บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจ เก็บรวบรวมเห็ดเผาะ

ทำการสำรวจ เก็บรวบรวมเห็ดเผาะจากแหล่งต่าง ๆ ในภาคใต้ ภาคตะวันตก ภาคเหนือ และอีสาน โดยเก็บรวบรวมจากป่า และจากตลาดที่ชาวบ้านเก็บรวบรวมมาจำหน่ายในตลาด ถ่ายภาพและใส่ในกล่องพลาสติก นำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะส่วนประกอบภายนอกของดอกเห็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (disecting microcope) ใช้มีดตัดเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ เช่น exoperidium, endoperidium และ gleba ด้วยมือเปล่า (free-hand sectioning) นำชิ้นส่วนที่ตัดได้ไป mount สไลด์ด้วยน้ำกลั่น สังเกตลักษณะการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อ วัดขนาด และบันทึกภาพ ในส่วนของสปอร์ได้ทำการตรวจดูด้วยกล้องอิเลคตรอนแบบส่องกราดเพื่อสังเกตการจัดเรียงตัวของขนรอบ ๆ สปอร์

3. การแยกเชื้อเห็ด

การแยกเชื้อเห็ดทำ 2 วิธีคือ แยกโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture method) และการแยกเชื้อจากสปอร์ (spore culture method)

3.1 การแยกโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำโดยใช้มีดเฉือนดอกเห็ดลึกประมาณ 1 มม. แล้วค่อย ๆ ฉีกดอกเห็ดออกเป็นสองส่วน ใช้มีดปลายแหลมที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดเนื้อเยื่อบริเวณ exoperidium endoperidium และส่วน gleba ขนาดประมาณ 1 มม^3 แล้วจึงย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA

3.2 การแยกเชื้อจากสปอร์ เลือกดอกเห็ดที่แก่โดยสังเกตลักษณะผงสปอร์ในถุง endoperidium มีสีน้ำตาลดำ ทำการฉีกถุง endoperidium ออกและเคาะให้สปอร์ของเห็ดหล่นลงใน petridish เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 10 มล. จากนั้นใส่ Tween 20 ลงไป 2-3 หยด ใช้ loop จุ่มลงในสารแขวนลอยสปอร์แล้วจึง steak ลงบนอาหารวุ้น

4. การทดสอบสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์

เห็ดเผาะที่ใช้ในการทดลองคือเห็ดเผาะหนัง โดยเลือกดอกเห็ดที่แก่ ดอกมีขนาดใหญ่ สปอร์ที่อยู่ในถุง endoperidium มีสีดำเป็นผง และส่วนของเบสิเดียมสลายตัวหมดแล้ว ใช้มีดปลายแหลมตัดกลุ่มสปอร์ขนาดประมาณ 0.5 มม^3 ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. เติม tween 20 2 หยดและเขย่าให้เข้ากัน สารแขวนลอยที่ได้ใช้ในการศึกษาการงอกของสปอร์ต่อไป

4.1 อาหารวุ้นที่เหมาะสมในการงอกของสปอร์ อาหารวุ้นนี้ใช้ในการทดลองคือ CMA, Czapek's solution agar, malt extract agar, MFM และ PDA โดยใส่สปอร์แขวนลอยลงไป 1 มล. ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้สปอร์กระจายเต็มผิวหน้าอาหารวุ้น การทดลองทำ 2 ชุด ชุดที่ 1 หลังจากใส่สปอร์แล้วนำไปเก็บ (incubate) ไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C ส่วนอีกชุดหนึ่งนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C

4.2 ทดสอบอิทธิพลของยีสต์บางชนิดต่อการงอกของสปอร์เห็ด

เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลองมี 5 ชนิดคือ *Candida* sp., *Endomycopsis* sp., *Pichia* sp., *Saccharomyces cerivisiae* และ *Schizosaccharomyces* sp. เชื้อทั้งหมดได้รับจากภาควิชาจุลชีววิทยา MFM หลังจากทำการ inoculate สปอร์แขวนลอยลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นแล้ว ปล่อยทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 1 ชม. จึงทำการ inoculate เชื้อยีสต์แต่ละชนิดลงไปบนผิวหน้าอาหารด้วย วิธีการโดยใช้ loop ย้ายเชื้อยีสต์จากหลอดอาหารมาทำการ streak เป็นเส้นยาว 3 เส้น ที่ผิวหน้าอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ แต่ละเส้นห่างกันประมาณ 3.5 ซม. (ภาพที่ 1) นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C ตรวจหาสปอร์งอกทุกวันเป็นเวลา 30 วัน

4.3 ทดสอบการงอกของสปอร์เมื่อผ่านการกระทำ (treat) ด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ

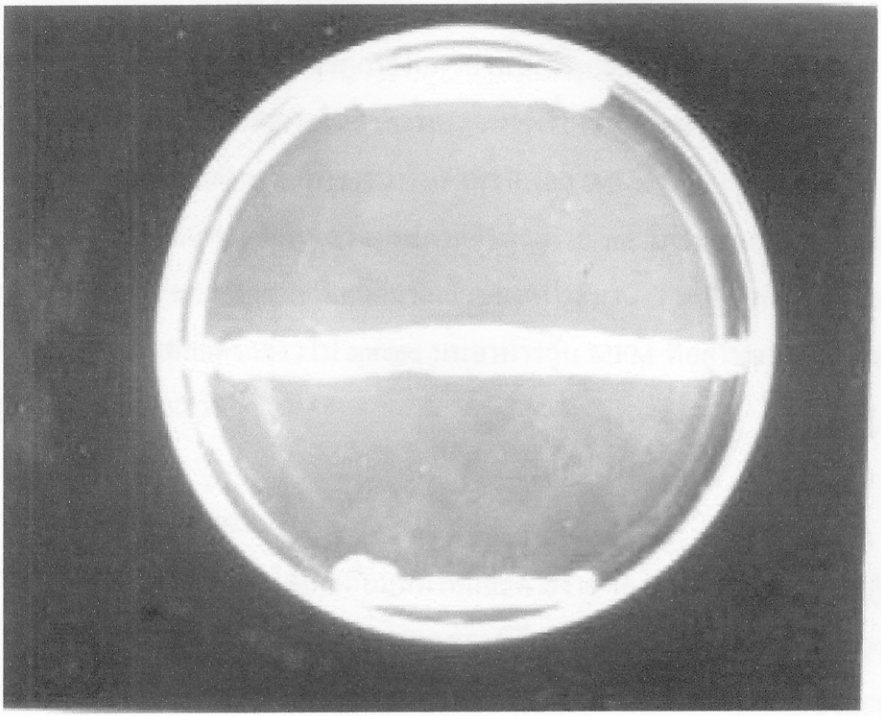
การทดสอบกระทำบนอาหารวุ้น MFM สปอร์ที่ใช้ทดลองผ่านการกระทำดังนี้

1) แช่สปอร์ในแอลกอฮอล์ 60% นาน 20 นาที
2) แช่สปอร์ในน้ำอุ่น (70 °C) นาน 20 นาที
3) แช่สปอร์ในน้ำอุณหภูมิประมาณ 28 °C นาน 20 นาที 24 ชม. 48 ชม. และ 72 ชม.
4) แช่สปอร์ในน้ำ+สารจับใบ (tween 20) 20 นาที
5) ผึ่งดอกเห็ดให้แห้งเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน จึงนำสปอร์มาทำสารแขวนลอย

สปอร์เมื่อผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ แล้วจึงนำมา spread plate บนอาหาร MFM นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวันเป็นเวลา 30 วัน เพื่อตรวจหาสปอร์ที่งอก

4.4 ทดสอบอิทธิพลของรากยางนาต่อการงอกของสปอร์

ต้นยางนาที่ใช้เป็นต้นกล้าอายุประมาณ 3 ปี ปลูกอยู่ในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นิ้ว (ภาพที่ 2) ต้นกล้าดังกล่าวจะมีรากฝอยที่เจริญอยู่ภายนอกกระถางด้านใต้เป็นจำนวนมาก ทำการผสมสารแขวนลอยสปอร์ จุ่มก้นกระถางยางนาลงในน้ำแขวนลอยสปอร์ยกขึ้นแล้วตั้งทิ้งไว้ให้รากแห้งพอหมาด ๆ จึงวางกระถางลงบนฝา petri dish ทำการตรวจผลโดยตัดปลายรากฝอยของต้นยางนายาวประมาณ 0.5 ซม. ทำการ mount สไลด์ด้วยน้ำกลั่น ตรวจดูสปอร์ของเห็ดเผาะที่ติดอยู่รอบ ๆ รากฝอยด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100-400X เพื่อตรวจดูสปอร์ที่จับอยู่รอบ ๆ รากว่ามีการงอกหรือไม่ โดยตรวจทุกวันจนครบ 30 วัน



ภาพที่ 1 อาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อที่ inoculate ด้วย basidiospore suspension ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* หลังจาก inoculate 3 วัน

4.5 การงอกของสปอร์เห็ดเผาะในอาหารวุ้นที่มีต้นอ่อนของยางนาเจริญอยู่ด้วย

เตรียมเพาะเลี้ยงปลายยอดยางนาในอาหาร MS+NAA 1 มก./ล. (ตามวิธีการในบทที่ 7) อายุ 5 เดือน ต้นยางนาดังกล่าวมีใบ 1 ใบ และรากที่สมบูรณ์ 2-3 ราก จึงย้ายสปอร์ของเห็ดเผาะลงไปบนผิวหน้าของอาหารในขวดต้นยางนา ตรวจดูการงอกของสปอร์ทุกวันจนครบ 30 วัน

4.6 การงอกของสปอร์เห็ดเผาะในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงรากยางนา

ทำการเลี้ยงปลายรากต้นยางนาในอาหารเหลว (MS+NAA 1 มก./ล.) นาน 1 เดือน (ตามวิธีการในบทที่ 3) ใช้หลอดดูดเอาอาหารเหลวจากฟลาสจำนวน 10 ml ใส่ในหลอดทดลองที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้มีดปลายแหลมตัดส่วน gleba ของเห็ดเผาะที่แก่เต็มที่แล้วขนาดประมาณ 5 มม^2 ใส่ลงในหลอดเขย่าแรง ๆ แล้วใช้ pipette ดูดสปอร์แขวนลอยดังกล่าวไป spread บนอาหารวุ้น MFM ที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ ตรวจหาการงอกของสปอร์ทุกวันเป็นเวลา 30 วัน

5. ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อเห็ดเผาะ

เนื่องจากเชื้อเห็ดเผาะที่แยกได้มักเสื่อมสภาพและตายง่าย โคโลนีที่แก่หรือเก็บในตู้เย็นเมื่อนำมาย้ายเชื้อใหม่ เชื้อไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งได้ทำการทดสอบวิธีการเก็บเชื้อว่ามีผลต่อการเจริญของเส้นใยหรือไม่ โดยทำการทดลองเก็บรักษาเชื้อ 2 กรรมวิธีคือ 1) เก็บภายใต้ parafin oil และเก็บโดยทำการย้ายเชื้อเป็นระยะ ๆ (serial transfer) อาหารที่ใช้คือ MFM ที่ปรับ pH = 7

5.1 ทำการย้ายเชื้อเห็ดเผาะลงบนอาหาร MFM slant ในหลอดขนาด 1.5×15 cm บ่มเชื้อไว้ 20 วัน จนกระทั่งเชื้อเห็ดเจริญเต็มผิวหน้าวุ้น จึงเทพาราฟินเหลวที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปในหลอดทดลอง โดยให้ปริมาณพาราฟินสูงกว่าผิวหน้าอาหารวุ้นประมาณ 1 ซม. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7, 20, 40, 60 และ 80 วัน จึงเทพาราฟินออก ทำการย้ายเชื้อเห็ดเผาะลงเลี้ยงในอาหาร MFM หลอดใหม่

5.2 เก็บโดยทำการย้ายเชื้อเป็นระยะ ๆ ทำโดยแยกเชื้อเห็ดเผาะหนังลงเลี้ยงบนอาหาร MFM (pH7) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C รอจนกระทั่งเชื้อเห็ดเริ่มสร้างโคโลนี (ประมาณ 5 วัน) บ่มเชื้อต่ออีก 20 วัน ทำการวัดขนาดโคโลนีที่ได้ เสร็จแล้วจึงใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ตัดริมของโคโลนีแล้วจึงย้ายเชื้อไปเลี้ยงในอาหาร MFM ใหม่ เลี้ยงเชื้อไว้และทำการย้ายเชื้อไปเลี้ยงในจานอาหารใหม่ทุก ๆ 20 วัน เป็นเวลา 11 ครั้ง รวมเวลาที่ทดลอง 220 วัน

6. การเจริญของเส้นใย

ศึกษาในหัวข้อต่อไปนี้

6.1 อาหารวุ้น

ในการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะได้ทดลองเลี้ยงเส้นใยเห็ดเผาะหนัง และเห็ดเผาะฝ้ายในอาหารวุ้น 7 ชนิดในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยในแนวระดับ อาหารเหล่านี้มีส่วนประกอบของวุ้นผง 12 กรัมต่ออาหาร ซึ่งเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ซึ่งได้แก่ 1) MA+M_1 2) MFM 3) PDA 4) PDA+น้ำคั้นใบยางนา 5) PDA+M_1 6) PYPDA 7) เห็ดเผาะ+ดิน+M_1

6.2 แหล่งคาร์บอน

เพื่อต้องการทราบแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ ได้ทดลองเลี้ยงเส้นใยเห็ดเผาะบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ จำนวน 12 ชนิด ที่ระดับตามเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ในจานเลี้ยงเชื้อ อาหาร (basal medium) ที่ใช้คือ MFM ซึ่งตัดแหล่งคาร์บอนออกแล้วซึ่งประกอบด้วย แหล่งคาร์บอนที่ทดลองคือ arabinose, cellulose, cellubiose, dextrin, fructose, galactose, glucose, inulin, maltose, starch, sticky rice flour และ sucrose

6.3 แหล่งไนโตรเจน

การทดสอบแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญได้ทดสอบแหล่งไนโตรเจนจำนวน 10 ชนิดคือ asparagine, arginine, $Ca(OH_3)_2$, glutamic acid, KNO_3, NH_4Cl, NH_4NO_3 $(NH_4)_2$ SO_4, peptone และ urea โดยทดลองที่ระดับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ อาหารที่ได้คือ MFM

6.4 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

การทดลองหาระดับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ต่อการเจริญของเส้นใยทำโดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดเผาะหนังในอาหาร MFM ซึ่งปรับระดับพีเอชให้มีช่วงห่างช่วงละ 1 โดยเริ่มต้นจากพีเอช 5-10 รวม 6 ระดับ ด้วย 1N NaOH และ 1N HCl บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 20 วัน

6.5 แสงสว่าง

การเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะในที่มืดและในที่มีแสงสว่างสลับกับมืด ได้ทำการทดลองเลี้ยงเส้นใยบนอาหาร 2 ชนิดคือ MFM และ PDA บนอาหารแต่ละชนิดทำ 2 ชุด จานอาหารชุดแรกห่อด้วยอลูมิเนียมฟรอยเพื่อป้องกันแสงสว่าง ส่วนอีกชุดหนึ่งห่อด้วยพลาสติก นำจานเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชุด วางไว้ริมหน้าต่างให้ได้รับแสงสว่างตามปกติ จานที่ชุดที่ห่อด้วยพลาสติกจะได้รับแสงสว่างประมาณวันละ 12 ชม. ส่วนจานที่ห่อด้วยอลูมิเนียมฟรอยจะไม่ได้รับแสงตลอดการทดลอง

7. การทำเชื้อเห็ด

ได้ทดลองทำเชื้อเห็ดเผาะในอาหารต่าง ๆ จำนวน 12 สูตรดังนี้

1. ข้างฟ่างต้ม
2. ข้าวฟ่างต้ม+ดิน (1:1)
3. ขี้เลื่อย+รำ (4:1)
4. ข้าวโอ๊ต+ดิน (1:1)
5. ข้าวโอ๊ต+ปุ๋ยหมัก (3:1)
6. ข้าวโอ๊ต+ขี้เลื่อย (1:1)
7. ข้าวฟ่างต้ม+ดิน (1:1) ทำให้ชื้นโดยน้ำคั้นจากใบยางนา (10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)
8. ขี้เลื่อย+รำ (4:1) ทำให้ชื้นโดยน้ำคั้นจากใบยางนา (10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)
9. ข้าวโอ๊ต+ดิน (1:1) ทำให้ชื้นโดยน้ำคั้นจากใบยางนา (10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)
10. ข้าวโอ๊ต+ปุ๋ยหมัก (3:1) ทำให้ชื้นโดยน้ำคั้นจากใบยางนา (10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)
11. ข้าวโอ๊ต+ขี้เลื่อย (1:1) ทำให้ชื้นโดยน้ำคั้นจากใบยางนา (10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร)
12. ดิน (จากใต้ต้นยางนา)

อาหารแต่ละสูตรผสมให้มีความชื้นประมาณ 65% กรอกใส่ฟลาสขนาด 250 ml ประมาณครึ่งฟลาส ปิดด้วยจุกสำลี นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที เมื่อเย็นจึงเขี่ยเชื้อเห็ดเผาะหนังที่อยู่บนอาหาร MFM ลงไปเลี้ยงในฟลาสอาหารดังกล่าว โดยทำสูตรอาหารละ 5 ฟลาส

8. ศึกษาการปลูกเชื้อเห็ดเผาะลงบนพืชอาศัยในเรือนทดลอง

ต้นกล้ายางนาที่ใช้ในการทดลองได้รับจากศูนย์เพาะกล้าไม้ จังหวัดสงขลา ต้นกล้าดังกล่าวปลูกในถุงดำมีอายุประมาณ 2 ปี นำมาปลูกลงในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 นิ้ว อีก 1 ปี เพื่อให้ต้นกล้ามีปริมาณรากฝอยจำนวนมากรอบ ๆ กระถาง

เชื้อเห็ดเผาะที่ใช้เป็นเห็ดเผาะพันธุ์หนังซึ่งเก็บจากจังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดราชบุรี เป็นดอกเห็ดที่แก่ภายในมีกลุ่มสปอร์สีน้ำตาลดำเมื่อตรวจดูไม่พบเบสิเดียม นำมาใส่เครื่องปั่น (blender) โดยในอัตราส่วนดอกเห็ดแก่ 0.5 กก. กับน้ำ 3 ลิตร ปั่นเป็นเวลา 1 นาที ซึ่งจะได้สปอร์แขวนลอยของเห็ดเผาะ

การปลูกเชื้อเห็ดเผาะลงบนต้นยางนาทำโดยเทต้นไม้พร้อมดินออกจากกระถาง ดินที่ปลูกจะมีรากของยางนาจับเป็นรูปกระถางและรอบ ๆ ดินที่ติดกระถางจะมีรากฝอยของยางนาจำนวนมาก จุ่มรากยางนาพร้อมดินลงในสปอร์แขวนลอยนาน 10 นาที (ภาพที่ 2) แล้วจึงนำต้นยางนาใส่ไว้ในกระถางอย่างเดิม นำเก็บไว้ในโรงเรือนเพาะชำ ทำการตรวจรากเป็นเวลา 2 ปี

ภาพที่ 2 ก) ต้นยางนาที่ปลูกไว้อายุ 3 ปี ยกขึ้นออกจากกระถางสังเกตดินที่จับเป็นรูปกระถางจะพบรากฝอยเป็นจำนวนมาก

ข) การปลูกเชื้อเห็ดเผาะโดยการจุ่มต้นยางนาลงในสปอร์แขวนลอยของเห็ดเผาะเป็นเวลา 10 วินาที

9. การปลูกเชื้อเห็ดเผาะลงบนต้นยางนาในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงปลายยอดยางนาโดยใช้อาหาร MS+NAA. 1 มก./ล. ตามวิธีการในบทที่ 7 จนกระทั่งยอดยางนาเกิดใบและรากที่สมบูรณ์ ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 5 เดือน จึงย้ายเส้นใยเห็ดเผาะที่เลี้ยงไว้บนอาหารวุ้น MSM ลงวางบนอาหารวุ้นที่เลี้ยงปลายยอดยางนาโดยให้ห่างจากรากยางนาประมาณ 2 ซม. ตรวจผลการทดลองทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อครบกำหนด 30 วัน จึงทำการย้ายต้นยางนาลงเลี้ยงในกระถางที่มีดิน+เวอมิคิวไลท์+เพอไลท์ (1:1:1 โดยปริมาตร) เป็นวัสดุปลูก