

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

- ห่วงเขี่ยเชื้อ
- หลอดทดลอง
- จานเลี้ยงเชื้อ
- ปิเปต
- หลอดหยด
- ลูกยางขนาดเล็ก
- ลูกยางขนาดใหญ่
- แท่งแก้วเกลี่ยสปอร์
- ตู้บ่มเชื้อ Binder
- ขวดรูปชมพู่
- แผ่นเซลโลเฟน
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา Olympus
- กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ รุ่น Wilover 5 บริษัท Hund, Germany
- เครื่องนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด
- เครื่องซั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น 80 A-200 M บริษัท Precisa, Switzerland
- สายยางน้ำ
- หัวฉีดหมอก
- ไม้บรรทัด
- ปากกาเคมี
- แผ่นป้ายสติ๊กเกอร์
- ชั้นวางถุงซีลื้อย

เคมีภัณฑ์

- อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว PDB ยี่ห้อ DIFCO
- ผงวุ้น
- น้ำตาลเด็กซ์โทส

- ข้าวฟ่าง
- ยิปซัม
- กรดอะซิติก
- รำ
- ซีลี้อย
- ดีเกลือ
- ปูนขาว
- แอลกอฮอล์

เส้นใยเห็ดโคนญี่ปุ่นที่ใช้ทำการวิจัย

เส้นใยที่ใช้ทำการวิจัยคือเส้นใยเห็ดโคนญี่ปุ่นที่เพาะได้จากสปอร์เห็ดสายพันธุ์ CUY1 ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัย

1. การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เห็ดในรุ่นที่หนึ่ง

1.1 การหาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เห็ดโคนญี่ปุ่นสายพันธุ์ CUY 1 ที่อุณหภูมิต่างๆ

1.1.1 การเตรียมสปอร์

นำห้วงเชื้อเห็ดและสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่นที่เก็บจากสปอร์หนึ่งดอก ลงเชื้อจางในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วในหลอดทดลองจากนั้น นำน้ำกลั่นที่มีสปอร์อยู่ไปหาปริมาณสปอร์ โดยเครื่องนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือด (รายละเอียดใน ภาคผนวก ข) เมื่อทราบความเข้มข้นของสปอร์ (จำนวนสปอร์/มล.) แล้วปรับความเข้มข้นโดยใช้ ปิเปตดูดน้ำกลั่นที่มีสปอร์ไปใส่น้ำกลั่นอีกหลอด โดยคำนวณความเข้มข้นของน้ำกลั่นหลอดสุดท้าย ให้มีความเข้มข้นสปอร์ประมาณ 1000 สปอร์/มล. จากนั้นทำซ้ำอีก 4 ซ้ำโดยแต่ละซ้ำ ใช้สปอร์ที่เก็บจากดอกเห็ดต่างดอกกัน

1.1.2 การหาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ

นำสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่นสายพันธุ์ CUY1 เจือจางในน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้นของสปอร์ ประมาณ 1000 สปอร์/มล. จากนั้น หยดน้ำกลั่นที่มีสปอร์ลงในอาหารแข็ง PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 0.1 มล. ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้กระจายทั่วจานเลี้ยงเชื้อ นำจานเพาะเชื้อที่มีสปอร์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 32, 36 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน จนสปอร์เริ่มงอก ส่องกล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์ทั้งหมด และจำนวนสปอร์ที่งอก หาเปอร์เซ็นต์การงอกเปรียบเทียบกันระหว่างสปอร์ที่บ่มที่อุณหภูมิ 25, 32, 36 และ 40 องศาเซลเซียส

1.2 การคัดเลือกสปอร์ที่ทนร้อนซึ่งออกเป็นเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว (monosporous culture)

1.2.1 ตักสปอร์ที่เริ่มงอกจากข้อ 1.1.2 ที่งอกในอุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส และสามารถมีชีวิตรอดได้ที่อุณหภูมิดังกล่าว หลังจากงอกออกมาเป็นเวลา 7 วัน จำนวน 50 ตัวอย่าง นำเส้นใยไปเพาะเพิ่มปริมาณในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

1.2.2 ตักเส้นใยจากข้อ 1.1.2 ที่งอกในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จำนวน 10 ตัวอย่าง นำเส้นใยไปเพาะเพิ่มปริมาณ ในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

1.3 การศึกษาอัตราการเจริญของเส้นใยระยะที่หนึ่งของเห็ดโคนญี่ปุ่นในช่วงอุณหภูมิต่างๆ

1.3.1 อัตราการเจริญในอาหารแข็ง PDA

นำเส้นใยระยะที่หนึ่งของเห็ดโคนญี่ปุ่นใน ข้อ 1.2.2 มาเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ซม. เจาะเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารแข็ง PDA วางลงในอาหารแข็ง PDA กลางจานเลี้ยงเชื้อจากนั้น นำเส้นใยไปบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน ที่ 25, 28, 32, และ 36 องศาเซลเซียส วัดรัศมีการเจริญ ทุกๆ 2 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มจานเลี้ยงเชื้อ หาอัตราการเจริญเฉลี่ยของเส้นใย ในแต่ละอุณหภูมิ

1.3.2 อัตราการเจริญของเส้นใยระยะที่หนึ่งในอาหารเหลว PDB

นำเส้นใยระยะที่หนึ่งของเห็ดโคนญี่ปุ่นใน ข้อ 1.2.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ซม. เจาะเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารแข็ง PDA วางลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว PDB จากนั้น นำเส้นใยไปบ่มที่อุณหภูมิต่างกันว่า 25, 28, 32, และ 36 องศาเซลเซียส ซึ่งนำหนักแห้งของเส้นใยทุกๆ 2 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มขวด หาอัตราการเจริญเฉลี่ย และเขียนกราฟแสดงการเจริญในแต่ละอุณหภูมิ

1.4 การทดสอบอัตราการเจริญและคัดเลือกเส้นใยระยะที่หนึ่ง ในอาหารแข็ง PDA และอาหารเหลว PDB

1.4.1 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารแข็ง PDA

นำเส้นใยระยะที่หนึ่งของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 1.2.1 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA วัดรัศมีการเจริญ (รายละเอียดในภาคผนวก ข) ทุกๆ 2 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มจานเลี้ยงเชื้อ หาอัตราการเจริญเฉลี่ย โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 จานเลี้ยงเชื้อ

1.4.2 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารเหลว PDB

นำเส้นใยระยะที่หนึ่งของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 1.2.1 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มขวด นำเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ซึ่งนำหนักแห้ง หาอัตราการเจริญเฉลี่ย โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ขวด

1.4.3 การคัดเลือกเส้นใยระยะที่หนึ่ง

คัดเส้นใยระยะที่หนึ่งที่มีอัตราเจริญสูงสุด 15 อันดับแรก ในอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ทั้งในอาหารแข็ง PDA และในอาหารเหลว PDB โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ ANOVA (ตำรงค์ ทิพย์โยธา, 2545) และพิจารณาคัดเลือกโดยดูจากอันดับการเจริญในอาหารแข็ง PDA ก่อน หากเส้นใยเจริญได้ดีเป็น 15 อันดับแรกในอาหารแข็ง PDA และเจริญได้ดีอยู่ในกลุ่ม 15 อันดับแรกของอาหารเหลว PDB ด้วย ก็คัดเลือกไปใช้ได้ แต่หากเส้นใยเจริญอยู่ในกลุ่ม 15 อันดับแรกในอาหารแข็ง PDA แต่เจริญได้ไม่ดีในอาหารเหลว PDB ทำการคัดทิ้ง และพิจารณาเส้นใยที่เจริญได้ดีในลำดับต่อไป

1.5 การตรวจสอบรูปแบบการผสมพันธุ์ของเห็ดโคนญี่ปุ่น

1.5.1 นำสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่นที่มีอยู่จากดอกเห็ด 3 ดอก ไปเจือจางในน้ำกลั่นที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยแยกทำเป็น 3 ชุด ชุดแรกใช้สปอร์จากดอกที่หนึ่ง ชุดที่สองใช้สปอร์จากดอกที่สอง และชุดที่สามใช้สปอร์จากดอกที่สาม

1.5.2 เตรียมสปอร์โดยวิธีการเดียวกับวิธีใน ข้อ 1.1.1

1.5.3 หยดน้ำกลั่นที่มีสปอร์ลงในอาหารแข็ง PDA ในจานเลี้ยงเชื้อจานละ 0.1 มล. ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้กระจายทั่วจานเลี้ยงเชื้อ

1.5.4 นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มในอุณหภูมิห้องใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจดูทุกวัน จนกระทั่งพบว่าสปอร์งอก ให้ตักสปอร์เดี่ยวที่งอกออกมา จนครบชุดละ 15 สปอร์

1.5.5 นำเส้นใยที่งอกจากสปอร์เดี่ยวของแต่ละชุด นำไปผสมกันลงในจานเลี้ยงเชื้อจานละคู่ผสมโดยวางให้ห่างกันประมาณ 2 ซม. วางแผ่นเซลโลเฟนที่ตัดเป็นชิ้นเล็กประมาณ 1X1 ซม. ไว้ตรงกลางระหว่างเส้นใย ผสมเส้นใยแบบพบกันหมดทั้ง 15 สปอร์ ในแต่ละชุด ได้จำนวนคู่ที่ทำการผสมทั้งหมดชุดละ 105 คู่

1.5.6 เมื่อเส้นใยเจริญมาพบกัน สังเกตลักษณะเส้นใย รวมทั้งตักแผ่นเซลโลเฟนไปตรวจสอบการเกิดแคลมป์คอนเนคชันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกจำนวนคู่ผสมที่ผสมเข้ากันได้ (เกิดแคลมป์คอนเนคชัน)

1.5.7 นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Chi-square test เปรียบเทียบอัตราส่วนจำนวนคู่ที่ผสมเข้ากันได้กับคู่ที่ผสมทั้งหมด ว่าอยู่ในขอบเขตที่ยอมรับได้อยู่ในอัตราส่วน 1 : 4 ซึ่งเป็นอัตราส่วนของรูปแบบการผสมพันธุ์แบบ tetrapolar

1.6 การผสมเส้นใยระยะที่หนึ่งเพื่อให้เกิดเส้นใยระยะที่สอง

1.6.1 นำเส้นใยระยะที่หนึ่งที่คัดเลือกได้ในข้อ 1.4.3 มาทำการผสมแบบพบกันหมดในจานเลี้ยงเชื้อ วางแผ่นเซลโลเฟนที่ตัดเป็นชิ้นเล็กประมาณ 1X1 ซม. ไว้ตรงกลางระหว่างเส้นใย จากนั้นรอจนเส้นใยเจริญมาพบกัน

1.6.2 นำแผ่นเซลโลเฟนที่มีเส้นใยไปตรวจสอบแคลมป์คอนเน็คชั่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากตรวจพบแคลมป์คอนเน็คชั่นแสดงว่าเส้นใยผสมกันได้ เกิดเป็นเส้นใยระยะที่สอง

1.6.3 นำเส้นใยระยะที่สอง ไปเพาะเพิ่มปริมาณในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

1.6.4 ผสมเส้นใยระยะที่หนึ่งจากข้อ 1.1.2 ให้เกิดเป็นเส้นใยระยะที่สอง เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ (CUY 1) เพาะเพิ่มปริมาณในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

1.7 การศึกษาอัตราการเจริญของเส้นใยระยะที่สองของเห็ดโคนญี่ปุ่นในช่วงอุณหภูมิต่างๆ

1.7.1 อัตราการเจริญในอาหารแข็ง PDA

นำเส้นใยระยะที่หนึ่งของเห็ดโคนญี่ปุ่นใน ข้อ 1.2.2 มาผสมเพื่อให้เกิดเส้นใยระยะที่สอง จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ซม. เจาะเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารแข็ง PDA วางลงบนอาหารแข็ง PDA กลางจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเส้นใยไปบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน ที่ 25 28 32 และ 36 องศาเซลเซียส วัดรัศมีการเจริญ ทุกๆ 2 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มจานเลี้ยงเชื้อ หาอัตราการเจริญเฉลี่ยของเส้นใย ในแต่ละอุณหภูมิ

1.7.2 อัตราการเจริญในอาหารเหลว PDB

นำเส้นใยระยะที่สองของเห็ดโคนญี่ปุ่นใน ข้อ 1.7.1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ซม. เจาะเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารแข็ง PDA วางลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว PDB นำเส้นใยไปบ่มที่อุณหภูมิต่างกันที่ 25 28 32 และ 36 องศาเซลเซียส ซึ่งนำหนักแห้งของเส้นใยทุกๆ 2 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มขวด หาอัตราการเจริญเฉลี่ย และเขียนกราฟแสดงการเจริญในแต่ละอุณหภูมิ

1.8 การทดสอบอัตราการเจริญและคัดเลือกเส้นใยระยะที่สองในอาหารแข็ง PDA และ อาหารเหลว PDB

1.8.1 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารแข็ง PDA

นำเส้นใยระยะที่สองของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 1.6.3 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA วัดรัศมีการเจริญ ทุกๆ 2 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มจานเลี้ยงเชื้อ หาอัตราการเจริญเฉลี่ย โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 จานเลี้ยงเชื้อ

1.8.2 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารเหลว PDB

นำเส้นใยระยะที่สองของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 1.6.3 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มขวด นำเส้นใยไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ซึ่งนำหนักแห้ง หาอัตราการเจริญเฉลี่ย โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ขวด

1.8.3 การคัดเลือกเส้นใยระยะที่สอง

คัดเส้นใยระยะที่สองที่มีอัตราเจริญที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส สูงที่สุดในกลุ่มแรก จากวิธีการวิเคราะห์แบบ ANOVA ทั้งในอาหารแข็ง PDA และในอาหารเหลว PDB เพาะเพิ่มปริมาณ เส้นใยที่คัดเลือกได้ในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

1.9 การทดสอบอัตราการเจริญของเส้นใยระยะที่สองในถุงซีลีย

1.9.1 นำเส้นใยระยะที่สองที่คัดได้ในข้อ 1.8.3 และสายพันธุ์เปรียบเทียบ (CUY 1) จากข้อ 1.6.4 ไปทำหัวเชื้อข้าวฟ่าง (ดูในภาคผนวก ก) ก่อนที่จะนำเส้นใยที่อยู่ในหัวเชื้อข้าวฟ่าง ไป ถ่ายลงในถุงซีลีย โดยแบ่งการทดลองเป็นสองชุดคือ ชุดที่อยู่ในห้องเย็น 25 องศาเซลเซียส กับชุดที่อยู่ในอุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิเฉลี่ย ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) โดยแต่ละห้องจะทำการ ทดลองสายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 50 ถุง

1.9.2 วัดการเจริญของเส้นใยในถุงซีลีย โดยวัดตามแนวจากปากถุงลงด้านล่าง ถุงละ 3 แนว หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล ทำการวัดทุก ๆ 5 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มก้นถุง ทำอัตราการ เจริญของเส้นใยในแต่ละถุง วิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยแต่ละสายพันธุ์ทั้งสองชุด อุณหภูมิ โดยการวิเคราะห์แบบ ANOVA

1.10 การทดสอบปริมาณผลผลิตดอกเห็ดและการเก็บสปอร์เห็ดโคนญี่ปุ่น

1.10.1 การเปิดดอกเห็ดโคนญี่ปุ่น

หลังจากเส้นใยเจริญเต็มก้นถุงแล้ว รอจนเส้นใยมีสีเข้มขึ้นจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลอ่อน และเส้นใยบริเวณปากถุงเป็นสีน้ำตาลใกล้เคียงกับสีซีลีย จากนั้นย้ายถุงเห็ดทั้งหมดลงไปในโรงเรือน เปิดดอก โดยแบ่งครึ่งแต่ละซั้งลงในเรือนเปิดดอกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง โดย เปิดจุกสำลีที่ปิดปากถุงซีลียและคอขวดพลาสติกออก วางถุงในลักษณะนอน ตั้งเวลาชั่งน้ำ วันละ 3 เวลา นานครั้งละ 30 นาที

1.10.2 การเก็บผลผลิตดอกเห็ด

หลังจากเริ่มเปิดดอกเห็ด รอจนเห็ดโคนญี่ปุ่นเริ่มเกิดการรวมตัวเป็นตุ่มเห็ดและเจริญ เป็นดอกเห็ดในระยะที่ยังตูมอยู่ ทำการเก็บดอกเห็ดสดในระยะที่ยังตูมอยู่ ชั่งน้ำหนักสดของดอกเห็ด บันทึกน้ำหนักสด จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของน้ำหนักสดของเห็ด โดยแยกวิเคราะห์ตาม อุณหภูมิที่ห้องบ่มเส้นใยและอุณหภูมิที่ห้องเปิดดอกได้ 4 ชุดทดลอง ได้แก่

1. เห็ดที่บ่มเชื้อและเปิดดอกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
2. เห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเปิดดอกที่อุณหภูมิห้อง
3. เห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและเปิดดอกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
4. เห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและเปิดดอกที่อุณหภูมิห้อง

1.10.3 การเก็บสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่น

เก็บสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่นแต่ละสายพันธุ์ที่เปิดดอก ทั้ง 4 ชุดทดลอง ชุดทดลองละ 6 ดอก เพื่อเก็บไว้ทำการคัดเลือกและผสมเส้นใยในรุ่นต่อไป โดยใช้กระดาษที่นิ่งมาเชื้อแล้ว หุ้มดอกเห็ดที่เริ่มบานไว้ ปิดให้มีขีดจนสปอร์เริ่มติดออกมาบนกระดาษ จึงทำการเก็บสปอร์ จากนั้นนำกระดาษที่มีสปอร์ใส่ลงในถุงพลาสติก แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

1.11 การพิจารณาหาสายพันธุ์ที่ร้อนที่สุดที่สุกในรุ่น

วิเคราะห์หาสายพันธุ์ที่ร้อนที่สุดที่สุกในรุ่น โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญในถุงซีลี้อยที่บ่มในอุณหภูมิห้อง และน้ำหนักสดของดอกเห็ดที่บ่มเชื้อและเปิดดอกที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้หากอัตราการเจริญในถุงซีลี้อยที่บ่มในอุณหภูมิห้องไม่แตกต่างกันมากนัก จะให้น้ำหนักในการพิจารณา กับน้ำหนักสดของดอกเห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและเปิดดอกที่อุณหภูมิห้องมากที่สุด

2. การคัดเลือกและผสมพันธุ์เห็ดในรุ่นที่สอง

2.1 การหาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เห็ดโคนญี่ปุ่นที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เตรียมสปอร์โดยใช้สปอร์จากสายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่สุกในรุ่นที่หนึ่ง และสปอร์จากสายพันธุ์ CUY1 ทำการเตรียมสปอร์เช่นเดียวกับข้อ 1.1.1 หาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ที่ 25 และ 36 องศาเซลเซียส จากสายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่สุกในรุ่นที่หนึ่ง และสปอร์จากสายพันธุ์ CUY1 เช่นเดียวกับข้อ 1.1.2

2.2 การคัดเลือกสปอร์ที่ทนร้อนซึ่งงอกเป็นเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว

2.2.1 ตักสปอร์ที่งอกเป็นเส้นใยที่ 36 องศาเซลเซียสของสายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่สุกในรุ่นหนึ่ง จำนวน 50 ตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบและคัดเลือกเส้นใย

2.2.2 ตักสปอร์ที่งอกเป็นเส้นใยของสายพันธุ์ CUY1 ที่งอกที่ 25 องศาเซลเซียส 10 ตัวอย่างเพื่อใช้ในการผสมเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ นำเส้นใยทั้งหมดไปเพาะเพิ่มปริมาณในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

2.3 การทดสอบอัตราการเจริญและคัดเลือกเส้นใยระยะที่หนึ่ง ในอาหารแข็ง PDA และอาหารเหลว PDB

2.3.1 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารแข็ง PDA

นำเส้นใยระยะที่หนึ่งของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 2.2.1 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA วัดรัศมีการเจริญ ทุกๆ 2 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มจานเลี้ยงเชื้อ หาอัตราการเจริญเฉลี่ย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 จานเลี้ยงเชื้อ

2.3.2 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารเหลว PDB

นำเส้นใยระยะที่หนึ่งของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 2.2.1 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มขวด นำเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง หาอัตราการเจริญเฉลี่ย โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ขวด

2.3.3 การคัดเลือกเส้นใยระยะที่หนึ่ง

คัดเส้นใยระยะที่หนึ่งที่มีอัตราเจริญสูงที่สุด 15 อันดับแรก ในอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ทั้งในอาหารแข็ง PDA และในอาหารเหลว PDB โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ ANOVA และพิจารณาคัดเลือกโดยดูจากอันดับการเจริญในอาหารแข็ง PDA ก่อน หากเส้นใยเจริญได้ดีเป็น 15 อันดับแรกในอาหารแข็ง PDA และเจริญได้ดีอยู่ในกลุ่ม 15 อันดับแรกของอาหารเหลว PDB ด้วย ก็คัดเลือกไปใช้ได้ แต่หากเส้นใยเจริญอยู่ในกลุ่ม 15 อันดับแรกในอาหารแข็ง PDA แต่เจริญได้ไม่ดีในอาหารเหลว PDB ทำการคัดทิ้ง และพิจารณาเส้นใยที่เจริญได้ดีในลำดับต่อไป

2.4 การผสมเส้นใยระยะที่หนึ่งเพื่อให้เกิดเส้นใยระยะที่สอง

2.4.1 นำเส้นใยระยะที่หนึ่งที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.3.3 มาทำการผสมแบบพบกันหมด ในจานเลี้ยงเชื้อ วางแผ่นเซลโลเฟนที่ตัดเป็นชิ้นเล็กประมาณ 1X1 ซม. ไว้ตรงกลางระหว่างเส้นใยจากนั้นรอจนเส้นใยเจริญมาพบกัน

2.4.2 นำแผ่นเซลโลเฟนที่มีเส้นใยไปตรวจสอบแคลมป์คอนเน็คชั่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากตรวจพบแคลมป์คอนเน็คชั่นแสดงว่าเส้นใยผสมกันได้ เกิดเป็นเส้นใยระยะที่สอง

2.4.3 นำเส้นใยระยะที่สองไปเพาะเพิ่มปริมาณในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

2.4.4 ผสมเส้นใยระยะที่หนึ่งจากข้อ 2.2.2 ให้เกิดเป็นเส้นใยระยะที่สอง เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ (CUY1) เพาะเพิ่มปริมาณในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

2.5 การทดสอบอัตราการเจริญและคัดเลือกเส้นใยระยะที่สอง ในอาหารแข็ง PDA และอาหารเหลว PDB

2.5.1 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารแข็ง PDA

นำเส้นใยระยะที่สองของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 2.4.3 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA วัดรัศมีการเจริญ ทุกๆ 2 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มจานเลี้ยงเชื้อ หาอัตราการเจริญเฉลี่ย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 จานเลี้ยงเชื้อ

2.5.2 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารเหลว PDB

นำเส้นใยระยะที่สองของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 2.4.3 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มขวด นำ

เส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง หาอัตราการเจริญเฉลี่ย โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ขวด

2.5.3 การคัดเลือกเส้นใยระยะที่สอง

คัดเส้นใยระยะที่สองที่มีอัตราเจริญที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสสูงที่สุดในกลุ่มแรก จากวิธีการวิเคราะห์แบบ ANOVA ทั้งในอาหารแข็ง PDA และในอาหารเหลว PDB จากนั้นเพาะเพิ่มปริมาณเส้นใยที่คัดเลือกได้ในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

2.6 การทดสอบอัตราการเจริญของเส้นใยระยะที่สองในถุงซีลีย

2.6.1 นำเส้นใยระยะที่สองที่คัดได้ในข้อ 2.5.3 และสายพันธุ์เปรียบเทียบ (CUY1) จากข้อ 2.4.4 ไปทำหัวเชื้อข้าวฟ่าง ก่อนที่จะนำเส้นใยที่อยู่ในหัวเชื้อข้าวฟ่างไปถ่ายลงในถุงซีลีย โดยแบ่งการทดลองเป็นสองชุดคือ ชุดที่อยู่ในห้องเย็น 25 องศาเซลเซียส กับชุดที่อยู่ในอุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิเฉลี่ย 32 องศาเซลเซียส) โดยแต่ละห้องจะทำการทดลองสายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 50 ถุง

2.6.2 วัดการเจริญของเส้นใยในถุงซีลีย โดยวัดตามแนวจากปากถุงลงด้านล่าง ถุงละ 3 แนว หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล ทำการวัดทุก ๆ 5 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มก้นถุง หาอัตราการเจริญของเส้นใยในแต่ละถุง วิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยแต่ละสายพันธุ์ ทั้งสองชุด อุณหภูมิ โดยการวิเคราะห์แบบ ANOVA

2.7 การทดสอบปริมาณผลผลิตดอกเห็ดและการเก็บสปอร์เห็ดโคนญี่ปุ่น

2.7.1 การเปิดดอกเห็ดโคนญี่ปุ่น

หลังจากเส้นใยเจริญเต็มก้นถุงแล้ว รอจนเส้นใยมีสีเข้มขึ้นจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลอ่อน และเส้นใยบริเวณปากถุงเป็นสีน้ำตาลใกล้เคียงกับสีซีลีย จากนั้นย้ายถุงเห็ดทั้งหมดลงไปโรงเรือนเปิดดอก โดยแบ่งครึ่งแต่ละซ้าลงในโรงเรือนเปิดดอกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง โดยเปิดจุดลำลิที่ปิดปากถุงซีลียและคอขวดพลาสติกออก วางถุงในลักษณะนอน ตั้งเวลาฉีดน้ำวันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที

2.7.2 การเก็บผลผลิตดอกเห็ด

หลังจากเริ่มเปิดดอกเห็ด รอจนเห็ดโคนญี่ปุ่นเริ่มเกิดการรวมตัวเป็นตุ่มเห็ดและเจริญเป็นดอกเห็ดในระยะที่ยังตูมอยู่ ทำการเก็บดอกเห็ดสดในระยะที่ยังตูมอยู่ ชั่งน้ำหนักสดของดอกเห็ด บันทึกน้ำหนักสด จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของน้ำหนักสดของเห็ด โดยแยกวิเคราะห์ตามอุณหภูมิที่บ่มเส้นใยและอุณหภูมิที่เปิดดอกได้ 4 ชุดทดลอง ได้แก่

1. เห็ดที่บ่มเชื้อและเปิดดอกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
2. เห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเปิดดอกที่อุณหภูมิห้อง
3. เห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและเปิดดอกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
4. เห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและเปิดดอกที่อุณหภูมิห้อง

2.7.3 การเก็บสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่น

เก็บสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่นแต่ละสายพันธุ์ที่เปิดดอก ทั้ง 4 ชุดทดลอง ชุดทดลองละ 6 ดอก เพื่อเก็บไว้ทำการคัดเลือกและผสมเส้นใยในรุ่นต่อไป โดยใช้กระดาษที่นิ่งมาเชื้อแล้ว หุ้มดอกเห็ดที่เริ่มบานไว้ ปิดให้มิดชิดจนสปอร์เริ่มติดออกมาบนกระดาษ จึงทำการเก็บสปอร์ จากนั้นนำกระดาษที่มีสปอร์ใส่ลงในถุงพลาสติก แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

2.8 การพิจารณาหาสายพันธุ์ที่ร้อนที่สุดในรอบ

วิเคราะห์หาสายพันธุ์ที่ร้อนที่สุดในรอบ โดยจะพิจารณาจากอัตราการเจริญในถุงซีลียที่บ่มในอุณหภูมิห้อง และน้ำหนักสดของดอกเห็ดที่บ่มเชื้อและเปิดดอกที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้หากอัตราการเจริญในถุงซีลียที่บ่มในอุณหภูมิห้องไม่แตกต่างกันมากนัก จะให้นำหนักในการพิจารณากับน้ำหนักสดของดอกเห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและเปิดดอกที่อุณหภูมิห้องมากที่สุด

3. การคัดเลือกและผสมพันธุ์เห็ดในรอบที่สาม

3.1 การหาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เห็ดโคนญี่ปุ่นที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เตรียมสปอร์ โดยใช้สปอร์จากสายพันธุ์ที่ร้อนที่สุดในรอบที่สอง และสปอร์จากสายพันธุ์ CUY1 ทำการเตรียมสปอร์เช่นเดียวกับข้อ 1.1.1 หาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ที่ 25 องศาเซลเซียส และ 36 องศาเซลเซียส จากสายพันธุ์ที่ร้อนที่สุดในรอบที่หนึ่ง และสปอร์จากสายพันธุ์ CUY1 เช่นเดียวกับข้อ 1.1.2

3.2 การคัดเลือกสปอร์ที่ทนร้อนซึ่งออกเป็นเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว

3.2.1 ตักสปอร์ที่งอกเป็นเส้นใยที่ 36 องศาเซลเซียสของสายพันธุ์ที่ร้อนที่สุดในรอบที่สอง จำนวน 50 ตัวอย่าง เพื่อใช้ในการทดสอบและคัดเลือกเส้นใย

3.2.2 ตักสปอร์ที่งอกเป็นเส้นใยของสายพันธุ์ CUY1 ที่งอกที่ 25 องศาเซลเซียส 10 ตัวอย่างเพื่อใช้ในการผสมเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ นำเส้นใยทั้งหมดไปเพาะเพิ่มปริมาณในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

3.3 การทดสอบอัตราการเจริญและคัดเลือกเส้นใยระยะที่หนึ่งในอาหารแข็ง PDA และ อาหารเหลว PDB

3.3.1 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารแข็ง PDA

นำเส้นใยระยะที่หนึ่งของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 3.2.1 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA วัดรัศมีการเจริญ ทุกๆ 2 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มจานเลี้ยงเชื้อ หาอัตราการเจริญเฉลี่ย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 จานเลี้ยงเชื้อ

3.3.2 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารเหลว PDB

นำเส้นใยระยะที่หนึ่งของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 3.2.1 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มขวด นำเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักแห้ง หาอัตราการเจริญเฉลี่ย โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ขวด

3.3.3 การคัดเลือกเส้นใยระยะที่หนึ่ง

คัดเส้นใยระยะที่หนึ่งที่มีอัตราเจริญสูงที่สุด 15 อันดับแรก ในอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ทั้งในอาหารแข็ง PDA และในอาหารเหลว PDB โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ ANOVA และพิจารณาคัดเลือกโดยดูจากอันดับการเจริญในอาหารแข็ง PDA ก่อน หากเส้นใยเจริญได้ดีเป็น 15 อันดับแรกในอาหารแข็ง PDA และเจริญได้ดีอยู่ในกลุ่ม 15 อันดับแรกของอาหารเหลว PDB ด้วย ก็คัดเลือกไปใช้ได้ แต่หากเส้นใยเจริญอยู่ในกลุ่ม 15 อันดับแรกในอาหารแข็ง PDA แต่เจริญได้ไม่ดีในอาหารเหลว PDB ทำการคัดทิ้ง และพิจารณาเส้นใยที่เจริญได้ดีในลำดับต่อไป

3.4 การผสมเส้นใยระยะที่หนึ่งเพื่อให้เกิดเส้นใยระยะที่สอง

3.4.1 นำเส้นใยระยะที่หนึ่งที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.3.3 มาทำการผสมแบบพบกันหมด ในจานเลี้ยงเชื้อ วางแผ่นเซลโลเฟนที่ตัดเป็นชิ้นเล็กประมาณ 1X1 ซม. ไว้ตรงกลางระหว่างเส้นใยจากนั้นรอจนเส้นใยเจริญมาพบกัน

3.4.2 นำแผ่นเซลโลเฟนที่มีเส้นใยไปตรวจสอบแคลมป์คอนเน็คชั่น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากตรวจพบแคลมป์คอนเน็คชั่นแสดงว่าเส้นใยผสมกันได้ เกิดเป็นเส้นใยระยะที่สอง

3.4.3 นำเส้นใยระยะที่สอง ไปเพาะเพิ่มปริมาณในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

3.4.4 ผสมเส้นใยระยะที่หนึ่งจากข้อ 3.2.2 ให้เกิดเป็นเส้นใยระยะที่สอง เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ (CUI 1) เพาะเพิ่มปริมาณในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

3.5 การทดสอบอัตราการเจริญและคัดเลือกเส้นใยระยะที่สอง ในอาหารแข็ง PDA และอาหารเหลว PDB

3.5.1 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารแข็ง PDA

นำเส้นใยระยะที่สองของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 3.4.3 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA วัดรัศมีการเจริญ ทุกๆ 2 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มจานเลี้ยงเชื้อ หาอัตราการเจริญเฉลี่ย โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 จานเลี้ยงเชื้อ

3.5.2 การทดสอบอัตราการเจริญในอาหารเหลว PDB

นำเส้นใยระยะที่สองของเห็ดโคนญี่ปุ่นในข้อ 3.4.3 มาทำการทดสอบอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 25 และ 32 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มขวด นำเส้น

ใยไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักแห้ง หาอัตราการเจริญเฉลี่ย โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ขวด

3.5.3 การคัดเลือกเส้นใยระยะที่สอง

คัดเลือกเส้นใยระยะที่สองที่มีอัตราเจริญสูงที่สุดในกลุ่มแรกที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส จากวิธีการวิเคราะห์แบบ ANOVA ทั้งในอาหารแข็ง PDA และในอาหารเหลว PDB เพาะเพิ่มปริมาณเส้นใยที่คัดเลือกได้ในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง

3.6 การทดสอบอัตราการเจริญของเส้นใยระยะที่สองในถุงซีลีย

3.6.1 นำเส้นใยระยะที่สองที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.5.3 และสายพันธุ์เปรียบเทียบ (CUY 1) จากข้อ 3.4.4 ไปทำหัวเชื้อข้าวฟ่าง ก่อนที่จะนำเส้นใยที่อยู่ในหัวเชื้อข้าวฟ่างไปถ่ายลงในถุงซีลีย โดยแบ่งการทดลองเป็นสองชุดคือ ชุดที่อยู่ในห้องเย็น 25 องศาเซลเซียส กับชุดที่อยู่ในอุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิเฉลี่ย 32 องศาเซลเซียส) แต่ละห้องจะทำการทดลองสายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 50 ถุง

3.6.2 วัดการเจริญของเส้นใยในถุงซีลีย โดยวัดตามแนวจากปากถุงลงด้านล่าง ถุงละ 3 แนว หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล ทำการวัดทุก ๆ 5 วัน จนเส้นใยเจริญใกล้เต็มก้นถุง หาอัตราการเจริญของเส้นใยในแต่ละถุง วิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยแต่ละสายพันธุ์ ทั้งสองชุด อุณหภูมิ โดยการวิเคราะห์แบบ ANOVA

3.7 การทดสอบปริมาณผลผลิตดอกเห็ดและการเก็บสปอร์เห็ดโคนญี่ปุ่น

3.7.1 การเปิดดอกเห็ดโคนญี่ปุ่น

หลังจากเส้นใยเจริญเต็มก้นถุงแล้ว รอจนเส้นใยมีสีเข้มขึ้นจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลอ่อน และเส้นใยบริเวณปากถุงเป็นสีน้ำตาลใกล้เคียงกับสีซีลีย จากนั้นย้ายถุงเห็ดทั้งหมดลงไปในโรงเรือนเปิดดอก โดยแบ่งครึ่งแต่ละซั้งลงในโรงเรือนเปิดดอกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง โดยเปิดจุลินทรีย์ที่ปิดปากถุงซีลียและคอบวดพลาสติกออก วางถุงในลักษณะนอน ตั้งเวลาชั่งน้ำ วันละ 3 เวลา นานครั้งละ 30 นาที

3.7.2 การเก็บผลผลิตดอกเห็ด

หลังจากเริ่มเปิดดอกเห็ด รอจนเห็ดโคนญี่ปุ่นเริ่มเกิดการรวมตัวเป็นตุ่มเห็ดและเจริญเป็นดอกเห็ดในระยะที่ยังตูมอยู่ ทำการเก็บดอกเห็ดสดในระยะที่ยังตูมอยู่ ซึ่งน้ำหนักสดของดอกเห็ด บันทึกน้ำหนักสด จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของน้ำหนักสดของเห็ด โดยแยกวิเคราะห์ตามอุณหภูมิที่ห้องบ่มเส้นใยและ อุณหภูมิที่ห้องเปิดดอกได้ 4 ชุดทดลอง ได้แก่

1. เห็ดที่บ่มเชื้อและเปิดดอกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
2. เห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเปิดดอกที่อุณหภูมิห้อง
3. เห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและเปิดดอกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
4. เห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและเปิดดอกที่อุณหภูมิห้อง

3.7.3 การเก็บสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่น

เก็บสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่นแต่ละสายพันธุ์ที่เปิดดอก ทั้ง 4 ชุดทดลอง ชุดทดลองละ 6 ดอก เพื่อเก็บไว้ทำการคัดเลือกและผสมเส้นใยในรุ่นต่อไป โดยใช้กระดาษที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว หุ้มดอกเห็ดที่เริ่มบานไว้ ปิดให้มีมิดชิดจนสปอร์เริ่มติดออกมาบนกระดาษ จึงทำการเก็บสปอร์ จากนั้นนำกระดาษที่มีสปอร์ใส่ลงในถุงพลาสติก แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

3.8 การพิจารณาหาสายพันธุ์ที่ร่อนที่ดีที่สุด

วิเคราะห์หาสายพันธุ์ที่ร่อนที่ดีที่สุด โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญในถุงซีลียที่บ่มในอุณหภูมิห้อง และน้ำหนักสดของดอกเห็ดที่บ่มเชื้อและเปิดดอกที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้หากอัตราการเจริญในถุงซีลียที่บ่มในอุณหภูมิห้องไม่แตกต่างกันมากนัก จะให้นำหนักในการพิจารณากับน้ำหนักสดของดอกเห็ดที่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและเปิดดอกที่อุณหภูมิห้องมากที่สุด



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย