

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์ และสารเคมี

1. อุปกรณ์รวบรวมเห็ดจากอุทยานแห่งชาติคอยสุเทพ-ปุย
 - 1.1 อุปกรณ์ในการบันทึกสภาพแหล่งอาศัยของเห็ด
 - 1.1.1 เทอร์โมมิเตอร์
 - 1.1.2 ไฮโกรมิเตอร์
 - 1.1.3 กระดาษวัด pH
 - 1.1.4 เครื่องวัดระดับความสูง
 - 1.1.5 แผนที่อุทยานแห่งชาติคอยสุเทพ-ปุย
 - 1.2 อุปกรณ์ในการเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ด
 - 1.2.1 พลั่วมือ
 - 1.2.2 มีดปลายแหลม
 - 1.2.3 ตะกร้า
 - 1.2.4 กระดาษ
 - 1.2.5 กระดาษใบ
 - 1.2.6 ถุงพลาสติก
 - 1.2.7 ขางรัด
 - 1.2.8 กล่องพลาสติกบุด้วยแผ่นโฟม
 - 1.2.9 เช็มหมุด
 - 1.2.10 กระดาษขาว-ดำ
2. อุปกรณ์ศึกษาโครงสร้าง ลักษณะโค โดนี เส้นใย และการเจริญเติบโตของเส้นใย
 - 2.1 อุปกรณ์ตรวจสอบและบันทึกข้อมูลตัวอย่างเห็ด
 - 2.1.1 ไม้บรรทัด
 - 2.1.2 แวนชยาย
 - 2.1.3 กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ พร้อมอุปกรณ์บันทึกภาพ
 - 2.1.4 กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ พร้อมอุปกรณ์บันทึกภาพ

2.1.5 ใบมีด

2.1.6 กล้องถ่ายรูป Nikon EOS 500 N + macrolens

2.1.7 ปากคืบ

2.1.8 เข็มเขี่ย

2.1.9 ชุดทำสไลด์ (ภาคผนวก ง)

2.1.10 แผ่นเทปสีของ Kangsadal Books Publishing (1996) (ภาคผนวก จ)

2.2 อุปกรณ์แยกเชื้อเห็ด

2.2.1 ตู้ฉายเชื้อ + หลอด UV ขนาด 30 W

2.2.2 มีดผ่าตัด

2.2.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.2.4 จานเลี้ยงเชื้อ

2.2.5 แอลกอฮอล์ 70% และ 95%

2.2.6 สารละลาย sodium hypochlorite 5.25 % w/v (Clorox)

2.2.7 กระดาษฟิชชู่ฆ่าเชื้อ

2.2.8 น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

2.2.9 อาหารวุ้นเชื้อ PDA

2.2.10 เข็มเขี่ย

2.3 อุปกรณ์ศึกษาและบันทึกลักษณะโคโคโคนี

2.3.1 ไม้บรรทัด

2.3.2 อาหารวุ้น PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ

2.3.3 กล้องถ่ายรูป Nikon EOS 500N + Macrolens

2.3.4 ขาค้างกล้องถ่ายรูป

2.3.5 เข็มเขี่ย

2.3.6 Cork borer

2.3.7 ตู้ฉายเชื้อ

2.4 อุปกรณ์ศึกษาลักษณะเส้นใย

2.4.1 กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ พร้อม micrometer

2.4.2 แท่งแก้วรูปตัววี

2.4.3 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์

2.4.4 ลำโพงน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.4.5 เข็มเขี่ยเชื้อ

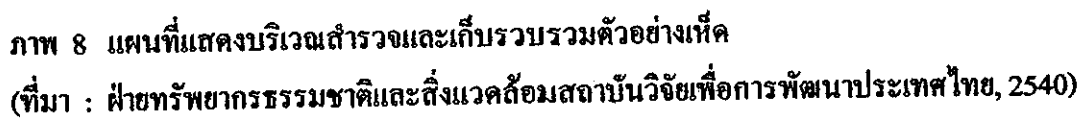
- 2.4.6 กล้องถ่ายภาพ
- 2.4.7 lactophenol cotton blue
- 2.4.8 น้ำยาทาเล็บ
- 3. อุปกรณ์ศึกษาการสร้างดอกเห็ด
 - 3.1 ขี้าวฟาง
 - 3.2 หลอดทดลองขนาดใหญ่
 - 3.3 Thermometer
 - 3.4 Hygrometer
 - 3.5 จุกสำลี
 - 3.6 อาหารทดสอบการสร้างดอกเห็ดชนิดต่าง ๆ (ภาคผนวก ก)
 - 3.7 โรงเพาะเห็ด
- 4. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดอกเห็ดและเชื้อเห็ด
 - 4.1 อุปกรณ์ในการเก็บรักษาตัวอย่างดอกเห็ด
 - 4.1.1 ตู้อบเห็ด
 - 4.1.2 จีสิกานจถ
 - 4.1.3 กล่องพลาสติก
 - 4.2 อุปกรณ์ในการเก็บรักษาเชื้อเห็ด
 - 4.2.1 น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ
 - 4.2.2 Cork borer
 - 4.2.3 หลอดฝาเกลียว
 - 4.2.4 ตู้เย็น
 - 4.2.5 เข็มเขี่ย
 - 4.2.6 ตู้ถ่ายเชื้อ
- 5. อุปกรณ์ระบุชื่อวิทยาศาสตร์
 - 5.1 หนังสือรูปวิธานของ Ainsworth *et al.*(1973) , Ryvaden and Johansen (1980) และ Ellis and Ellis (1990)
 - 5.2 หนังสือของราชบัณฑิตยสถาน (2539) อนงค์ (2539) อดิษฐ์ (2539) เสน่ห์ (2540) และดวงจันทร์ (2541)

วิธีการสำรวจและวิจัย

1. การรวบรวมเห็ดจากเขตอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย

ศึกษาขอบเขตของอุทยานจากแผนที่ (ภาพ 8) เลือกป่าตัวแทนที่ระดับความสูงต่างกันได้ 4 แห่ง ได้แก่ ป่าบริเวณวังบัวบานเป็นตัวแทนของป่าผสมผลัดใบ มีความสูง 650 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง ประกอบด้วยไม้ผลัดใบหลากหลายชนิด พืชเด่นบริเวณนั้น ได้แก่ สัก ประดู่ รกฟ้า และ คีว (ภาพ 9) ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 60 – 70% อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 22 – 30 องศาเซลเซียส ลักษณะดินเป็นดินส่วนใหญ่จะเป็นหินกรวด ชั้นของดินคั้น ผิวหน้าดินคั้น และมีปริมาณอินทรีย์วัตถุต่ำ เมื่อดินจับตัวกันแน่นทำให้ดินมีการระบายน้ำได้ช้า ป่าบริเวณน้ำตกมณฑาธารมีความสูง 700 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง เป็นตัวแทนของป่าเบญจกึ่งรังประกอบด้วยไม้หลายชนิด เช่น เหียง พลวง พะยอม และก่อคาหุ (ภาพ 10) ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 70 – 90 % อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 22 – 29 องศาเซลเซียส ลักษณะดินส่วนใหญ่เป็นดินปนหินกรวดถูกรังสีแสง และดินร่วนปนทราย เมื่อดินบางบริเวณเกาะกันแน่นทำให้ดินระบายน้ำได้ช้า ป่าห้วยคอกม้ามีความสูง 1250 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง เป็นตัวแทนของป่าแบบดิบเขา ประกอบด้วยไม้หลายชนิด เช่น ก่อแป้น ก่อเคือช อบเชย เข็มขาว และเข็มแดง (ภาพ 11) ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 68 – 90 % อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 18 – 27 องศาเซลเซียส ลักษณะชั้นดินค่อนข้างลึกเมื่อดินร่วนซุยและมีความอุดมสมบูรณ์สูงเนื่องจากมีปริมาณอินทรีย์วัตถุสูง ผิวหน้าดินมีชั้นของเศษใบไม้ ปกคลุม ดินชั้นบนมีสีค่อนข้างดำ เมื่อดินมีก้อนกรวดปนน้อย ดินเป็นดินร่วนระบายน้ำและอากาศค่อนข้างดี ป่าบริเวณแหลมสนมีความสูง 1,650 เมตร จากระดับน้ำทะเลปานกลาง เป็นตัวแทนของป่าแบบสนเขา ประกอบด้วยไม้หลายชนิด แต่ส่วนใหญ่จะเป็นสน เช่น สนสองใบ สนสามใบ (ภาพ 12) ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 61 – 90 % อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 16 – 26 องศาเซลเซียส ลักษณะดินส่วนใหญ่เป็นดินร่วนปนทรายมีสีน้ำตาลอ่อนปนดำ เมื่อดินร่วนซุย ระบายน้ำและอากาศได้ดี

1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดบริเวณวังบัวบาน น้ำตกมณฑาธาร ห้วยคอกม้า และแหลมสน





ภาพ 9 พื้นที่ป่าบริเวณวังบัวบานเป็นป่าผสมผลัดใบ



ภาพ 10 พื้นที่ป่าบริเวณน้ำตกมณฑาธารเป็นป่าเต็งรัง



ภาพ 11 พื้นที่ป่าบริเวณห้วยคอกม้าเป็นป่าดิบเขา



ภาพ 12 พื้นที่ป่าบริเวณแหลมสนเป็นป่าสนเขา

1.2 การเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ด

สำรวจจากบริเวณจุดเริ่มต้นจากถนนใหญ่เส้นทางคอสสุเทพ - แหยมสน เข้าไปในป่าที่เป็นตัวแทนแต่ละแห่ง จนถึงจุดสุดท้ายเป็นระยะทางประมาณ 1,000 เมตร กว้างประมาณ 50 เมตร ทั้งสองข้างของถนนที่แยกเข้าไปในป่า โดยทำการสำรวจประมาณเดือนละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 12 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนธันวาคม 2539 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2540 ในการสำรวจทุกครั้งจะบันทึกอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ลักษณะแหล่งอาหาร เช่น ใบไม้แห้ง กิ่งไม้ ดอกไม้ บนต้นไม้ โคนต้นไม้ และ คิน ภาของดอกเห็ดในธรรมชาติ และลักษณะต่าง ๆ ของดอกเห็ด เช่น สี ขนาด รูปร่าง กลิ่น ผิวของ หมวกเห็ด ใช้มีดกรีดดอกเห็ดให้เป็นแผลเพื่อดูการเปลี่ยนแปลง เช่น สีเปลี่ยนไป มีสารคล้าย น้ำมันไหลออกมา เก็บดอกเห็ดด้วยความระมัดระวัง ดอกเห็ดบางชนิดมีขนาดเล็ก และเลี้ยหายง่าย ใช้เท้ามือหรือมีดปลายแหลม แะะดอกเห็ดออกจากแหล่งที่พบ เก็บใส่ถุงพลาสติก กระดาษ หรือ กล่องพลาสติก ดอกเห็ดที่มีขนาดเล็กมากจะห่อด้วยกระดาษไข หรือห่อด้วยขี้ผึ้งหุ้มห่อติดกับ แผ่นโฟมในกล่องพลาสติก ไม่ใช้มือคีบดอกเห็ดออกมาโดยตรง เพราะจะทำให้ดอกเห็ดเลี้ยหายได้ นำดอกเห็ดบางชนิด เช่น เห็ดมีครีบ และ โบลิตส์มาทำพิมพ์สปอร์บนกระดาษขาว-ดำ

2. การศึกษาอนุกรมวิธานของดอกเห็ด

2.1 การศึกษาพื้นฐานและบันทึกข้อมูลตัวอย่างเห็ด

บันทึกลักษณะทั่วไป ได้แก่ ขนาดและรูปร่างของดอกเห็ด และส่วนประกอบต่าง ๆ ของดอกเห็ด เช่น ก้าน ครีบ และวงแหวน ด้วยดาเปล่า แวนชชา และไดกล้องสเตอริโอ ระบุนี ของดอกเห็ด โดยใช้แผ่นเทียบสีของ Kangsadal Books Publishing ปี ค.ศ. 1996 (ภาคผนวก) ดอกเห็ดบางชนิดต้องนำมากรีดทำแผลเพื่อดูการหลังของสารทางบาดแผล ตรวจสอบโครงสร้าง ภายในดอกเห็ด และสปอร์ ภายใกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ และทดสอบเห็ดบางชนิด ด้วยน้ำยา Melzer's

2.2 การหาชื่อวิทยาศาสตร์

รวบรวมลักษณะต่าง ๆ และข้อมูลที่ไดจากการศึกษาขั้นต้นมาหาชื่อวิทยาศาสตร์โดย

2.2.1 ใช้รูปวิธานที่เสนอไว้ในหนังสือของ Ainsworth *et al.* (1973) Ryvardeen and Johansen (1980) และ Ellis and Ellis (1990) ระดับวงศ์ขึ้นไปใช้ของ Ainsworth *et al.* (1973) เป็นหลัก ส่วนใหญ่สามารถจัดเข้ากับระบบที่เสนอไว้ โดย Hawksworth *et al.* (1995) แต่อาจถูกจัดไว้คนละลำดับ

2.2.2 เทียบกับภาพและคำบรรยายในหนังสือของ ราชบัณฑิตยสถาน (2539) อนงค์ (2539) อณิสณี (2539) เสน่ห์ (2540) และดวงจันทร์ (2541)

2.3 การเก็บตัวอย่างดอกเห็ด

อบตัวอย่างเห็ดที่เก็บมาได้ 60 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้อบจะขึ้นอยู่กับลักษณะของดอกเห็ด และขนาดของดอกเห็ด โดยจะใช้เวลาดังแต่ 6-12 ชั่วโมง เมื่ออบแล้วเก็บตัวอย่างดอกเห็ดในกล่องพลาสติกที่บรรจุซิลิกาเจลเพื่อใช้ดูดความชื้น และการบูร เพื่อกันแมลง ปิดฝาให้สนิท

3. การทดลองเพาะเลี้ยงเห็ดที่เก็บรวบรวมได้

3.1 การแยกเชื้อ

3.1.1 ดอกเห็ดคั้น

ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวดอกเห็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% ใช้มีดกรีดบนดอกเห็ดใช้มือจับดอกเห็ดแยกออกเป็นสองส่วน ใช้เข็มเย็บคัดเนื้อเชื้อตรงกลางดอกเห็ดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 2 x 2 มิลลิเมตร วางบนอาหารวุ้นเยิง PDA นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส

3.1.2 ดอกเห็ดแข็ง

คัดเนื้อเชื้อเห็ดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 2 x 2 มิลลิเมตร แช่น้ำยา Clorox ไม่เจือจางเป็นเวลา 2 นาที นำขึ้นมาซับด้วยกระดาษทิชชูที่ฆ่าเชื้อแล้ว ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับด้วยกระดาษทิชชูที่ฆ่าเชื้อ นำชิ้นเนื้อเชื้อดอกเห็ดวางบนอาหารวุ้นเยิง PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส

3.2 การศึกษาลักษณะโคโลนี

ใช้เข็มเย็บ เชื้อเชื้อจากอาหารวุ้นเยิงลงบนจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 วัน ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เจาะเชื้อเห็ด นำไปวางตรงกลางอาหารวุ้น PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีด้วยไม้บรรทัด บันทึกภาพโคโลนี

3.3 การศึกษาลักษณะเส้นใย

นำแท่งแก้วรูปตัววี แผ่นสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ ใส่ลงไปในจานเลี้ยงเชื้อนำไปอบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสำลีเป็นก้อนจุ่มน้ำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เตรียมอาหารวุ้น PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ เทอาหารให้หนากว่าปกติเล็กน้อย ($\sim \frac{1}{2}$ ความสูงของขอบจานเพาะเชื้อ) ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร เจาะอาหารวุ้นนำไปวางบนแผ่นสไลด์ที่อยู่บนแท่งแก้วรูปตัววี ใช้เข็มเย็บสะกิดเส้นใยเห็ดจากจานเลี้ยงเชื้อ วางลงบนอาหารวุ้น 4 ด้าน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ใส่สำลีชุบน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไป นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำเชื้อที่ได้บนกระจกปิดสไลด์ และแผ่นสไลด์มาศึกษาลักษณะได้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ โดยย้อมสีด้วย lactophenol cotton blue ถ่ายรูปได้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อบันทึกลักษณะของเส้นใย

3.4 วิธีกระตุ้นการสร้างดอกเห็ด

แช่เมล็ดข้าวฟ่าง 1 คีน นึ่งให้สุก ผึ่งพอหมาด บรรจุในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เชื้อเชื้อจากอาหารวุ้นเหียง PDA ใส่ลงไปบนเมล็ดข้าวฟ่าง นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เตรียมอาหารสูตรขี้เถ้าในถุงพลาสติก สูตรฟางข้าวในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิตร สูตร PDA ที่ใช้มันฝรั่ง 300 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร (PDA rich) และ PDA ผสมกึ่งกึ่งในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำเชื้อบนเมล็ดข้าวฟ่างประมาณ 10 เมล็ด ใส่ลงบนอาหารทดสอบทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง อาหารสูตรขี้เถ้าเมื่อเชื้อเห็ดเดินเต็มก้อนให้เปิดจุก และรดน้ำเข้า-เย็น โดยพ่นน้ำให้เป็นฝอยคล้ายฝนตก

3.5 การเก็บรักษาเส้นใย

เชื้อเห็ดเห็ดจากอาหารวุ้นลงสู่อาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ใส่น้ำกลั่นลงในขวดฝาเกลียว (vial) ประมาณ 2 ใน 3 ของหลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ด ไข่เข็มเขี่ยดักขึ้นวุ้นใส่ขวดฝาเกลียว เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส