บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1.พืชที่ใช้ทดสอบพืชอาศัยของเห็ดโบลีทส์ ได้แก่ โสน น้อยหน่า มะดัน และมะกอกน้ำ

2.วัสดุเพาะเห็ด ได้แก่ ข้าวฟ่าง ชานอ้อย ดินทราย ดินละเอียด ข้าวโอ๊ต และ เส้นใยเห็ด

3. สารเคมี

3.1 แหล่งคาร์บอน ได้แก่

arabinose ($C_5H_{10}O_5$), cellubiose ($C_{12}H_{12}O_{11}$), cellulose ($C_6H_{10}O_5$), fructose ($C_6H_{12}O_6$), galactose ($C_6H_{12}O_6$), glucose ($C_6H_{12}O_6$), inulin, maltose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), mannose ($C_6H_{12}O_6$), soluble starch ($C_6H_{10}O_5$), sticky rice flour และ sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

3.2 แหล่งไนโตรเจน ได้แก่

ammonium chloride (NH_4Cl), ammonium nitrate (NH_4NO_3), ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$, arginine ($C_6H_{14}N_4O_2$), asparagines ($C_4H_8N_2O_3.H_20$), calcium nitrate ($Ca(NO_3)_2$), glycine ($C_2H_5NO_2$), glutamic acid($C_5H_9NO_4$), peptone, phenylalanine ($C_9H_{11}NO_2$), potassium nitrate (KNO_3) และ urea (CH_4N_2O)

3.3 สารเคมีในการเตรียมอาหารสูตร MS ได้แก่

ammonium nitrate (NH_4NO_3), boric acid (H_3BO_3), calcium chloride ($CaCl_2$ $2H_2O$), cobalt chloride ($CoCl_2$ $6H_2O$),copper sulfate ($CuSO_4$ $5H_2O$), ferrous sulfate ($FeSO_4$ $7H_2O$), glycine ($C_2H_5NO_2$), potassium iodide (KI), manganese sulfate ($MnSO_4$ H_2O), magnesium sulfate ($MgSO_4$ $7H_2O$), my-o inositol ($C_6H_{12}O_6$), nicotinic acid, potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4), potassium nitrate (KNO_3), pyridoxine hydrochloride, sodium ethylene diamine triacetate (Na_2 EDTA), sodium molybdate (Na_2MoO_4 $2H_2O$), sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), thiamine hydrochloride และ zinc sulfate ($ZnSO_4$ $7H_2O$)

3.4 สารเคมีในการเตรียมอาหารสูตร MFM ได้แก่

ammonium chloride (NH_4Cl), ammonium nitrate (NH_4NO_3), biotine, calcium chloride ($CaCl_2$ $2H_2O$), copper sulfate ($CuSO_4$ $5H_2O$), D (-) fructose ($C_6H_{12}O_6$), D (+) glucose

($C_6H_{12}O_6$), ferrous sulfate ($FeSO_4$ $7H_2O$), magnesium sulfate ($MgSO_4$ $7H_2O$), my-o inositol ($C_6H_{12}O_6$), nicotinamide, Panthotenic acid, P – aminobenzoic acid, potassium nitrate (KNO_3), Pyridoxine, Riboflavine ($C_{17}H_{20}N_4$ O_6), sodium chloride (Nacl), sodium ethylene diamine triacetate (Na_2 EDTA), Succinic acid ($C_4H_6O_4$) และ Thiamine

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมเองตามสูตรในภาคผนวก ก ได้แก่

- MEA (malt extract agar)
- MEA^+(MEA + macrostock A + Eriksson microstock + Fries vitamine stock)
- MFM (modified fries medium)
- MS (MURASHIGE and SKOOG)
- PDA (potato dextrose agar
- PDA^+(PDA + macrostock A + Eriksson microstock + Fries vitamine stock)
- PDPYA (PDA+ peptone + yeast extract)

อุปกรณ์

- ocular micrometer
- stage micrometer
- slide และ coverslipe
- ขวดดองตัวอย่าง
- เข็มเขี่ย
- มีดปลายแหลม
- ไม้บรรทัด
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- กระดาษขาว
- กล้องถ่ายรูป
- กล้องจุลทรรศน์ แบบ compound พร้อมอุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ
- กล้องจุลทรรศน์ แบบ stereo พร้อมอุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ
- กล้องจุลทรรศน์
- ฟิล์มถ่ายรูป
- จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม.
- จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม.

- เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด
- ตู้ปลอดเชื้อ (larminar air flow cabinet)
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
- ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- เตาแก๊ส
- เตาไมโครเวฟ
- ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม.
- อลูมิเนียมฟอยล์
- ถุงพลาสติก + ยางรัด
- กระถางพลาสติกปลูกต้นไม้ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว
- เครื่องเขย่าเลี้ยง

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเห็ดโบลีทส์

ดำเนินการเก็บตัวอย่างในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทย เริ่มเก็บตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2547 – กันยายน พ.ศ. 2548 ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเก็บในพื้นที่จังหวัดต่างๆได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี ยโสธร ชัยภูมิ สกลนคร ขอนแก่น ภาคเหนือ ได้แก่ เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง ภาคใต้ ได้แก่ สงขลาและพัทลุง สภาพพื้นที่โดยส่วนใหญ่เป็นป่าธรรมชาติที่มีต้นไม้ขึ้นอยู่หลากหลายชนิด ป่าสน สวนป่า และพื้นที่บริเวณโดยรอบน้ำตกซึ่งมีความชื้นสูง เห็ดโบลีทส์ ที่สามารถรับประทานได้บางส่วน ทำการซื้อจากชาวบ้านที่เก็บรวบรวมมาขายในตลาดท้องถิ่น เห็ดโบลีทส์ที่เก็บได้ต้องทำการศึกษาเบื้องต้น (วัดขนาด สังเกตการเปลี่ยนสี) ก่อนดองในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 70% เพื่อนำไปศึกษาในด้านอื่นๆ ต่อไป

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจำแนกชนิดของเห็ดโบลีทส์

นำตัวอย่างเห็ดโบลีทส์ ที่เก็บรวบรวมมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เบื้องต้นก่อนทำการศึกษาในด้านอื่นๆ ต่อไป

รายละเอียดในการศึกษาแบ่งออกเป็นส่วนต่างๆ ดังนี้

ลักษณะสัณฐานภายนอกของดอกเห็ด

- หมวกเห็ด วัดขนาดของหมวกเห็ด โดยใช้ไม้บรรทัดวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหมวกเห็ด รูปทรงของหมวกเห็ด สีของหมวกเห็ดทั้งผิวด้านนอก และเนื้อเยื่อด้านใน ลักษณะผิวของหมวกเห็ดว่ามีลักษณะเป็นเมือกเหนียวหรือแห้งแตกเป็นสะเก็ด บางชนิดพบว่าอาจมี scale ติดอยู่ที่บริเวณหมวกเห็ด

- ก้านดอก วัดขนาดของก้านดอก ทั้งความกว้าง และความยาว (ความยาววัดจากบริเวณโคนจนถึงส่วนปลายที่เชื่อมติดกับดอกเห็ด) รูปทรงของก้าน สีทั้งบริเวณผิวด้านนอก และเนื้อเยื่อด้านใน ลักษณะผิวเรียบ/มีลายหรือมีสิ่งปกคลุมอื่นๆ

- รูสร้างสปอร์ บันทึกการเรียงตัวของรูใต้ดอกเห็ด สี ขนาด

- veil มีหรือไม่มีโดยดูที่บริเวณก้านดอก และบริเวณหมวกเห็ด

- เนื้อเยื่อเห็ด บันทึกลักษณะของเนื้อเยื่อเห็ด สี การเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อมีการฉีกขาดหรือเมื่อเกิดแผล ในเห็ดบางชนิดพบว่าอาจมียางไหลออกมา ทดสอบโดยใช้มีดขูดหรือตัด

ลักษณะทางจุลสัณฐานภายในดอกเห็ด

- ศึกษารูปร่าง ขนาด และสีของเบสิดิโอสปอร์ โดยใช้เข็มเขี่ยขนาดเล็ก เขี่ยเอาเนื้อเยื่อบริเวณใต้หมวกที่มีลักษณะเป็นรูมาทำสไลด์กึ่งถาวรใน lactophenol จากนั้นนำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10x 40x และ 100x วัดขนาดสปอร์ที่กำลังขยาย 40x โดยใช้ ocular micrometer ศึกษารูปร่าง และสีของเบสิดิโอสปอร์ โดยเปรียบเทียบกับหนังสือ ต่างๆ ได้แก่ Both (1993), Breitenbach และ Kranzlin (1991), Corner (1972), Moser (1994), Snell และ Dick (1970), Arora (1986) และ ราชบัณฑิตยสถาน (2539) จากนั้นทำการบันทึก และถ่ายรูปโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound พร้อมอุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ

- ศึกษาขนาด และรูปร่างของเบสิเดียมโดยใช้เข็มเขี่ยขนาดเล็ก เขี่ยเอาเนื้อเยื่อบริเวณใต้หมวกที่มีลักษณะเป็นรูมาทำสไลด์กึ่งถาวรใน lactophenol จากนั้นนำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10x 40x และ 100x วัดขนาดของ เบสิเดียม ที่กำลังขยาย 40x โดยใช้ ocular micrometer ศึกษารูปร่าง และขนาดของเบสิเดียมโดยเปรียบเทียบกับหนังสือ ต่างๆ เช่นเดียวกับการศึกษาในสปอร์ จากนั้นทำการบันทึก และถ่ายรูปโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound พร้อมอุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ

3. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำเห็ด โบลีทส์ ที่เก็บรวบรวมมา ทั้ง 67 ชนิด มาแยกเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA slant โดยใช้ดอกเห็ดที่เก็บมาใหม่ ๆ ใช้มือฉีกดอกเห็ดออกเป็น 2 ส่วน ตามแนวยาว จากนั้นใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดเนื้อเยื่อเห็ดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมาวางเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตรวจผลโดยดูความสามารถในการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5-10 วัน แล้วทำการบันทึกผลการเจริญของเส้นใยเห็ดแต่ละชนิดบนอาหาร PDA slant

4. ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดตับเต่า [*Phlebopus colossus* (Heim.) Singer]

เห็ดที่นำมาศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยานั้น เป็นเห็ดสามารถเจริญได้ดีที่สุดในการทดลอง ข้อ 3 (การแยกเชื้อบริสุทธิ์) จากนั้นนำเห็ดตับเต่ามาแยกเชื้อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA slant แล้วนำไปวางในตู้บ่มเชื้อ เมื่อจะทำการทดลองจึงย้ายเส้นใยจากหลอดลงเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA วางเลี้ยงในตู้บ่มเลี้ยงอีกครั้ง หลังจากนั้น 10 วัน จึงใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ตัดเส้นใยพร้อมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่บริเวณขอบของโคโลนีออกเป็นชิ้นกลม ๆ แต่ละชิ้นที่ได้นี้คือเชื้อที่ใช้สำหรับปลูกเชื้อลงบนอาหารที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสรีร วิทยา ดังนี้

4.1 การเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทดลองเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิดในจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดในแนวระดับ โดยนำเชื้อที่เตรียมไว้มาวางเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 6 ทรีตเมนต์ คือ MEA MEA^{+} (MEA+ macrostock A + eriksson microstock + fries vitamine stock), MFM, PDA, PDA^{+} (PDA+ macrostock A + eriksson microstock + fries vitamine stock) และ PDPYA (PDA + peptone+yeast extract) แต่ละทรีตเมนต์ มี 5 ซ้ำๆ ละ 5 จาน ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยเห็ดตับเต่าเพื่อเปรียบเทียบกันในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละทรีตเมนต์ เมื่อครบ 10 วัน

4.2 แหล่งคาร์บอน

ทดลองเลี้ยงเส้นใยเห็ดตับเต่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน จำนวน 12 ชนิด โดยเติมสารเคมีที่เป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณ 4.80 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร อาหาร (basal medium) ที่ใช้คือ อาหาร MFM ที่ตัด fructose, glucose, my - o inositol และ succinic acid ออก ปรับระดับ pH 5.5 จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมไว้วางเลี้ยงบนอาหารในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 13 ทรีตเมนต์คือ arabinose, cellubiose, cellulose, fructose, galactose, glucose, inulin, maltose, mannose, soluble starch, sticky rice flour, sucrose และ control (ไม่เติมแหล่งคาร์บอน) ในละทรีตเมนต์ มี 5 ซ้ำๆ ละ 5 จาน ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยเห็ดตับเต่าเพื่อเปรียบเทียบกันในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละทรีตเมนต์ เมื่อครบ 10 วัน

4.3 แหล่งไนโตรเจน

ทดลองเลี้ยงเส้นใยเห็ดตับเต่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างๆ กัน จำนวน 12 ชนิด โดยเติมสารเคมีที่เป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณ 0.58 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร อาหาร (basal medium) ที่ใช้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MFM ที่ตัด ammonium chloride ออก ปรับระดับ pH 5.5 นำเชื้อที่เตรียมไว้วางเลี้ยงบนอาหารในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 13 ทรีตเมนต์ คือ ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonium sulfate, arginine, asparagine, calcium nitrate, glycine, glutamic acid, peptone, phenylalanine, potassium nitrate, urea และ control (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน) ในแต่ละทรีตเมนต์มี 5 ซ้ำๆ ละ 5 จาน ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยเห็ดตับเต่าเพื่อเปรียบเทียบกันในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละทรีตเมนต์ เมื่อครบ 10 วัน

4.4 แสงสว่าง

ทดลองโดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดตับเต่า บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MFM ระดับ pH 5.5 โดยนำเชื้อที่เตรียมไว้วางเลี้ยงบนอาหารซึ่งอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม.วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 2 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ที่ 1 วางเลี้ยงเส้นใยให้ได้รับแสงสว่างปกติในห้องปฏิบัติการ 12 ชม. / วัน ทรีตเมนต์ที่ 2 วางเลี้ยงในที่มืด 24 ชม. / วัน ตลอดการทดลอง ตรวจผลโดยวัดขนาดโคโลนีของเส้นใยเพื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 ทรีตเมนต์ เมื่อครบ 10 วัน

4.5 อุณหภูมิ

ทดลองโดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดตับเต่า บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MFM ระดับ pH 5.5 โดยนำเชื้อที่เตรียมไว้วางเลี้ยงบนอาหารซึ่งอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงในตู้ปรับอุณหภูมิซึ่งปรับอุณหภูมิไว้ที่ระดับต่างๆ คือ 10, 15, 20, 25, 30, 32.5 และ 35 ^{0}C ตามลำดับ วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 7 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์มี 5 ซ้ำๆ ละ 5 จาน ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใยเห็ดตับเต่าเพื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละทรีตเมนต์ เมื่อครบ 10 วัน

4.6 ความเป็นกรด - ด่าง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MFM โดยไม่ต้องเติมวุ้นอาหาร จากนั้นปรับระดับ pH ให้มีช่วงห่างช่วงละ 1 เริ่มต้นที่ระดับ pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 รวม 8 ระดับด้วย NaOH 1N หรือ HCl 1N ในการทดลองนี้ใช้อาหารปริมาณ 10 มล. ฟลาสค์ขนาด 200 มล. ใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อเขี่ยเชื้อเห็ดตับเต่าที่เตรียมไว้แล้วมาวางเลี้ยงในอาหาร จากนั้นบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าเลี้ยงความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 26-32 ^{0}C) บ่มเชื้อนาน 30 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 8 ทรีตเมนต์ ตั้งแต่ระดับ pH 3 – 10 แต่ละทรีตเมนต์มี 5 ซ้ำๆ ละ 5 ขวด เมื่อครบ 30 วันนำเส้นใยเห็ดตับเต่าที่เลี้ยงในอาหารเหลวไปกรองโดยใช้กระดาษกรอง แล้วจึงนำไปอบ

แห้งที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C นาน 24 ชม. และนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด (4 ตำแหน่ง) เพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักของเส้นใยเห็ดตับเต่าในแต่ละทรีตเมนต์

4.7 หัวเชื้อ

เส้นใยเห็ดตับเต่า (*Phlebopus colossus* Heim.) Singer ที่ใช้ ในการทดลองเป็นเส้นใยที่เลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อมีอายุ 10 วันจึงใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ตัดส่วนของเส้นใยพร้อมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่บริเวณขอบโคโลนีออกเป็นชิ้นกลม แต่ละชิ้นที่ได้นี้คือ เชื้อที่ใช้สำหรับทดลองบนหัวเชื้อวัสดุ หัวเชื้อวัสดุประกอบด้วย ข้าวฟ่าง ชานอ้อยสับ ข้าวโอ๊ต ทราย และดินละเอียด วัสดุที่ใช้ทำหัวเชื้อวัสดุต้องผสมให้เข้ากันดี และผสมน้ำทำให้มีความชื้นประมาณ 70 % จากนั้นบรรจุลงในฟลาสค์ขนาด 250 มล. ปริมาณ 200 ก. และอุดด้วยจุกสำลีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที 2 รอบ รอให้เย็นแล้วจึงใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเส้นใยเห็ดลงไปในวัสดุหัวเชื้อสูตรต่างๆ

หัวเชื้อวัสดุสูตรต่าง ๆ มีดังนี้

สูตรที่ 1 ข้าวฟ่าง

สูตรที่ 2 ข้าวฟ่าง + ชานอ้อยสับ (1:1 โดยปริมาตร)

สูตรที่ 3 ข้าวโอ๊ต + ดินละเอียด (1:1 โดยปริมาตร)

สูตรที่ 4 ข้าวโอ๊ต + ทรายละเอียด (1:1 โดยปริมาตร)

สูตรที่ 5 ข้าวฟ่าง + ชานอ้อยสับ + ดินละเอียด (1:1:1 โดยปริมาตร)

สูตรที่ 6 ชานอ้อยสับ + ดินละเอียด (1: 1 โดยปริมาตร)

สูตรที่ 7 ชานอ้อยสับ + ทรายละเอียด (1 : 1 โดยปริมาตร)

ตรวจผลโดยดูการเจริญของเส้นใยบนหัวเชื้อวัสดุสูตรต่าง ๆ เพื่อเลือกสูตรที่เหมาะต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดตับเต่ามากที่สุด แล้วนำไปทดลองต่อ ในข้อ 4.8

4.8 การเจริญบนวัสดุเพาะในถุงพลาสติก

วัสดุที่ใช้เพาะเป็นวัสดุหัวเชื้อที่ได้จากการทดลอง ในข้อ 4.7 ซึ่งเส้นใยเห็ดตับเต่าสามารถเจริญได้ดีที่สุด โดยผสมวัสดุเพาะให้เข้ากัน ผสมน้ำทำให้มีความชื้นประมาณ 70 % บรรจุถุงพลาสติกขนาด 7x12 นิ้ว จำนวน 25 ถุง (800 กรัม / ถุง) อัดวัสดุให้แน่นพอสมควร ใส่คอขวดพลาสติกและอุดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 60 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจึงเขี่ยเชื้อจากวัสดุหัวเชื้อลงไป 1 ช้อนต่อถุง เมื่อเชื้อเจริญเต็มวัสดุเพาะแล้ว จึงดึงจุกสำลีออกพับปากถุงลงมาให้อยู่เหนือวัสดุเพาะประมาณ 1 ซม. ปิดผิวหน้า (casing) ด้วยดินร่วน รดน้ำวันละ 2 ครั้งเช้าและเย็น ตรวจผลโดยดูการเจริญของเส้นใยในวัสดุเพาะเพื่อดูว่าสามารถพัฒนาเป็นดอกเห็ดในถุงพลาสติกได้หรือไม่

5. การเลี้ยงต้นกล้าพืชในหลอดทดลองและศึกษาปฏิกริยาของเส้นใยเห็ดตับเต่าต่อการเจริญของต้นอ่อนพืช

เพาะเมล็ดโสนในหลอดทดลองโดยนำเมล็ดโสนมาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% นาน 30 วินาที ถึง 1 นาที จากนั้นแช่ในคลอร็อกซ์ 20 % นาน 20 - 30 นาที นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วจึงนำเมล็ดพืชไปวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต วางเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเมล็ดงอกเป็นต้นอ่อนจึงย้ายเส้นใยเห็ดตับเต่าไปวางเลี้ยงในขวดที่เพาะเลี้ยงต้นอ่อน โดยใช้ที่เจาะจุกคอร์กเจาะบริเวณขอบของโคโลนีเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นจึงใช้เข็มเขี่ย ๆ เชื้อไปวางเลี้ยงในขวดที่มีต้นอ่อนพืชโดยวางห่างจากบริเวณโคนของต้นพืช 1 ซม. ในการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 4 ชุดการทดลอง คือ

ชุดการทดลอง ที่ 1 ชุดควบคุม วางเลี้ยงเส้นใยเห็ดอย่างเดียว

ชุดการทดลอง ที่ 2 วางเลี้ยงเส้นใยเห็ดร่วมกับต้นอ่อนของพืชเมื่อพืชงอกได้ 1 วัน

ชุดการทดลอง ที่ 3 วางเลี้ยงเส้นใยเห็ดร่วมกับต้นอ่อนของพืชเมื่อพืชงอกได้ 5 วัน

ชุดการทดลอง ที่ 4วางเลี้ยงเส้นใยเห็ดร่วมกับต้นอ่อนของพืชเมื่อพืชงอกได้ 10 วัน

แต่ละทรีตเมนต์ มี 5 ซ้ำๆ 5 ขวด ตรวจผลโดยเปรียบเทียบขนาดโคโลนีของเส้นใยเห็ด ระหว่าง ทรีตเมนต์ เมื่อครบ 10 วัน และตรวจดูการเกิดไมคอไรซาที่รากพืช โดยตัดบริเวณส่วนปลายของรากฝอย มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ compound และแบบ stereo เป็นเวลา 30 วัน หลังจากเมล็ดโสนงอกเป็นต้นอ่อน

6. การเพาะเชื้อลงบนพืช

ทดสอบโดยปลูกพืช 4 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยพืชที่ ปลูกโดยวิธีเพาะเมล็ด คือ น้อยหน่า และโสน พืชที่ปลูกโดยใช้กิ่งตอน คือ มะกอกน้ำ และมะดัน โดยปลูกพืชทั้ง 4 ชนิดในกระถางพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว เมื่อพืชอายุได้ 6 เดือน จึงปลูกเชื้อลงไป เชื้อที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อเห็ดตับเต่า (*Phlebopus colossus* Heim.) Singer ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้จากการทดลองแยกเชื้อบริสุทธิ์ ดินที่ใช้ปลูกเป็นดินผสมที่ไม่ได้อบฆ่าเชื้อ โดยมีส่วนผสม คือ ดินร่วน : แกลบ : มูลวัว (2 :2 :1 โดยปริมาตร) เมื่อปลูกเชื้อเสร็จจึงนำกระถางปลูกวางไว้กลางแจ้ง รดน้ำวันละ 1 ครั้ง

วิธีการปลูกเชื้อ มี 3 วิธี ได้

1.ใช้เส้นใยเห็ดตับเต่าที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำแผลบริเวณรากฝอยของพืชทดลองด้วยการใช้มือขยี้ที่บริเวณราก จากนั้นนำเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. อายุ 10 วัน หุ้มที่บริเวณรากพืชที่ทำแผล แล้วนำต้นพืชลงปลูกในกระถางตามเดิม และรดน้ำตามปกติ ตรวจดูการเจริญของเส้นใยในบริเวณรากพืช ทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 18 เดือน โดยตัดบริเวณรากฝอยของต้นไม้มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound เพื่อตรวจดูการเจริญของเส้นใยที่รากพืช

2.ใช้หัวเชื้อเห็ดสูตรที่เส้นใยเห็ดสามารถเจริญได้ดีที่สุดจากการทดลองในข้อ 4.7 ทำแผลบริเวณรากฝอยของพืชทดลองด้วยการขยี้ จากนั้นนำหัวเชื้อปริมาณ 200 กรัม เทลงไปรองก้นกระถาง แล้วนำต้นพืชลงปลูกตามเดิม รดน้ำตามปกติ ตรวจดูการเจริญของเส้นใยในบริเวณรากพืช ทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 18 เดือน โดยตัดบริเวณรากฝอยของต้นไม้มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ แบบ compound เพื่อตรวจดูการเจริญของเส้นใยที่รากพืช

3.ใช้สปอร์จากดอกเห็ดสด เห็ดที่นำมาใช้คือ เห็ดตับเต่า [*Phlebopus colossus* (Heim.) Singer] ทำแผลบริเวณรากฝอยของพืชทดลองด้วยการขยี้ จากนั้นนำเห็ดที่หมวกเห็ดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์ กลาง ประมาณ 5 ซม. ฉีกดอกเห็ดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วรองที่ก้นกระถางนำต้นพืชลงปลูกตามเดิม รดน้ำตามปกติ ตรวจดูการเจริญของเส้นใยในบริเวณรากพืช ทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 18 เดือน โดยตัดบริเวณรากฝอยของต้นไม้มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ แบบ compound เพื่อตรวจดูการเจริญของเส้นใยที่รากพืช