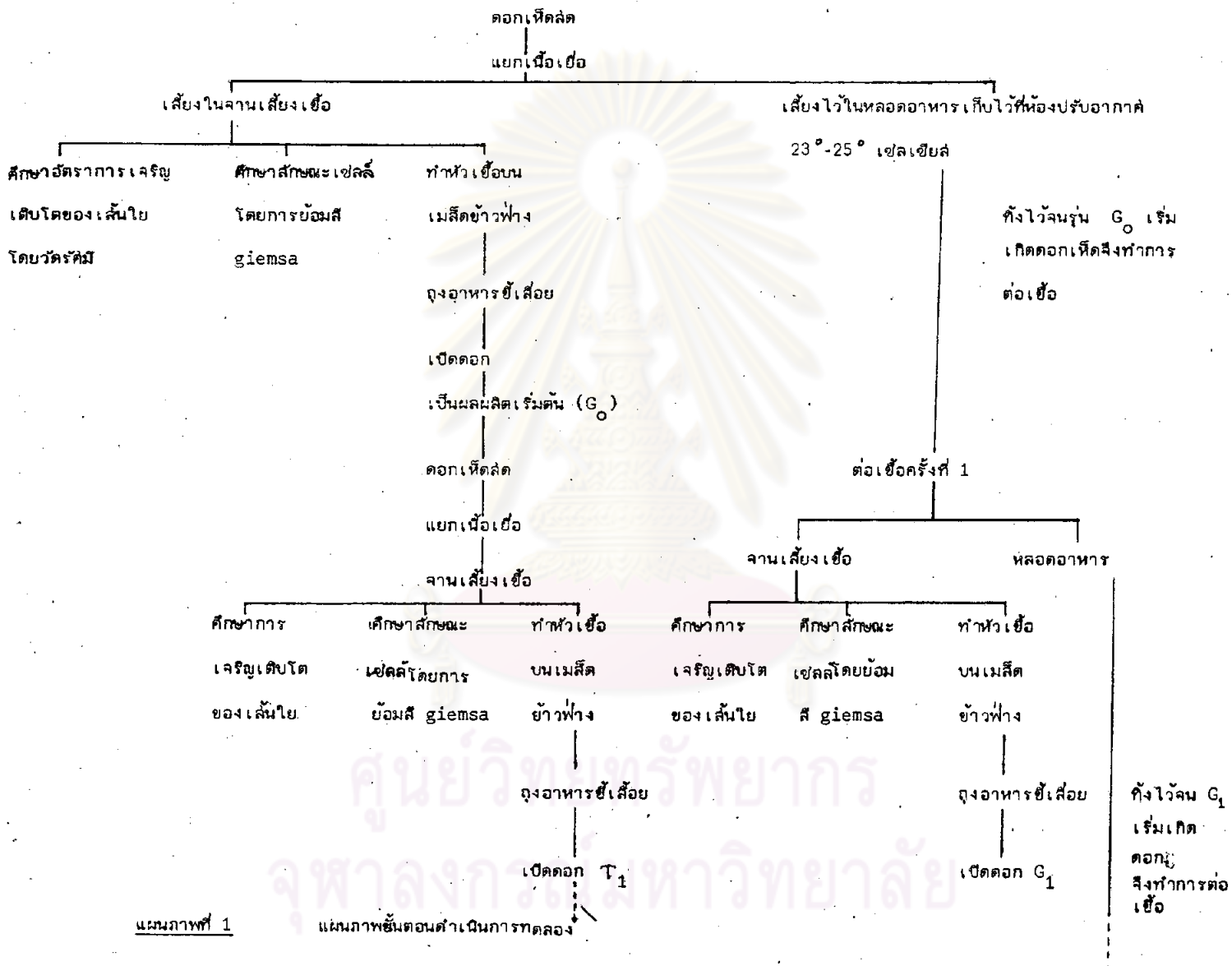
วิธีการ

1. แผนการทดลอง

ดอกเห็ดหูหนูส้ด [Auricularia polytricha (Mont.) Sacc. Mon-leh] ที่ใช้ในการทดลองมี 3 สายพันธุ์คือ กวร 6 นย และ ฟร สายพันธุ์ กวร 6 และ นย ได้มาจาก ดร.สัญชัย ตันตยาภรณ์ สาขาวิทยาไมโค กรมวิชาการเกษตร ส่วนสายพันธุ์ ฟร. ผู้วิจัยได้ตั้งรหัสขึ้นเอง เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่นำมาจากฟาร์มเห็ดเติมรุ่งโรจน์ อำเภอกระทุ่มแบน จังหวัดสมุทรสาคร และไม่สามารถระบุสายพันธุ์แน่นอนได้ เพียงแต่กล่าวว่าได้มาจากอาจารย์ดีพร้อม ไชยวงค์เกียรติ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แผนการทดลอง คือ นำดอกเห็ดมาแยกเนื้อเยื่อ และเลี้ยงให้เกิดเป็นเส้นใยในอาหารวุ้น PDYA (Potato Dextose Yeast-extract Agar) ส่วนหนึ่งเลี้ยงไว้ในหลอดอาหาร (agar slant) และเก็บไว้เป็น stock culture ที่อุณหภูมิประมาณ 23° - 25° เซลเซียส มีแสงสลัว อีกส่วนหนึ่งเลี้ยงไว้ในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย ศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยการย้อมสี giemsa โดยการทำ slide culture และศึกษาผลผลิตโดยนำเส้นใยไปเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างเพื่อทำหัวเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงต่อในถุงขี้เลื่อยเพื่อเปิดดอก

การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบลักษณะทั้งสามชนิดดังกล่าวแล้วข้างต้นในรุ่นต่าง ๆ การต่อเชื้อ (subculture) ใช้สัญลักษณ์แทนว่า G จาก stock culture กับการแยกเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดสดที่เป็นชุดควบคุมใช้สัญลักษณ์แทนว่า T

แผนการทดลองได้แสดงไว้เป็นแผนภาพดังนี้



แผนภาพที่ 1 แผนภาพขั้นตอนดำเนินการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. วิธีการแยกเนื้อเยื่อ

นำดอกเห็ดสด มาล้างให้สะอาดในน้ำกลั่น ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ ผ่าขอบดอกออกด้วยกรรไกร เนื้อของดอกเห็ดจะประกอบด้วยชั้น 2 ชั้น แกะชั้นของดอกนี้ให้แยกจากกัน ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ สะกิดเนื้อเยื่อที่อยู่บริเวณด้านในของชั้นของดอกเห็ด 2 ชั้นนี้ แล้วนำมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อและหลอดอาหาร

3. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDYA

เตรียมอาหาร PDA (มนทกานติ, 2521) และเติม yeast extract 5 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร

4. การศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยโดยวัดรัศมี (linear mesurement)

หลังจากทำการแยกเนื้อเยื่อหรือจากการต่อเชื้อ จาก stock culture มาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อแล้ว เมื่อเส้นใยเจริญออกมาจนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 เซนติเมตร ใช้ที่เจาะไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณรอบนอกโคโลนีห่างจากจุดศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วนำไปวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อซึ่งได้เทอาหาร PDYA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไว้ก่อนแล้ว โดยแต่ละสายพันธุ์เลี้ยงไว้ 9 จาน (ซ้ำ) บ่มเชื้อที่แล่งสลัว อุณหภูมิประมาณ 23°- 25° เซลเซียส วัดการเจริญเติบโตของโคโลนี ทั้ง 4 ด้านของจานเลี้ยงเชื้อตามแนวรัศมีที่ตั้งฉากกันทุกวันจนเส้นใยเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ คือ 42 มิลลิเมตร แล้วหาค่าเฉลี่ยจากรัศมี 36 ค่า (จาก 9 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ค่า)

5. การศึกษาลักษณะของเซลล์โดยการย้อมสีนิวเคลียสด้วย giemsa

การย้อมสีนิวเคลียสด้วย giemsa จะต้องใช้เซลล์หรือเส้นใยที่อายุน้อย ดังนั้นการศึกษาต้องอาศัยเทคนิคของ slide culture เข้ามาช่วยเพราะนอกจากจะได้เซลล์ที่เพิ่งมีการเจริญเติบโตขึ้นมาแล้ว ยังสามารถเห็นการแผ่ขยายของเส้นใยอีกด้วย วิธีทำ slide culture ทำตามแบบของ Riddle's method

วิธีการย้อมสีนิวเคลียสด้วย giemsa ได้กล่าวไว้ในภาคผนวก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การศึกษาผลผลิต

6.1 การทำหัวเชื้อ

ทำตามวิธีการเตรียมหัวเชื้อโดยทั่วไป (อานนท์, 2523) และเติมยิบซั่ม และปูนขาว 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก บรรจุข้าวฟ่างลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 100 กรัม อบฆ่าเชื้อที่ 121° เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยเชื้อเห็ดหูหนูใส่ลงบนเมล็ดข้างฟ่าง ประมาณ 2 สัปดาห์ เส้นใยจะเจริญเต็มขวดเมล็ดข้าวฟ่าง

6.2 การเจริญเติบโตในถุงขี้เลื่อย

เตรียมถุงอาหารขี้เลื่อยมีสูตรผสมดังนี้

ขี้เลื่อยตากแห้งร่อน	50	กิโลกรัม
น้ำตาลทรายขาว	1	"
รำละเอียด	2.5	"
ดีเกลือ	0.1	"
น้ำ	45	"

คลุกเคล้าให้ทั่วกันแล้วนำมาบรรจุถุงพลาสติกขนาด 7 นิ้ว คูณ 11 นิ้ว ถุงละ 500 กรัม นำไปอบฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121° เซลเซียส 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วใส่หัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างลงไปสายพันธุ์ละ 15 ถุง เก็บถุงไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเส้นใยเดินเต็มถุง ทิ้งไว้ต่ออีก 7 วัน เพื่อให้เส้นใยรัดตัวยิ่งขึ้น จากนั้นนำไปเปิดดอก โดยกรีดถุงด้วยใบมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วถุงละ 4 จุด รอยที่กรีดแต่ละจุดเป็นรูปกากะบาดตั้งฉากกันยาวด้านละ 3 นิ้ว เก็บถุงเหล่านี้ไว้ในโรงเพาะเห็ดที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ความชื้นโดยการพ่นน้ำ รักษาความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศไม่ให้ต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ การเก็บดอกเห็ด เก็บดอกบานเต็มที่ ชั่งน้ำหนักดอกเห็ดสด และจัดกลุ่มขนาดของดอกเห็ดซึ่งแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ คือ

ก. ดอกขนาดเล็ก ขนาดตั้งแต่ 0 - 3.0 เซ็นติเมตร

ข. ดอกขนาดกลาง ขนาดตั้งแต่ 3.1 - 5.0 เซ็นติเมตร

ค. ดอกขนาดกลาง ขนาดตั้งแต่ 5.1 - 6.0 เซ็นติเมตร

ง. ดอกขนาดใหญ่มาก ขนาดตั้งแต่ 6.1 ขึ้นไป
ทำการเก็บผลการทดลองเป็นเวลา 2 เดือน

6.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

6.3.1 การวิเคราะห์ทางด้านน้ำหนักของดอกเห็ด ตามวิธีของ Zar (1974) นำน้ำหนักสดของดอกเห็ดหูหนูที่ได้จากการทดลองมาทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างการต่อเชื้อ (G) กับการแยกเนื้อเยื่อ (T) ตามขั้นตอนดังนี้

6.3.1.1 ทำการทดสอบโดยใช้ F-test เพื่อหาตามแตกต่างของความแปรปรวน (variance) ของข้อมูลระหว่างการต่อเชื้อ (G) กับการแยกเนื้อเยื่อ (T)

6.3.1.2 ทำการทดสอบโดยใช้ t-test เพื่อหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (means) ของข้อมูลระหว่างการต่อเชื้อ (G) กับการแยกเนื้อเยื่อ (T)

รายละเอียดได้กล่าวไว้ในภาคผนวก

6.3.2 การวิเคราะห์ทางด้านขนาดของดอกเห็ด

ทำการวิเคราะห์รุ่นแรกและรุ่นสุดท้ายของทุกสายพันธุ์โดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง แต่ละซ้ำมาคูณด้วยค่าคงที่ จำนวนหนึ่ง เพื่อใช้เป็นค่าตัวแทน ซึ่งจะนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดดอกที่มีขั้นตอนเหมือนข้อ 6.3.1.1 และ 6.3.1.2

รายละเอียดได้กล่าวไว้ในภาคผนวก