บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แสดงวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก

3.1.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

3.1.2 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Alcohol)

3.1.3 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (70% Alcohol)

3.1.4 อะกาโรสเจล (Agarose Gel)

3.1.5 เดทตอล (Dettol)

3.1.6 PCR 2x Master mix (Apsalagen, Korea)

3.1.7 TAE Buffer (50x)

3.1.8 RedSafe (iNtRON, Korea)

3.1.9 100 bp DNA Ladder (GenedireX, USA)

3.1.10 สีย้อม lactophenol cotton blue (HIMEDIA, India)

3.1.11 ขี้เลื่อย

3.1.12 รำละเอียด

3.1.13 ภูไมท์

3.1.14 ดีเกลือ

3.1.15 ชุดสกัด DNA (FavoPrep™, Taiwan)

3.1.16 ชุดทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR (PureDireX™, Taiwan)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.2.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)

3.2.2 หลอดเซนติฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร

3.2.3 ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip) ขนาด 2-10, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร

3.2.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.2.5 ถุงพลาสติก

3.2.6 บีกเกอร์ (Beaker)

3.2.7 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

3.2.8 ขวดแก้ว ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.2.9 คอขวด

3.2.10 ปากคีบ (Forcep)

3.2.11 ไม้บรรทัด (Ruler)

3.2.12 เข็มเขี่ยปลายงอ

3.2.13 ใบมีดผ่าตัด

3.2.14 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.2.15 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.16 กระดาษอลูมิเนียมฟอยด์ (Aluminum foil)

3.2.17 พาราฟิล์ม (Parafilm)

3.2.18 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)

3.2.19 Cork borer

3.2.20 ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.21 หลอดขนาด 0.2 และ 1.5 ml microcentrifuge tube

3.2.22 วาสลีน

3.2.23 กระจกสไลด์ (Glass slide)

3.2.24 กระจกปิดสไลด์ (Cover slip)

3.2.25 แท่งบด (Micropestle)

3.2.26 กรรไกร

3.2.27 ถุงมือยาง (Dura, Thailand)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.3.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

3.3.2 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

สถาบันวิทยบริการ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.3.3 ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven)

3.3.4 เครื่องชั่งดิจิตอล (Analytical Balance)

3.3.5 ไมโครเวฟ (Microwave)

3.3.6 กล่องพลาสติกเก็บตัวอย่าง

3.3.7 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.3.8 ตู้บ่มเชื้อ (Incubater)

3.3.9 เครื่องปั่นผสม (Vortex)

3.3.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.11 เครื่อง Electrophoresis (Mupid, Japan)

3.3.12 ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส (Deep freeze)

3.3.13 เครื่องฉายแสงยูวี (UV-transluminator)

3.3.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

3.3.15 Thermal box TDB-120 (Biosan, UK)

วิธีดำเนินงานวิจัย

การเก็บตัวอย่างเห็ด

ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดราขนาดใหญ่ในพื้นที่สวนยางพารา ตำบลแสนตุ้ง อำเภอเขาสมิง จังหวัดตราด พร้อมกับถ่ายภาพตัวอย่างเห็ดเพื่อเป็นข้อมูลทางสัณฐานวิทยา นำตัวอย่างเห็ดใส่กล่องแล้วทำการระบุรหัสตัวอย่างเห็ดให้ชัดเจน จากนั้นทำการเก็บเนื้อเยื่อดอกเห็ดเพียงเล็กน้อยใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge tube เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ และนำดอกเห็ดมาทำการแยกเนื้อเยื่อหรือแยกสปอร์เพื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วนำตัวอย่างเห็ดสดที่เหลือทั้งหมดมาอบแห้ง โดยนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์หรือจนกว่าตัวอย่างจะแห้ง เพื่อเป็นการเก็บรักษาเป็นตัวอย่างแบบแห้ง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด ทั้งจากตัวอย่างสดและการนำภาพถ่ายดอกเห็ด มาทำการศึกษาลักษณะด้านบนหมวกดอก ด้านใต้หมวกดอก ด้านข้างดอกเห็ด และพื้นที่โดยรอบบริเวณที่เห็ดเจริญ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, และอุทัยวรรณ แสงวณิช, 2551 : 1-514; ราชบัณฑิตยสถาน, 2550 : 1-272 ; ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544: 1-268)

การระบุชนิดเห็ดราโดยวิธีทางอณูชีววิทยา

การสกัด DNA ด้วยชุดสกัด FavoPrep™

1. เก็บเนื้อเยื่อเห็ดสดเพียงเล็กน้อยใส่ไว้ในหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube เติม FATG1 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (เพื่อทำให้เกิด cell lysis) ในหลอด 1.5 ml

microcentrifuge tube และทำการบดตัวอย่างด้วย micropestle จนกว่าเส้นใยจะละเอียด (2-3 นาที)

2. เติม Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร : เพื่อทำให้โปรตีนบางส่วนย่อยสลาย) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงไปในหลอดตัวอย่าง และจากนั้นทำการเขย่าให้เข้ากันหรือ vortering mix

3. บ่มหลอดตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนเซลล์เกิดการแตกอย่างสมบูรณ์ (ประมาณ 1 ชั่วโมง) ทำการเขย่าสารเพื่อให้เข้ากันด้วย vortering mix ทุก 20 นาที ตลอดระหว่างการบ่ม

4. เมื่อครบกำหนดจากการบ่มแล้ว ปั่นหลอดให้ตกตะกอน และเพื่อให้หยดน้ำที่ฝาตกลงภายในหลอดด้วยการ Briefly spin – เป็นเวลาประมาณ 10 วินาที

5. เติม RNase (RNA-free genomic DNA) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง จากนั้นทำการเขย่าให้เข้ากันหรือ vortering mix และทำการปั่นหลอดเพื่อให้เกิดการตกตะกอน (Briefly spin – เป็นเวลาประมาณ 10 วินาที) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที

6. เติม FATG2 buffer (เพื่อทำให้เกิด cell lysis ครั้งที่2) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเขย่าให้เข้ากันหรือ vortering mix และปั่นหลอดให้ตกตะกอน (Briefly spin – เป็นเวลาประมาณ 10 วินาที) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

7. เมื่อครบกำหนดปั่นหลอดเพื่อให้เกิดการตกตะกอน และเพื่อให้หยดน้ำที่ฝาตกลงในหลอด (Briefly spin –เป็นเวลาประมาณ 10 วินาที)

8. เติม 100% ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปในตัวอย่าง จากนั้นทำการเขย่าให้เข้ากันหรือ vortering mix และปั่นหลอดให้ตกตะกอน (Briefly spin –เป็นเวลาประมาณ 10 วินาที)

9. วาง FATG Mini Collection tube จากนั้นทำการเขย่าตัวอย่างในหลอด micro-centrifuge ลงใน FATG Mini Collection ปั่นเหวี่ยงต่อเป็นเวลา 1 นาที โดยจะใช้ความเร็วรอบที่ 11,000 รอบ/นาที และทิ้งส่วนของเหลว

10. ล้าง FATG Mini Culumn ด้วยการเติม W1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงต่อเป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ความเร็วรอบที่ 11,000 รอบ/นาที และทิ้งส่วนที่เป็นของเหลวอีกครั้ง

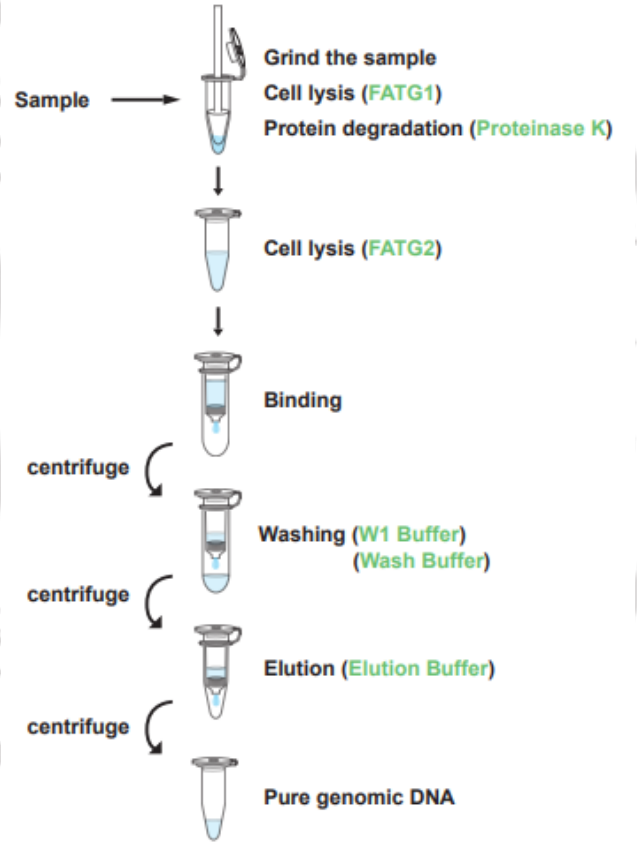
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

11. ล้าง FATG Mini Culumn อีกครั้งด้วยการเติม W1 buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ความเร็วรอบที่ 11,000 รอบ/นาที และทิ้งส่วนที่เป็นของเหลว

12. ปั่นเหวี่ยงเพื่อทำให้ Culumn แห้ง เป็นเวลา 3 นาที โดยใช้ความเร็วรอบที่ 11,000 รอบ/นาที

13. เติมสาร Elution buffer (ddH_2O: pH 7.5-9.0) ผ่าน membrane center ของ FATG Mini Culumn ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที เพื่อให้ membrane เกิดการขยายตัว

14. ปั่นเหวี่ยงเพื่อชะเก็บดีเอ็นเอ เป็นเวลา 2 นาที โดยจะใช้ความเร็วรอบที่ 15,000 รอบ/นาที และเก็บหลอดดีเอ็นเอเอาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ลำดับต่อไป (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 การสกัด DNA ด้วยชุดสกัด FavoPrep™

ที่มา : (Favorgen, 2022)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในการเตรียมปฏิกิริยา PCR ใน 1 หลอดนั้น จะมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.1 จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS ด้วยเครื่อง Thermal cycle โดยใช้สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR

Composition	20 µl reaction	Final concentration
DW	6 µl	-
2x Master mix	10 µl	1x
Primer ITS1	1 µl	0.5 µM
Primer ITS4	1 µl	0.5 µM
DNA template	2 µl	-

ตารางที่ 3.2 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR

PCR profile	Cycle number	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 °C	3 min
denaturation	35	95 °C	30 sec
Annealing		52 °C	30 sec
Extension		72 °C	1 min
Final extension	1	72 °C	10 min

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis

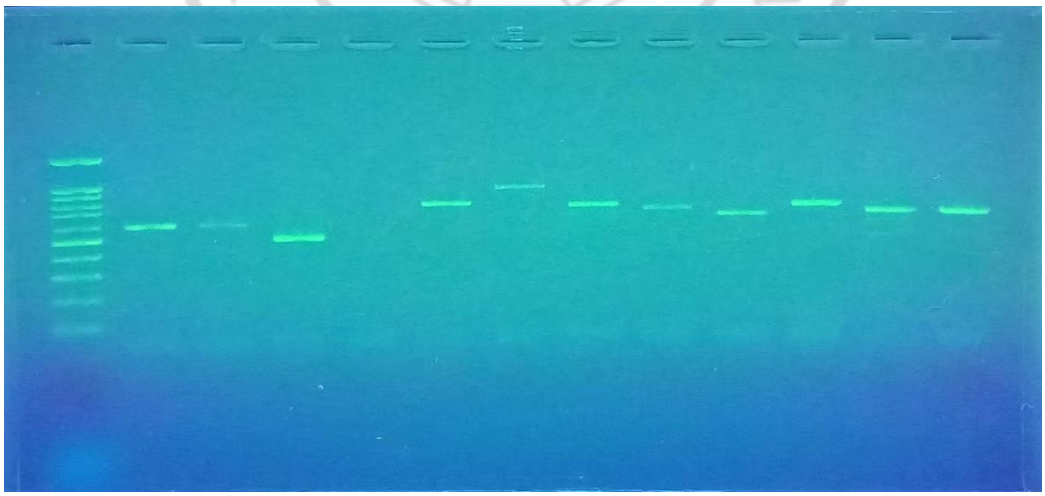
1. เตรียม 2% Agarose gel ใน 1x TAE Buffer 50 ml โดยชั่งเจล 1.0 กรัม ผสมกับ 1X TAE Buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยค่อย ๆ หลอมให้เจลละลายหมดด้วยเครื่องไมโครเวฟ จนสังเกตเห็นเจลใสเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีเม็ดเจลปนอยู่

2. จากนั้นนำขวดเจลไปเขย่าในน้ำอุณหภูมิปกติ เพื่อให้อุณหภูมิเจลลดลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส แล้วเติม RedSafe ปริมาตร 5 µl ผสมให้เข้ากัน ควรระวังการเกิดฟองอากาศ

3. เทใส่ถาดบล็อกเจลทิ้งไว้ให้เย็นอย่างน้อย 30 นาที แล้วแกะเจลออกจากบล็อกเจล นำไปใส่ในเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสที่เติม 1xTAE buffer ปริมาตรให้ท่วมแผ่นเจล

4. ต่อมาใช้ไมโครปิเปต ดูดสี (loading dye) หยดสีลงบนแผ่นพาราฟิล์มเป็นหยดเล็ก ๆ (2 ไมโครลิตร) แล้วดูด PCR product (5 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง) ผสมกับหยดสีที่เตรียมไว้ แล้วทำการปิเปตลงในหลุมบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้แล้วในเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิส โดยมี DNA marker เพื่อบอกขนาดของ PCR product

5. ในการรันเจลจะใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลมาส่องด้วยเครื่อง UV-Transilluminator เพื่อสังเกตแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างผล Gel Electrophoresis

การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ให้บริสุทธิ์ (Purified PCR product)

นำ DNA ของเห็ดมาทำการเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ด้วยปฏิกิริยา PCR 50 µl (ตารางที่ 3.3) ทั้งหมด 4 หลอดต่อเห็ด 1 ชนิด เพื่อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 200 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.3 การเตรียมปฏิกิริยา PCR

Composition	50 µl reaction	Final concentration
DW	18 µl	-
2x Master mix	25 µl	1x
Primer ITS1	2.5 µl	0.5 µM
Primer ITS4	2.5 µl	0.5 µM
DNA template	2 µl	-

ตารางที่ 3.4 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR

PCR profile	Cycle number	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 °C	3 min
denaturation	35	95 °C	30 sec
Annealing		52 °C	30 sec
Extension		72 °C	1 min
Final extension	1	72 °C	10 min

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

นำ PCR product ที่ได้ทั้งหมดมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป PureDireX™ ซึ่งมีวิธีการดังนี้ (ภาพที่ 3.3)

1. ทำการเติม buffer B ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต่อปริมาตรตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube

2. ทำการสวม column PG ลงใน Collection tube (ย้ายสารในตอนแรกมาใส่ใน column PG)

3. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งส่วนใส่ด้านล่าง 4. ทำการเติม buffer W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน column PG นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งส่วนใส่ด้านล่าง

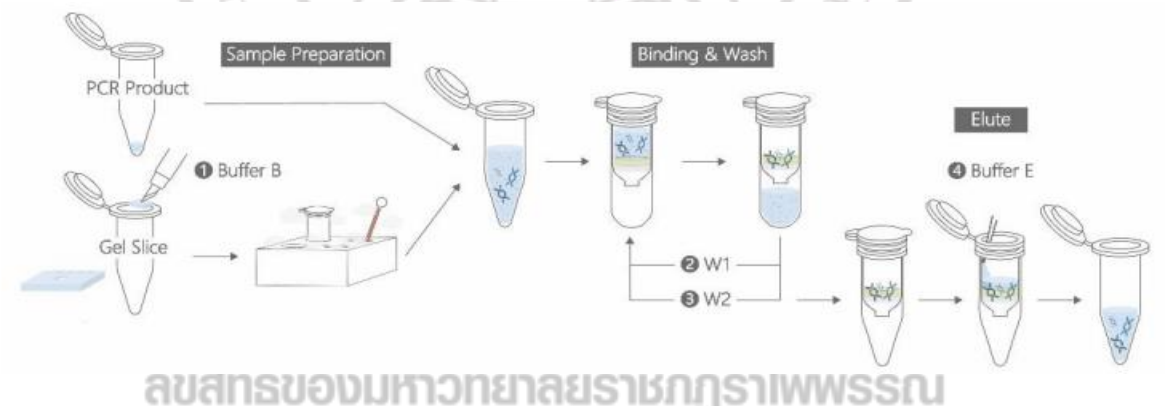
5. เติม buffer W2 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน column PG นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการทิ้งส่วนใสด้านล่าง

6. centrifuge อีกครั้งหนึ่งที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเป็นการปั่นเหวี่ยงแห้งให้สารที่ยังมีตกค้างอยู่นั้นไหลออกมา

7. นำหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube ใหม่ มาสวมด้านล่างของ column PG

8. ทำการเติม buffer E ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงครั้งสุดท้ายที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จะได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมากขึ้นและบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อที่จะใช้ในการส่ง Sequencing

9. ทำการรันเจลเช็คแบรนดีเอ็นเออีกครั้งหนึ่งโดยขั้นตอนดัง 3.4.2.3 ข้างต้น โดยทำการดูด DNA Product ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่างเท่านั้น



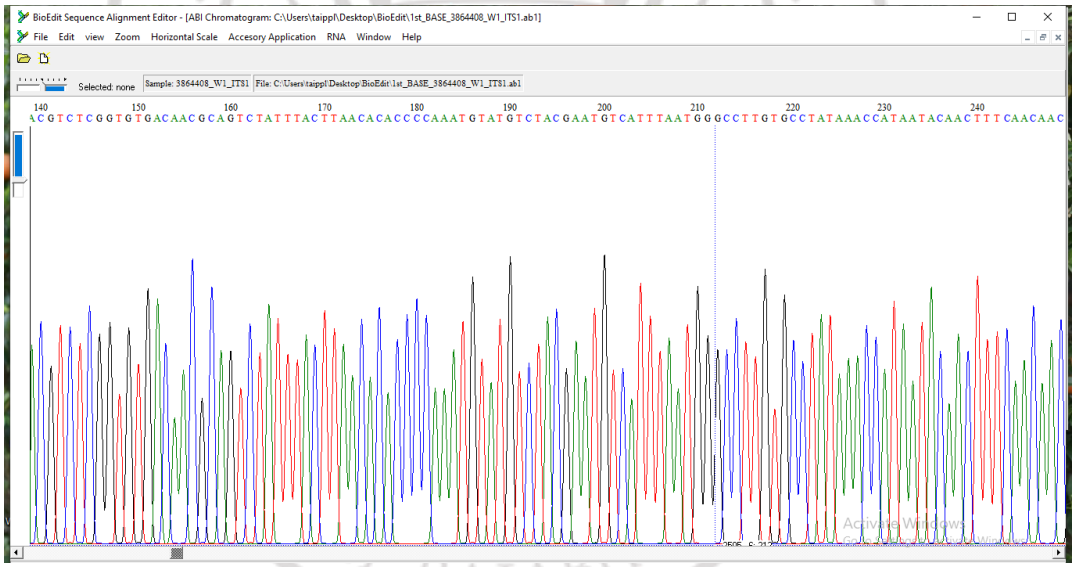
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏราชนครินทร์

ภาพที่ 3.3 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป PureDireX™

ที่มา : (Bio-helix, 2021)

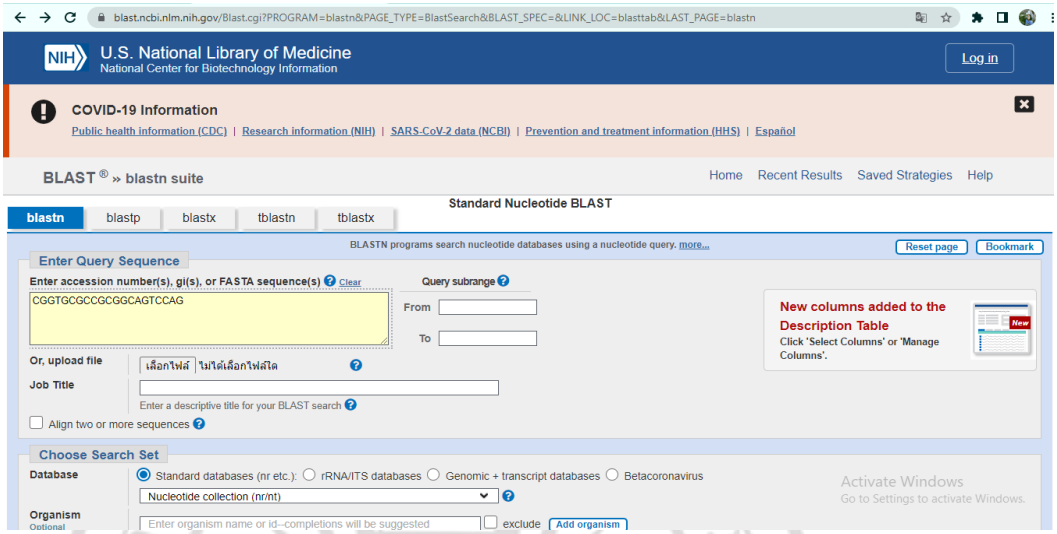
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล

นำ PCR product ที่ได้ส่งไปยังบริษัท ATGC ประเทศไทย เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทางบริษัทจะส่งผลการวิเคราะห์เป็นไฟล์ข้อมูลผ่านช่องทางอีเมลล์ จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของลำดับนิวคลีไอไทด์ที่ได้ โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor และแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เหมาะสมกับคู่เบสเพื่อให้เกิดความถูกต้องด้วยโปรแกรม GeneStudio Professional Edition โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องแล้วใส่ในโปรแกรม BLAST N (Basic Local Alignment Search Tool) ในฐานข้อมูล (GenBank) ของ National Center for Biotechnology Information NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อตรวจสอบร้อยละความคล้ายคลึง (percent similarity) และทำการระบุชนิดของเห็ดรา (ภาพที่ 3.4-3.6)



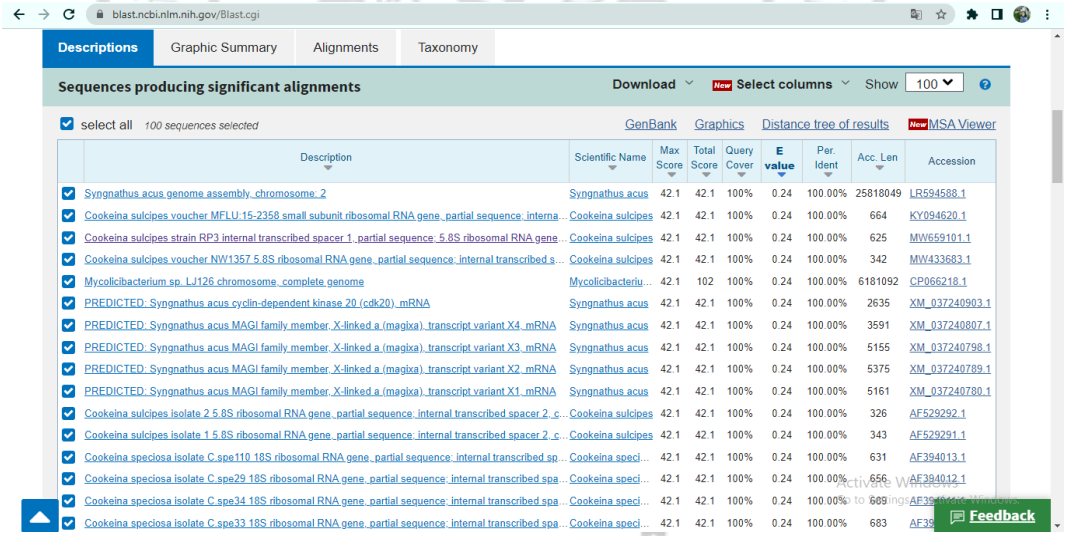
ภาพที่ 3.4 ตัวอย่างผล DNA sequencing โดยโปรแกรม BioEdit

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 3.5 หน้าต่างโปรแกรม BLAST N

ที่มา : (NCBI, 2022)



ภาพที่ 3.6 ตัวอย่างผลการ BLAST

ที่มา : (NCBI, 2022)

ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงในระดับห้องปฏิบัติการ

จากผลการระบุชนิดของเห็ดรา จึงทำการคัดเลือกเห็ดที่มีรายงานว่ากินได้คือ เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) มาเพียง 1 ชนิด เพื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยในระดับห้องปฏิบัติการและทำการเพาะเลี้ยงให้เกิดดอกในระดับโรงเรือน

การแยกเชื้อเห็ด

เนื่องจากเห็ดแครงมีลักษณะดอกที่มีขนาดเล็ก การแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อจึงทำได้ยาก ในการศึกษานี้จึงใช้วิธีการแยกเชื้อเห็ดจากสปอร์ โดยการนำวาสลีนแปะไว้ที่ฝาจานเพาะเชื้อ แล้วนำดอกเห็ดแครงติดไว้กับวาสลีนโดยหันด้านที่มีครีบเข้าหาจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA จากนั้นบ่มทิ้งไว้ข้ามคืน สปอร์จากครีบของเห็ดแครงจะร่วงหล่นลงบนอาหาร PDA แล้วงอกเป็นเส้นใยเห็ด นำดอกเห็ดและวาสลีนออกจากฝาจานเพาะเชื้อ แล้วบ่มจานเพาะเชื้อต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-7 วัน จนเส้นใยเต็มจาน และทำการตรวจสอบลักษณะของเส้นใยเห็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการนำเส้นใยเห็ดมาย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue

การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดบนอาหาร PDA

ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงสายพันธุ์สวนยางบนอาหาร PDA โดยมีการเปรียบเทียบกับเชื้อเห็ดแครงสายพันธุ์ทางการค้า โดยนำเส้นใยเห็ดแครงที่เจริญบนจานเพาะเชื้ออายุ 7 วัน ใช้ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนี จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดแครงจากทั้งสองสายพันธุ์มาวางกลางจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเห็ดแครง โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และเรียกเชื้อเห็ดบนอาหาร PDA นี้ว่า แม่เชื้อ (mother mycelium)

การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดบนเมล็ดข้าวฟ่าง

จากขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหาร PDA นั้น เราจะได้เส้นใยเห็ดที่เรียกว่า แม่เชื้อ (mother mycelium) ซึ่งไม่นิยมถ่ายไปเลี้ยงวัสดุเพาะโดยตรง เพราะจะเกิดการปนเปื้อนสูง จะต้องผ่านการทำหัวเชื้อหรือเชื้อขยาย (spawn) ก่อนเพื่อให้มีปริมาณของเชื้อเห็ดมากพอที่จะถ่ายต่อไปยังวัสดุเพาะ ทำการเตรียมเมล็ดข้าวฟ่าง โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างมาแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้เมล็ดข้าวฟ่างอ่อนตัวลง จากนั้นนำไปต้มไฟปานกลาง ในขณะที่ต้มควรจะคนด้วยเพื่อให้เมล็ดข้าวสุกอย่างสม่ำเสมอ ใช้เวลาประมาณ 15 นาทีจากน้ำเดือด เมื่อบิดเมล็ดให้แตกจะเห็นเนื้อแป้งของเมล็ดรอบนอกใส ส่วนภายในของเมล็ดครึ่งหนึ่งยังขาวขุ่นเป็นแป้งอยู่ก็ใช้ได้ นำขึ้นสรงให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรง

เมื่อเย็นกรอกใส่ขวดแก้วประมาณหนึ่งในสอง หรือหนึ่งในสามของขวดแล้วปิดจุกสำลี นำไปนึ่งหม้อนึ่งความดันไอ โดยใช้ความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

ใช้เข็มเขี่ยหรือใบมีดที่ปลอดเชื้อ ตัดเชื้อบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงบนวุ้นขนาด 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่เชื้อเห็ดลงไปกลางขวด การใส่เชื้อบริสุทธิ์จะต้องปฏิบัติอย่างระมัดระวังด้วยความสะอาด เมื่อเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงไปแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องแล้วทำการวัดระยะทางการเจริญของเส้นใยจนกระทั่งเส้นใยเจริญถึงก้นขวด โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และเรียกเชื้อเห็ดบนเมล็ดข้าวฟ่างนี้ว่า หัวเชื้อ (spawn)

ศึกษาผลผลิตจากการเพาะเห็ดแครงในระดับโรงเรือน

ทำการเพาะเห็ดแครงในวัสดุเพาะจำนวน 3 สูตร เพื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 แบบ แล้วทำการวัดปริมาณผลผลิตดอกเห็ดที่เกิดขึ้น

การเตรียมก้อนเชื้อ

ทำการเตรียมก้อนเชื้อสำหรับเห็ดแครง จำนวน 3 สูตร ดังนี้

สูตร 1 ประกอบด้วย

ขี้เลื่อย	15	กิโลกรัม
รำละเอียด	7.5	กิโลกรัม
ภูไมท์	300	กรัม
ดีเกลือ	30	กรัม

สูตร 2 ประกอบด้วย

ขี้เลื่อย	17	กิโลกรัม
รำละเอียด	5.5	กิโลกรัม
ภูไมท์	300	กรัม
ดีเกลือ	30	กรัม

สูตร 3 ประกอบด้วย

ขี้เลื่อย	18	กิโลกรัม
รำละเอียด	4.5	กิโลกรัม
ภูไมท์	300	กรัม

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ดีเกลือ 30 กรัม

ทำการคลุกเคล้าส่วนผสมให้เข้ากัน เติมน้ำให้มีความชื้นพอเหมาะ ทดสอบโดยใช้มือกำแล้วขี้เลื่อยมีการจับตัวเป็นก้อนถือว่าใช้ได้ จากนั้นบรรจุวัสดุเพาะลงในถุงพลาสติกทนร้อน กดให้แน่นตึง สูงประมาณ 1/2 ของถุง รวบปากถุง บีบอากาศออก สวมคอพลาสติก แล้วพับปากถุงพาดลงมารัดยางให้แน่นอุดด้วยสำลี หุ้มด้วยกระดาษ หรือฝาครอบพลาสติก (ภาพที่ 3.7) ทำการนึ่งฆ่าเชื้อก้อนเชื้อ โดยนำก้อนเชื้อไปนึ่งหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) หลังจากนึ่งก้อนเชื้อเสร็จแล้ว รอให้ก้อนเชื้อเย็นเสียก่อน จึงทำการเขี่ยหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างลงก้อนเชื้อได้

การเจริญเติบโตของเส้นใยบนก้อนเชื้อ

ทำการเขี่ยหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างลงก้อนเชื้อ โดยนำเชื้อเห็ดในเมล็ดข้าวฟ่างมาเขย่าให้เมล็ดแตกกระจายออก เทเมล็ดข้าวฟ่างประมาณ 15-20 เมล็ด ลงบนถุงก้อนเชื้อ ในการเทเมล็ดข้าวฟ่างไม่ควรตั้งขวดหัวเชื้อขึ้น เพราะจะเป็นการดูดเอาอากาศที่สกปรกเข้าไป หลังจากนั้นหุ้มด้วยกระดาษ รัดหนังยาง แล้วนำไปเก็บไว้ในโรงบ่มเชื้อ ไม่ต้องรดน้ำ ไม่ต้องการแสงสว่าง อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 24-30 องศาเซลเซียส ทำการบ่มจนเส้นใยเจริญเต็มก้อนเชื้อ นำไปเปิดดอกที่โรงเรือนเพาะเห็ด

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาพที่ 3.7 การเตรียมก้อนเชื้อและการใส่หัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างลงในก้อนเชื้อ

การเพาะให้เกิดดอกและการเก็บผลผลิต

เมื่อเส้นใยเจริญจนเกือบถึงก้นถุง ให้ทำการถอดคอขวดแล้วใช้หนังยางรัดปากถุงก้อนเชื้อให้แน่น ให้ทำการแขวนก้อนบนราวแขวนก้อน แล้วใช้มีดจุ่มแอลกอฮอลล์ 70% เพื่อทำการฆ่าเชื้อใบมีด จากนั้นใช้มีดกรีดที่ข้างถุง ใน 1 ก้อนจะมี 4 ด้าน ด้านละ 1 รอยมีด (ภาพที่ 3.8) จากนั้นบ่มไว้ที่โรงเพาะเห็ดจนเริ่มมีตุ่มดอกเกิดขึ้นตามรอยกรีด จึงเริ่มทำการรดน้ำได้ การรดน้ำจะรดเช้า กลางวัน เย็น จนกระทั่งเกิดดอกที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 3.9)

ทำการเก็บผลผลิตโดยใช้มีดจุ่มแอลกอฮอลล์ 70% เพื่อทำการฆ่าเชื้อใบมีด จากนั้นใช้มีดแซะเพื่อทำการเก็บดอกตามแนวรอยกรีด นำผลผลิตที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก (ภาพที่ 3.10)

ภาพที่ 3.8 การแขวนก้อนและการกรีดถุงเพื่อเปิดดอกเห็ดแครง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาพที่ 3.9 ตุ่มดอกที่เกิดขึ้นหลังการกรีดและดอกเห็ดที่สมบูรณ์แล้ว

ภาพที่ 3.10 การเก็บดอกเห็ดแครง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาคำนวนค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ 2 กลุ่มตัวอย่างจะใช้สถิติ t-test กำหนดให้การมีนัยสำคัญทางสถิติจะมีค่า *p*-values < 0.05 ซึ่งการวิเคราะห์ทางสถิตินี้ใช้โปรแกรม SPSS 11.5 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี