บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ดอกเห็ดโคนน้อย จากโรงเพาะเห็ดคุณทองไมล์ บัวหอม 58/1 หมู่ 7 ต.หนองจ๊อม อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ในจานเพาะเชื้อ (ภาคผนวก ค)
3. ฟางข้าว ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณชาติชาย โยเหลา (ภาคผนวก ค)
4. อาหารเสริม KAT 701
5. เมล็ดข้าวฟ่าง
6. เมล็ดข้าวเปลือก
7. น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
8. จานเพาะเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
9. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร
10. ขวดฝาเกลียว (universal)
11. ขวดแบน
12. กระบะพลาสติก ขนาด 25 x 32 x 8 เซนติเมตร
13. สำลี
14. เข็มเขี่ย
15. ปากคีบ
16. ใบมีดผ่าตัด
17. cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร
18. ไม้บรรทัด
19. แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
20. ตะเกียงแอลกอฮอล์
21. เทอร์โมมิเตอร์
22. แว่นขยาย
23. เครื่องวัดความเข้มแสง (Illuminance Meter Model 510 02)

24. ตู้ถ่ายเชื้อ + หลอด UV ขนาด 30 W
25. ตู้บ่มเชื้อ
26. ตู้เย็น
27. กระดาษทิชชูฆ่าเชื้อ
28. กระดาษแก้วสีน้ำเงิน สีแดง และกระดาษแก้วใส
29. กล้องถ่ายภาพ Cannon EOS 888 N
30. ขาตั้งกล้องถ่ายภาพ
31. กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ พร้อมอุปกรณ์บันทึกภาพ
32. กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ พร้อมอุปกรณ์บันทึกภาพ

วิธีการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างดอกเห็ดโคนน้อยจำนวน 50 ดอก นำมาศึกษาสัณฐานในห้องปฏิบัติการ
   1.1 บันทึกลักษณะทั่วไป ได้แก่ ขนาดและรูปร่างของดอกเห็ด และส่วนประกอบต่างๆ ของดอกเห็ดโคนน้อย ด้วยตาเปล่า แว่นขยาย ใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ และใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ
   1.2 หาชื่อวิทยาศาสตร์ โดยรวบรวมลักษณะต่าง ๆ และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาขั้นต้น มาหาชื่อวิทยาศาสตร์โดย
      1.2.1 ใช้รูปวิธานที่เสนอไว้ในหนังสือของ Ainsworth *et al.* (1973) Moser (1978) และ Arora (1986)
      1.2.2 เทียบกับภาพและคำบรรยายในหนังสือของ ราชบัณฑิตยสถาน (2539) อนงค์ (2539) Pacioni (1985) Hurst and Rutherford (1991) Horn *et al.* (1993) Mabey (1993) Jordan (1996) และ Keizer (1997)
2. การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดอกเห็ดโคนน้อย
   2.1 เลือกดอกเห็ดขนาดใหญ่ ในระยะตูม มีความสมบูรณ์ ไม่เป็นโรคหรือมีแมลงเข้าทำลาย ดอกเห็ดต้องไม่ถูกน้ำ
   2.2 ทำความสะอาดมือโดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
   2.3 ลนไฟฆ่าเชื้อที่เข็มเขี่ย โดยให้ลนที่ด้ามเข็มด้วย แล้วปล่อยให้เย็นตัวสักครู่
   2.4 ฆ่าเชื้อที่ผิวดอกเห็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้มีดผ่าตัดปราศจากเชื้อ (จุ่มแอลกอฮอล์และลนไปฆ่าเชื้อ รอให้เย็น) กรีดดอกเห็ด

2.5 ใช้มือฉีกดอกเห็ดออกเป็นสองส่วน ใช้เข็มเขี่ยปราศจากเชื้อตัดเนื้อเยื่อดอกเห็ดที่อยู่ภายในให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 x 2 x 2 มิลลิเมตร พร้อมกับใช้เข็มเขี่ยจิกเนื้อเยื่อให้ติดมากับปลายเข็มเขี่ย

2.6 วางเนื้อเยื่อเห็ดลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 $\pm$2 องศาเซลเซียส)

2.7 เก็บรักษาเชื้อเห็ดโคนน้อย เพื่อใช้เป็น stock culture (ภาพ 4)

2.7.1 เขี่ยเชื้อเห็ดโคนน้อยที่แยกได้ ลงบนจานอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

2.7.2 ใส่น้ำกลั่นลงในขวดฝาเกลียว (universal) 2 ใน 3 ของขวด (ประมาณ 25 มิลลิลิตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2.7.3 ใช้ cork borer ปราศจากเชื้อ (จุ่มแอลกอฮอล์และลนไฟฆ่าเชื้อ รอให้เย็น) เจาะอาหารวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดเจริญ ใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นใส่ขวดฝาเกลียว จำนวน 15 ชิ้นต่อ 1 ขวด เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบอิทธิพลของอุณหภูมิ

3.1 เพาะเชื้อเห็ดโคนน้อยบริสุทธิ์ จาก stock culture ลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

3.2 ใช้ cork borer ปราศจากเชื้อ เจาะอาหารบริเวณขอบของโคโลนีซึ่งเป็นบริเวณที่มีเส้นใยเห็ดโคนน้อยเจริญ ใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นวางด้านที่มีเส้นใยเห็ดลงบนอาหาร PDA บริเวณกลางจานเพาะเชื้อ (1 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเชื้อ)

3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 37, 40, 45 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง โดยทำการทดลองอุณหภูมิละ 5 ซ้ำ

3.4 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเส้นใย จนเกิดการสลายตัวของดอกเห็ด บันทึกผลโดย

3.4.1 วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีทุกวันจนเชื้อเจริญเต็มจานเพาะเชื้อ

3.4.2 บันทึก สี และความหนาบางของโคโลนี

3.4.3 ติดตามการเจริญเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์

3.5.3.1 บันทึกปริมาณ รูปร่าง และขนาด ของดอกเห็ด

3.5.3.2 บันทึก และเปรียบเทียบอายุของดอกเห็ดตั้งแต่เริ่มเป็นตุ่มเห็ดจนถึงระยะสลายตัว

3.5.3.3 บันทึก และเปรียบเทียบระยะเวลาในการสลายตัวของดอกเห็ด

3.5.3.4 บันทึกลักษณะการสลายตัวของดอกเห็ด

4. การทดสอบการเจริญของเชื้อเห็ดโคนน้อยบนวัสดุขยายเชื้อ

4.1 เพาะเชื้อเห็ดโคนน้อยบริสุทธิ์ จาก stock culture บนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

4.2 ใช้ cork borer ปราศจากเชื้อ เจาะอาหารที่มีเส้นใยเห็ดโคนน้อยเจริญ ใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นมาวางบนอาหาร PDA บริเวณกลางจานเพาะเชื้อ (1 ชิ้นต่อ 1 จาน) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

4.3 ถ่ายเชื้อเห็ดโคนน้อยลงบนวัสดุที่ใช้เป็นหัวเชื้อ 3 ชนิด คือ เมล็ดข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวเปลือก และ เมล็ดข้าวฟ่างผสมเมล็ดข้าวเปลือก อัตราส่วน 1 : 1 (ภาคผนวก ง) โดยวางชิ้นอาหารวุ้นที่เส้นใยเจริญอยู่ ไว้ตรงกลางขวด ลนไฟฆ่าเชื้อที่ปากขวดก่อนปิดจุกสำลี และหุ้มปากขวดด้วยกระดาษอีกชั้นหนึ่ง เขย่าขวดเมล็ดธัญพืชเพื่อเลื่อนอาหารวุ้นให้มาอยู่ตรงกลางเมล็ดธัญพืช บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดลองละ 5 ซ้ำ

4.4 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเส้นใยที่เจริญบนวัสดุที่ใช้เป็นหัวเชื้อ โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเป็นเวลา 7 วัน

5. การทดสอบผลของแสงต่อการสร้างและการสลายตัวของดอกเห็ด แบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้น ดังนี้

5.1 การทดสอบอิทธิพลของแสง

5.1.1 เพาะเชื้อเห็ดโคนน้อยบริสุทธิ์จาก stock culture ลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

5.1.2 ใช้ cork borer ที่ปราศจากเชื้อ เจาะอาหารที่มีเส้นใยเห็ดโคนน้อยเจริญ ใช้เข็มเขี่ยตักชิ้นวุ้นวางบนอาหาร PDA บริเวณกลางจานเพาะเชื้อ (1 ชิ้น ต่อ 1 จาน) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

5.1.3 ถ่ายเชื้อเห็ดโคนน้อยลงบนวัสดุขยายเชื้อ โดยใช้ cork borer ปราศจากเชื้อ เจาะอาหารที่มีเส้นใยเห็ดโคนน้อยเจริญ ใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นวางบนเมล็ดข้าวฟ่างปราศจากเชื้อ ที่อยู่ในขวดแบน (1 ชิ้นต่อ 1 ขวด) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส จนเชื้อมีการเจริญเต็มขวด (ประมาณ 5 - 6 วัน)

5.1.4 ถ่ายเชื้อเห็ดโคนน้อยที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างจากขวดขยายเชื้อ ประมาณ 1 ช้อนโต๊ะ ลงบนวัสดุเพาะที่เป็นฟางข้าวหมักผสมอาหารเสริม KAT 701 ในกระบะพลาสติก บ่มที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ได้แก่

5.1.4.1 ที่มืดตลอดเวลา

5.1.4.2 ที่สว่างตลอดเวลา

5.1.4.3 ที่สว่าง 12 ชั่วโมง สลับกับที่มืด 12 ชั่วโมง

5.1.5 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเส้นใย และการพัฒนาของเห็ดโคนน้อย ภายใต้ สภาวะต่าง ๆ ตามข้อ 5.1.4 ติดตามผลจนกระทั่งดอกเห็ดโคนน้อยสลายตัว

5.2 การทดสอบอิทธิพลของแสงสีต่าง ๆ

5.2.1 เพาะเชื้อเห็ดโคนน้อยบริสุทธิ์จาก stock culture ลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

5.2.2 ใช้ cork borer ที่ปราศจากเชื้อ เจาะอาหารที่มีเส้นใยเห็ดโคนน้อยเจริญ ใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นวางบนอาหาร PDA บริเวณกลางจานเพาะเชื้อ (1 ชิ้น ต่อ 1 จาน) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

5.2.3 ถ่ายเชื้อเห็ดโคนน้อยลงบนวัสดุขยายเชื้อ โดยใช้ cork borer ปราศจากเชื้อ เจาะอาหารที่มีเส้นใยเห็ดโคนน้อยเจริญ ใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นวางบนเมล็ดข้าวฟ่างปราศจากเชื้อ ที่อยู่ในขวดแบน (1 ชิ้นต่อ 1 ขวด) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส จนเชื้อมีการเจริญเต็มขวด (ประมาณ 5 - 6 วัน)

5.2.4 ถ่ายเชื้อเห็ดโคนน้อยที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างจากขวดขยายเชื้อ ประมาณ 1 ช้อนโต๊ะ ลงบนวัสดุเพาะที่เป็นฟางข้าวหมักผสมอาหารเสริม KAT 701 ในขวดรูปชมพู่ บ่มในตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ได้แก่ แสงสีน้ำเงิน สีแดง สีขาว และในที่มืด ในที่นี้จะนำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุฟางข้าวหมักที่ลงเชื้อแล้วมาหุ้มด้วยกระดาษแก้ว สีน้ำเงิน สีแดง ใส และสีดำ เพื่อแทนแสงสีต่าง ๆ แล้วนำมาวางตามจุดที่แต่ละสีให้ความเข้ม 350 ลักซ์ เท่ากันทุกแสงสี โดยใช้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์(ภาพ 5) ทำการทดลองแสงสีละ 5 ซ้ำ

5.2.5 ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยและพัฒนาการของดอกเห็ด โดยการบันทึก

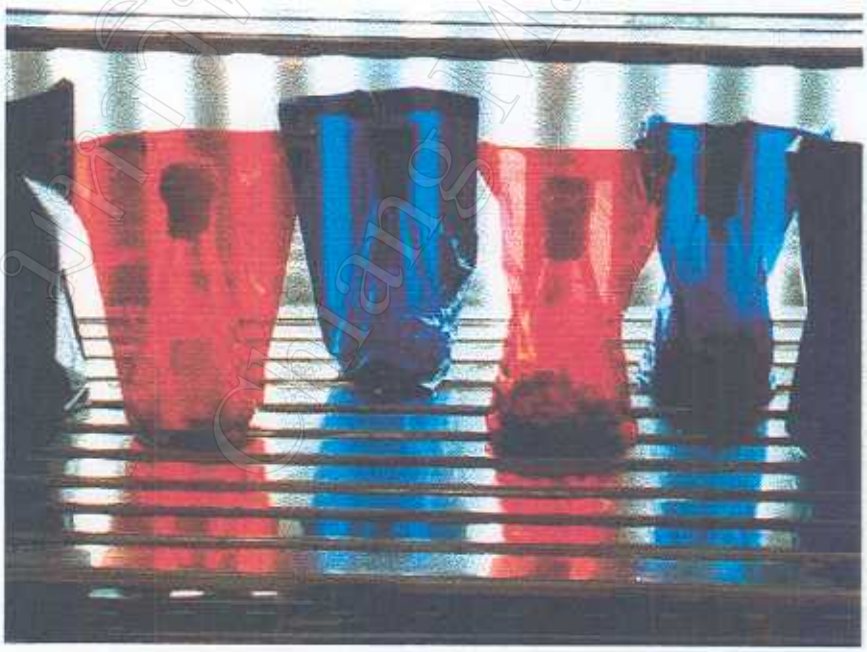
5.2.5.1 ลักษณะของดอกเห็ดที่เกิดขึ้น

5.2.5.2 บันทึก และเปรียบเทียบระยะเวลาในการให้ผลผลิตของดอกเห็ด ทุกวันเป็นเวลาประมาณ 30 วัน

5.2.5.3 บันทึก และเปรียบเทียบระยะเวลาในการสลายตัวของดอกเห็ด และลักษณะของการสลายตัวของดอกเห็ด ทุกวันเป็นเวลาประมาณ 30 วัน

<u>หมายเหตุ</u> การตรวจผลการทดลองจะกระทำในตอนกลางคืน ในที่ที่มืดสนิท และใช้ผ้าสีดำคลุมตู้ เพื่อป้องกันไม่ให้มีแสงกระทบจากด้านนอกตู้บ่มเชื้อ

ภาพ 4 Stock culture ของเชื้อเห็ดโคนน้อยที่เก็บในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



ภาพ 5 การทดสอบอิทธิพลของแสง แต่ละตำแหน่งที่วางจะได้รับแสง 350 ลักซ์ และมีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University