บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดฟาง

1.1 แหล่งสำรวจและรวบรวมเชื้อเห็ดฟาง

สำรวจและเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดฟางจากแหล่งต่างๆ ระหว่างเดือนมิถุนายน 2544 ถึงเดือนธันวาคม 2546 โดยการเก็บดอกเห็ดฟางหรือหัวเชื้อเห็ดฟางจากแหล่งผลิตหัวเชื้อเห็ดฟางเป็นการค้า (commercial type) ได้แก่ แหล่งจำหน่ายเชื้อพันธุ์เห็ดฟางในประเทศ เกษตรกรผู้เพาะและตลาดขายดอกเห็ด กรมวิชาการเกษตร และดอกเห็ดจากสภาพธรรมชาติ (wild type) เช่นกองฟาง กองเศษพืชวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเช่น เปลือกถั่ว เปลือกมันสำปะหลัง กองขี้เลื่อยไม้ยางพาราที่นำมาใช้เป็นวัสดุเพาะเห็ดในถุงพลาสติก โดยให้ความสำคัญในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นหลัก ทำการจดบันทึกลักษณะเบื้องต้นของเห็ดฟางที่สำรวจและรวบรวมได้ จากนั้นนำดอกเห็ดที่ได้ไปทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อเก็บไว้ศึกษาต่อไป

1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

บันทึกรายละเอียดลักษณะทางสัณฐานของดอกเห็ด เพื่อบันทึกลักษณะประจำพันธุ์ของดอกเห็ดทั้งในระยะที่เป็นดอกตูม (ระยะไข่) และดอกบานจากตัวอย่างที่รวบรวมได้ โดยจดบันทึกลักษณะต่างๆ ดังนี้

1.2.1 ลักษณะรูปร่างและสีของดอกเห็ด

1.2.2 ขนาดของดอกเห็ด

1.2.3 น้ำหนักของดอก

1.3 การแยกเชื้อเห็ดฟางบริสุทธิ์

แยกเชื้อเห็ดฟางบริสุทธิ์จากตัวอย่างดอกเห็ดที่เก็บรวบรวมได้ โดยวิธีการย้ายเนื้อเยื่อ (tissue transplanting method) โดยนำดอกเห็ดฟางที่สมบูรณ์ซึ่งยังตูมอยู่ในระยะไข่ (egg stage) มาทำความสะอาดบริเวณผิวดอกเห็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 % แล้วตัดเนื้อเยื่อภายในดอกเห็ดบริเวณรอยต่อระหว่างก้านดอกส่วนบนกับส่วนที่ใกล้กับหมวกดอก โดยเทคนิคปลอดเชื้อนำมาวางเลี้ยงบนอาหารวุ้น Potato Dextrose Agar (PDA) นำเข้าบ่มไว้ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 32 °ซ ประมาณ 1-3 วัน จะมีเส้นใยสีขาวเจริญออกมารอบเนื้อเยื่อ จากนั้นตัดส่วนปลายเส้นใยบริสุทธิ์ที่เจริญออกมา เก็บเส้นใยใน PDA slant โดยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วนำไปเก็บรักษาไว้เป็น stock culture เพื่อเป็นแหล่งเชื้อ และส่วนหนึ่งนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อไป

2. การทดสอบความสามารถในการออกดอกของเชื้อเห็ดฟาง

นำเชื้อเห็ดฟางทั้งหมดที่สำรวจและเก็บรวบรวมได้จากข้อ 1 มาศึกษาความสามารถในการชักนำให้เกิดดอก โดยศึกษาในสภาพโรงเรือนวางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จำนวน 126 กรรมวิธี (treatment) กำหนดแผนผังจุดวางภายในโรงเรือนของทุกสายพันธุ์แบบสุ่ม ดูแลรักษาวัสดุเพาะเห็ดให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอกเห็ด บันทึกพันธุ์ที่สร้างปุ่มดอก (fruiting primordia) ได้เร็วหลังจากการเพาะ (สุมาลี, 2541)

2.1 การเตรียมหัวเชื้อเห็ดฟางสำหรับเพาะ

วัสดุสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้อาหารธัญพืชคือ เมล็ดข้าวฟ่าง โดยใช้เมล็ดข้าวฟ่างแช่ในน้ำเป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง นำมานึ่งเป็นเวลาประมาณ 30 นาที จนเมล็ดอ่อนนุ่ม บรรจุถุงพลาสติกทนร้อนปริมาณ 50 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที รอให้วัสดุเย็นจึงย้ายเชื้อเห็ดอายุ 3 วันที่เลี้ยงบน PDA ลงในวัสดุหัวเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ เป็นเวลา 7 วัน สังเกตดูว่าเส้นใยเชื้อเจริญเต็มถุง ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นสามารถนำไปเพาะได้

2.2 การเตรียมวัสดุสำหรับเพาะเห็ดฟางโรงเรือน

วัสดุเพาะเห็ดฟางสามารถเตรียมได้โดยการทำปุ๋ยหมัก (สูตรเพาะของเกษตรกร) ตามสัดส่วนดังนี้ ฟางข้าว 40 กิโลกรัม เปลือกมันสำปะหลัง 1 ตัน ปูนขาว 2 กิโลกรัม ยิบซั่ม 2 กิโลกรัม ปุ๋ยคอก 20 กิโลกรัม รำละเอียด 5 กิโลกรัม อาหารเสริม [ถุงเงิน : P, K, Ca, Mg, Na, Zn, Mn, Fe, Cu และ H_2SiO_2(silica)] 5 กิโลกรัม หมักวัสดุรวมกันเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นบรรจุปุ๋ยหมักใส่ในตะกร้าสำหรับเพาะซึ่งมีขนาด 20 x 28 x 10 ซม. เช็ดทำความสะอาดตะกร้าด้วย 70% แอลกอฮอล์ รองพื้นตะกร้าด้วยฟางข้าวก่อนใส่วัสดุเพาะปริมาณ 0.8 กิโลกรัม นำตะกร้าขึ้นวางเรียงบนชั้นขนาด 1 x 9 เมตร ระยะห่างระหว่างชั้น 45 เซนติเมตร จำนวน 4 ชั้น ภายในโรงเรือนซึ่งมีขนาดความกว้าง 3 เมตร ยาว 10 เมตร หลังจากนั้นเปิดโรงเรือนทิ้งไว้ 1 วันเพื่อระบายกลิ่นของก๊าซแอมโมเนียออกจากโรงเรือน วันรุ่งขึ้นรดน้ำวัสดุเพาะให้ชุ่มปิดโรงเรือนให้สนิทเพื่ออบไอน้ำฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อนทำการเพาะ (pasteurization) เมื่ออุณหภูมิภายในโรงเรือนสูงประมาณ 60-70 °ซ เริ่มจับเวลาโดยใช้เวลาในการอบไอน้ำเพื่อฆ่าเชื้อประมาณ 2-3 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับขนาดโรงเรือนและความสม่ำเสมอของอุณหภูมิ จากนั้นปล่อยให้อุณหภูมิภายในโรงเรือนเย็นลง (ประมาณ 35 °ซ) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 วัน จึงโรยเชื้อเห็ดลงบนวัสดุเพาะได้

2.3 การเพาะเห็ดฟาง

การเพาะเห็ดฟางใช้หัวเชื้อเห็ดฟาง 50 กรัมต่อวัสดุเพาะ 0.8 กิโลกรัม โรยลงบนวัสดุเพาะที่บรรจุในตะกร้าพลาสติก หลังโรยเชื้อเห็ดฟางเสร็จแล้วปิดโรงเรือนให้สนิทเพื่อให้เส้นใยเห็ดฟางเจริญคลุมวัสดุเพาะก่อนทำการตัดเส้นใยเห็ดฟาง

2.4 การตัดเส้นใยเห็ดฟาง

การตัดเส้นใยซึ่งหมายถึงการให้ความชื้นอย่างเต็มที่ให้กับเส้นใยเห็ดฟาง เพื่อให้เส้นใยเห็ดเกิดการรัดตัวสร้างตุ่มดอกและพัฒนาเจริญเป็นดอกเห็ดที่พร้อมเก็บผลผลิต ทำได้หลังจากเชื้อเห็ดฟางเจริญคลุมเต็มผิวหน้าวัสดุเพาะเห็ด ทำการตัดเส้นใยเห็ดฟางโดยการพ่นน้ำเป็นฝอยลงบนเส้นใยเห็ด จากนั้นปิดโรงเรือนเพื่อให้เส้นใยเห็ดเกิดการรัดตัว ระหว่างนี้สามารถเปิดโรงเรือนเห็ดเพื่อระบายอากาศภายในโรงเรือนไม่ให้ร้อนมากจนเกินไป

2.5 การบันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง

เก็บผลผลิตของเห็ดฟางที่ได้ รวมทั้งเปรียบเทียบผลผลิตของเชื้อเห็ดฟางแต่ละไอโซเลตที่สำรวจและเก็บรวบรวมได้ โดยศึกษาไอโซเลตที่สามารถให้ผลผลิตได้ น้ำหนักรวมทั้งหมดของเห็ดฟางที่ให้ผลผลิต และลักษณะของดอกเห็ด รูปร่าง สี ขนาด

3. การแยกสปอร์เดี่ยวและศึกษาคุณสมบัติของสปอร์เดี่ยวเชื้อเห็ดฟาง

3.1 วิธีการทำ spore print ของเห็ดฟาง

นำดอกเห็ดฟางส่วนหนึ่งที่ได้จากการเพาะที่มีลักษณะดีตามที่คัดเลือกไว้จาก 2 หรือจากการสำรวจและรวบรวมสายพันธุ์จาก 1.1 คัดเลือกดอกเห็ดฟางที่สมบูรณ์และอยู่ในระยะยืดตัวกำลังบาน มาทำการฆ่าเชื้อทำความสะอาดบริเวณผิวด้วยเอทธิลแอลกฮอล์ 70 % ตัดก้านดอกด้วยวิธีปลอดเชื้อ แล้วนำไปวางบนกระดาษกรองปลอดเชื้อใน Petri dish เพื่อรองรับสปอร์ ในกล่องพลาสติกที่ผ่านการทำความสะอาดฆ่าเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °ซ) เพื่อให้ดอกเห็ดปลดปล่อยสปอร์ลงบนกระดาษกรองโดยปล่อยทิ้งไว้ 12-24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรวบรวมสปอร์ที่ได้ไว้ใน Petri dish ที่ปลอดเชื้อ เก็บรวบรวมสปอร์ที่ได้ไว้ศึกษาต่อไป

3.2 การศึกษาความทนต่ออุณหภูมิต่ำ (4 ± 3 °ซ) ของสปอร์เชื้อเห็ดฟาง

นำสปอร์ที่ได้จากการทำรอยพิมพ์สปอร์มาทำสารแขวนลอยสปอร์เห็ดฟางในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยตรวจนับสปอร์ให้ได้ความเข้มข้น 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารแขวนลอยสปอร์ 100 ไมโครลิตร spread plates บนอาหาร PDA (10^6 สปอร์/จานอาหาร) บ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 4 ± 3 °ซ และ 15 °ซ ตรวจการงอกของสปอร์และเจริญเติบโตเป็นเส้นใยได้ ที่อุณหภูมิต่ำ ภายในเวลา 1-6 เดือน

3.3 การแยกสปอร์เดี่ยว

คัดเลือกไอโซเลตที่ดอกเห็ดฟางมีลักษณะรูปร่าง ขนาดที่ต้องการ และดอกที่ได้จากการเพาะชักนำให้เกิดดอกนำมาทำรอยพิมพ์สปอร์ และแยกโคโลนีจากสปอร์เดี่ยว โดยนำสปอร์ใส่ลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นสารแขวนลอยสปอร์แล้วนำไป streak plate บนอาหาร WA บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ ตักสปอร์ที่งอกด้วยเข็มขนาดเล็กภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วางบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ คัดเลือกสปอร์ที่สามารถเจริญต่อไปได้แต่ละไอโซเลตแยกเก็บใน PDA slant ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4 การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดฟางจากสปอร์เดี่ยว

โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยของเห็ดฟางแต่ละไอโซเลต บนอาหารPDA โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ลักษณะของเส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA และการสร้างคลามิโดสปอร์ (chlamydospore) ของเห็ดฟางแต่ละไอโซเลตบนอาหาร PDA

นำเชื้อเห็ดฟางที่รวบรวมได้จากแยกสปอร์เดี่ยวทั้งหมดจำนวน 126 ไอโซเลต มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเห็ดฟางที่สำรวจและเก็บรวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.1 วิธีการทดสอบ นำเชื้อเห็ดฟางบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการแยกสปอร์เดี่ยว มาเพิ่มปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borrer เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. เผาไฟรอให้เย็นแล้วเจาะบริเวณส่วนปลายของเส้นใยเห็ดฟาง นำไปวางตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติมสารปฏิชีวนะ streptomycin ให้มีความเข้มข้น 100 ppm เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำเชื้อเห็ดไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 °ซ

3.4.2 การบันทึกผลการศึกษา การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเห็ดฟางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เลือกศึกษา 3 ลักษณะเนื่องจากคาดว่าจะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการให้ผลผลิตของเห็ดฟาง ลักษณะที่นำมาใช้ในการศึกษามีดังนี้คือ

3.4.2.1 อัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดฟาง บันทึกการเจริญของเส้นใยโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเห็ดทุก 24 ชั่วโมง จนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.2.2 ลักษณะของเส้นใยเห็ดฟางที่เจริญบนอาหาร จดบันทึกลักษณะของเส้นใยเห็ดฟางที่เจริญเหนือผิวหน้าอาหาร โดยบันทึกลักษณะการเจริญของเส้นใยเป็น 2 ลักษณะ คือ เส้นใยเจริญราบไปกับผิวหน้าอาหาร และเส้นใยเจริญหนาฟู

3.4.2.3 การสร้าง chlamydospores หรือ primordia เมื่อเชื้อเจริญเต็มจานอาหารแล้วบ่มเชื้อต่อจนครบระยะเวลา 15 วันที่อุณหภูมิ 32 °ซ ตรวจสอบเส้นใยเห็ดฟางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยบันทึกจำนวนไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างและไม่สร้าง chlamydospore หรือ primordia บนอาหาร

4. ศึกษาความสามารถในการเก็บรักษาดอกเห็ดในสภาพอุณหภูมิต่ำและการทนอุณหภูมิต่ำของเส้นใยเห็ดฟาง

4.1 ความสามารถในการเก็บรักษาดอกเห็ดในสภาพอุณหภูมิต่ำ

แบ่งดอกเห็ดที่สำรวจและรวบรวมได้ จากข้อ 1.1 มาเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งรักษาอุณหภูมิที่ 4 ± 3 °ซ บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของดอกเห็ดและจำนวนวันที่เห็ดเริ่มเน่าสลาย และเห็ดฟางไอโซเลตที่สามารถชักนำให้เกิดดอกได้ในข้อ 2.3 นำมาศึกษาความสามารถในการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ ที่ 4 ± 3 °ซ ในตู้เย็น โดยบรรจุเห็ดฟางในถุงพลาสติกเจาะรูจำนวน 6 รู ซึ่งประยุกต์ตามวิธีการทดลองของ จุฬาภรณ์ (2545) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผลโดยจดบันทึกจำนวนวันที่ดอกเห็ดฟางสามารถคงสภาพได้โดยไม่เน่าเสีย

4.2 การทนอุณหภูมิต่ำของเส้นใยเชื้อรา

ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดฟางแต่ละไอโซเลตบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิต่ำ (4 ± 3 °ซ) เปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตของเส้นใยที่อุณหภูมิ 32 °ซ คัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตในอุณหภูมิต่ำได้

5. การผลิตเห็ดฟางลูกผสม

5.1 การผสม

คัดเลือกเห็ดฟางเฉพาะไอโซเลตที่มีความสามารถในการชักนำให้เกิดดอกเห็ดได้ และมีลักษณะที่เด่นในทางการค้า (ขนาดดอกสม่ำเสมอ หรือ ดอกใหญ่ ผลผลิตดอกเห็ดต่อรุ่นมาก และหรือทนทานต่ออุณหภูมิต่ำ) ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์โดยมาทำการแยกสปอร์เดี่ยวแล้วนำเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว (single spore culture) ที่สามารถสร้างเส้นใยเจริญต่อไปได้ (viable mycelium) มาเลี้ยงบนจานอาหาร PDA ศึกษาการเจริญของเส้นใยแบ่งลักษณะความแตกต่างของการเจริญ เป็นพวกเจริญเร็วสามารถเต็มจานอาหารภายใน 3 วัน พวกเจริญปานกลาง และพวกเจริญช้าซึ่งไม่เจริญเต็มจานอาหารภายใน 7 วัน เลือกสายพันธุ์ที่เจริญเร็ว และสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้าง chlamydospore เก็บไว้ใช้ต่อไป

นำเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว ที่คัดเลือกไว้เป็นพ่อแม่พันธุ์มาจับคู่ผสมพันธุ์กันโดยวิธี anastomosis โดยวางชิ้นวุ้นของคู่ผสมห่างกัน 3 เซนติเมตรในจานเลี้ยงเชื้อหรือในหลอดทดลองทิ้งไว้ประมาณ 7-10 วัน เส้นใยทั้งสองสายพันธุ์จะประสานกัน ตัดชิ้นส่วนวุ้นตรงกลางบริเวณส่วนที่ประสานกัน (เกิด anastomosis) ของแต่ละคู่ มาเก็บรักษาไว้เป็น stock culture เพื่อเป็นแหล่งเชื้ออ้างอิง นำไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ และนำไปชักนำให้เกิดดอกตามวิธีการในข้อ 6

5.2 ศึกษาการเจริญของเส้นใยเชื้อเห็ดฟางลูกผสม

โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดฟางลูกผสมแต่ละไอโซเลตบนอาหาร PDA โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ลักษณะของเส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA และการสร้างคลามิโดสปอร์ (chlamydospore) ของเห็ดฟางลูกผสมแต่ละไอโซเลต บนอาหาร PDA

นำเชื้อเห็ดฟางลูกผสมทั้งหมดจำนวน 82 ไอโซเลต มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเห็ดฟางที่สำรวจและเก็บรวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.2.1 วิธีการทดสอบ นำเชื้อเห็ดฟางลูกผสมที่ได้จากข้อ 5.1 มาเพิ่มปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borrer เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. เผาไฟรอให้เย็นแล้วเจาะบริเวณส่วนปลายของเส้นใยเห็ดฟาง นำไปวางตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติมสารปฏิชีวนะ streptomycin ให้มีความเข้มข้น 100 ppm เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำเชื้อเห็ดฟางลูกผสมไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 °ซ

5.2.2 การบันทึกผลการศึกษา การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเห็ดฟางลูกผสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เลือกศึกษา 3 ลักษณะเนื่องจากคาดว่าจะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการให้ผลผลิตของเห็ดฟาง ลักษณะที่นำมาใช้ในการศึกษามีดังนี้คือ

5.2.2.1 ความเร็วในการเจริญของเส้นใยเห็ดฟาง บันทึกการเจริญของเส้นใยโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเห็ดทุก 24 ชั่วโมง จนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.2.2.2 ลักษณะของเส้นใยเห็ดฟางที่เจริญบนอาหาร จดบันทึกลักษณะของเส้นใยเห็ดฟางลูกผสมที่เจริญเหนือผิวหน้าอาหาร โดยบันทึกลักษณะการเจริญของเส้นใยเป็น 2 ลักษณะ คือ เส้นใยเจริญราบไปกับผิวหน้าอาหาร และเส้นใยเจริญหนาฟู

5.2.2.3 การสร้าง chlamydospores หรือ primordium ของเส้นใยเห็ดฟางลูกผสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยบันทึกจำนวนไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างและไม่สร้าง

chlamydospore หรือ primordium รวมทั้งลักษณะของ chlamydospore หรือ primordium ที่เส้นใยเห็ดฟางสร้างบนอาหาร เป็นระยะเวลา 15 วัน

6. การชักนำให้เกิดดอกในลูกผสมและการศึกษาลักษณะต่างๆของลูกผสม

เลี้ยงเชื้อเห็ดที่ได้จากการผสมรวมกันบนอาหารธัญพืชคือ เมล็ดข้าวฟ่างหรือปุ๋ยหมักเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเห็ดฟาง เมื่อเส้นใยเจริญเต็มที่แล้วจึงนำไปเพาะบนวัสดุเพาะเห็ดฟาง ใช้แผนการทดลองแบบ randomized completely block design สายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ กำหนดแผนผังจุดวางภายในโรงเรือนของทุกสายพันธุ์แบบสุ่ม ดูแลรักษาวัสดุเพาะเห็ดให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอกเห็ด บันทึกลูกผสมพันธุ์ที่สร้างปุ่มดอก (fruiting primordia)ได้เร็วหลังจากการเพาะ (สุมาลี, 2541)

บันทึกลักษณะของการเกิดดอกเห็ด ลักษณะของดอก สี ขนาด และน้ำหนักของผลผลิตที่ได้ทั้งหมด เปรียบเทียบกันในแต่ละลูกผสม และเปรียบเทียบกับเชื้อเห็ดฟางสายพันธุ์การค้าที่นำมาเปรียบเทียบมาตรฐานของเชื้อเห็ดฟางลูกผสมที่ทดสอบ แต่เริ่มให้ผลผลิต จนถึงอายุได้ 15 วันหลังการเพาะ

บันทึกลักษณะรูปร่าง ขนาดและสีของดอกเห็ดลูกผสมที่ได้ น้ำหนักผลผลิตดอกเห็ดที่ได้รับ จัดทำ spore print ตรวจสอบลักษณะความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำโดยศึกษาระดับความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำของดอกเห็ดที่เกิดขึ้น

6.1 การเตรียมหัวเชื้อเห็ดฟางสำหรับเพาะ

วัสดุสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้อาหารปุ๋ยหมัก โดยใช้ปุ๋ยคอก : เปลือกถั่วเหลือง : ไส้นุ่น ในอัตรา 1 : 1 : 4 ที่หมักเป็นเวลา 3 วันโดยกลับกองปุ๋ยทุกวัน(ดัดแปลงจากปัญญาและกิตติพงษ์, 2538) นำมาบรรจุในถุงพลาสติกทนร้อนปริมาณ 50 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที รอให้วัสดุเย็นจึงย้ายเชื้อเห็ดอายุ 3 วันที่เลี้ยงบน PDA ลงในวัสดุหัวเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 32 °ซ เป็นเวลา 7 วัน สามารถนำไปเพาะได้

6.2 การเตรียมวัสดุสำหรับเพาะเห็ดฟางโรงเรือน

วัสดุเพาะเห็ดฟางสามารถเตรียมได้โดยการทำปุ๋ยหมัก ตามสัดส่วนดังนี้ ฟางข้าว 40 กิโลกรัม เปลือกมันสำปะหลัง 1 ตัน ปูนขาว 2 กิโลกรัม ยิบซั่ม 2 กิโลกรัม ปุ๋ยคอก 20 กิโลกรัม รำละเอียด 5 กิโลกรัม อาหารเสริม 5 กิโลกรัม หมักวัสดุรวมกันเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นบรรจุปุ๋ยหมักใส่ในตะกร้าสำหรับเพาะซึ่งมีขนาด 20 x 28 x 10 ซม. โดยรองพื้นตะกร้าด้วยฟางข้าวก่อนใส่วัสดุเพาะ นำตะกร้าขึ้นวางเรียงบนชั้นขนาด 1 x 9 เมตร ระยะห่างระหว่างชั้น 45 ซม. จำนวน 4 ชั้น ภายในโรงเรือนซึ่งมีขนาดความกว้าง 3 เมตร ยาว 10 เมตร หลังจากนั้นเปิดโรงเรือนทิ้งไว้ 1 วันเพื่อระบายกลิ่นของก๊าซแอมโมเนียออกจากโรงเรือน วันรุ่งขึ้นรดน้ำวัสดุเพาะให้ชุ่มปิดโรงเรือนให้สนิทเพื่อ

อบไอน้ำฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อนทำการเพาะ (pasteurization) เมื่ออุณหภูมิภายในโรงเรือนสูงประมาณ 60-70 °ซ เริ่มจับเวลาโดยใช้เวลาในการอบไอน้ำเพื่อฆ่าเชื้อประมาณ 2-3 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับขนาดโรงเรือนและความสม่ำเสมอของอุณหภูมิ จากนั้นปล่อยในอุณหภูมิภายในโรงเรือนเย็นลง (ประมาณ 35 °ซ) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 วัน จึงโรยเชื้อเห็ดลงบนวัสดุเพาะได้

6.3 การเพาะเห็ดฟาง

การเพาะเห็ดฟางใช้หัวเชื้อเห็ดฟาง 50 กรัมต่อวัสดุเพาะ 0.8 กิโลกรัม โรยลงบนวัสดุเพาะที่บรรจุในตะกร้าพลาสติก หลังโรยเชื้อเห็ดฟางเสร็จแล้วปิดโรงเรือนให้สนิทเพื่อให้เส้นใยเห็ดฟางเจริญคลุมวัสดุเพาะก่อนทำการตัดเส้นใยเห็ดฟาง

6.4 การตัดเส้นใยเห็ดฟาง

การตัดเส้นใย หมายถึง การให้ความชื้นอย่างเต็มที่ให้กับเส้นใยเห็ดฟาง เพื่อให้เส้นใยเห็ดเกิดการรัดตัวสร้างตุ่มดอกและพัฒนาเจริญเป็นดอกเห็ดที่พร้อมเก็บผลผลิต ทำได้หลังจากเชื้อเห็ดฟางเจริญคลุมเต็มผิวหน้าวัสดุเพาะเห็ด ทำการตัดเส้นใยเห็ดฟางโดยการพ่นน้ำเป็นฝอยลงบนเส้นใยเห็ดด้วยกระบอกฉีดน้ำ จากนั้นปิดโรงเรือนเพื่อให้เส้นใยเห็ดเกิดการรัดตัว ระหว่างนี้สามารถเปิดโรงเรือนเห็ดเพื่อระบายอากาศภายในโรงเรือนไม่ให้ร้อนมากจนเกินไป

6.5 การบันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ผลผลิตของเห็ดฟางที่ได้จะนำมาใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานกับความสามารถในการให้ผลผลิตของเห็ดฟาง และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ รวมทั้งเปรียบเทียบผลผลิตของเชื้อเห็ดฟางแต่ละไอโซเลตที่สำรวจและเก็บรวบรวมได้ ซึ่งลักษณะที่การศึกษามีดังนี้

(1) ไอโซเลตที่สามารถให้ผลผลิตได้

(2) น้ำหนักรวมทั้งหมดและน้ำหนักต่อดอกของเห็ดฟาง

(3) จำนวนดอกเห็ดทั้งหมด

(4) ลักษณะของดอกเห็ด รูปร่าง สี ขนาด

(5) การวิเคราะห์ผลผลิตของดอกเห็ด โดยการคำนวณผลผลิตจากค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการให้ผลผลิต (Biological efficiency, %B.E.) สามารถคำนวณได้จากเปอร์เซ็นต์น้ำหนักดอกเห็ดสดต่อน้ำหนักของวัสดุเพาะ (Quimio et al., 1990) ตามสูตร

$$\%\,B.\,E. = \frac{\text{ผลผลิตเห็ดทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักวัสดุเพาะ}} \times 100$$

6.6 ศึกษาการทนอุณหภูมิต่ำของดอกเห็ดฟางลูกผสม

โดยนำดอกเห็ดฟางลูกผสมที่เพาะได้มาเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4 ± 3 °ซ บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของดอกเห็ดและจำนวนวันที่เห็ดเริ่มเน่าสลาย

7. การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ กับลูกผสม

7.1 การเตรียมเชื้อเห็ดฟางบริสุทธิ์สำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยเห็ดฟางสายพันธุ์พ่อ-แม่ และลูกผสมที่ต้องการศึกษามาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว potato dextrose broth (PDB) นำเข้าเครื่องเขย่าแบบหมุนวน ความเร็วรอบ 120 rpm ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ เป็นเวลา 7 วัน ล้างเส้นใยใน 1X STE (0.1 M NaCl, 10mM Tris-HCL, pH 8.0, 1mM EDTA, pH8.0) เก็บเส้นใยเห็ดฟางและลูกผสมที่อุณหภูมิ -20 °ซ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

7.2 การแยกสกัดดีเอ็นเอ

แยกสกัด genomic DNA ตามวิธีของ Stewart และคณะ 1993 ซึ่งดัดแปลงโดยตามกรรมวิธีของเพชรรัตน์ (2545) ที่ใช้แยกสกัดดีเอ็นเอพืชแบบง่าย กล่าวโดยสังเขป คือ บดตัวอย่างเส้นใยเห็ดฟางบริสุทธิ์ 0.15 กรัม ในโกร่งเย็น โดยเติม DNA extraction buffer (2% CTAB (w/v), 1.42 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCL, pH 8.0, 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone,5 mM citric acid) 600 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethanol 3 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียดเทใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (eppendorf) ผสมเบาๆ โดยพลิกหลอดกลับหัวท้ายไปมาเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 °ซ นาน 30 นาที กำจัดตะกอนโปรตีนและเศษเซลล์โดยการเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 :1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ โดยพลิกหลอดกลับหัว-ท้ายไปมา นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ดูดน้ำใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม isopropanal ที่แช่เย็น (-20 °ซ) ปริมาตร 0.7 เท่าของสารละลาย ผสมเบาๆโดยพลิกหลอดกลับหัว- ท้ายไปมา นาน 5 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ –20 °ซ นาน 20 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทส่วน isopropanal ทิ้ง เก็บตะกอนขาวใสก้นหลอด คว่ำหลอดให้แห้งบนกระดาษทิชชู ล้างตะกอนด้วย ethyl alcohol 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง เท ethyl alcohol 70 % ทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชู ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แบ่งสารละลายดีเอ็นเอมา 5 ไมโครลิตร เจือจางในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 495 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดซับแสงที่ 260 และ

280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer อีก 5 ไมโครลิตรนำมาตรวจสอบโดย 0.8 % agarose gel eletrophoresis ส่วนที่เหลือเก็บรักษาไว้ที่ –20 °ซ เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR

7.3 การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

เปรียบเทียบลักษณะทางลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ และลูกผสมที่ได้ด้วยเทคนิค Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งได้เลือกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ DNA ของเห็ดฟาง โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้

เพิ่มปริมาณ DNA ของเห็ดฟางโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer) ซึ่งเป็นไพรเมอร์สายสั้นๆ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ ชนิดของ primer ที่เลือกใช้ในเบื้องต้นสำหรับสร้างแบบแผนของ RAPD ประกอบด้วยไพรเมอร์ A-02 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-TGCCGAGCTG-3' ไพรเมอร์ A-07 ลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-GAAACGGGTG-3' และไพรเมอร์ A-09 ลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-GGGTAACGCC-3' ที่สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดในกลุ่ม *Agaricus* ได้ (Khush, 1992) ตามวิธีของเพชรรัตน์ (2545)

Initial denaturation	94 °ซ	นาน 1 นาที , 1 รอบ
PCR (35 รอบ)	94 °ซ	นาน 1 นาที
	36 °ซ	นาน 1 นาที
	72 °ซ	นาน 1 นาที
final extention	72 °ซ	นาน 2 นาที , 1 รอบ
maintained temperature	10 °ซ	นาน 5 นาที ด้วย GeneticThermal

Cycle 35 รอบ ภายใต้เงื่อนไข denature 94 °ซ นาน 1 นาที annealing 36 °ซ นาน 1 นาที และ extension 72 °ซ นาน 1 นาที เปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ที่เกิดขึ้นด้วย gel electrophoresis ชนิด horizontal โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 2 % ร่วมกับ 0.5 X Tris-borate electrophoresis buffer กำหนดกระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 60 นาที และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (PCR products)

ศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดฟางพ่อ แม่ และลูกผสมไอโซเลตต่างๆ ที่คัดเลือกมาศึกษากับข้อมูลต่างๆ ในทางด้านรูปร่าง ลักษณะต่างๆ ของดอกเห็ด และความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำที่ได้รับจากการศึกษา นำรูปแบบของ DNA fingerprint ของเชื้อเห็ดฟางที่ทำการศึกษาจากเทคนิค RAPD มา สร้างเป็น dendrogram เพื่อหาความสัมพันธ์ของรูปแบบ DNA ด้วยโปรแกรม NTSYS PC Version 2.0 ของพ่อ แม่และลูกผสมเห็ดฟางเพื่อวิเคราะห์หาชนิดของ primer ที่เหมาะสม หรือหาแถบดีเอ็นเอที่คาดว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ดีเป็นที่ต้องการของ

ตลาดเห็ดฟาง ได้แก่ ลักษณะรูปทรงและขนาดดอก การให้ผลผลิตสูง เพื่อพัฒนาให้เป็น genetic marker ต่อไปจากรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ