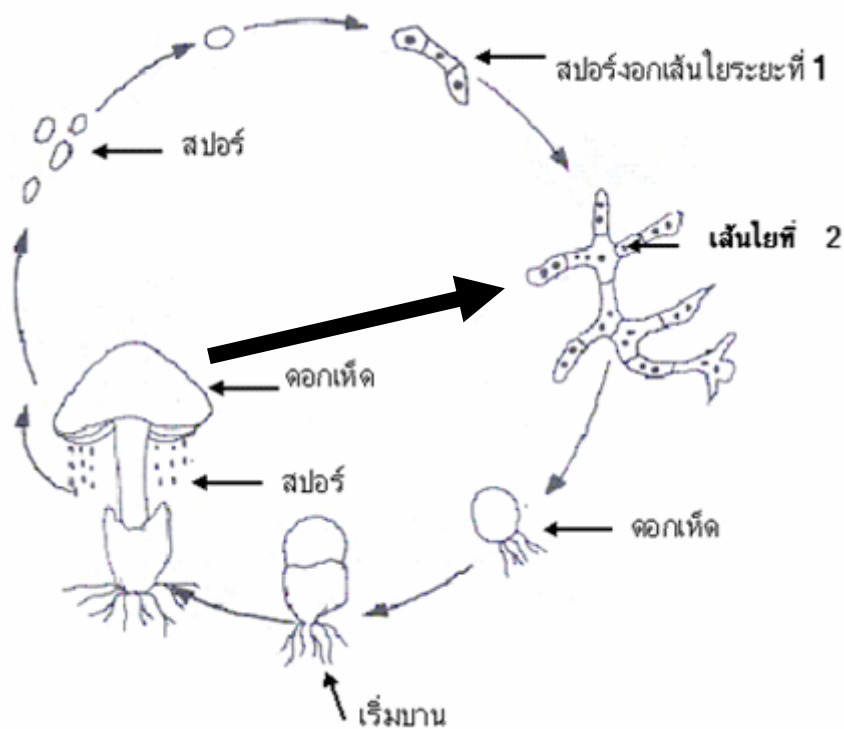
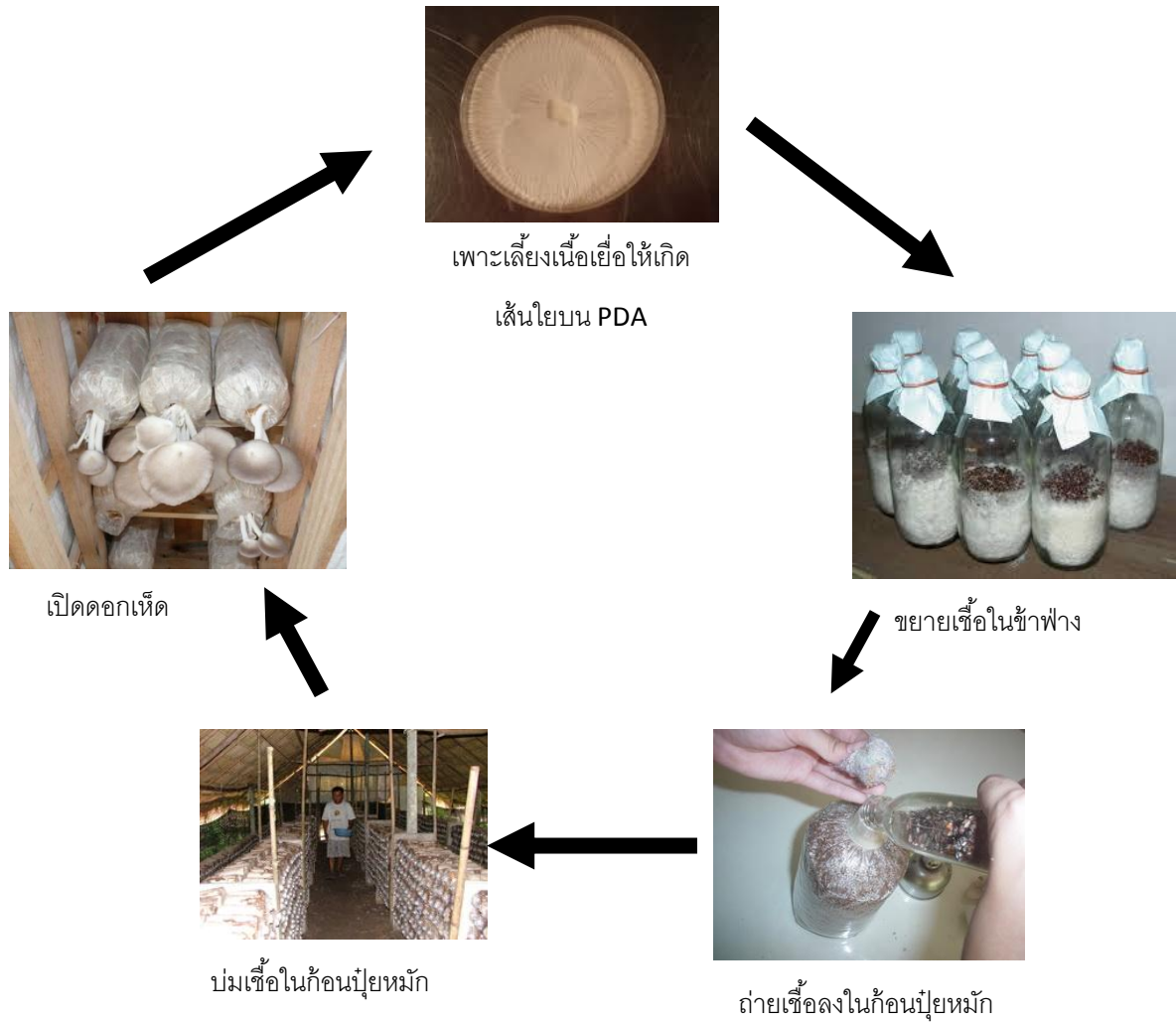


การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดบนอาหารวุ้น

เห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตในจำพวกเชื้อรา วงจรชีวิตเห็ดเริ่มจากสปอร์อันเป็นส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราเมื่อสปอร์งอกก็จะพัฒนาขึ้นเป็นเส้นใยระยะที่ 1 (primary mycelium) มีนิวเคลียสเดี่ยวในแต่ละเซลล์เส้นใยประเภทนี้มีอายุเพียงสั้นๆ เส้นใยระยะที่ 1 เหล่านี้จะผสมกันเกิดเป็นเส้นใยระยะที่ 2 (secondary mycelium) เส้นใยระยะที่ 2 นี้ในแต่ละเซลล์มี 2 นิวเคลียสเมื่อเจริญเติบโตพัฒนาแล้วสามารถสร้างเป็นดอกเห็ด ดอกเห็ดที่เกิดขึ้นเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่สร้างสปอร์เพื่อขยายพันธุ์ต่อไป การผลิตเห็ดเพื่อการค้ามีหลายขั้นตอนตามวงจรชีวิตเห็ดแต่ส่วนใหญ่จะลัดขั้นตอนไม่เพาะเลี้ยงสปอร์และเส้นใยระยะที่ 1 แต่จะเป็นการนำเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดมาเพาะเลี้ยงเพื่อขยายเป็นเส้นใยระยะที่ 2 และพัฒนาเป็นดอกเห็ดเพื่อเก็บผลผลิต การเพาะเลี้ยงสปอร์จะทำได้ในกรณีที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์เห็ดเท่านั้น



ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดเป็นเส้นใยขั้นที่ 2 จนกระทั่งพัฒนาเป็นดอกเห็ดมีขั้นตอนกระบวนการหลายขั้น ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดบนอาหารวุ้น การถ่ายเชื้อจากอาหารวุ้นลงในหัวเชื้อข้าวฟ่าง การถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อข้าวฟ่างลงในก้อนปุ๋ยหมัก การบ่มเชื้อ และการเปิดดอกเห็ด



ในบทปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะได้ฝึกขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดบนอาหารวุ้น ซึ่งขั้นแรกต้องรู้จักวิธีการเตรียมอาหารวุ้นที่เรียกว่า PDA เสียก่อน

วิธีทำอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อรา (Potato dextrose agar (PDA))

ส่วนประกอบในการเตรียมอาหาร PDA ปริมาตร 1 ลิตรประกอบด้วย

1. น้ำสะอาดปริมาตร 1 ลิตร
2. มันฝรั่ง 200 กรัม
3. น้ำตาลเด็กโทรสหรือกลูโคส 20 กรัม
4. ผงวุ้น 20 กรัม

วิธีทำ

1. ให้เลือกมันฝรั่งหัวที่ไม่มีบาดแผลหรือร่องรอยการทำลายของโรคหรือแมลงซึ่งมันฝรั่งให้ได้ 200 กรัม นำมาปอกเปลือกแล้วล้างให้สะอาด จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ภาพที่ 1 ก-ง)



ก. ชั่งหัวมันฝรั่ง 200 กรัม



ข. ล้างหัวมันฝรั่งให้สะอาดด้วยน้ำเปล่า



ค. ปอกเปลือกหัวมันฝรั่ง



ง. หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

- นำมันฝรั่งที่หั่นเป็นชิ้นเรียบร้อยแล้วใส่ลงในหม้อเติมน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปตั้งบนเตาไฟฟ้า เมื่อน้ำเริ่มเดือดเริ่มจับเวลาแล้วต่อไปเป็นเวลาประมาณ 10-15 นาทีโดยคนเป็นระยะป้องกันไม่ให้ไหม้



- ในขณะที่รอมันฝรั่งต้มอยู่ ละลายผงวุ้น 20 กรัมในน้ำ 500 มิลลิลิตรคนให้เข้ากัน



- เมื่อต้มมันฝรั่งครบตามเวลาที่กำหนดกรองเอามันฝรั่งออก นำน้ำต้มมันฝรั่งที่ผ่านการกรองแล้วผสมกับน้ำที่ละลายผงวุ้นเอาไว้ในข้อ 3 แล้วนำไปต้มอีกครั้ง หมั่นคนจนผงวุ้นละลายดีจะเห็นน้ำที่ต้มใสไม่มีสี (ผงวุ้นจะละลายที่อุณหภูมิ 97 °C ดังนั้นหลังจากน้ำเดือดต้มต่อไปอีกไม่เกิน 5 นาทีผงวุ้นก็จะละลายดี)



กรองกากมันทิ้งไป



ผสมรวมกับน้ำที่ละลายผงวุ้น



เคี่ยวจนใส

5. เติมน้ำตาลกลูโคสลงไป 20 กรัมคนให้ละลายนำลงจากเตาแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยการเติมน้ำเปล่า



6. กรอกอาหารที่เตรียมได้ลงในขวดแบนให้ได้ปริมาตรประมาณ 1/4 ของขวด จากนั้นปิดฝาขวดด้วยจุกสำลี หุ้มด้วยกระดาษแล้วรัดยาง



7. นำขวดบรรจุอาหารไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ (autoclave) โดยตั้งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ด

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นขั้นตอนสำคัญในการทำเชื้อเห็ด เป็นการนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดมาเลี้ยงเป็นเส้นใย ที่หนาแน่นสมบูรณ์แล้วจึงถ่ายเชื้อลงไปยังหัวเชื้อข้าวฟ่างเพื่อใช้เป็นเชื้อเห็ดทางการค้าที่รู้จักกันดี ในขั้นตอนนี้เทคนิคการปลอดเชื้อเป็นสิ่งสำคัญ

อุปกรณ์

1. ดอกเห็ดที่มีลักษณะสมบูรณ์ไม่มีร่องรอยการทำลายจากศัตรูพืช
2. เข็มเขี่ย และมีดผ่าตัด (อาจใช้มีดโกนหรือคัตเตอร์)

3. จานเลี้ยงเชื้อ
4. 70% Ethanol
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. ตู้เขี่ยเชื้อ
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีการ

ให้นักศึกษาฆ่าเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อโดยใช้ 70% ethanol พ่นเป็นละอองในตู้เขี่ยเชื้อให้ทั่วแล้วปิดตู้ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที



เมื่อนักศึกษานึ่งฆ่าเชื้ออาหาร PDA เสร็จแล้วรอให้ความดันใน autoclave ลดลงจนเป็นศูนย์ก่อนจึงเปิดฝา autoclave นำขวดอาหารไปใส่ในตู้เขี่ยเชื้อ รอให้ขวดบรรจุอาหาร PDA เย็นลงจนพอจับถือได้



เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นพอแล้ว ระวังอย่าให้เย็นเกินไปเพราะจะจับตัวเป็นก้อนแข็ง เปิดจุกกรนปากขวดกับเปลวไฟแล้วเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ (Plate) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็นจนอาหารอุ่นแข็งตัว ให้นักศึกษาเทคนิคละ 4 จาน



เลือกดอกเห็ดที่สมบูรณ์ไม่มีแมลงทำลาย ก่อนทำให้ทำความสะอาดมือด้วย 70% ethanol



นำดอกเห็ดเข้าไปในตู้เชื้อเชื้อ และขั้นตอนต่อไปนี้ทั้งหมดให้ทำในตู้เชื้อเชื้อ จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ นำใบมีดมารนไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วรอให้ใบมีดเย็น



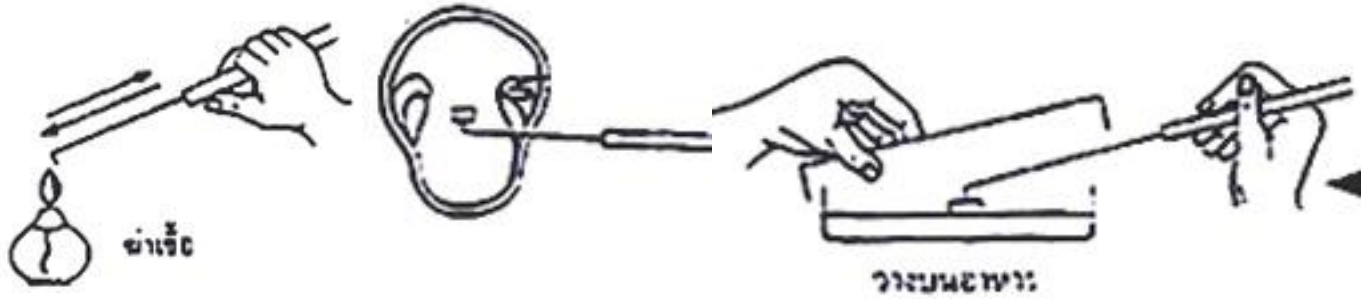
ผ่าดอกเห็ดตามแนวตั้งออกเป็น 4 ส่วนดังภาพ



ฉีกเนื้อเยื่อด้านในที่อยู่ระหว่างก้านและหมวกเห็ดออกมาให้มีขนาดประมาณ 1x0.5 เซนติเมตร ดังภาพ



นำเข็มเย็บไปร่นไฟจากนั้นรอให้เย็นแล้วจึงเขี่ยชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ฉีกไว้วางบนอาหารวุ้นโดยการแฉกผาจาน
ขึ้นแล้วสอดเข็มเขี่ยนำเนื้อเยื่อไปวางตรงกลางจานเพาะเชื้อ



นำจานเพาะเชื้อที่วางเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดแล้วมาใส่ถุงพลาสติกมัดยางหลวมๆ แล้วเก็บไว้ในตู้บ่มเชื้อ บ่มไว้ 1
สัปดาห์ โดยหมั่นมาตรวจดูหากจานไหนมีการปนเปื้อนให้นำออกไปทิ้ง

บันทึกผล

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....