การแยกเชื้อ การบ่งบอกชนิดและการหาสภาวะที่เหมาะสม ในการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

จันทร์จิรา วิริยา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พฤษภาคม 2556

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การแยกเชื้อ การบ่งบอกชนิดและการหาสภาวะที่เหมาะสม
ในการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

จันทร์จิรา วิริยา

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พฤษภาคม 2556

การแยกเชื้อ การบ่งบอกชนิดและการหาสภาวะที่เหมาะสม ในการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

จันทร์จิรา วิริยา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
ดร. บุญสม บุษบรรณ์

.....กรรมการ
ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง

.....กรรมการ
ดร. นพรัตน์ วรรณเทศ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....
ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง

27 พฤษภาคม 2556

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างสูงจาก ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งกรุณาให้ความรู้และคำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องจนวิทยาพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้ และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา ที่เกื้อหนุนสถานที่เก็บตัวอย่างงานวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ 2813 สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คอยเป็นกำลังใจ และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ และคอยช่วยเหลือ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาชีววิทยาทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อถนอม วิริยา และคุณแม่เจริญ วิริยา และครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจ ส่งเสริม คอยสนับสนุน ให้คำแนะนำวิธีการในการเก็บตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย ทำให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ศูนย์ประสานภาคเหนือ ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษาแก่ผู้เขียนในครั้งนี้

ขอขอบคุณสำนักประสานทุนวิจัยบัณฑิต (สกว.) สาขาวิทยาศาตร์และเทคโนโลยี สัญญาเลขที่ MRG-WI525S062 ร่วมกับสาขาวิชาจุลชีวประยุกต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้สนับสนุนสนับสนุนทุนวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

จันทร์จิรา วิริยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การแยกเชื้อ การบ่งบอกชนิดและการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นเห็ดโคน
ผู้เขียน	นางสาวจันทร์จิรา วิริยา
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. สายสมร ลำยอง

บทคัดย่อ

ได้เก็บตัวอย่างดอกเห็ดโคน 5 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงใหม่ พะเยา และเพชรบูรณ์ของประเทศไทย ในระหว่างปี 2009-2011 และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ จากการทดลองในการระบุชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา และอณูชีววิทยา จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM003, CMUTM004 และ CMUTM005 บ่งชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา และอณูวิทยา ไอโซเลท CMUTM003 สามารถบ่งชนิดได้คือ *T. clypeatus* ส่วนไอโซเลทอื่นๆ ไม่สามารถระบุชนิดได้ ในการทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหาร อุณหภูมิ pH แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอาหารแข็งได้ใช้ในการทดสอบ การทดสอบเรเจริญของเส้นใยเห็ดโคนบนอาหารทั้ง 10 ชนิด malt extract agar เป็นอาหารที่ดีที่สุด เส้นใยสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่ดีที่สุดต่อการเจริญคือ 25 องศาเซลเซียส ทุกไอโซเลทเจริญได้ดีที่ pH เท่ากับ 6 ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดต่อการเจริญของ *Termitomyces* sp. CMUTM001 และ CMUTM002 จากผลการทดลองแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Termitomyces* sp. CMUTM004 และ *T. clypeatus* CMUTM003 คือ ฟรุคโตส ในขณะที่ ไอโซเลท CMUTM005 ก็เจริญได้ดีบนกลูโคส แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยคือ เปปโตน อาหารแข็งจากลูกเดือยทำให้เส้นใยเจริญได้ดี และเหมาะสมเป็นวัสดุในการผลิตหัวเชื้อเห็ดโคน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Isolation, Identification and Optimization of *Termitomyces* Mushroom for Mycelial Growth

Author Miss Janjira Wiriya

Degree Master of Science (Applied Microbiology)

Thesis Advisor Prof. Dr. Saisamorn Lumyong

Abstract

Five different *Termitomyces* sporocarps were collected from Chiang Mai, Phayao and Petchaboon Provinces in Thailand during rainy season from 2009 to 2011. Five pure cultures (*Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM003, CMUTM004 and CMUTM005) were identified based on morphological characters and molecular evidence based on ITS gene isolate CMUTM003 was identified as *T. clypeatus*. Other 4 isolates still remain unknow species. In present study, we tested the growth of all isolates at different temperature, pH, carbon sources, nitrogen sources, and solid substrates. Malt extract agar was the best medium for mycelia growth. With the rang of growth temperature from 25-30 degree Celsius and 25 degree Celsius was the best temperature for all isolates. All isolates were grew well at pH 6. Sucrose was the best carbon source for *Termytomyces* sp. CMUTM001 and CMUTM002. The results showed that the suitable carbon source for *Termitomyces* sp. CMUTM004 and *T. clypeatus* CMUTM003 was fructose while the best growth of isolate CMUTM005 was on glucose. The optimal nitrogen source for radially mycelial growth was peptone. Job's tear grain medium gave the highest mycelia growth and seem to be the most suitable substrate for *Termitomyces* mycelia inocula production.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบาญตาราง	ช
สารบาญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	29
บทที่ 4 ผลการวิจัย	36
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	64
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	69
เอกสารอ้างอิง	70
ภาคผนวก	81
ประวัติผู้เขียน	89

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ลักษณะเห็ดโคนยูเทอไมโตไมซีส (Eu-Termitomyces)	8
2	ชนิดเห็ดโคนที่รับประทานได้ พบในทวีปแอฟริกาตอนกลาง แอฟริกาตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศไทยที่สามารถรับประทานได้	12
3	แหล่งคาร์บอนที่ใช้เลี้ยงเห็ดรา	20
4	แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เลี้ยงรา	22
5	อาหารที่นำมาใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดโคน	23
6	อาหารธัญพืชที่นำมาใช้เลี้ยงเห็ดรา	27
7	อาหารวุ้นชนิดต่างๆ ที่นำมาใช้ศึกษา	34
8	ตัวอย่าง Herbarium เห็ดโคน	36
9	การสำรวจ การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ	37
10	ค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดโคนไอโซเลทต่างๆ กับข้อมูลลำดับเบสของเห็ด (National center for Biotechnology Information)	44

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ

ภาพ		หน้า
1	เห็ดที่ดำรงชีวิตในแหล่งธรรมชาติ	4
2	เห็ดที่มีความสัมพันธ์กับแมลงแบบพึ่งพาอาศัยกัน	6
3	เห็ดโคน กลุ่ม Pre-termitomyces	8
4	เห็ดโคนดอกแก่	11
5	เห็ดโคนเจริญบนสวนเห็ดรา	16
6	เส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคนจำนวน 5 ไอโซเลท	37
7	*Termitomyces* sp. CMUTM001	38
8	*Termitomyces* sp. CMUTM002	39
9	*Termitomyces clypeatus*	40
10	*Termitomyces* sp. CMUTM004	41
11	*Termitomyces* sp. CMUTM005	42
12	Maximum-parsimonious trees แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคน และเชื้อรานอกกลุ่มที่ได้จากลำดับเบสในบริเวณ internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene และ internal transcribed spacer 2 sequence	45
13	อัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหารวุ้นชนิดต่างๆ บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน	47
14	อัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* (น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)) บนอาหารวุ้นชนิดต่างๆ บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน	48

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
15	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร malt extract agar บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	50
16	น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร malt extract agar บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน	51
17	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร malt extract agar ที่มีค่า pH ต่าง ๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน	53
18	น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร malt extract agar ที่ค่า pH ต่างๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน	54
19	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร basal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน	57
20	น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร basal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน	58

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
21	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร basal medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 อุณหภูมิ เป็นเวลา 30 วัน	60
22	น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร basal medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน	61
23	อัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* ในอาหารแข็งชนิดต่างๆ (มิลลิเมตรต่อวัน)) บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน	63

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 1

บทนำ

เห็ดโคน (Termite mushroom) เป็นเห็ดที่มีการดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยปลวกที่อยู่ใน subfamily *Macrotermitinae* (Mueller *et al*., 2005) เห็ดโคนย่อยสลายสับสเตรท และปลวกจะใช้สารอาหารที่ได้เป็นอาหาร จากรายงาน Matsumoto (1976) เห็ดโคนช่วยเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้กับปลวก ส่วนเห็ดโคนจะใช้สารอาหารภายในรังปลวกที่เรียกว่า สวนเห็ดรา (fungus garden หรือ fungus comb) เมื่อเกิดสภาวะที่เหมาะสมเส้นใยจะเจริญไปเป็นดอกเห็ด เห็ดโคนพบได้ทั่วไปซึ่งพบได้ตามไร่นา และเขตป่า ชนิดป่าเป็นป่าโปร่ง ป่าเบญจพรรณ ป่าไผ่ และป่าดงดิบเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดโคน นอกจากนี้ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนทำให้มีความหลากหลายทางระบบนิเวศ เช่น มีฝนตกชุก ทำให้มีความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดโคนและความหลากหลายของปลวก (Bels and Patragetvit, 1982; Sornuwat *et al*., 2004)

พิชญางกูร (2547) ได้รายงานว่าในประเทศไทยสามารถพบเห็ดโคนได้ในจังหวัด กาญจนบุรี ราชบุรี อุทัยธานี นนทบุรี กรุงเทพมหานคร สระบุรี ตาก นครนายก เชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน มีรายงานศึกษาแหล่งเห็ดโคนที่ห้วยแขย่ง อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าเป็นแหล่งที่พบเห็ดโคนได้ในปริมาณมาก ทำรายได้ให้แก่ชาวบ้านในท้องที่ มีมูลค่ารวม 658,821 บาทต่อปี (Terakunpisut *et al*., 2007)

การศึกษาปลวกที่อยู่ร่วมกับปลวกเพาะเลี้ยงราในแต่ละท้องถิ่นจะช่วยให้เข้าใจถึงระบบนิเวศได้ดียิ่งขึ้น และการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดโคนในห้องปฏิบัติการได้พยายามหาสภาวะที่เหมาะสมแต่ยังไม่สามารถกระตุ้นให้เส้นใยด้วยอาหารสังเคราะห์เจริญเป็นดอกเห็ดได้ (Sornuwat and Thienhirun, 2005) นอกจากนี้มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดโคน ได้แก่ Tibuhwa (2012) ศึกษาลักษณะเส้นใยที่เจริญบนอาหารสังเคราะห์พบว่าเส้นใยเจริญได้ดี และให้ลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน พิชญางกูร (2547) ใช้เทคนิคการหลอมรวมโปรโตพลาสของเห็ดโคนกับเห็ดฟางเพื่อหาลูกผสมที่เหมาะสม สามารถส่งเสริม และพัฒนาเป็นเห็ดเศรษฐกิจได้ (Kaur, 2011)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารอาหารมีความจำเป็นต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของเห็ดโคน ประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ธาตุต่างๆ และวิตามิน เส้นใยเห็ดโคนเจริญได้บนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ แต่การศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมต่อความต้องการของเส้นใยจะส่งผลต่อการพัฒนาสูตรอาหารที่สามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นใยให้เจริญได้ดี และเพิ่มเส้นใยปริมาณมากในการทดลองห้องปฏิบัติการได้ นอกจากนี้ต้องมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด และด่าง ปริมาณ CO_2 เป็นต้น ควบคู่กับการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมด้วย ในป่าสักธรรมชาติ และป่าสักปลูกก็มีเห็ดโคนขึ้นอยู่เป็นจำนวนมาก และมีปลวกอาศัยอยู่ร่วมกัน การส่งเสริมให้มีการปลูกป่าสักเป็นการค้านั้น ถ้าสามารถเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเห็ดโคนในธรรมชาติก็อาจจะสามารถเพิ่มปริมาณการเกิดดอกเห็ดโคนในป่าสักได้ ทั้งนี้การศึกษาปัจจัยในการเจริญของเห็ดโคน ระบบนิเวศในแหล่งที่อยู่อาศัยต่างๆ จะช่วยให้เข้าใจกระบวนการเกิดดอกเห็ดได้มากขึ้น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความหลากหลายของเห็ดโคน ลักษณะสัณฐานวิทยาประกอบการศึกษาทางชีววิทยาโมเลกุลจากลำดับสารพันธุกรรม
2. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคนในห้องปฏิบัติการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 เห็ด

เห็ด (Mushroom) จัดอยู่ในกลุ่มฟังไจที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสง และสร้างอาหารเองได้ การได้อาหารของเห็ดเป็นแบบการดูดซึมอาหารจากสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ มาใช้ โดยปล่อยเอนไซม์ไปย่อยสลายอินทรียวัตถุ และอนินทรียวัตถุในทางธรรมชาติ แล้วดูดซึมเข้าไปในเส้นใย ตัวอย่างเห็ดในธรรมชาติบนแหล่งที่อยู่อาศัยต่างๆ (ภาพ 1) แหล่งกำเนิดของเห็ดแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน บางชนิดเกิดในป่าบนภูเขา บนพื้นดินในทุ่งนา บนตอไม้ บนพื้นดินที่มีจอมปลวก บนซากพืชหรือบนเห็ดด้วยกัน เห็ดบางชนิดรับประทานได้ บางชนิดเป็นเห็ดมีพิษถ้านำมารับประทานอาจเสียชีวิตได้ เพราะพิษของเห็ดเข้าไปในระบบเลือดซึ่งกระจายไปทั่วร่างกาย ไม่ตกค้างในกระเพาะ แต่เห็ดมีพิษบางชนิดก็อาจทำให้มึนเมาและอาเจียน การดำรงชีวิตของเห็ดแบ่งได้เป็น 3 แบบคือ (Hawksworth, 1991; Mueller *et al*., 2007)

2.1.1 ผู้ย่อยสลาย (saprobe)

เห็ดกลุ่มนี้ย่อยสลายอินทรียวัตถุในบริเวณที่เห็ดขึ้นอยู่ เช่น *Agrocybe*, *Agaricus*, *Macrolepiota*, *Corpinus*, *Mycena* เป็นต้น เห็ดเจริญ และกระจายพันธุ์ได้ในระดับความสูงต่าง ๆ พื้นที่อากาศหนาวเย็น ที่ราบตามไหล่เขา ป่าดงดิบ ป่าไผ่ บนขอนไม้ ต้นไม้ริมลำธาร เห็ดจะย่อยสลายสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้วเป็นอาหาร ได้แก่ ซากพืชและซากสัตว์ ความหลากหลายของเห็ดกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เจริญ ยิ่งอินทรียวัตถุมีความหลากหลายชนิดของเห็ดกลุ่มนี้ก็มากขึ้น (Tibuhwa, 2011)

2.1.2 พาราสิต (parasit)

เห็ดกลุ่มนี้เจริญเติบโตหรืออาศัยอยู่กับสิ่งมีชีวิตแล้วดูดซึมเอาอาหารจากสิ่งมีชีวิตนั้นมาใช้ เห็ดกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต เช่น *Armillaria* ทำให้เกิดโรคในรากพืช (Bruhn *et al*.,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2000; Rizzo and Slaughter, 2001) *Ganoderma lucidum* ทำให้เกิดโรครากเน่าในต้นประดู่แขก (Harsh *et al*., 2011) และ *Ganoderma applanatum* ทำให้เกิดโรครากเน่าในยางพารา (Teoh *et al*., 2011)

ภาพ 1 เห็ดที่ดำรงชีวิตในแหล่งธรรมชาติ, [จันทร์จิรา วิริยา, ถ่ายภาพ]

(A): *Cyathus*, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ บ้านขุนกลาง อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่

(B): *Russula*, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ บ้านขุนกลาง อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่

(C): *Pholiota*, อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ บ้านขุนกลาง อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่

(D): *Amanita*, Mushroom Research Center (MRC) อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่

(E): *Termitomyces*, Mushroom Research Center (MRC) อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่และ

(F): *Phlebopus*, บ้านโป่งไคร้ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่

บาร์ A , B, C, D, E และ F = 3 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.3 พึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) (Hawksworth, 1991)

เห็ดที่มีความสัมพันธ์กับรากพืชโดยการสร้างเส้นใยเจริญในรากพืช ช่วยสะสมแร่ธาตุ และอาหารให้กับพืช ทำให้ต้นพืชเจริญเติบโต ทนทานต่อโรค และสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้ง เป็นการให้และรับผลประโยชน์ระหว่างสิ่งมีชีวิตสองชนิด แบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่

2.1.3.1 ไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) (Brundett, 2002; Hoeksema, 2010)

ประกอบด้วย เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) เห็ดราไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่บริเวณเซลล์ผิวของรากภายนอกของพืชหรือต้นไม้ เส้นใยของเชื้อราจะประสานจับตัวกันแน่น ภายนอกผิวรากคล้ายรากฝอย และเอนโดไมคอร์ไรซา (endomycorhiza) เป็นราไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์ผิวของรากพืชหรือต้นไม้ เชื้อราชนิดนี้ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า แต่สามารถตรวจสอบได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์และกล้องสเตอริโอ จะเห็นมีลักษณะสปอร์รูปทรงกลม มีเส้นใย 2 ในพืชลักษณะคือ คล้ายถุงเรียก เวสิเคิล (vesicles) และคล้ายพุ่มไม้เรียก อาร์บัสคูล (arbusculars)

2.1.3.2 เห็ดที่มีความสัมพันธ์กับแมลง มีชื่อเรียกทั่วไปว่า เห็ดโคน เห็ดปลวก (ภาพ 2)

เป็นการดำรงชีวิตพึ่งพาอาศัยกันกับปลวก เห็ดอาศัยสารอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมภายในรังปลวกเจริญขึ้นสร้างเป็นดอกเห็ด ส่วนปลวกใช้เห็ดเป็นอาหาร (Johnson *et al.,* 1981) เห็ดโคนเป็นเห็ดป่า พบได้ในช่วงฤดูฝน รูปร่างทั่วไปแบบกรวยคว่ำยอดนูนหรือแหลม เมื่อดอกแก่จะค่อยๆ กางออกจนถึงเกือบแบนราบ ส่วนก้านที่อยู่ใต้ดินเชื่อมกับสวนเห็ดเรียกว่า รากเทียม (pseudorhiza) (Fløslev *et al*., 2003; Heim, 1977)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 2 เห็ดที่มีความสัมพันธ์กับแมลงแบบพึ่งพาอาศัยกัน, [จันทร์จิรา, ถ่ายภาพ]

(A): เห็ดโคน

(B): ปลวก

บาร์ A และ B = 3 เซนติเมตร

2.2 เห็ดโคน

เห็ดโคน เป็นเห็ดป่าที่รู้จักมานาน เป็นที่นิยมของผู้บริโภค เนื่องจากมีรสชาติดี ในท้องตลาดมีราคาแพง พบได้เฉพาะช่วงของฤดูฝนตั้งแต่เดือนพฤษภาคมจนถึงเดือนพฤศจิกายน ปัจจุบันยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเห็ดโคนเหมือนเห็ดชนิดอื่น ๆ มีชื่อเรียกทั่วไปแต่ละพื้นที่ (local name) เช่น เห็ดปลวก เห็ดสารท เห็ดข้าวตอก ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Termitomyces* ดำรงชีวิตแบบ obligate symbiosis กับ ปลวก subfamily *Macrotermitinae* ได้แก่ *Odontermes*, *Microtermes*, *Macrotermes*, *Hypotermes*, และ *Ancistrotermes* (Korb and Aanen, 2003; Sornuwat and Thienhirum, 2005; Nobre *et al.,* 2011) เห็ดกลุ่มนี้อาศัยสารอาหาร อุณหภูมิ ก๊าซในรังปลวกที่เหมาะสมในการงอกของสปอร์และการสร้างเส้นใยเพื่อพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด การกระจายตัวพบในเขตอบอุ่น และเขตร้อนเท่านั้น เช่น ทวีปแอฟริกาตอนกลาง และทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งอินเดีย ฟิลิปปินส์ ญี่ปุ่นตอนใต้และจีน (Pegler and Vhaeke, 1994; Wei *et al.,* 2004) เห็ดโคนในประเทศไทยพบในจังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา และแม่ฮ่องสอน ภาคกลาง ได้แก่ นครนายก กาญจนบุรี และราชบุรี เป็นต้น จะเริ่มออกตั้งแต่เดือนพฤษภาคม จนถึงเดือนพฤศจิกายน (พิชญางกูร, 2547; Tibuhwa, 2011)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 อนุกรมวิธานของเห็ดโคน (Heim, 1942; Johnson *et al*., 1981; Kirk *et al*., 2001)

Kingdom: *Fungi*

Division: *Basidiomycota*

Class: *Basidiomycetes*

Subclass: *Agaricomycetidae*

Order**:** *Agaricales*

Family**:** *Lyophyllaceae*

Genus**:** *Termitomyces*

เห็ดโคนจำแนกได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ พรีเทอไมโตไมซีส (Pre-termitomyces) ลักษณะเด่นคือ ปรากฏรากเทียมเพียงเล็กน้อยหรือไม่เห็นเลย เจริญบนรังปลวกที่ปลวกขนมาทิ้งบนหน้าดิน และยูเทอไมโตไมซีส (Eu-termitomyces) เป็นกลุ่มมีรากเทียม (pseudorhiza) และมีความสัมพันธ์กับปลวกแท้จริง

2.3.1 เห็ดโคนที่ไม่ปรากฏรากเทียม หรือปรากฏรากเทียมแล็กน้อย (Pre-termitomyces) (Heim, 1977)

ขึ้นอยู่บนรังปลวกที่ตัวปลวกขนดินและส่วนของรังเก่าขึ้นมาบนหน้าดิน ลักษณะสำคัญของเห็ดกลุ่มนี้ คือ ขึ้นบนจอมปลวกเก่า ไม่มีราก หรือมีรากสั้นๆ ที่ฝังลึกใต้ดิน ประกอบด้วย 3 ชนิด คือ *Termitomyces microcarpus*, *T. medius* Heim and Grasse และ *T. perforans* R. Heim (ภาพ 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3 เห็ดโคน กลุ่ม Pre-termitomyces

(A): เห็ดข้าวตอก, *Termitomyces microcarpus*, แหล่งที่พบ น้ำตกวังบัวบาน อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ. เมือง จ. ชียงใหม่, (จันทร์จิรา วิริยา_ถ่ายภาพ)

(B): *Termitomyces meduis*, (Kamari and Atri, 2012),

(C): *Termitomyces perforans*, (พิชญางกูร, 2547)

2.3.2 เห็ดโคนที่ปรากฏรากเทียม (Eu-termitomyces) แบ่งได้ 6 กลุ่ม ดังตาราง 1

ตาราง 1 ลักษณะเห็ดโคนยูเทอไมโตไมซีส (Eu-Termitomyces) (Heim, 1977) ใช้ลักษณะก้านในการแบ่งกลุ่มเห็ดโคนชนิดต่าง ๆ

ภาพ	กลุ่ม
	กลุ่มที่ 1 Stipe striatus ลักษณะเด่นของดอกเห็ดกลุ่มนี้คือ เมื่อดอกอ่อนจะกางเป็นรูประฆัง เมื่อบานเต็มที่อาจมียอดแหลม หรือไม่มี สีหมวกเห็ด สีนวล เหลือง เทา เทาอม น้ำตาลแก่ ก้านรูปร่างเป็นแท่งกลม และขยายใหญ่ที่โคน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 (ต่อ)

ภาพ	กลุ่ม
	กลุ่มที่ 2 Stipe mammiformis กลุ่มนี้มียอดแหลมชัดเจน บางครั้งอาจพบเศษเนื้อเยื่อเล็ก ๆ ติดอยู่ที่บริเวณยอดแหลม ก้านแข็ง และอาจพองที่โคน
	กลุ่มที่ 3 Stipe schimperi มีลักษณะเด่น คือ มีแอนนูลัส เป็นส่วนที่หมวกเคยติดอยู่กับก้านดอก วงรอบก้านดอกส่วนตอนปลายดอกบานครีบหรือส่วนของเยื่อที่ติดกับปลายหมวกจะคงอยู่เป็นแผ่น รูปร่างของก้านเป็นแท่ง และพองตรงโคน
	กลุ่มที่ 4 Stipe robustus หมวกเห็ดไม่เรียบเป็นคลื่นอาศัยลักษณะของภายในเห็ด การสังเกตดอกเห็ดจะสังเกตลักษณะภายนอก รูปร่างของดอกเห็ด และตัดก้านตามยาวดูลักษณะการเรียงตัวของชั้นเซลล์ภายในดอกเห็ด และลักษณะของซิสทิเดียที่พบ(cystidia) ก้านมีรากเทียวยาวส่วนปลายมีปม สีนวล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 (ต่อ)

ภาพ	กลุ่ม
	กลุ่มที่ 5 Stipe clypeatus ก้านมีผิวเรียบ มีรากเทียมใช้ยึดเกาะคอมบ์ ยอดแหลมค่อนข้างแหลมและยาว เห็นได้ในดอกอ่อนชัดเจน สีหมวกเห็ดเป็นสีเทาอมขาว ดอกใหญ่ปานกลาง
	กลุ่มที่ 6 Stipe lanatus ก้านขรุขระ หมวกเห็ดมีส่วนของเยื่อเซลล์ติดอยู่บนหมวก รูปร่างไม่เรียบทั้งหมวกและที่ก้านดอก

2.3.3 โครงสร้างทั่วไปของเห็ดโคน (Heim, 1977; พิชญางกูร, 2547)

การจัดกลุ่มของเห็ดโคนแบ่งตามลักษณะของหมวก ก้าน ดอก รากเทียม วงแหวนรอบก้านดอกหรือเยื่อหุ้มก้าน ยอดแหลมบนหมวก (ภาพ 4) ดอกเห็ดประกอบด้วย 2 ส่วนคือ

2.3.3.1 ส่วนที่เจริญเหนือดิน (Epigenous) ได้แก่

หมวกเห็ด (Pileus, cap) (ภาพ A-1) ประกอบด้วยยอดแหลมที่เรียกว่า เพอฟอราทอเรียม (perforatorium) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเห็ดโคนที่แตกต่างจากเห็ดชนิดอื่น (ภาพ A-2)

ครีบ (Lamellae) เป็นส่วนที่สร้างเบสิดิโอสปอร์ อยู่ใต้หมวกเห็ด (ภาพ B-1)

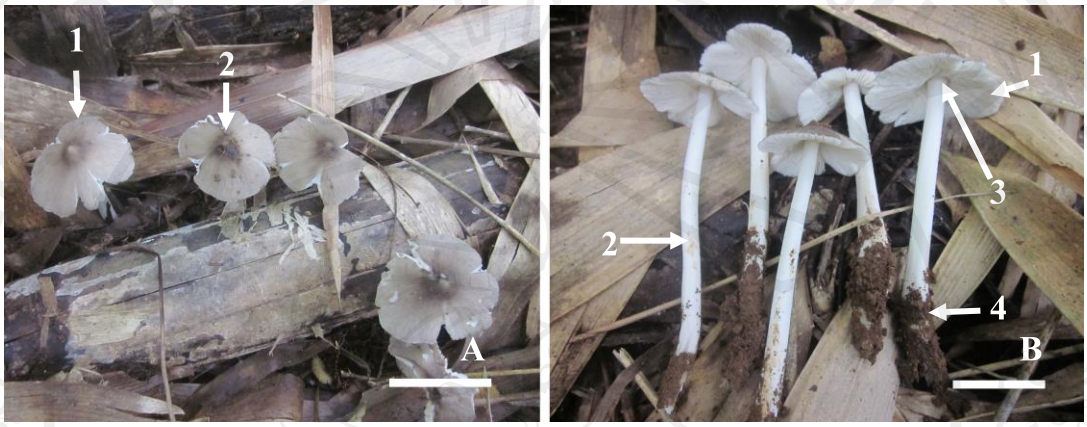
ก้าน (Stipe, stalk) เป็นส่วนชูดอกเห็ดเหนือพื้นดิน (ภาพ B-2)

เยื่อหุ้มดอกอ่อน (Annulus, veil) แผ่นเนื้อเยื่อที่ติดก้านดอก เป็นโครงสร้างที่ติดอยู่กับดอกอ่อน บางสายพันธุ์ก็ไม่พบโครงสร้างนี้ (ภาพ B-3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.3.2 ส่วนที่เจริญใต้ดิน (Hypogenous)

รากเทียม (Pseudorhiza) เป็นส่วนที่ใช้ยึดกับ fungus-comb (ภาพ B-4)



ภาพ 4 (A, B) เห็ดโคนดอกแก่ ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

หมวกเห็ด	(A-1)
ยอดแหลมบนหมวก	(A-2)
ครีบ	(B-1)
ก้าน	(B-2)
เยื่อหุ้มดอกอ่อน	(B-3)
รากเทียม	(B-4)

บาร์ A และ B = 4 เซนติเมตร

2.3.4 ชนิดเห็ดโคนที่กินได้

มีรายงานการรวบรวมเห็ดโคนที่กินได้ในเขตร้อน เขตอบอุ่นร้อน (Heim, 1977; Zang, 1981; Pegler and Vanhecke, 1994; Bel and Pataragetvit, 1982; Wei *et al.,* 2006; พิชญางกูร, 2547 และ อนงค์ และคณะ, 2551) มีดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 ชนิดเห็ดโคนที่รับประทานได้ พบในทวีปแอฟริกาตอนกลาง แอฟริกาตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศไทยที่สามารถรับประทานได้

ชนิดเห็ดโคน	อ้างอิง
1. *Sinotermitomyces carvas* M. Zang.	(Zang, 1981; Wei *et al.,* 2006; พิชญางกูร, 2547)
2. *Sinotermitomyces carnosus* M. Zang.	(Zang, 1981, Wei *et al.,* 2006; พิชญางกูร, 2547; อนงค์ และคณะ, 2551)
3. *Termitomyces albiceps* S.C. He.	(Pegler and Vanhecke, 1994; พิชญางกูร, 2547)
4. *Termitomyces albuminosus* (Berk.) R. Heim.	(Heim, 1977)
5. *Termitomyces aurantiacus* R. Heim.	(Heim, 1977; Pegler and Vanhecke, 1994; พิชญางกูร; 2547; อนงค์ และคณะ, 2551)
6. *Termitomyces bulborhizus* T.Z. Wang	(Wei *et al*., 2006)
7. *Termitomyces clypeatus* R. Heim.	(Heim, 1977; Pegler and Vanhecke, 1994; พิชญางกูร, 2547; อนงค์ และคณะ, 2551)
8. *Termitomyces cylindricus* S.C. He	(Pegler and Vanhecke, 1994, พิชญางกูร, 2547)
9. *Termitomyces entolomoides* R. Heim	(Heim, 1977; Pegler and Vanhecke, 1994)
10. *Termitomyces eurrhizus* (Berk.) R. Heim.	(Heim, 1977; Pegler and Vanhecke, 1994; พิชญางกูร, 2547; อนงค์ และคณะ, 2551)
11. *Termitomyces fuliginosus* R. Heim.	(Heim, 1977; Bel and Pataragetvit, 1982, พิชญางกูร, 2547)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 (ต่อ)

ชนิดเห็ดโคน	อ้างอิง
12. *Termitomyces globulus* R. Heim. and Gooss.-Font.	(Pegler and Vanhecke, 1994; พิชญางกูร, 2547; อนงค์ และคณะ, 2551)
13. *Termitomyces heimii* Natarajan.	(Pegler and Vanhecke, 1994; อนงค์ และคณะ, 2551)
14. *Termitomyces indicus* Natarajan.	(Pegler and Vanhecke, 1994; พิชญางกูร, 2547; อนงค์ และคณะ, 2551)
15. *Termitomyces madius* R. Heim.	(Heim, 1977)
16. *Termitomyces mammiformis* R. Heim.	(Heim, 1977; Pegler, 1977; พิชญางกูร, 2547)
17. *Termitomyces microcarpus* (Berk. and Broom.) R. Heim.	(Heim, 1977; Pegler and Vanhecke, 1994; พิชญางกูร, 2547; อนงค์ และคณะ, 2551)
18. *Termitomyces perforans* R. Heim.	(Heim, 1977; พิชญางกูร, 2547)
19. *Termitomyces rabuorii* Otieno.	(Pegler, 1977)
20. *Termitomyces radicacus* Natarajan.	(Pegler and Vanhecke, 1994; อนงค์ และคณะ, 2551)
21. *Termitomyces robustus* (Beeli) R. Heim.	(Heim, 1977; Pegler and Vanheke, 1994; Bel and Pataragetvit, 1982; พิชญางกูร, 2547; อนงค์และคณะ 2551
22. *Termitomyces striatus* (Beeli) R.	(Heim, 1977; Pegler and Vanhecke, 1994, พิชญางกูร; 2547)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 (ต่อ)

ชนิดเห็ดโคน	อ้างอิง
23. *Termitomyces tyleranus* Oteino.	(Pegler, 1977; ; อนงค์ และคณะ, 2551)
24. *Termitomyces unkowaani* (Cooke and Massee) D.A. Reid	(องค์ และคณะ, 2551)

2.4 นิเวศวิทยาของปลวก

ปลวกจัดเป็นผู้ย่อยสลายในระบบนิเวศที่สำคัญในเขตร้อน (Guedegbe *et al*., 2009) มีอิทธิพลต่อวิวัฒนาการของระบบนิเวศบนบกทั้งหมด สามารถย่อยสลายซากพืชได้หลากหลาย ตัวอย่างเช่น เศษไม้ ท่อนไม้ กิ่งไม้ ใบไม้ ที่หักร่วง ล้มตายทับถมกัน และอินทรียวัตถุในดิน (Sealford *et al*., 1996: Donovan *et al*., 2001) จากนั้นจะขับถ่ายกากอาหารออกมาซึ่งเห็ดบางชนิดนำเอาไปใช้เป็นอาหาร จึงกล่าวได้ว่าปลวกเป็นแมลงสำคัญที่ทำให้ดินอุดมสมบูรณ์ และเป็นตัวช่วยให้เกิดเห็ดธรรมชาติ สามารถจำแนกโดยใช้แหล่งที่อยู่อาศัยได้ 2 ประเภท (Sornuwat *et al*., 2004) คือ

2.4.1 ปลวกที่อาศัยอยู่ในไม้ (Wood-dweller termites) ได้แก่

ปลวกไม้แห้ง (Dry-wood termites) เป็นปลวกที่ต้องการความชื้นเล็กน้อยในการดำรงชีพ ทำลายไม้เฉพาะภายในชิ้นไม้ พบได้ในวัสดุแข็งรูปกลมรี ก้อนเล็กๆ บริเวณโคนเสา ฝาผนัง หรือโครงสร้างไม้ที่ถูกทำลาย

ปลวกไม้เปียก (Damp-wood termites) เป็นปลวกที่ต้องการความชื้นในการดำรงชีวิตสูง อาศัยอยู่ในเนื้อไม้ของไม้ยืนต้น หรือไม้ล้มตายที่มีความชื้นสูง

2.4.2 ปลวกที่อาศัยอยู่ในดิน (Subterranean termites) ปลวกชนิดนี้อาศัยอยู่ในดินแต่จะสร้างอุโมงค์ไปสู่แหล่งอาหารต่างๆ บนพื้นดิน และหลบซ่อนตัวจากศัตรู ได้แก่

ปลวกที่อาศัยอยู่ตามจอมปลวก (Mound-building termites) เช่น ปลวกในสกุล *Globitermes*, *Odontotermes* และ *Macrotermes*

ปลวกที่สร้างรังขนาดเล็ก (Carton-nest-building termites) เช่น ปลวกในสกุล *Microcerotermes, Termes, Dicuspiditermes, Nasutitermes* และ *Hospitalitermes*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปลวกใต้ดิน (Subterranean termites) เช่น ปลวกสกุล *Coptotermes*, *Microtermes*, *Ancistrotermes* และ *Hypotermes*

2.4.3 วงจรชีวิต ของปลวก

วงจรชีวิตของปลวกเริ่มในฤดูฝน แมลงเม่าบินออกจากรังและจับคู่ผสมพันธุ์กัน แมลงเม่าตัวเมียที่เป็นนางพญาจะวางไข่ และสลัดปีกหาที่เหมาะสมเพื่อสร้างรังในบริเวณที่มีอาหาร โดยที่ไข่ชุดแรกนางพญาจะควบคุมไข่ให้ฟักเป็นปลวกวรรณะกรรมกรหรือปลวกงานเพื่อรับช่วงในการหาอาหารดูแลตัวตัวอ่อน และสร้างรังต่อ การพัฒนาของไข่รุ่นใหม่ตัวอ่อนจะถูกกำหนดให้เป็นปลวกวรรณะกรรมกร ปลวกวรรณะทหาร และวรรณะสืบพันธ์ตามลำดับ (ยุพาพร, 2546)

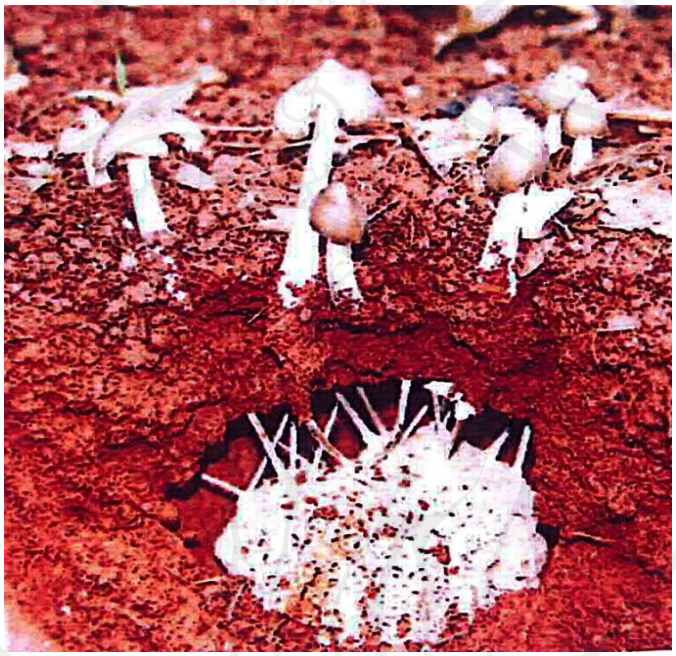
2.5 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยของเห็ดโคนกับปลวก

เห็ดโคนเป็นเชื้อรากลุ่ม white rot fungi เชื้อราในธรรมชาติที่ย่อยสลายลิกนินในเนื้อไม้รวมไปถึงการย่อยสลายสารระเหยปนเปื้อนในอากาศ (aromatic pollutant) เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน มีประสิทธิภาพย่อยสลายได้ดีกว่าแบคทีเรีย สามารถสร้าง extracellular enzyme ได้แก่ แลกเคส ลิกนินเพอรอกซิเดส และแมงกานีสเพอรอกซิเดส เป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) จัดอยู่ในกลุ่ม oxidizing enzyme ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่น กับ phenolic group ของลิกนิน

ปลวกที่เลี้ยงรา (fungus-growing termites) จัดอยู่ใน subfamily *Macrotermitinae* ดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับเชื้อราในจีนัส *Termitomyces* ส่วนปลวกที่อยู่ร่วมกับเห็ดโคนมีประมาณ 20 ชนิด (Bels and Pataragetvit, 1982) ในประเทศไทยมีการสำรวจเห็ดโคนพบปลวกที่มีความสัมพันธ์กับเห็ดโคนมีอยู่ 5 สกุล คือ *Ancistrotermes, Gdontotermes*, *Hypotermes, Macrotermes* และ *Microtermes* พบว่าปลวกกับชนิดเห็ดโคนไม่มีความจำเพาะซึ่งกันและกัน ปลวกชนิดหนึ่งอาจเลี้ยงเห็ดโคนได้หลายชนิด (Sornnuwat *et al.,* 2004) ปลวกสร้างห้องเล็กๆ ที่เรียกว่า ห้องเห็ด (fungus chamber) ภายในห้องเห็ดจะมีสวนเห็ด (fungus comb) เส้นใยเห็ดโคนเจริญบนสวนเห็ด ต่อมาจะรวมกันเป็นก้อนกลมนูนขนาดเล็กสีขาว ที่เรียกว่า fungus nodule (Johnson *et al*., 1981; Leuhold *et al*., 1989; Frøslev *et al*., 2003) ประกอบด้วยสปอโดเชียม (sporodochium) รูปร่างแบบรูปกระบอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สั้น ๆ อยู่รวมกันเป็นกระจุกและปลายก้านเป็นที่สร้าง conidium ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ nodule (Ohkuma *et al*., 2001) การสร้างดอกเห็ดโคนจะอยู่ในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Nobre *et al*., 2011) ในระยะนี้ปลวกจะกินราก้อนเล็กเป็นอาหาร เมื่อเข้าสู่สภาวะที่เหมาะสม ราจะเจริญรวมตัวกันภายในห้องเห็ด (fungus comb) และพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดต่อไป (ภาพ 5)



ภาพ 5 เห็ดโคนเจริญบนสวนเห็ดรา (Ohkuma *et al*., 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.6 คุณค่าทางอาหารและโภชนาการ

เห็ดโคนเป็นอาหารที่ประกอบไปด้วยคุณค่าทางอาหาร เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน โดยเฉพาะ vitamin B รวมไปถึง riboflavin, niacin และ flolate (Jansson and Kutti, 2004) เกลือแร่ จากน้ำหนักแห้งเห็ดโคน *T. letestui* มีโปรตีน 3.9 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้งมากกว่าโปรตีนที่พบเห็ด *Cantharellus cibarius* (Masamba and Kazombo-Mwale, 2010) Kansci *et al*. (2003) ได้ศึกษาคุณค่าของอาหารเห็ดโคน 6 ชนิดที่เก็บได้ในประเทศแคเมอรูน *T. letestui*, *T. aurantiacus*, *T. schimperi*, *T. mammformis*, *T. mboudaeina mossebo* sp., และ *T. subcypeatus formebisporus* sp. พบโปรตีน15.1 และ19.1 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง จะเห็นว่าเห็ดโคนเป็นแหล่งโปรตีนที่อุดมไปด้วยสารเหมาะสมที่จะเป็นแห่งโปรตีนแทนเนื้อสัตว์ได้

2.7 ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

เห็ดโคนเป็นเห็ดที่ได้รับความนิยมในการบริโภคอย่างแพร่หลายและเนื่องจากยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้จึงมีราคาแพง ราคาราคาของเห็ดโคนในประเทศไทยจะแตกต่างกันตามความหลากหลายของเห็ดโคนในแต่ละท้องที่ เช่น เห็ดโคนในจังหวัดเชียงใหม่มีราคาสูงถึง 185 บาทต่อเห็ด 1 กิโลกรัม (Jones *et al*., 1994) กาญจนบุรีเป็นจังหวัดที่พบเห็ดได้มากที่สุดในประเทศไทย ราคาเฉลี่ยสูงถึง 280-380 บาท เห็ดโคนที่เก็บได้ที่ห้วยแขย่ง อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี มีมูลค่ารวม 658,821 บาทต่อปี (Terakunpisut *et al*., 2007) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานประเทศใดในทวีปแอฟริกาตะวันออก แอฟริกากลาง และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่เพาะเห็ดชนิดนี้ในห้องปฏิบัติการได้ (พิชญางกูร, 2547)

2.8 ประโยชน์ด้านยารักษาโรค (Medicine)

เห็ดนอกจากนิยมนำมาบริโภคแล้วยังมีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรค เห็ดโคนนอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการ และคุณค่าทางอาหารสูงแล้ว มีคุณสมบัติเป็นสมุนไพร (Chang and Miles, 1991) ประชาชนในหลายประเทศนิยมนำใช้เป็นยารักษาโรค (Devgota, 2006) มีรายงานในทางการแพทย์ของ Appetorgbor *et al*. (2005) เห็ดโคนมีคุณสมบัติในการรักษาโรคความดันโลหิตต่ำ (Low pressure), รูมาตอยด์ (Rheumatism), โรคขาดสารอาหารในเด็กที่เรียกว่า ควาชิวากอร์ (Kwashiorkor) โรคอ้วน (Obesty) โรคท้องเสีย (Diarrhea) และอาการท้องผูก (Purgative)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.9 ปัจจัยที่มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเห็ดโคน

เห็ดราต้องการสารอาหารพื้นฐานเพื่อการเจริญ นอกจากอาหารที่เหมาะสมแล้วยังต้องมีปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมอีกด้วย เห็ดราจะใช้สารอาหารเพื่อนำมาสร้างพลังงานและสารประกอบที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ หรือสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเซลล์ เห็ดราต่างชนิดกันจะมีความต้องการสารอาหารและปัจจัยทางกายภาพต่างกัน การศึกษาการเจริญของเห็ดโคนมีปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ เป็นตัวกำหนดที่มีอิทธิพลต่อลักษณะการเจริญของเห็ดโคนคือ อุณหภูมิ, pH, ความชื้น และสารอาหาร เป็นต้น (Zeleke, 2013)

2.9.1 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิมีผลดีต่ออัตราความเร็วของปฏิกิริยาทางเคมีของขบวนการเมทาบอลิซึม เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของเส้นใยและการเจริญเติบโตของเชื้อรา เชื้อราแต่ละชนิดเจริญได้ดีในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อราส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อราสามารถเจริญได้ คือ -11 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อราเจริญได้อยู่ในช่วงระหว่างอุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส *Lignosus rhinoserus* หรือเห็ดนมเสือจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อราดิน (soil fungi) และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Lai *et al*., 2011) เห็ดโคนเป็นเห็ดที่มีความสัมพันธ์กับแมลงแบบพึ่งพาอาศัยกัน จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อราย่อยสลายลิกโนเซลลูเลส (lignocellulase) อาศัยอุณหภูมิที่เหมาะสมในรังปลวกในการงอกของสปอร์ สร้างเส้นใยและสร้างดอกเห็ด อุณหภูมิในรังปลวกอยู่ในช่วง 27-35 องศาเซลเซียส (Konaté *et a*l., 2003 และพิชญางกูร, 2547) การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดผู้ย่อยสลาย *Corprinus comatus* คือ 25 องศาเซลเซียส (Chaiyama *et al*., 2007) *Macrolepiota procera* 30 องศาเซลเซียส (Shim *et al*., 2005) เห็ด *Oudemansiella radicata* ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Kim *et al*., 2005) และเห็ด *Lentinus straigosus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Vargas-Isla and Ishigawa, 2008)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.9.2 ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร (pH)

เกี่ยวข้องกับความสามารถในการละลายของสาร และการยอมรับผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ภายในโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา มีการสังเคราะห์พลังงาน (ATP) จากสารอาหารที่ถูกลำเลียงผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ สะสมพลังงานอยู่ในรูปโปรตรอน เป็นตัวช่วยให้เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้า และเป็นแรงขับเคลื่อนให้อาหารจากภายนอก สารที่ไม่มีประจุเข้าสู่ในเซลล์ เห็ดโดยทั่วไปชอบ pH ที่เป็นกรด ในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีการเติมบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมลงไปในอาหาร เห็ดที่อยู่ในกลุ่มแซบโพรบมีต้องการสภาวะความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน *Calocybe indigo* เจริญได้ดีที่ pH 6 (Pheutela and Phutela, 2012) *Ganoderma lucidum* เห็ดที่มีความสำคัญในทางการแพทย์เจริญได้ดีในช่วง pH 6 *Macrolepiota procera* (Shim *et al*., 2005) เห็ดกินได้ที่พบในแถบประเทศทางตอนเหนือของเอเชีย ได้แก่ จีน ญี่ปุ่น เกาหลี เจริญได้ดีใน pH ที่เป็นกลาง *Corpinus comatus* หรือเห็ดโคนน้อยเป็นเห็ดที่ได้รับความนิยม และมีการเพาะทางเศรษฐกิจอย่างแพร่หลาย เจริญได้ดีในช่วง pH เท่ากับ 6–8 (Jang *et al*., 2009) เห็ด *Armillaria mellea* เจริญได้ดีในอาหารที่มี pH 3.5 (Weitz *et al*., 2001) จากปัจจัยความเป็นกรด-ด่างเบื้องต้น เชื้อราในแต่ละชนิดเจริญในสภาวะที่แตกต่างกัน แต่จะเห็นได้ว่าเห็ดในกลุ่มที่เป็นแซบโพรบส่วนใหญ่เจริญได้ดีใน pH ในสภาวะที่เป็นกรด การเลือกใช้อาหารจึงต้องเลือกใช้อาหารให้ถูกต้องตามความต้องการของเชื้อราแต่ละชนิด

2.9.3 สารอาหาร

เห็ดโคนต้องการสารอาหารที่เหมาะสม ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน แร่ธาตุต่างๆ และสารประกอบอินทรีย์บางชนิด เพื่อนำไปสร้างเส้นใย โครงสร้างหลักต่างๆ และใช้เป็นแหล่งพลังงาน (Lodge *et al*., 2004) สารอาหารที่เห็ดโคนใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน แร่ธาตุต่างๆ และวิตามิน ซึ่งสารอาหารแต่ละชนิดมีความจำเป็นในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ความสำคัญของธาตุอาหารเกี่ยวข้องกับการเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเห็ดในห้องปฏิบัติการ ได้มีนักวิชาการได้พยายามหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเห็ดโคนในห้องปฏิบัติการ ประกอบกับการศึกษาระบบนิเวศวิทยาระหว่างเห็ดโคนกับปลวก ซึ่งต้องใช้ความรู้หลายแขนงเพื่อที่จะใช้อธิบายความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.9.3.1 คาร์บอน

แหล่งคาร์บอนส่วนใหญ่ของเห็ดโคนมาจากสารอาหารที่อยู่ในสวนเห็ดรา (Darlington, 1994) และนำไปใช้ โดยการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายซับสเตรท ช่วยเพิ่มปริมาณเซลลูเลส และน้ำตาลเชิงเดี่ยว ให้แก่ปลวก (Martin and Martin, 1978; Rouland-Lefevre *et al*., 1991) กระบวนการย่อยสลายเห็ดโคนสร้างเอนไซม์แลคเคสย่อยสลายลิกนินที่อยู่ในเนื้อไม้ให้อยู่ในรูปโพลีแซคคาไรด์ จากนั้นจะสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไซลาเนส ย่อยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เพื่อให้ได้แหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปโมเลกุลเพื่อใช้ในกระบวนการเมทาบอลึซึมต่อไป (Hyodo *et al*., 2000; Johjima *et al*., 2003) ในตาราง 3 เห็ดราส่วนใหญ่ต้องการแหล่งคาร์บอนในรูปโมเลกุลเดี่ยว *T. striatus* เจริญได้ดีในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส และกลูโคสเป็นองค์ประกอบ (Kaur, 2011) *Psathyerella atroumbonata* เจริญได้ดีในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น sorbose และ myo-inositol (Jonathan and Fasidi, 2000) การเลือกใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อทดสอบแหล่งสารอาหารที่เหมาะสมของเห็ดโคนจะพิจารณาเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายในธรรมชาติ ส่วนใหญ่คล้ายคลึงเช่นเดียวกับเห็ดทั่วไป ได้แก่ กลุ่มน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่บางชนิด

ตาราง 3 แหล่งคาร์บอนที่ใช้เลี้ยงเห็ดรา

แหล่งคาร์บอน	เห็ด	อ้างอิง
Monosaccharide		
Fructose	*Termitomyces striatus*	Kaur, 2011
Glucose		
Sorbose		
Oligosaccharide		
Maltose	*Psathyerella atroumbonata*	Jonathan ann Fasidi, 2000
Manitol		
Sucrose		
Starch		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	เห็ด	อ้างอิง
Polysaccharide		
Cellulose	*Pleurotus* spp.	Stajic *et al*., 2006
Carboxymethyl-		
Cellulose sodium salt,		
Starch		
Xylan		

2.9.3.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นอะตอมที่มีทั้งในโปรตีนและกรดนิวคลิอิค โปรตีนเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของเซลล์ หรือเอนไซม์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ กรดนิวคลิอิคเป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ ตาราง 4 เชื้อราบางชนิดสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปของก๊าซไนโตรเจน บางชนิดสามารถใช้ในรูปของเกลือแอมโมเนียมหรือเกลือไนเตรต และบางชนิดใช้ในรูปสารอินทรีย์ เช่น peptone, yeast extract, KNO_3bovine serum เป็นต้น บางชนิดอยู่ในรูปกรดอะมิโน เช่น glycine, aspartic acid, glutamic acid, aspartic acid, asparagines และ leucine ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นอาหารในเห็ดแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน Kaur *et al*. (2011) ได้ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ที่มีผลต่อการเจริญของเห็ดโคนชนิด *T. stiatus* พบว่า sodium nitrate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน *O. radicata* เจริญได้ดีดีบนอาหารที่มี alanine เป็นองค์ประกอบ (Kim *et al*., 2005) *P. atroumbonata* เจริญได้ดีในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์ และกรดอะมิโน ได้แก่ yeast extract และ asparagines (Ayodele, 2008) เห็ด *L. edod*es เจริญได้ดีในอาหารที่มี glutamate เป็นองค์ประกอบ และพบว่าวิตามิน และคาร์โบไฮเดรตมีผลต่อการเจริญเส้นใยเพียงเล็กน้อย (Boyle, 1998) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องการศึกษาแหล่งสารอาหารเห็ดโคนยังไม่สามารถระบุแหล่งไนโตรเจนที่แน่นอนได้ จึงจำเป็นเป็นต้องศึกษาแหล่งนิเวศวิทยาของเห็ดโคนในธรรมชาติประกอบควบคู่กับการทดลองในห้องปฏิบัติการด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เลี้ยงรา

แหล่งไนโตรเจน	เห็ด	อ้างอิง
Inorganic sources		
Ammonium acetate	*Termitomyces striatus*	Kaur, 2011
Ammonium oxalate		
Ammonium phosphate		
Ammonium nitrate		
Sodium nitrate		
Potassium nitrate		
Complex organic sources		
Peptone	*Oudemansiella radicata*	Kim *et al*, 2005
Yeast extract		
KNO_3	*Pleurotus citrinopileatus*	Wu *et al.,* 2008
$NaNO_3$, $(NH_4)_3SO_4$	*Pleurotus* spp.	Stajić *et al*., 2006.
Urea		
Amino acids		
Glycine	*Psathyrella atroumbonata*	Ayodele, 2008
Aspartic acids		
Glutamic acid		
Asparagines		
Leucine		

2.9.3.3 อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน (C:N ratio)

การเจริญของเส้นใยเห็ดจะต้องมีอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ดี อาหารเลี้ยงที่เลือกใช้จะต้องมีองค์ประกอบของคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม อาหารที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดได้มีการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสม และเติมแหล่งสารอาหารแตกต่างกันตามความเหมาะสมของชนิดเห็ด เส้นใยเห็ด *P. atroumbonata* เจริญดีบนอาหารที่มีอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 2:3 (Jonathan and Fasidi, 2001) เห็ด *O. radicata* เจริญในได้ดีในอาหารที่มีอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน 20:1 (Kim *et al*., 2005) เห็ด *L. subnudus* เจริญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ดีในอาหารที่มีอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน 4:3, 5:3 และ 3:1 (Gbolagade *et al.*, 2006) *Agaricus brasiliensis* เจริญได้ดีอาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในช่วง 10:1-50:1 และเส้นใยจะถูกยับยั้งการเจริญในอาหารที่มีอัตราส่วนแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอัตราส่วนที่ต่ำกว่า 10:1 (Montovani *et al*., 2007) จะเห็นว่าเชื้อราแต่ละชนิดมีความต้องการแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในปริมาณต่างกัน อาหารที่เป็นสูตร complex ถ้ามีการนำมาใช้เพาะเลี้ยงเห็ดโคนหลายชนิด (ตาราง 5) จากความรู้พื้นฐานที่เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ง่าย เนื่องจากเป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer) ที่สำคัญของห่วงโซ่อาหาร มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดทำให้สามารถใช้วัตถุดิบในธรรมชาติได้หลากหลาย แม้กระทั่งเซลลูโลส เชื้อราก็ใช้เป็นแหล่งอาหารได้ดี การเติมสารอาหารบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อจะส่งเสริมให้เส้นใยเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้เมล็ดธัญพืช และวัสดุเหลือใช้จาการเกษตรจำนวนมาก เช่น กากมันสำปะหลัง ข้าวเปลือก ซังข้าวโพด วัสดุเหล่านี้เชื้อราสามารถใช้ในการเจริญเติบโตให้โครงสร้างและรูปร่างที่สมบูรณ์ได้ดี และที่สำคัญได้มีการพัฒนาใช้วัตถุดิบเหล่านี้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราแล้ว

ตาราง 5 อาหารที่นำมาใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดโคน

อาหาร	เห็ด	อ้างอิง
Gosh media (Gosh *et al*., 1978), Normal malt extract agar, Hagem Modes media	*T. aurantiacus* R. Heim. *T. clypeatus* R. Heim *T. eurrhizus* (Berk) R. Heim *T. letestui* (Pat.) R. Heim. *T. microcarpus* (Berk and Broom) R. Heim *T. saggitiformis* (Kalchbr and Cooke) D.A. Reid. *T. stria*tus (Beeli) R. Heim. *T. tita*nicus(Pegler and Piearce) R. Heim	Tibuwa, 2012

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 (ต่อ)

อาหาร	เห็ด	อ้างอิง
Potato dextrose agar	*T. umkowaani* Cke & Mass	Sawhasan *et al*., 2012,
	T. mammiformis R. Heim	Kaur, 2011
	T. clypeatus	Olila *et al*., 2007
Oat meal agar	*T. sriatus* (Beeli) Heim	Okane and Nakagiri,
	T. microcarpus Berk&Br	2007
	Fungus	

2.9.4 ความชื้น

ความชื้นจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยในระยะดอกอ่อน ฤดูกาลมีความสัมพันธ์ต่อการเจริญของดอกเห็ดโคน (Koné *et al.,* 2011) เห็ดไม่สามารถสังเคราะห์อาหารเองได้ เห็ดจะสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยซับสเตรทแล้วดูดซึมเข้าเส้นใยด้วยวิธีการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เห็ดโคนจัดเป็นราที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินไปเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสาจำเป็นที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเส้นใย ความชื้นในอากาศหรือที่เรียกว่าความชื้นสัมพัทธ์ ส่วนใหญ่จะอยู่ที่ประมาณ 85-90 เปอร์เซ็นต์ (พิชญางกูร, 2547)

2.9.5 ธาตุอาหาร

เชื้อราต้องการธาตุอาหารไปใช้สร้างกรดอะมิโน ความต้องการธาตุอาหารแต่ละชนิดซึ่งจะมีในปริมาณที่แตกต่างกัน ฟอสฟอรัสจัดเป็นธาตุที่จำเป็นเพื่อนำไปใช้สร้างกรดนิวคลิอิกและพลังงานเชื้อจุลินทรีย์ได้รับฟอสฟอรัสจากอาหารในรูปของเกลือฟอสเฟต นอกจากนี้ยังมี Ca^{2+}, Zn^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}และ Fe^{3+} เชื้อราต้องการเพื่อควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ควบคุมแรงดันออสโมซิส และการขนส่งอิเลคตรอน โดยธาตุเหล่านี้ต้องการเพียงปริมาณเล็กน้อยเท่านั้นเพื่อให้เซลล์สามารถดำรงอยู่ได้ตามปกติ ได้รับธาตุเหล่านี้จากเกลืออนินทรีย์

เกลือแร่ และแร่ธาตุบางชนิดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวเคมีหลายอย่าง เป็นส่วนประกอบบางอย่างของเอนไซม์ และองค์ประกอบบางอย่างของเซลล์มีผลต่อการรักษาสมดุลของสารละลายภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์คงรูปอยู่ได้ ในเห็ดแต่ละชนิดมีความต้องการแร่ธาตุที่แตกต่างกัน เส้นใยของ *M. inclinata* ต้องการ Mn เพื่อใช้ในการเจริญ 103 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเส้นใยของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

C. comatus ต้องการ Zn 162 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เส้นใยเห็ด *P. stipticus* ต้องการ Cu ปริมาณ 86.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Mendil *et al*., 2005) มีการศึกษาแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนต้องการอินทรียวัตถุ N, K, Ca, Mg, Fe และ Mn สูงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเห็ดที่เป็นเอคโตไมคอร์ไรซา เห็ดไค เห็ดระโงก และ เห็ดเผาะ (Thongthummachat, 2009) การเลือกใช้อาหารต้องคำนึงถึงความต้องการแร่ธาตุ และสารอาหารให้เหมาะสมกับความต้องการของเห็ดแต่ละกลุ่ม

2.9.6 วิตามิน

เป็นสารประกอบที่ต้องการในปริมาณน้อย แต่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตและเจริญเติบโต ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในกระบวนการเคมีต่างๆ เชื้อราบางชนิดต้องการวิตามินเพื่อให้กิจกรรมของเซลล์ดำเนินไปได้ ซึ่งถ้าขาดไปจะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถมีกิจกรรมได้ กระบวนการเมทาบอลิซึมในเซลล์จะเสียไป มีการศึกษาผลของวิตามินที่มีผลต่อการเจริญของเห็ด *Lyophyllum decaster* พบว่าเห็ดชนิดนี้เจริญได้ดีในอาหารที่มีวิตามิน cyanocobalmin, riboflavin, thiamine, pyridoxine, biotin และ nicotinic acid (Pokhrel *et al*., 2009) แต่วิตามินก็ไม่มีผลต่อการเจริญของเห็ดบางชนิด เช่น เห็ด *Volvariella speciosa* (Fasidi and Akwakwa, 1996)

2.10 การผลิตหัวเชื้อเห็ด

การผลิตหัวเชื้อเห็ดจะต้องมีการเตรียมเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการขยายเชื้อหรือเพิ่มปริมาณเชื้อบริสุทธิ์บนเมล็ดธัญพืช ประกอบไปด้วยการเตรียมอาหารเพื่อเลี้ยงเชื้อเห็ด อาหารที่เลือกใช้กันทั่วไปคือ PDA จากนั้นจะทำการคัดเลือกดอกเห็ดเพื่อเป็นสายพันธุ์ และการแยกเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดเพื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ซึ่งการแยกเชื้อเห็ดสามารถแยกได้ 2 วิธี คือ

2.10.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อภายในก้านดอก

เป็นวิธีการที่เหมาะสมกับดอกเห็ดที่มีขนาดใหญ่ และเห็ดไม่มีเปลือกหุ้มดอกอ่อน เป็นการตัดเอาเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นเพื่อให้เป็นเส้นใย โดยอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อ บริเวณเนื้อเยื่อที่เลือกใช้ส่วนใหญ่ต้องเป็นส่วนเนื้อเยื่อที่อยู่บริเวณด้านในดอกเห็ด ได้แก่ ก้าน ครีบ (Sawhasan *et al*., 2012) เมื่อเส้นใยเจริญแข็งแรงก็จะสามารถย้ายชิ้นวุ้นได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.10.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดบริสุทธิ์จากสปอร์

เป็นวิธีการแยกที่เหมาะสมในการศึกษาหาสายพันธุ์เห็ด หรือผสมพันธุ์เห็ด โดยที่เห็ดที่ได้อาจมีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม สปอร์เห็ดบางชนิดที่งอกออกมานั้น ไม่สามารถจะเจริญไปเป็นดอกเห็ดได้ (Kües, 2000; Olila *et al*., 2007)

2.10.3 การผลิตเชื้อเมล็ดธัญพืช

การผลิตหัวเชื้อเมล็ดธัญพืชเป็นวิธีการที่ใช้แพร่หลายในปัจจุบันเป็นขั้นตอนที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเส้นใยให้มีจำนวนมากขึ้น เมล็ดธัญพืชที่นิยมใช้ ได้แก่ ข้าวเปลือก ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี เป็นต้น โดยเฉพาะข้าวฟ่างเป็นเมล็ดธัญพืชที่มีการนำมาใช้มากที่สุดเนื่องจากหาง่ายและมีราคาถูก นอกจากนี้ยังมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่หาได้ และมีราคาถูกมากมาย เช่น ขี้เลื่อย ฟางข้าว ชานอ้อย เป็นต้น เมล็ดที่ดีจะต้องไม่แตกหักมาก ไม่มีราขึ้น ไม่มีแมลงทำลาย และไม่มีการคลุกยาฆ่าเชื้อราและแมลงด้วย เห็ดเศรษฐกิจส่วนใหญ่มีการขยายเชื้อในอาหารพวกเมล็ดธัญพืช

Olila *et al*. (2007) มีการศึกษาการผลิตหัวเชื้อเห็ด *T. microcarpus* หรือเห็ดข้าวตอก โดยการใช้เดือยเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นโดยใช้หัวเชื้อที่แยกจากเทคนิค monospore starter culture พบว่าเส้นใยเจริญได้ดีปานกลาง และมีเส้นใยเพิ่ม 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เจริญบนอาหารวุ้น เมื่อนำหัวเชื้อ monospore culture 1, monospore culture 2 และ monospore culture 3 มาเปรียบเทียบการเจริญเส้นใยพบว่าเส้นใยที่เจริญในหัวเชื้อ monospore culture 1 เจริญได้ดีสุด รองลงมาคือ monospore culture 3 และ monospore culture 2 การศึกษาคุณสมบัติของเห็ดโคนในการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส และเอนไซม์เซลลูเลส บนวัสดุแข็งได้แก่เมล็ดพืช และวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร พบว่าการเลี้ยงเส้นใยเห็ดโคนสามารถเจริญได้ดีเมื่อวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์บนวัสดุอาหารแข็ง (Zeleke *et al*., 2013) จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติเส้นใยเห็ดสามารถเจริญได้ดีบนวัสดุอาหารที่แข็งกลุ่มเมล็ดธัญพืช และวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร การศึกษาการเจริญเส้นใยของเห็ดเศรษฐกิจ *P. ostreatus* ในอาหารธัญพืช ได้แก่ ข้าวฟ่าง และลูกเดือย ผสมในอัตราส่วน 3:1, 1:1 และ 3:1 (มวลต่อมวล) และชุดควบคุม พบว่าเส้นใยเจริญได้ดีในอาหารธัญพืชข้าวฟ่างต่อลูกเดือย ในอัตราส่วน 3:1ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ในชุดควบคุมที่มีข้าวฟ่างเพียงอย่างเดียว เส้นใยที่เป็น vegetative cell ของเห็ด *L. squarrosulus* เจริญได้ดีในวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร (Adejoye, 2009) การทำหัวเชื้อ *A. bisporus* เจริญได้ดีในอาหารธัญพืชโดยให้ yield ถึง 7.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่มีการผสม non-compose substrate และ spent mushroom compose ในอัตราส่วน 50/50 (มวลต่อมวล) เห็ดในแต่ละชนิดเจริญได้ดีในอาหารแข็งที่มีเมล็ดธัญพืชเป็นองค์ประกอบ และวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเป็นวัสดุหลักที่มีอัตราส่วนแตกต่างกัน ในการเลือกใช้วัสดุอาหารแข็งแต่ละชนิดต้องพิจารณาว่าเห็ดแต่ชนิดมีคุณสมบัติความจำเพาะของการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายซับสเตรท นอกจากนี้องค์ประกอบอาหารแข็งจะต้องมีความชื้นที่เหมะสมและไม่อัดตัวกันแน่นจนเกินไป การนำวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมาใช้นอกจากจะหาง่าย และมีราคาถูกแล้ว ยังช่วยลดมลภาวะและกำจัดขยะอีกด้วย

ตาราง 6 อาหารธัญพืชที่นำมาใช้เลี้ยงเห็ดรา

วัสดุอาหารแข็ง	เห็ด	อ้างอิง
เมล็ดธัญพืช		
Millet grain	*Termitomyces microcarpus*	Olila *et al*., 2007
Sorghum , corn, wheat	*Pleurotus ostreatus*	Narh *et al*., 2011
Soy bean, crushed corn	*Auricularia polytica*	Razak *et al*., 2012
Rye, ground-alfafa, ground-bean, wheat barn	*Agaricus bisporus*	Mamiro *et al*., 2008
วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร		
Wheat barn, termite comb , wheat strawn, bean strawn, teff strawn	*Termitomyes* spp.	Zeleke *et al*.,2013
Saw dust	*Lentinus squarrosulus*	Oghenekaro *et al*., 2009
Wheat barn	*Agaricus bisporus*	Mamiro *et al*., 2008

มีงานวิจัยที่ได้พยายามศึกษาระบบความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันของปลวก และเห็ดโคน การแยกเส้นใยบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการเพื่อหาเทคนิคการแยกเชื้อเห็ด สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน Thibhuwa (2012) ได้แยกเชื้อเห็ดโคน *T. aurantiacus* Heim., *T. clypeatus* Heim., *T. eurrhizus* (Berk) R. Heim., *T. letestui* (Pat.) R. Heim., *T. microcarpus* Berk and Broom., *T. saggitiformis* (Kalchbr and Cooke) D.A. Reid., *T. striatus* (Beeli) R. Heim., *T.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

*tita*nicus Pegler and Piearce., *T. umkowaani* Cke and Mass และ *T. mammiformis* R. Heim. บนอาหารสังเคราะห์ 4 ชนิด ได้แก่ Ghosh media, Hagem Modess media และ Modified Malt extract agar พบว่าลักษณะของ growt rate, lateral advancing zone และevaluating zone ใช้เป็นข้อมูลร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการแยกชนิดเห็ด และเส้นใยเห็ดโคนเจริญได้ดีบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆได้ แหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารหลักที่จำเป็นต่อเชื้อราในกระบวนการเมทาบอลิซึม การเลือกใช้อาหารจำเป็นต้องพิจารณาสารอาหารที่อยู่ในองค์ประกอบอาหารชนิดนั้นๆ มีการศึกษาแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมะสมของเห็ดโคนสายพันธุ์ *T. stria*tus (Beeli) R. Heim พบว่าแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยคือ D (+) Glucose, D (+) Sucrose, D (+) maltose และ rafinose แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ sodium nitrate (Kaur, 2011) นอกจากนี้ carbon:nitrogen ratio ที่เหมาะสมมีผลต่อการเจริญของเส้นใย และการพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด

มีการศึกษาความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยของปลวก และเห็ดโคในระดับยีนที่ควบคุมการสืบพันธุ์ การเกิด heterothallic mating type system ของเห็ดโคนโดยแยกเชื้อบริสุทธิ์จาก nodules ที่เจริญภายในรังปลวก *Macrotermes natalensis* โดยใช้เทคนิค single basidiospore culture จากนั้นตรวจสอบหา multi-nucliate ของนิวเคลียสพบระยะ heterokaryotic และ homokaryotic ของเห็ดโคน แต่เซลล์นิวเคลียสที่พบมีความแตกต่างจากเซลล์เห็ดในกลุ่มเบซิดิโอมัยซีท (De Fine Licht *et al.*, 2005)

พิชญางกูร (2547) ได้ศึกษารวบรวมงานวิจัย เห็ดโคน และการสร้างขยายพันธุ์ลูกผสม โดยใช้เทคนิคการหลอมรวมโปรโตพลาสของเห็ดโคน กับเห็ดฟาง เพื่อพัฒนาสายพันธุ์เห็ดลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ที่จะเป็นประโยชน์ต่อการค้า การศึกษาปัจจัยสภาวะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดดอกเห็ด ได้แก่ สารอาหาร อุณหภูมิ pH ความชื้น แสง และปลวกที่เลี้ยงรา ตลอดจนสภาพนิเวศวิทยาอื่นๆ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปใช้ในการศึกษาและพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงเห็ดโคนเพื่อให้เป็นแหล่งอาหารที่ยั่งยืนและเสริมรายได้ให้แก่ประชาชนในท้องถิ่น สามารถปลูกหัวเชื้อในธรรมชาติ ทนต่อสภาวะแวดล้อม ผู้ประกอบการสามารถเพิ่มดอกเห็ดที่มีคุณภาพ เพียงพอต่อการบริโภค และจัดจำหน่าย ส่งเสริมให้มีการผลิตเพื่อจัดจำหน่าย ผู้ประกอบการนำความรู้จากงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้ในพัฒนาการผลิตเห็ดโคนเพื่อผลิตเห็ดโคนในสวนสักได้ในปริมาณผลผลิตที่มาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 เก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อเห็ดโคน

สำรวจหาและเก็บตัวอย่างเห็ดโคนในป่าธรรมชาติ และป่าสักบนพื้นที่ปลูก 3 จังหวัดได้แก่ อำเภอเมือง และอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอภูซาง จังหวัดพะเยา และ อำเภอชนแดน จังหวัดเพชรบูรณ์ ระยะการเก็บตัวอย่างเริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม จนถึงเดือนพฤศจิกายน ปี 2552 – 2554 เก็บตัวอย่างดอกเห็ดจะเก็บดอกอ่อนจนถึงดอกแก่ บางดอกจะฝังอยู่ในดินร่วมกับรังปลวกอยู่ในดินจะใช้พลั่วมือในการขุดขึ้นมาตามระดับความลึกของรังปลวก เก็บรักษาตัวอย่างที่ออกพื้นนำตัวอย่างดอกเห็ดห่อด้วยกระดาษฟอยล์เก็บตัวอย่างในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง ถ่ายภาพพื้นที่เก็บตัวอย่าง บันทึกวัน เดือน ปี หมายเลขตัวอย่าง ลักษณะพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ pH ของดิน ความชื้น และอุณหภูมิ

3.2 แยกเชื้อเห็ดโคนให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนบนอาหารวุ้น ทำการแยกเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคนโดยใช้คีมปลายแหลม แยกเนื้อเยื่อด้านในส่วนก้านของดอกเห็ด วางบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 30 วัน ใช้เข็มปราศจากเชื้อตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีย้ายลงบนจานอาหารเพื่อใช้ในการศึกษาสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยของเห็ดโคน เก็บรักษาเส้นใยบริสุทธิ์ใน 20 เปอร์เซ็นต์ glycerol, mineral oil และ PDA slant นำดอกเห็ดไปทำแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เก็บในถุงสุญญากาศที่บรรจุ siliga gel เก็บรักษาเส้นใยบริสุทธิ์ และตัวอย่างแห้งไว้ ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา SCB2813 สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 ศึกษาชนิดเห็ดโคน

นำดอกเห็ดที่สมบูรณ์มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดโคน ได้แก่ ขนาด รูปร่าง และส่วนประกอบต่าง ๆ ด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Heim, 1977; Pegler and Van-Haeke, 1994; พิชญางกูร, 2547)

3.3.1 Macroscopic character ตรวจสอบลักษณะสี ขนาด ของหมวกเห็ด, ครีบ, ก้าน และรากเทียม

3.3.2 Microscopic character ได้แก่ สปอร์ เบสิเดียม ไคโลซิสทิเดีย และพิวโรซิสทิเดีย สี ตรวจสอบขนาด รูปร่าง สีภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง และการทำรอยพิมพ์สปอร์

3.4 สกัดดีเอ็นเอตัวอย่างของเห็ดโคน (ดัดแปลงวิธีการ CTAB method จาก Den *et al*., 2004; Kumla *et al*., 2012)

ใช้มีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อขูดเส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 30 วัน นำมาบดกับ sterile sand และไนโตรเจนเหลวปริมาณเล็กน้อยในโกร่งปราศจากเชื้อ (ดัดแปลงวิธีการบดตัวอย่าง) เติมสารละลาย CTAB extraction buffer 500 ไมโครลิตร (Tris-Cl 100 มิลลิโมล, NaCl 1.4 โมล, EDTA 20 มิลลิโมล, 2 เปอร์เซ็นต์ CTAB, pH 8.6) และ protease K จนเส้นใยเชื้อราละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปบ่มตัวอย่างใน water bath ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำการเขย่าทุกๆ 15 นาที หลังจากนั้นนำไปเติมสารละลาย chloroform:isoemyl (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที 2 ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้งจากนั้นใช้ autopipette ดูดสารละลายด้านบนใส่ลงในหลอดพลาสติก (eppendorf tube)หลอดใหม่ แล้วเติม absolute alcohol 1 มิลลิลิตร นำไปแช่ในตู้เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 ต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที 1 ครั้ง เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และเติม 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้ง เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้จนกว่าตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer บ่มเป็นเวลา 30 นาที และนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เตรียมวุ้น (agarose gel) ยี่ห้อ Agarose Low EEO (EP), Molecular Biology Grade ปริมาณ 0.6-0.8 เปอร์เซ็นต์ ละลายในบัฟเฟอร์ TAE 1X ต้มให้ละลายโดยใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

microwave เทวุ้นลงในถาดที่วางหวี เพื่อให้เกิดหลุม นำตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรวจสอบปริมาณคุณภาพโดยการผสมกับสี loading dye (5X) 1 ไมโครลิตรที่ใช้บอกระยะทางใส่ลงไปในแต่ละหลุมบนวุ้น แล้วนำไปวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 30 นาที

3.5 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยา PCR ไพรเมอร์ที่ใช้คือ ITS5 (Forword) ซึ่งมีลำดับเบส 5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3' และไพรเมอร์ ITS4 (Reverse) มีลำดับเบส 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'เตรียม master mix (2X PCR Master mix Solution (i-Taq) ให้เข้ากัน ดูดตามปริมาตรที่ต้องการใส่ลงใน PCR tube เติม DNA template ลงไปใส่ PCR tube จากนั้นนำ PCR tube ใส่ลงในเครื่อง thermal cycler (Bio-Rad, USA) ปฏิกิริยา PCR มีดังนี้ ขั้นตอนแรกของปฏิกิริยา Initial Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้แม่พิมพ์แยกกันอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงเริ่มวงจร Denaturation ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เป็นขั้นตอนให้แม่พิมพ์แยกกันอย่างสมบูรณ์ Annealing ไพร์เมอร์เข้าจับคู่สายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension เป็นการสังเคราะห์ DNA ต่อจากปลายด้าน 3' end ของ primers ทั้งสองชิ้นใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนสุดท้าย Final extension เป็นขั้นตอนที่ทำให้ PCR product เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบขนาดของ PCR product โดยวิธี agarose gel electrophoresis เทียบกับ marker จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณไปทำบริสุทธิ์ การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลโดย Gel Extraction NucleoSpin® 120 Extract II Purification Kit (Macherey-Nagel, Germany, Catalog no. 740 609.50) นำ PCR product ที่ได้มาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ที่บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลลำดับเบสของเชื้อราโดยใช้โปรแกรมใน (http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), Sequencher และ PUAP beta 10 software version 4.0 (Swofford, 1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 ศึกษาสภาวะการเจริญของเส้นใยบนอาหาร อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

3.6.1 ศึกษาผลของอาหารที่มีต่อการเจริญของเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคน (De Araùjo and Rossos, 2002)

นำเชื้อบริสุทธิ์เห็ดโคนจาก PDA slant มาต่อเชื้อลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป เลือกอาหารที่ใช้ทดสอบการเจริญเส้นใยของเห็ดโคน 10 ชนิด (ตาราง 7) การเตรียมอาหารวุ้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แข็ง จากนั้นนำอาหารที่เตรียมทั้ง 10 ชนิด เพื่อใช้ในการทดสอบ โดยเตรียมกระดาษเซลโลเฟนตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทำการทำไร้เชื้อนำมาวางบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นใช้ Pasteur pipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อทำการเจาะเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคนอายุ 30 วัน บนอาหารที่ใช้ทดสอบ 10 ชนิด วางบนผิวหน้าอาหาร นำพาราฟินพันรอบจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ในที่มืด วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกๆ 3 วัน อาหารละ 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 7 อาหารวุ้นชนิดต่างๆ ที่นำมาใช้ศึกษา

อาหารวุ้นชนิดต่างๆ	อ้างอิง
1. Fungal host medium	Vaario *et al*. (2000)
2. Malt extract agar	Hawksworth (1995)
3. Hagem medium	ดัดแปลงจาก Kalmiş and Kalyoncu (2008)
4. Murashige and Skook medium	Danell (1994)
5. Oat meal agar	Atlas (1993)
6. Potato dextrose agar	
7. Sabouraud's agar	ดัดแปลงจาก Atlas (1993)
8. Soil extract agar	Atlas (1993)
9. Yeast-extract agar	Atlas (1993)
10. Yeast-extract-malt-extract agar	Atlas (1993)

3.6.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

อาหารวุ้นที่นำมาใช้ทดสอบผลของอุณหภูมิ ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน ได้แก่ MEA ซึ่งได้คัดเลือกจากการทดลอง 3.6.1 เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเห็ดโคนสำหรับการทดลอง ทำการปลูกเชื้อเช่นเดียวกับวิธี 3.6.1 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ที่ในตู้บ่มเชื้อ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกๆ 3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.3 ศึกษาผลของความเป็น กรด-ด่าง ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

อาหารวุ้นที่นำมาใช้ทดสอบผลของ pH ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน ได้แก่ MEA ทำการปรับ pH ของอาหารเป็น 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 โดยใช้ 1N HCl และ 1 N NaOH ก่อนนำไปฆ่าเชื้อ ทำการปลูกเชื้อเช่นเดียวกับวิธี 3.6.1 บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.8.2 เป็นเวลา 30 วัน ในที่มืด วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกๆ 3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.4 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคน

อาหารที่นำมาใช้ในการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน เตรียมอาหาร Basal medium (Kumla *et al*., 2011)โดยมีแหล่งคาร์บอน ดังนี้ sucrose, fructose, maltose, manitol, starch และ xylose การเตรียมอาหารเพื่อใช้ทดสอบแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยเห็ดโคน นำน้ำตาลที่เลือกมาทดสอบชั่งในปริมาณ 5 กรัม ผสมกับสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ bovine serum, egg albumin, peptone, soybean meal, KNO_3, $(NH_4)H_2PO_4$ และ urea การเตรียมแหล่งคาร์บอน bovine serum และ egg albumin ผสมน้ำ 200 มิลลิลิตร ต้มด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตรจากนั้นผสมกับผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที การเตรียม peptone, soybean meal, KNO_3, $(NH_4)H_2PO_4$ และ urea ใช้วิธีการเดียวกับการเตรียมแหล่งคาร์บอน การทดสอบแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการ 3.7.1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ในที่มืด วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเส้นใยทุกๆ 3 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.5 การศึกษาวัสดุอาหารแข็งที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคน

เตรียมวัสดุอาหารแข็ง 2 ประเภท ได้แก่ เมล็ดธัญพืช ประกอบไปด้วย ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรน์ ข้าวโพด ถั่วเหลือง ขี้เลื่อย เดือย ถั่วดำ ถั่วเขียว ข้าวสาลี ข้าวกล้อง และรำข้าว เตรียมอาหารโดยนำเมล็ดธัญพืชโดยการล้างจากนั้นนำไปต้มให้สุกพอประมาณ 30–90 นาที ขึ้นอยู่กับชนิดเมล็ดธัญพืช ทดสอบความสุกของเมล็ดธัญพืชเมื่อใช้มือบิดเมล็ดจะสามารถบิดแยกออกได้ ส่วนรำข้าวและขี้เลื่อยแช่น้ำพอหมาด ใส่ในหลอดทดลองขนาด 18 × 100 เซนติเมตร ปิดหลอดทดลองด้วยจุกซิลิโคน บรรจุวัสดุอาหารแข็งชนิดต่างๆ ให้มีความสูง 10 เซนติเมตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้งโดยเว้นระยะการฆ่าเชื้อ 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ Pasture pipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยบริสุทธิ์ที่เลี้ยงบนอาหาร MEA บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วันที่เตรียมไว้ ใช้เข็มปราศจากเชื้อเขี่ยชิ้นวุ้นใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารแข็ง บ่มในที่มืด 60 วัน วัดการเจริญของเส้นใยทุก ๆ 5 วัน โดยวิธี linear line นำค่าที่วัดได้แต่ละวันไปหารด้วยระยะเวลาที่ทำการทดลองจะได้อัตราการเจริญของเส้นใยแต่ละวัน

3.7 วิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลมาวิเคราะห์แบบ one-way analysis of variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 16.0) สำหรับ window และใช้ Turkey's test เพื่อบ่งบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างเห็ดโคน

สำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดโคน *Termitomyces* sp. จากแหล่งที่พบเห็ดโคน ได้แก่ ไร่ผาทอง และ สวนเขาชะโงก อำเภอชนแดน จังหวัดเพชรบูรณ์ อำเภอภูซาง จังหวัดพะเยา อำเภอเมือง และ อำเภอเมืองสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารวุ้น PDA บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 5 ไอโซเลท (ตาราง 9)

ตาราง 8 ตัวอย่าง Herbarium เห็ดโคน

รหัสตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	วัน/เดือน/ปี	pH	ความชื้น (%)	อุณหภูมิ (°C)
CMUTM006	สันทราย, เชียงใหม่	6 มิถุนายน 2552	5.7	85	25
CMUTM007	สันทราย, เชียงใหม่	10 สิงหาคม 2552	5.0	70	27
CMUTM009	สันทราย, เชียงใหม่	10 พฤศจิกายน 2552	5.6	70	30
CMUTM010	สันทราย, เชียงใหม่	6 มิถุนายน 2552	5.4	85	26
CMUTM011	สันทราย, เชียงใหม่	6 มิถุนายน 2552	5.6	80	27
CMUTM012	แม่แตง, เชียงใหม่	6 มิถุนายน 2552	4.9	90	25
CMUTM013	แม่แตง, เชียงใหม่	6 มิถุนายน 2552	5.1	90	25

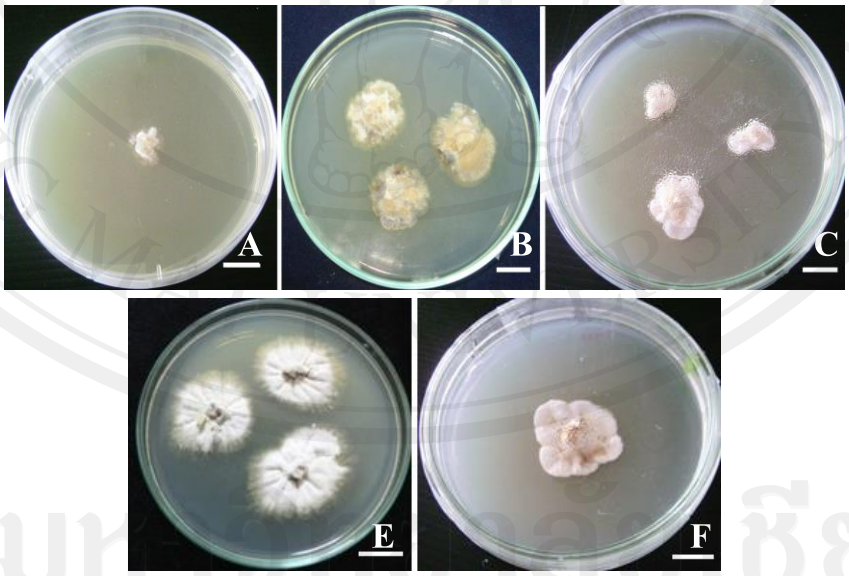
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 9 ตัวอย่างเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ 5 ไอโซเลท

ไอโซเลท	สถานที่เก็บ	วัน/เดือน/ปี	pH	ความชื้น (%)	อุณหภูมิ (°C)
CMUTM001	สันทราย, เชียงใหม่	12 กันยายน 2552	5.7	80	27
CMUTM002	ชนแดน, เพชรบูรณ์	17 สิงหาคม 2554	4.7	75	32
CMUTM003	ภูซาง, พะเยา	1 กันยายน 2553	5.0	60	30
CMUTM004	เมือง, เชียงใหม่	31 สิงหาคม 2553	4.2	70	28
CMUTM005	สันทราย, เชียงใหม่	8 กันยายน 2554	5.5	70	28

4.2 การแยกเชื้อเห็ดโคนในอาหารวุ้นให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

แยกเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้คีมปลายแหลมคีบเนื้อเยื่อภายในส่วนก้านดอกเห็ดบนอาหารวุ้น PDA บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ได้เชื้อบริสุทธิ์ 5 ไอโซเลท (ภาพ 6)



ภาพ 6 เส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคนจำนวน 5 ไอโซเลท (A= CMUTM001, B=CMUTM002, C=CMUTM003, D= CMUTM004 และ E-F= CMUTM005) บาร์ A, B, C, D, E และ F = 1 เซนติเมตร

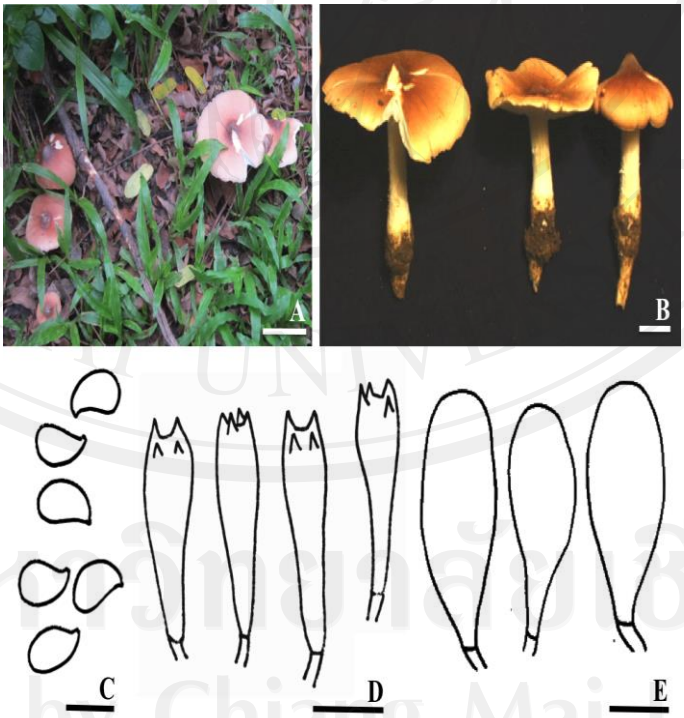
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการศึกษาชีววิทยาโมเลกุลของเห็ดโคน

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดที่โคนที่เก็บได้โดยใช้ลักษณะ microscopic character และ macroscopic character มีดังนี้

4.3.1 *Termitomyces* sp. CMUTM001

หมวกเห็ด เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.8–5.9 เซนติเมตร โค้งนูนแล้วแผ่แบนออกกลางหมวกมียอดแหลม ผิวหมวกเห็ดเรียบ และลื่น ตรงกลางหมวกสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีชมพูแดง สีดอกเห็ดจะจางลงเรื่อยๆจนถึงขอบหมวก ขอบเรียบ มีริ้วลักษณะคล้ายท่อเรียงอยู่ สีขาวถึงครีม **ครีบ** ไม่ติดก้าน ความกว้าง 4.0–6.0 มิลลิเมตร ครีบม้วนเข้าข้างใน เรียงถี่ สีขาวถึงครีม **ก้าน** ขนาด 3.8–4.0×6.4–11.9 เซนติเมตร ทรงกระบอก แข็ง มีขนเกล็ด สีขาวถึงครีม **รอยพิมพ์สปอร์** สีชมพูครีม **เนื้อ** 0.5–5.0 มิลลิเมตร สีขาว **สปอร์** 2.0–4.0×5.0–7.0 ไมโครเมตร รูปรีกว้าง ผนังบาง **เบสิเดีย** 5.0–8.0×24.0–26.0 ไมโครเมตร รูปกระบอง **ไคโลซิสทิเดีย** 6.0–8.0×16.0–25.0 ไมโครเมตร รูปลูกแพร ผนังบาง มีสารบรรจุภายในเล็กน้อย (ภาพ 7)

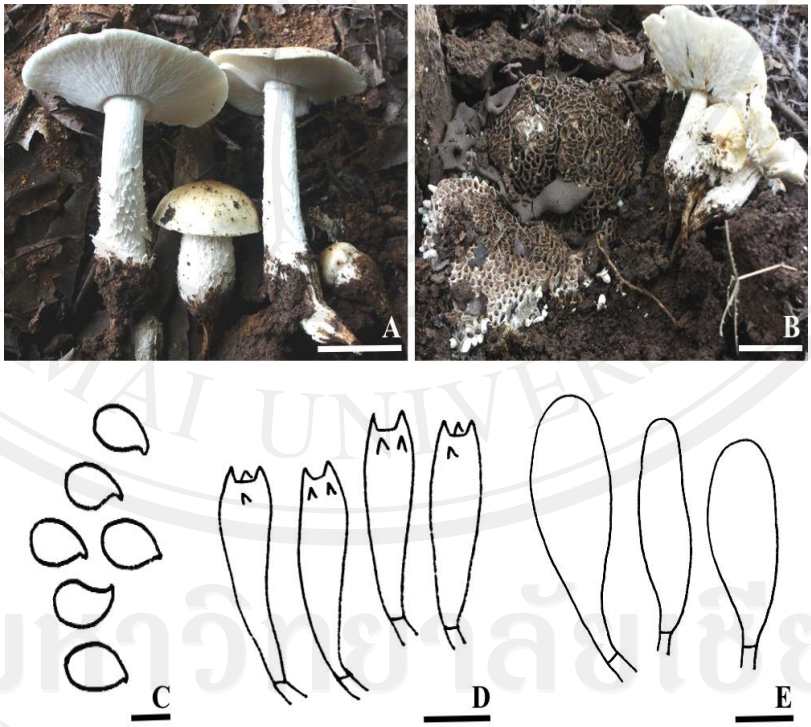


ภาพ 7 *Termitomyces* sp. CMUTM001. A, B สปอโรคาร์ป, C, เบสิดิโอสปอร์, D, เบสิเดีย แล E, ไคโลซิสทิเดีย. บาร์ A = 5 เซนติเมตร; B = 1 เซนติเมตร; C = 5 ไมโครเมตร; D-E = 10 ไมโครเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.2 *Termitomyces* sp. CMUTM002

หมวกเห็ด เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2–7.5 เซนติเมตร โค้งคล้ายครึ่งวงกลมแล้วแผ่นแบนออก มียอดแหลมเล็กน้อยตรงกลางหมวกสีน้ำตาลอ่อน แล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงครีมที่ขอบหมวก ขอบมีขนริ้ว **ครีบ** ไม่ติดก้านจนถึงติดก้านเล็กน้อย ความกว้าง 1.0–4.5 มิลลิเมตร ครีบม้วนเข้าข้างใน เรียงถี่ สีขาวถึงครีม **ก้าน** ขนาด 9.50×10.0–80 เซนติเมตร ทรงกระบอก บางครั้งจะโป่งพองเล็กน้อยตรงบริเวณฐาน เนื้อแข็ง มีขนเกล็ด สีขาวถึงครีม **เยื่อหุ้มดอกอ่อน** บางครั้งอาจพบครบโครงสร้างนี้ชัดเจนห้อยอยู่ใต้หมวกเห็ด ลักษณะเป็นเส้นใยบาง **รากเทียม** ขนาด 3.5–9.0 เซนติเมตร แหลมตรงปลาย **เนื้อ** 1.5–3.0 เซนติเมตร หนา สีขาว**รอยพิมพ์สปอร์** สีชมพูครีม **สปอร์** 3.5–5.0 ×6.0–8.0 ไมโครเมตร รูปร่างกลมรี ผนังบาง สีค่อนข้างอ่อน **เบสิเดีย** 6.0–8.0×17.0–24.0 ไมโครเมตร รูปกระบอง มี 4 สเตอริกมา **ไคโลซิสทิดีย** 6.0–10.0×14.0–28.0 ไมโครเมตร รูปลูกแพร ผนังบาง **พิวโรซิสทิเดีย** 10.0–21.0×16.0–28.0 รูปกลมรีจนถึงรูปลูกแพร (ภาพ 8)

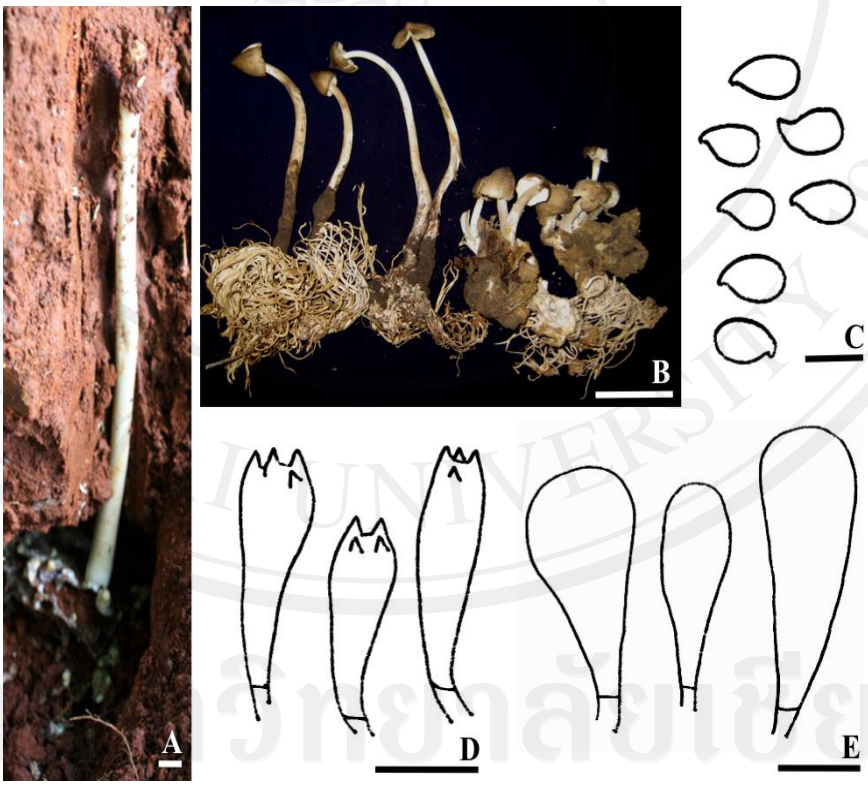


ภาพ 8 *Termitomyces* sp. CMUTM002. A, B, สปอโรคาร์ปในแหล่งอาศัยธรรมชาติ, C, เบสิดิโอสปอร์, D, เบสิเดีย และ E, ไคโลซิสทอเดีย. บาร์ A –B = 5 เซนติเมตร; B = 1 เซนติเมตร; C = 5 ไมโครเมตร; D-E = 10 ไมโครเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.3 *Termitomyces clypeatus* CMUTM003

หมวกเห็ด ขนาด 2.8–3.2 เซนติเมตร ดอกอ่อนโค้งคล้ายระฆังคว่ำ เมื่อแก่ดอกจะแผ่แบน ออกมียอดแหลมอยู่ตรงกลางดอก ทรงร่ม ผิวเรียบ ดอกอ่อนจะมีสีเทาเข้ม จนถึงน้ำตาลเข้ม เมื่อแก่สีจะจางลง ผิวแห้ง และเรียบ ลื่นเหมือนไหม **ครีบ** ไม่ติดก้าน 2.5–4.0 มิลลิเมตร สีขาว เรียงถี่ ขอบเรียบ **ก้าน** ขนาด 0.4–1.5×5.0–15.0 เซนติเมตร ทรงกระบอก ปลายก้านกว้าง เนื้อแข็ง สีขาว ถึงน้ำตาลอ่อน มีขนริ้ว **รากเทียม** ขนาด 5.0–24.0 เซนติเมตร **เนื้อ** 1.0–4.0 มิลลิเมตร จะหนาตรงบริเวณยอดแหลม สีขาว ผิวเรียบ **รอยพิมสปอร์** ชมพูครีม **สปอร์** 3.0–5.0×4.0–5.0 ไมโครเมตร **เบสิเดีย** 4.0–8.0×17.0–26.0 ไมโครเมตร รูปกระบอง มี 4 สเตอริกมา **ไคโลซิสทิดีย** 4.5–7.0×17.0–25.0 ไมโครเมตร รูปรกระบองถึงรูปลูกแพร สีใส ผนังบาง ภายในมีสารแขวนลอยเล็กน้อย **พิวโรซิสทิเดีย** 1.0-21.0× 20.0– 30.0 ไมโครเมตร รูปร่างคล้ายกับไคโลซิสทิเดีย (ภาพ 9)

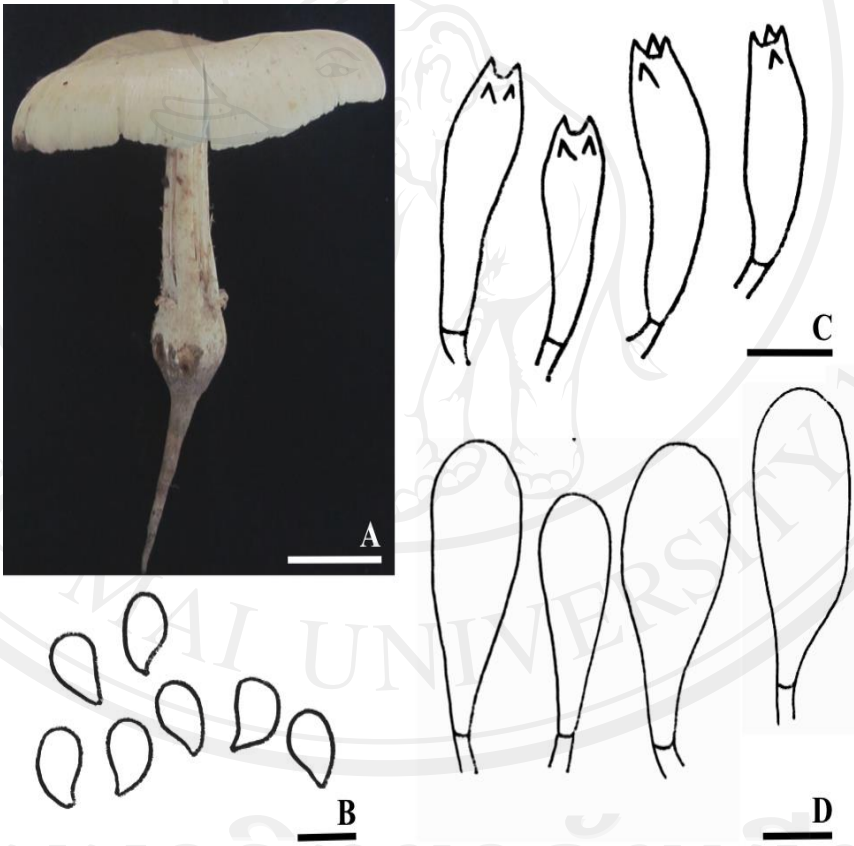


ภาพ 9 *Termitomyces* sp. CMUTM003. A, B, สปอโรคาร์ป, C, เบสิดิโอสปอร์, D, เบสิเดีย และ E, ไคโลซิสทิเดีย. บาร์ A = 1 เซนติเมตร; B = 5 เซนติเมตร; C = 5 ไมโครเมตร; D-E = 10 ไมโครเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.4 *Termitomyces* sp. CMUTM004

หมวกเห็ด 10.0–16.0 เซนติเมตร ดอกอ่อนจะนูน เมื่อแก่จะขยายออก ยอดแหลมเล็กน้อย ผิวเรียบ และแห้ง สีน้ำตาลครีมจนถึงขอบหมวก **ครีบ** 6.0–8.0 มิลลิเมตร ไม่ติดก้าน สีขาวถึงครีม ขอบเรียบ **ก้าน** 6.0–14.0×9.5–16.0 เซนติเมตร ทรงกระบอก กว้างตรงฐาน เนื้อแข็ง ผิวเรียบ สีขาวถึงน้ำตาล มีขนริ้ว **รากเทียม** 3.0–8.5 เซนติเมตร **เนื้อ** 2–4.0 มิลลิเมตร สีขาวถึงครีม **รอยพิมพ์สปอร์** ครีม **สปอร์** 2.5–5.5 ไมโครเมตร รูปไข่ **เบสิเดีย** 8.5×25.5 ไมโครเมตร รูปกระบอง ประกอบด้วย 4 สเตอริกมา **ไคโลซิสทิเดีย** 15.70×35.20 ไมโครเมตร รูปลูกแพร (ภาพ 10)



ภาพ 10 *Termitomyces* sp. CMUTM003. A, สปอโรคาร์ป, B, เบสิดิโอสปอร์, C, เบสิเดีย และD, ไคโลซิสทิเดีย. บาร์ A = 5 เซนติเมตร; B = 5 ไมโครเมตร; C–D = 10 ไมโครเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.5 *Termitomyces* sp. CMUTM005

หมวกเห็ด 0.5–2.5 เซนติเมตร ดอกอ่อนโค้งนูน เมื่อแก่ดอกจะบานแผ่ขยายออก มียอดแหลมตรงกลางหมวกเห็ด ทรงร่ม ผิวสีขาวถึงครีม ขอบมีเส้นขนคล้ายไหม เรียบ **ครีบ** 0.5–1.0 มิลลิเมตร กว้าง ไม่ติดครีบ เรียงถี่ สีขาวอมชมพู **ก้าน** 0.3–0.4×3.0–4.0 เซนติเมตรเมตร เรียว ทรงกระบอก เนื้อแข็ง สีขาว เรียบ มีเส้นขน ก้านสั้น ไม่พบเยื่อหุ้มดอกอ่อน **เนื้อ** 0.5–1.0 เซนติเมตร หนาตรงกลาง สีขาว **รากเทียม** 2.0–3.5 มิลลิเมตร **รอยพิมพ์สปอร์** ครีม **สปอร์** 3.0–5.5×5.0–7.0 ไมโครเมตร รูปไข่ถึงรี สีอ่อน ผนังหนาเล็กน้อย **เบสิเดีย** 6.0–8.0×18.0–26.0 ไมโครเมตร รูปกระบอง ประกอบด้วย 4 สเตอริกมา **ไคโลซิสทิเดีย** 13.0–22.0×24.0–62.0 ไมโครเมตร รูปลูกแพร **พิวโรซิสทิเดีย** ลักษณะคล้ายกับไคโลซิสทิเดีย แต่พบได้น้อย (ภาพ 11)

ภาพ 11 *Termitomyces* sp. CMUTM005. A, สปอโรคาร์ป, B, เบสิดิโอสปอร์, C, เบสิเดีย และ D, ไคโลซิสทิเดีย. บาร์ A = 1 เซนติเมตร; B = 1 เซนติเมตร; B = 5 ไมโครเมตร; C-D = 10 ไมโครเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 การจัดจำแนกเห็ดโคนด้วยเทคนิคอณูวิทยา

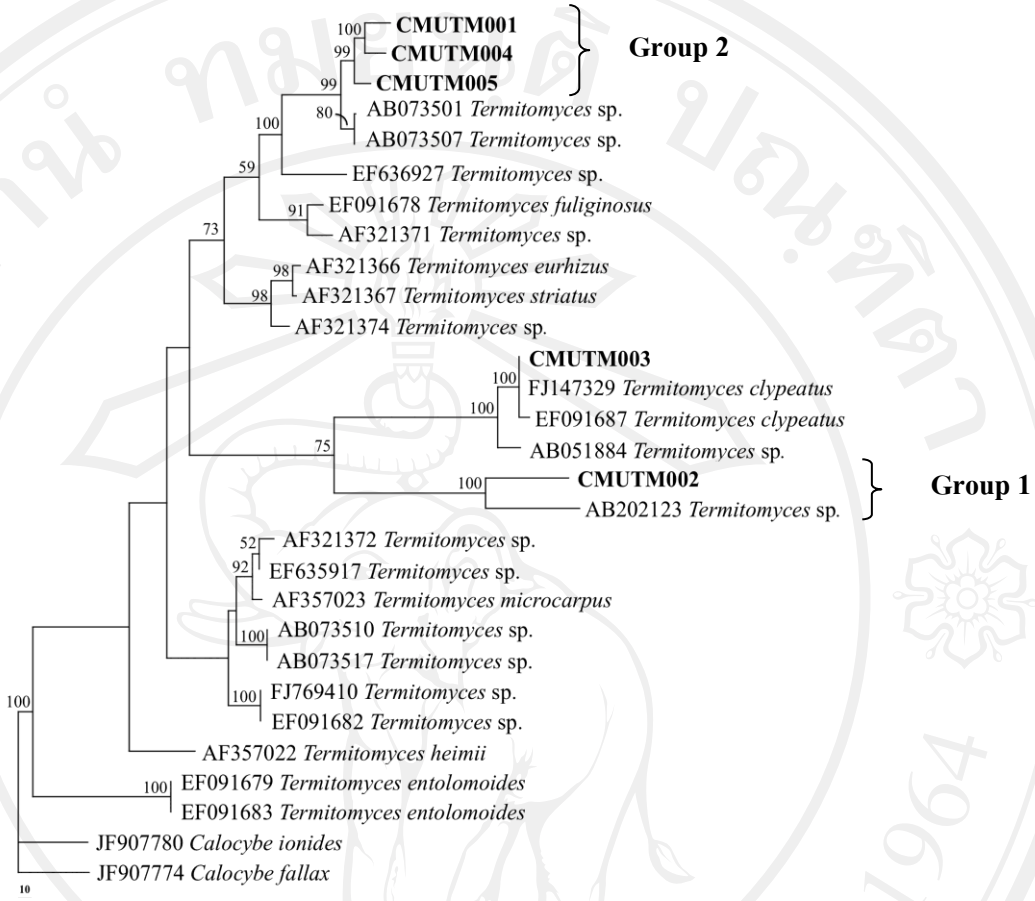
เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาร่วมมาวิเคราะห์กับลำดับเบสเชื้ออื่นๆ ที่มีความคล้ายคลึงกันจากฐานข้อมูล (ตาราง 10) เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดกลุ่มนี้ โดยใช้ *Calocybe ionides* และ *C. fallax* เป็น out group การปรับแต่งผลการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม sequencherในการเปรียบเทียบลำเบสของเห็ดโคนเบื้องต้นใช้โปรแกรม CRUSTAL X (Thomson *et al*., 1997) ในการทำ multiple aligment และใช้โปรแกรม PUAP beta 10 software version 4.0 (Swofford, 1999) จำนวนคาแรกเตอร์ทั้งหมดวิเคราะห์แบบ maximum parsimony เท่ากับ 788 คาแรกเตอร์ ค่า CI เท่ากับ 0.6984 ค่า RI เท่ากับ 0.7597 ค่า RC เท่ากับ 0.5305 ค่า HI เท่ากับ 0.3015 และค่าความยาว tree เท่ากับ 1,094 ขั้นตอน ในการวิเคราะห์ซึ่งให้ผลดังแสดงในภาพ 12 เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ที่มีความใกล้ชิดกันของเห็ดโคนไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้กับเชื้อราอื่นๆ ในฐานข้อมูลที่เลือกมาทำการวิเคราะห์ครั้งนี้ จะเห็นได้ว่าเชื้อเห็ดโคนไอโซเลท *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM004 และ CMUTM005 มีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 96, 99 และ 93 เปอร์เซ็นต์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเห็ดโคนสายพันธุ์ *Termitomyces* sp. AB073501 ไอโซเลท*Termitomyces* sp. CMUTM002 แสดงค่าความคล้ายคลึง 91เปอร์เซ็นต์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Termitomyces* sp. AB202123 และไอโซเลท CMUTM003 แสดงค่าความคล้ายคลึง 99% มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Termitomyces clypeatus* AB073501 แสดงค่า bootstrap 100 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 10 ค่าความเหมือนจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดโคนไอโซเลทต่างๆ กับข้อมูลลำดับเบสของเห็ด (National center for Biotechnology Information)

ไอโซเลท	Max identify	ฐานข้อมูลที่มีความใกล้เคียงกัน	รหัสข้อมูล	ขนาดคู่เบส (bp)
1. *Termitomyces* sp. CMUTM001	96	*Termitomyces* sp Group 2	AB073501	619
2. *Termitomyces* sp. CMUTM002	91	*Termitomyces* sp.	AB202123	998
3. *Termitomyces* sp. CMUTM003	99	*Termitomyces clypeatus*	FJ147329	571
4. *Termitomyces* sp. CMUTM004	96	*Termitomyces* sp. Group 2	AB073501	644
5. *Termitomyces* sp. CMUTM005	99	*Termitomyces* sp. Group 2	AB073501	680

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 12 Maximum-parsimonious trees แสดงความสัมพันธ์□ทางพันธุกรรมของเห็ดโคน และเชื้อรานอกกลุ่มที่ได□จากลำดับเบสในบริเวณ internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene และ internal transcribed spacer 2 sequence คาแรกเตอร์ที่ใช้วิเคราะห์ทั้งหมด 788 คาแรกเตอร์เป็นคาแรกเตอร์ที่เหมือนกันในทุกแทกซา (constant characters) 316 คาแรกเตอร์ เป็นคาแรกเตอร์ที่มีความแปรผันในแต่ละแทกซา (variable character) 127 คาแรกเตอร์ จำนวนคาแรกเตอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์ (informative characters) 345 คาแรกเตอร์ ค่า consistency index (CI) เท่ากับ 0.6984 ค่า retension index (RI) เท่ากับ 0.7597 ค่า rescaled consistency index (RC) เท่ากับ 0.5305 และค่า homoplasy index (HI) เท่ากับ 0.3015 กำหนด *Calocybe ionides* และ *C. fallax* เป็น out group ตัวเลขบนแต่ละเคลดแสดงค่า bootstrap ค่าความเชื่อมั่น ≥ 50 เปอร์เซ็นต์ (ค่า bootstrap ที่ < 50 เปอร์เซ็นต์ ไม่ได้แสดงไว้ในสายสัมพันธ์วิวัฒนาการนี้) โดยเลขที่กำกับบนแขนงของ tree จะบ่งชี้ถึงระดับของ bootstrap support (เปอร์เซ็นต์) ส□วน scale bar จะบ□งชี้ถึงปริมาณที่ถูกแทนที่ต□อ 1 ตำแหน□งนิวคลีโอไทด□ซึ่งมีค□าเท□ากับ 1

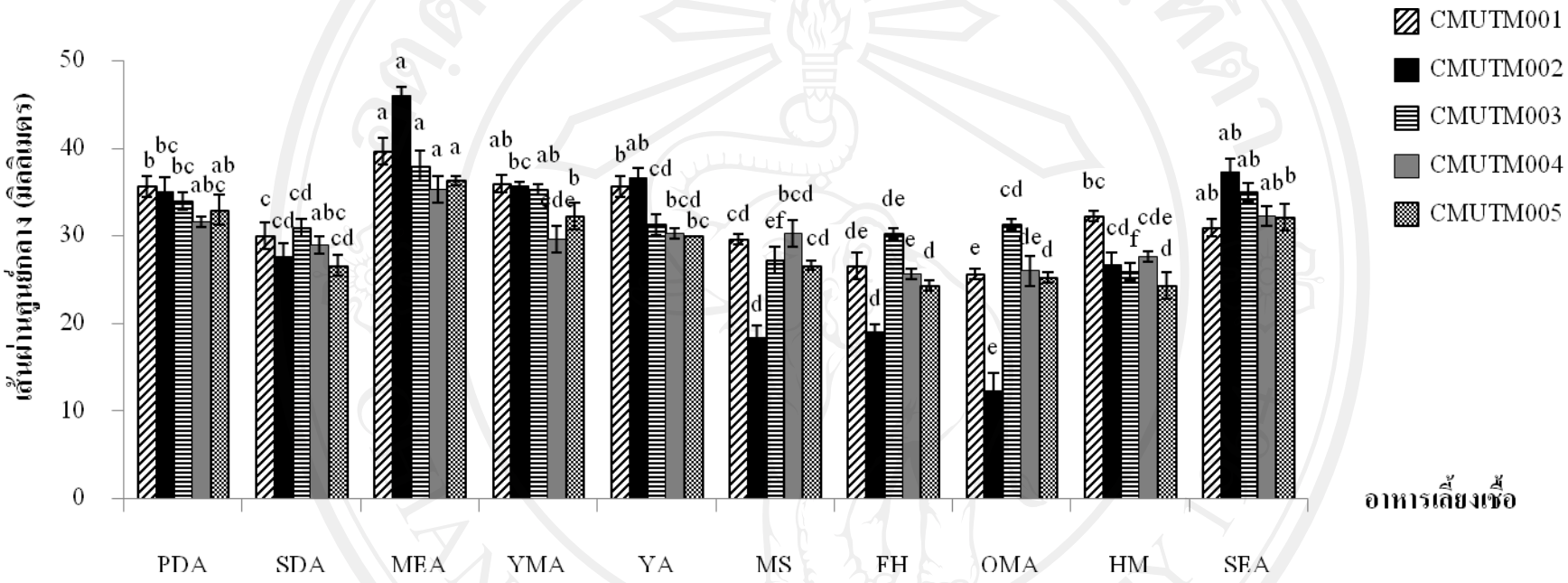
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5 ผลการศึกษาอาหารชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

การศึกษาผลของการเจริญเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 ชนิด ได้แก่ PDA, Sabouraud agar, malt extract agar, yeast extract malt extract agar, yeast extract agar, Murashige and Skoog medium, fungal host agar, Hagem medium และ soil extract agar ในจานเพาะเลี้ยงเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 30 วัน ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกๆ 3 วัน จากนั้นนำเส้นใยบริสุทธิ์ของเชื้อทั้ง 5 ชนิดที่ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำเส้นใยที่อบแห้งไปชั่งน้ำหนักแห้ง

จากการทดลองเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใย และชั่งน้ำหนักแห้งของเห็ดโคนทั้ง 5 สายพันธุ์ ลักษณะเส้นใยที่เจริญบนผิวอาหารของเห็ดโคนทั้ง 5 สายพันธุ์ สีขาว ลักษณะการเจริญบนผิวหน้าอาหาร 10 ชนิดคล้ายคลึงกัน พบว่าเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดโคนทั้ง 5 สายพันธุ์เจริญได้ดีบนอาหาร malt extract agar อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 13 และ 14) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 34.67±1.53, 46.00±1.00, 38.00±1.73, 35.33±1.53 และ36.33±0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ น้ำหนักแห้งที่ชั่งได้เท่ากับ 50.57±1.65, 60.60±6.93, 43.47±1.70, 46.17±1.68 และ 54.53±1.44 มิลลิกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

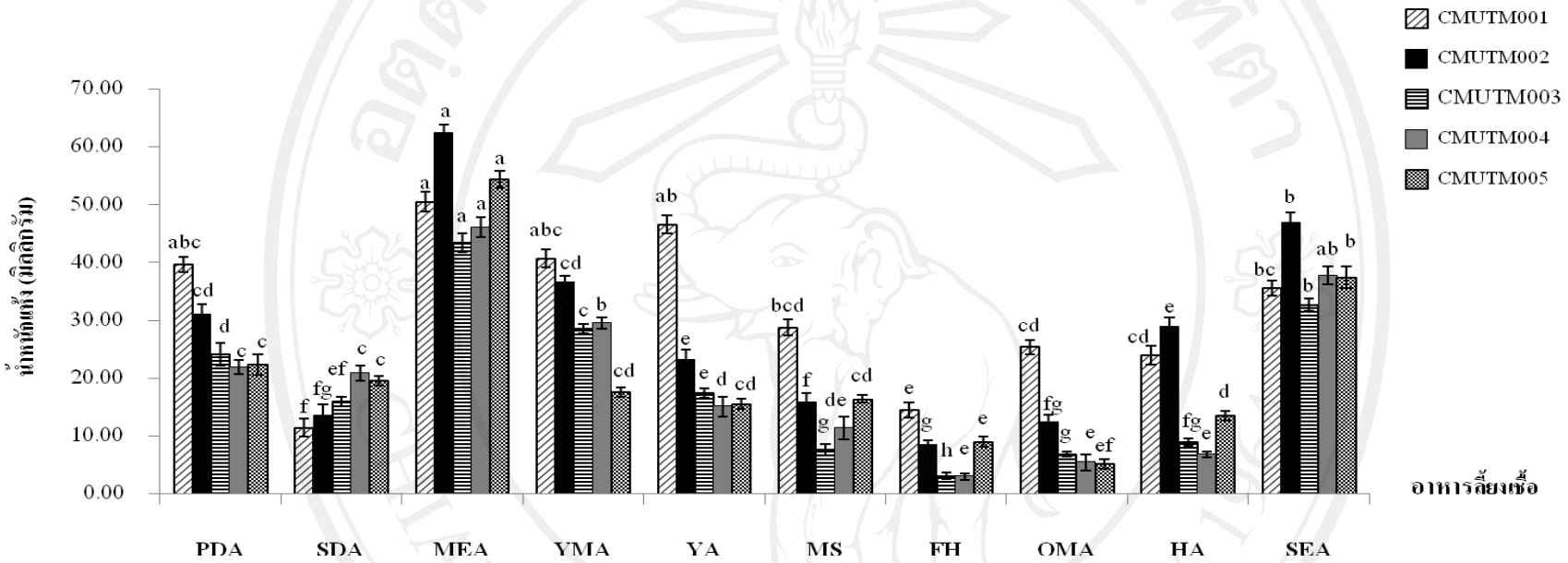


ภาพ 13 อัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหารวุ้นชนิดต่างๆ บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ PDA = potato dextrose agar , SDA = modified Sabouraud agar, MEA = malt-extract agar, YMA = yeast extract malt extract agar, YA = yeast extract agar, MS = Murashige and Skook medium (MS), FH = fungal host medium, OMA = oat meal agar, Hagem medium และ SEA = soil extract agar

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P<0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 14 อัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* (น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)) บนอาหารวุ้นชนิดต่างๆ บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ PDA = potato dextrose agar , SDA = modified Sabouraud agar, MEA = malt extract agar, YMA = yeast extract malt-extract agar, YA = yeast extract agar, MS = Murashige and Skook medium (MS), FH = fungal host medium, OMA = oat meal agar, HM = Hagem medium และ SEA = soil extract agar

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P<0.05$

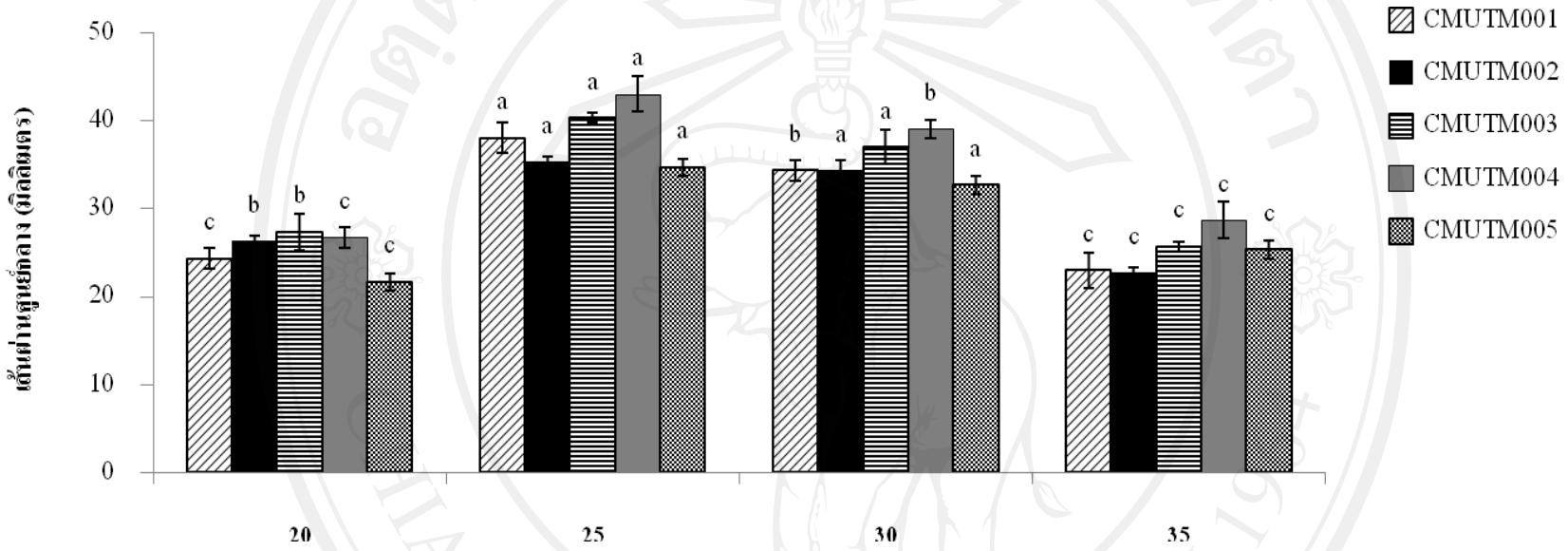
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคน

จากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง และน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดโคน 5 ไอโซเลทที่เจริญบนอาหาร MEA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ในตู้บ่ม (ภาพ 15 และ 16) พบว่าเส้นใยเห็ดโคนทุกไอโซเลทเจริญบนอาหารที่บ่มในอุณหภูมิที่ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เส้นใยทุกไอโซเลทไม่สามารถเจริญได้บนในอาหารที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส การเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

Termitomyces sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* อุณหภูมิที่เส้นใยเห็ดโคนเจริญได้ดีที่สุด คือ 25 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 51.43±1.16, 37.60±1.18, 49.77±1.55, 46.93±1.42 และ 44.90±1.32 มิลลิกรัม และความเส้นผ่านศูนย์กลางที่วัดได้เท่ากับ 38.00±1.73, 40.33±0.58, 43.00±0.58, 43.00±2.00 และ34.67±1.53 มิลลิเมตร เส้นเห็ดโคนเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดโคนคือ 25 และ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เส้นใยเห็ดโคนไม่สามารถเจริญได้คือ 40 และ 45 องศาเซลเซียส

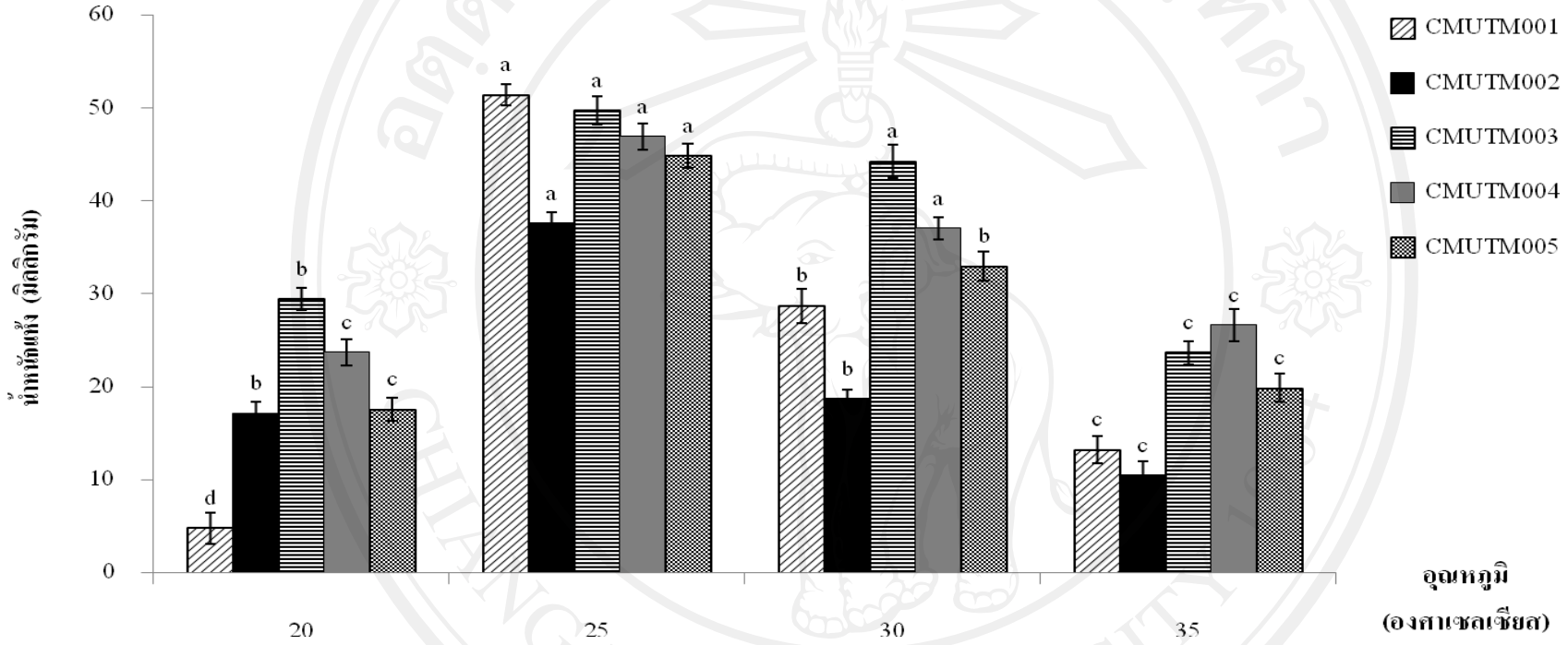
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 15 เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร malt extract agar บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P<0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 16 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร malt extract agar บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P<0.05$

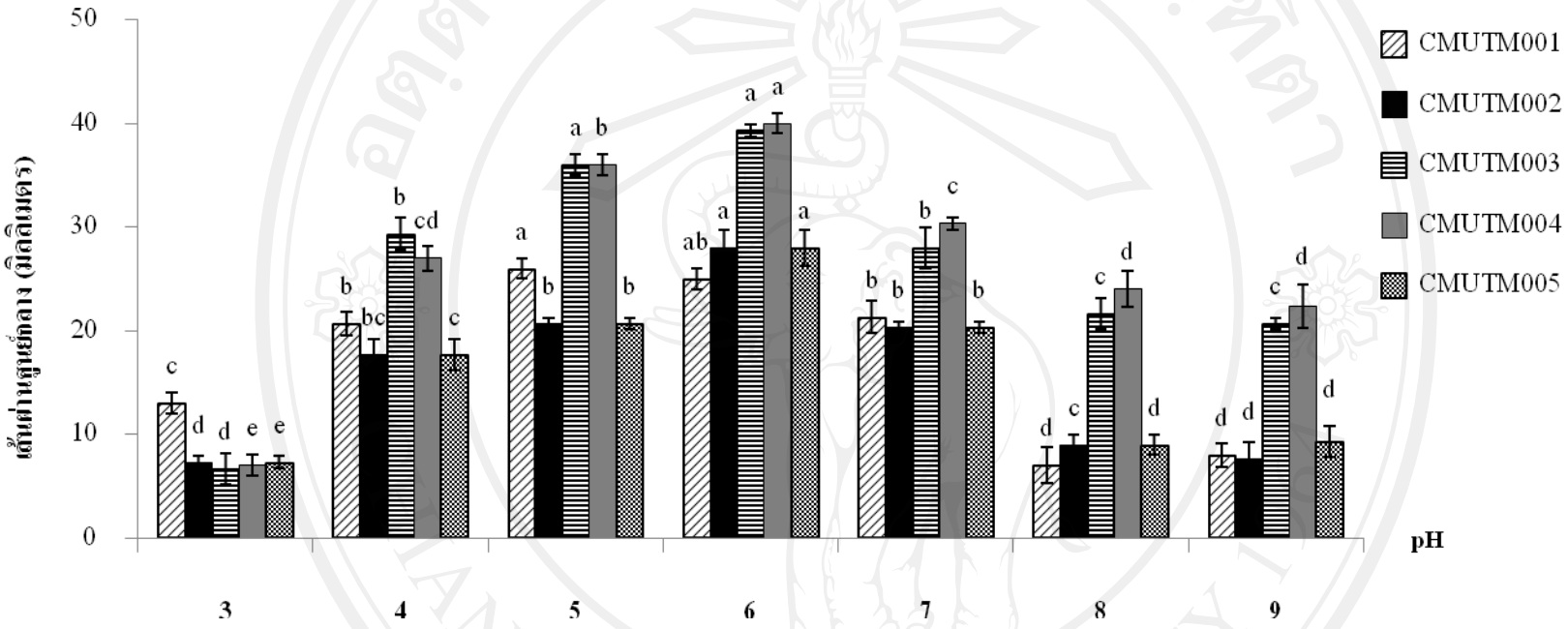
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.7 การศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคน

จากการศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน (*Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* CMUTM003) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ปริมาตร 20 มิลลิลิตรในจานเพาะเลี้ยง ที่ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ในที่มืด วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดโคนเห็ดโคน พบว่าเห็ดโคนทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้บน pH ระหว่าง 3-9 (ภาพ 17 และ18) เส้นใยเห็ดโคนไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มี pH 2

เส้นใยเจริญได้ดีสุดบน pH เท่ากับ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 17 และ18) โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 25.00±1.00, 28.00±1.73, 39.33±0.58, 40.00±1.00 และ 28.00±1.73 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 27.97±1.63, 43.13±1.06, 62.7±1.17, 45.40±1.37 และ 68.30±1.85 มิลลิกรัม

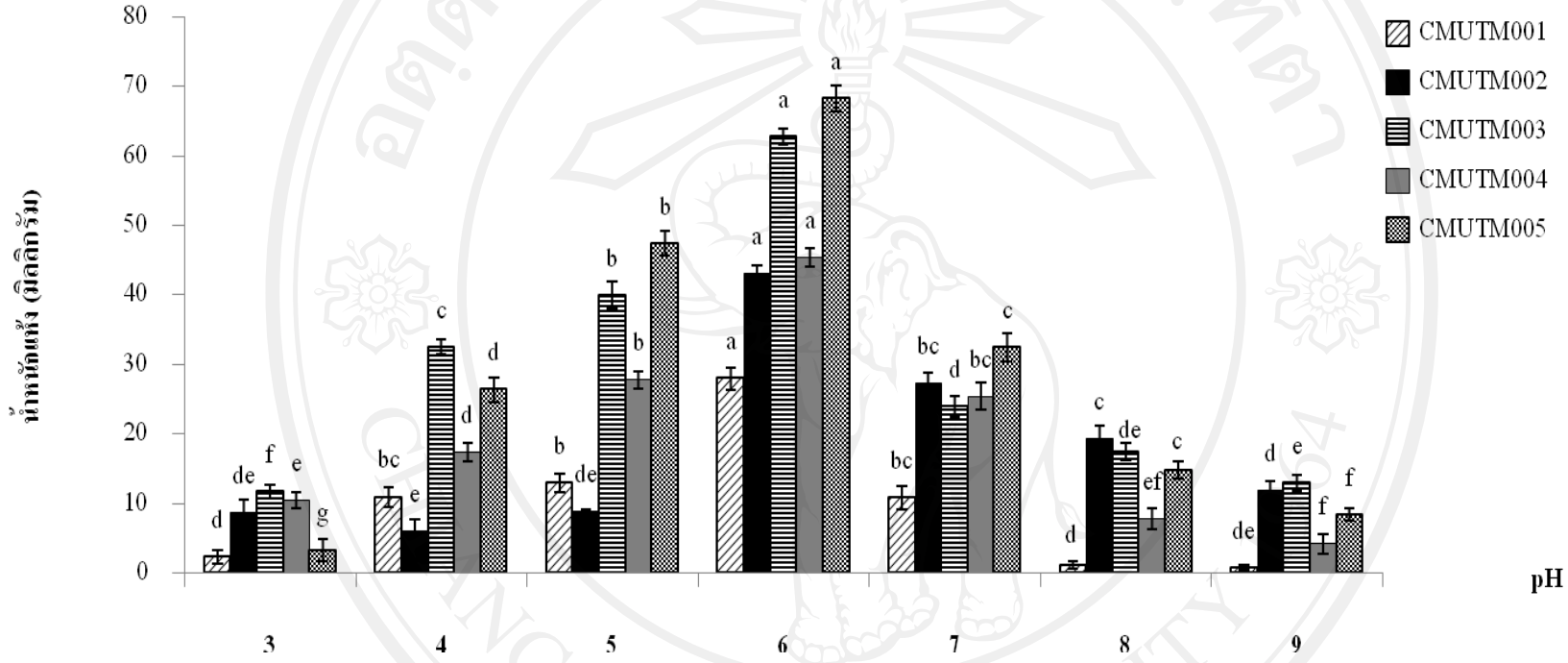
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 17 เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร malt extract agar ที่มีค่า pH ต่าง ๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P<0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 18 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร malt extract agar ที่มีค่า pH ต่างๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P<0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.8 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดโคนทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ sucrose, fructose, glucose, maoltose, manitol, starch และ xylose เลี้ยงเส้นใยเห็ดโคนบนอาหาร basal medium เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ลงไป จากนั้นวางแผ่นเซลโลเฟนบนผิวหน้าอาหาร วางชิ้นวุ้นขนาด 0.5 เซนติเมตร ใช้พาราฟิล์มพันรอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด 30 วัน วัดการเจริญโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางทุกๆ 3 วัน เมื่อครบ 30 วัน นำเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ชั่งน้ำหนักแห้งของเส้นใยที่ได้ ผลการทดลองขนาดเส้นผ่านเส้นผ่านศูนย์กลาง และน้ำหนักแห้งที่ได้ (ภาพ 19 และ20)

เห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001 และ CMUTM002 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มี sucrose เป็นองค์ประกอบ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 53.33±2.08 และ 51.67±1.53 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนังแห้งที่ได้เท่าได้ 66.90±1.65 และ 51.10±1.53 มิลลิกรัม ตามลำดับ แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แหล่งคาร์บอนที่เจริญได้ดีรองลงมาคือ fructose และ glucose ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 38.33±1.53 และ 34.00±1.00 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ได้เท่าได้ 44.10±1.75 และ 16.47±1.46 มิลลิกรัม และเส้นใยเจริญได้ช้าบนอาหารที่มี manitol, starch และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอน บนอาหารที่มี manitol เป็นแหล่งคาร์บอน ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 18.00±1.00 และ 22.67±1.53 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 4.03±0.71 และ 2.87±1.46 มิลลิกรัม starch ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 17.67±2.08 และ 17.33±0.58 mm ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ได้เท่าได้ 2.23±0.91 และ 2.43±1.12 มิลลิกรัม xylose ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 21.00±1.00 และ 18.33±1.15 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ได้เท่าได้ 3.09±2.07 และ 1.87±0.38 มิลลิกรัม

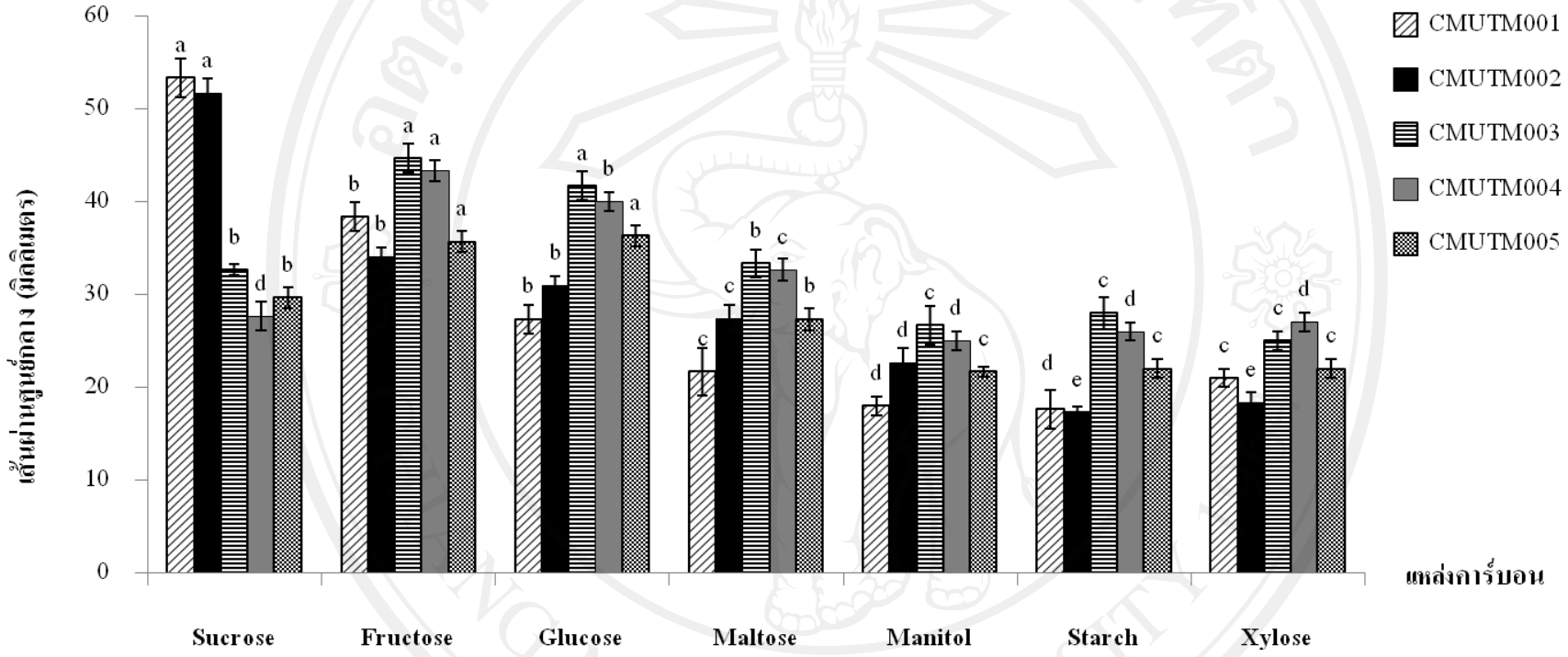
Termitomyces sp. CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* เจริญได้ดีบน basal medium ที่มี fructose และ glucose เป็นแหล่งคาร์บอน *T. clypeatus* และ *Termitomyces* sp. CMUTM004 เจริญได้ดีบนอาหาร basal medium ที่มี fructose เป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญ ตาราง 22 และ 23 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 44.67±1.53 และ 43.33±1.15 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 69.10±1.85 และ 45.53 มิลลิกรัม แหล่งคาร์บอนที่เจริญได้ดีรองลงมาคือ glucose ค่าเฉลี่ย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 41.67±1.53 และ 40.00±1.00 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 55.50±1.43 และ 39.77±1.27 มิลลิกรัม maltose ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 33.33±1.53 และ 32.67±1.15 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 36.33±1.70 และ 35.07±1.36 มิลลิกรัม sucrose ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 32.67±0.58 และ27.67±1.53 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 13.63±1.00 และ 15.97±1.45 มิลลิกรัม xylose ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 25.00±1.00 และ 27.00±1.00 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 26.93±1.84 1และ17.27±1.41 มิลลิกรัม และ starch ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 28.00±1.73 และ 26.00±1.00 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 9.37±1.31 และ 7.33±1.85 มิลลิกรัม

Termitomyces sp. CMUTM005 เจริญได้ดีบนอาหารที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 19 และ 20) ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 36.33 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 33.33 มิลลิกรัม แหล่งคาร์บอนที่เจริญดีรองลงมาคือ fructose ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 35.67±1.53 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 23.47 มิลลิกรัม และเส้นใยสามารถเจริญบนอาหารที่มี sucrose, maltose, manitol, starch และ xylose ตามลำดับเป็นแหล่งคาร์บอนค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 29.67±2.08, 27.33±1.15, 21.67±0.58 และ 22.00±1.00 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 25.93±1.70, 17.87±1.60, 6.83±2.01 และ 6.13±1.56 มิลลิกรัม

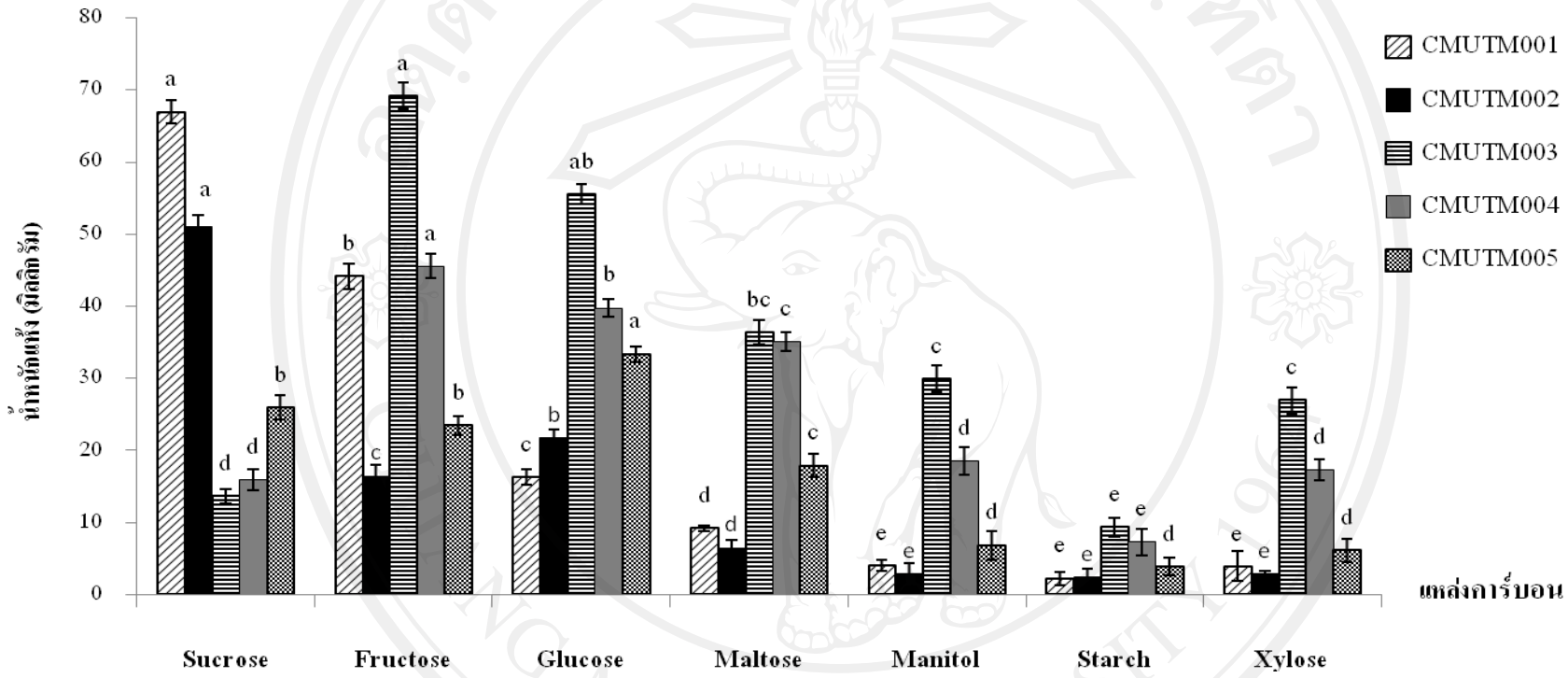
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 19 เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร basal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P<0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 20 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร basal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P<0.05$

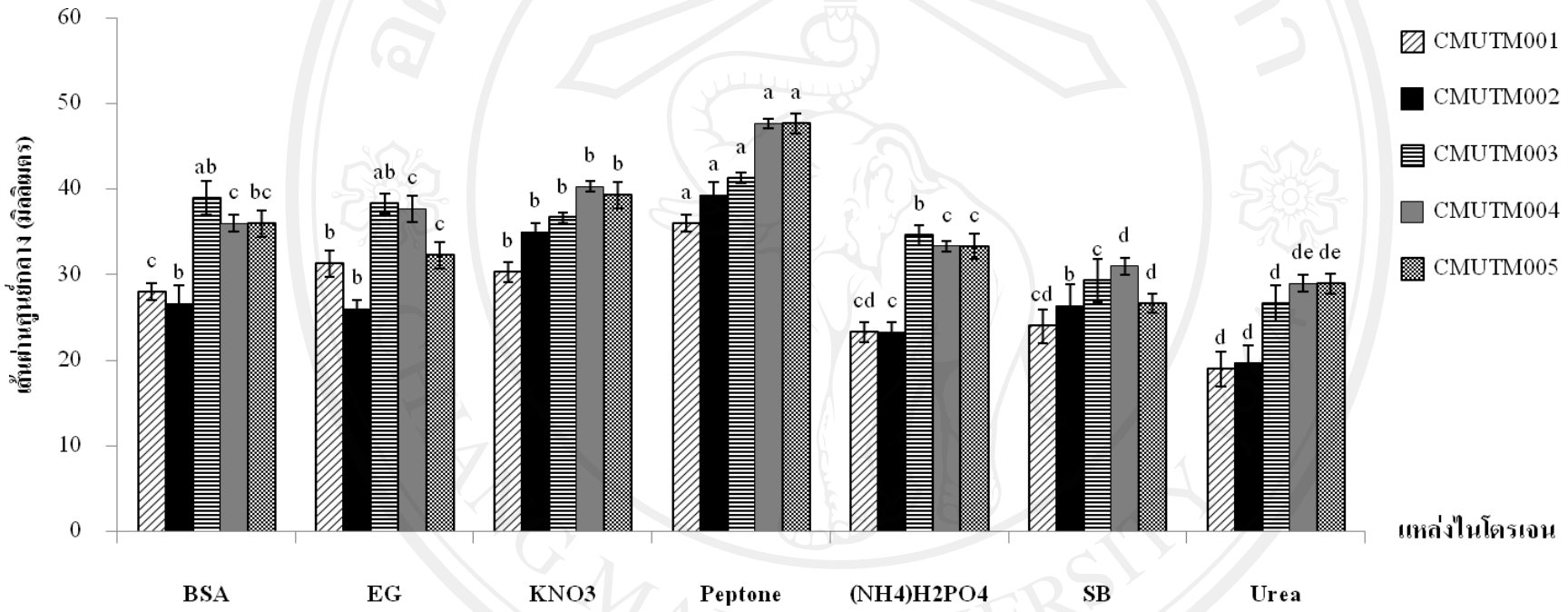
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.9 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน

ผลการทดลองแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM003, CMUTM004 และ CMUTM005 บนอาหาร basal medium เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ egg albumin, peptone, , KNO_3, $(NH_4)H_2PO_4$, soybean meal และ urea แสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เส้นใยที่วัดได้ เส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคนทุกสายพันธุ์เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น peptone (ภาพ 21) ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 36.00±1.00, 39.33±1.53, 41.33±0.58, 47.67±0.58 และ 41.33±1.15 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 51.00±1.61, 45.63±2.00, 64.73±1.62, 53.20±1.83 และ 48.60±1.38 มิลลิกรัม (ภาพ 21 และ22)

แหล่งคาร์บอนที่เจริญได้ดีรองลงมาคือ KNO_3 และ egg albumin ผลการทดลองภาพ 25 KNO_3 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 30.33±1.15, 35.00±1.00, 36.67±0.58, 40.33±0.58 และ 39.33±1.53 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยเท่ากับ 32.20±1.08, 25.30±1.97, 51.37±2.05, 44.33±2.21 และ 32.20±1.61 มิลลิกรัม egg albumin มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยเท่ากับ 31.33±1.53, 26.00±1.00, 38.33±1.15, 37.67±1.53 และ 32.33±1.53 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเส้นใยเท่ากับ 33.13±1.30, 26.93±1.66, 41.43±1.15, 36.27±2.14 และ 33.13±1.30 มิลลิกรัม

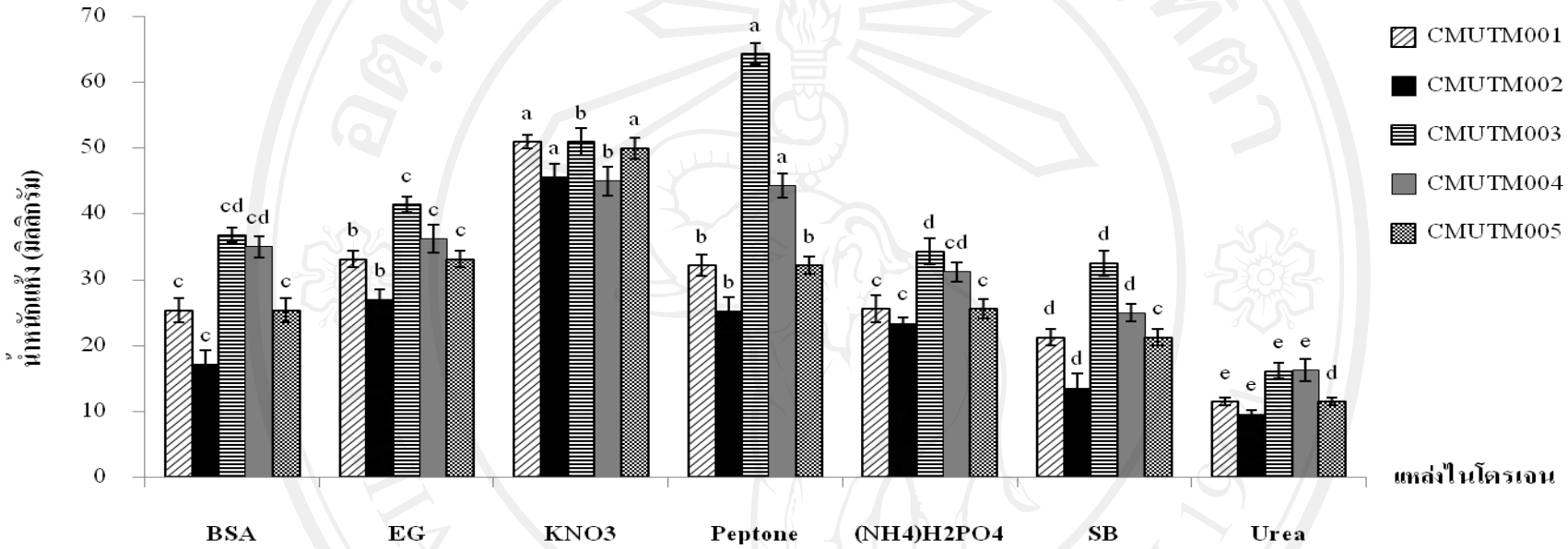
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 21 เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร basal medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 อุณหภูมิ เป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P<0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 22 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* บนอาหาร basal medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P<0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

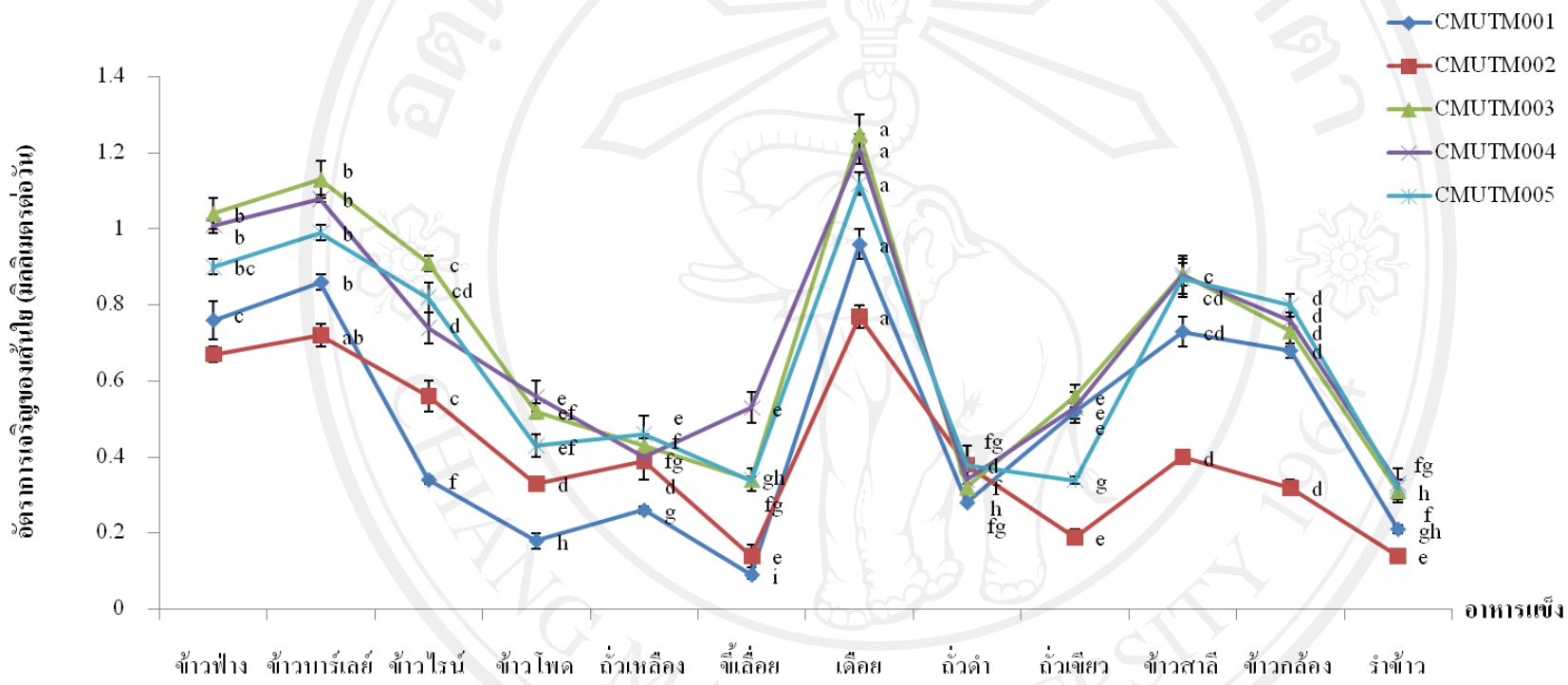
4.10 ผลการทดลองการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน 5 สายพันธุ์บนวัสดุอาหารแข็งชนิดต่างๆ

การศึกษาผลการเจริญเส้นใยเห็ดโคนบริสุทธิ์บนวัสดุอาหารแข็ง 2 ประเภท ได้แก่ เมล็ดธัญพืชและเศษวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร ประกอบไปด้วย ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรน์ ข้าวโพด ถั่วเหลือง ขี้เลื่อย เดือย ถั่วดำ ถั่วเขียว ข้าวสาลี ข้าวกล้อง และรำข้าว ในหลอดทดลองขนาด 18 × 100 เซนติเมตร บรรจุวัสดุอาหารแข็งชนิดต่างที่ความสูง 10 เซนติเมตร วางชิ้นส่วนของเส้นใยเห็ดขนาด 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้นบนอาหารแข็งที่ต้องการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วันในที่มืด วัดความยาวของเส้นใยทุกๆ 5 วัน โดยวิธี linear line นำค่าที่วัดได้ไปหารด้วยจำนวนระยะเวลาที่ทำการทดลองจะได้ค่าการเจริญของเส้นใยในแต่ละวัน

เส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคน 5 สายพันธุ์เจริญสามารถเจริญบนวัสดุอาหารแข็งได้ทุกชนิดสร้างเส้นใยสีขาวปกคลุมบนวัสดุอาหารแข็ง และเจริญได้ดีที่สุดบนเดือยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.96±0.04, 0.77±0.03, 1.25±0.05, 1.21±0.04 และ 1.12±0.03 มิลลิเมตรต่อวัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุอาหารชนิดอื่น วัสดุอาหารแข็งที่เส้นใยเห็ดโคน 5 สายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีรองลงมา คือ ข้าวบาร์เลย์ อัตราการเจริญเท่ากับ 0.86±0.02, 0.72±0.03, 1.13±0.05, 1.08±0.01 และ 0.99±0.02 มิลลิเมตรต่อวัน (ภาพ 23)

ลักษณะการสร้างเส้นใยปกคลุมบนอาหารแข็งแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่เส้นใยเห็ดโคนเจริญได้ดี ได้แก่ เดือย ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ข้าวไรน์ และข้าวกล้อง ลักษณะเส้นใยอัดแน่นบนเมล็ดธัญพืช และช่องว่างภายในหลอดทดลอง ส่วนในกลุ่มธัญพืชที่เป็น ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วดำ ข้าวโพด และข้าวกล้อง การสร้างเส้นใยมีลักษณะค่อนข้างบาง การอัดตัวกันของเส้นใยน้อยกว่ากลุ่มแรก อัตราการเจริญของเส้นใยบนเศษวัสดุทางการเกษตร ได้แก่ ขี้เลื่อย และรำข้าว เส้นใยมีอัตราการเจริญได้น้อย อัตราการอัดตัวบนวัสดุอาหารมีน้อยที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 23 อัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* ในอาหารแข็งชนิดต่างๆ (มิลลิเมตรต่อวัน)) บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน

หมายเหตุ: ตัวอักษรพิมพ์เล็กบนแต่ละแท่งของกราฟแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Turkey's test อย่างมีนัยสำคัญของแต่ละการทดลองที่ $P<0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการรวบรวมเก็บตัวอย่างรังปลวก และตัวอย่างเห็ดโคนในเขตพื้นที่ เก็บตัวอย่างเห็ดโคนในป่าธรรมชาติ และป่าสักบนพื้นที่ปลูก 3 จังหวัดได้แก่ อำเภอสันทราย และอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอภูซาง จังหวัดพะเยา และ อำเภอชนแดน จังหวัดเพชรบูรณ์ เมื่อพิจารณาตัวอย่างที่เก็บได้พบว่า ตัวอย่างดอกเห็ดโคนที่เก็บพบว่า ส่วนใหญ่ที่เก็บได้เจริญอยู่บนพื้นดินที่มีซากใบไม้ทับถมกัน บางชนิดขึ้นอยู่บนรังปลวก รังปลวก และตัวอย่างแต่ละชนิดต้องการความชื้นและแสงสว่างในปริมาณที่เหมาะสม ที่สำคัญที่ช่วยกระตุ้นการเจริญของเส้นใยผ่านชั้นดิน และบนเศษวัสดุที่ปกคลุมดิน (Srivasava *et al.,* 2011) เห็ดโคนจะเจริญได้ดีในช่วงฤดูฝน เห็ดโคนส่วนใหญ่ในภาคเหนือเริ่มออกในช่วงเดือนพฤษภาคมเป็นต้นไป ส่วนเห็ดโคนในภาคกลาง ได้แก่ อำเภอชนแดน จังหวัดเพชรบูรณ์ เริ่มออกในช่วงปลายเดือนกรกฎาคม หลังจากช่วงเทศกาลเข้าพรรษา ลักษณะพื้นที่เก็บตัวอย่างทั้งหมดในจากการพิจารณาสภาพทางภูมิศาสตร์พบว่าสภาพป่าบริเวณดอยปุย อำเภอเมือง ป่าชุมชน หมู่บ้านโปง อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอภูซาง จังหวัดพะเยา เป็นบริเวณที่มีความชื้นปานกลาง จนถึงความชื้นสูง ยอดไม้ไม่หนาทึบ จนเกินไป เป็นพื้นที่มีแสงสว่างส่องลงมาจนถึงพื้นล่าง บริเวณพื้นล่างมีเศษอินทรียวัตถุพวกเศษใบไม้ทับถมกันเป็นจำนวนมาก จึงทำให้พื้นที่เกิดความอุดมสมบูรณ์ ป่าสักในแปลงผาทอง และแปลงเขาชะโงก อำเภอชนแดน จังหวัดเพชรบูรณ์ เป็นพื้นที่ป่าที่มีการปลูกสักเพื่อจำหน่าย ภายในแต่ละแปลงมีการจัดระบบการจัดการที่ดี ให้ปุ๋ยขี้ไก่แก่ต้นกล้าสักปีละ 2 ครั้ง ทำการตัดแต่งกิ่งต้นสักไม่ให้รกเกินไป และให้แสงสว่างส่องลงในแปลงอย่างทั่วถึง จากนั้นมีการไถกลบเศษกิ่งไม้ ใบไม้ เพื่อเป็นปุ๋ยให้แก่ดิน จึงทำให้ภายในพื้นที่แปลงสักแต่ละแปลงมีความอุดมสมบูรณ์ไปด้วยแหล่งอาหาร มีปลวกสร้างรังในพื้นที่เพาะปลูกอย่างแพร่หลาย และเป็นตัวชักนำให้เกิดเห็ดโคน จะเห็นได้ว่าการเกิดเห็ดโคนในแต่ละพื้นที่มีปัจจัยของแสงสว่าง ความชื้น และที่ตั้งเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้อง (Koné *et al.,* 2011) และการย่อยสลายเศษซากใบไม้ และกิ่งไม้ยังส่งผลให้ต้นสักเจริญได้ดี ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์ (Watanabe *et al.,* 2010) จากการนำตัวอย่างมาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร พบว่าแยกเชื้อเห็ดได้ 5 ไอโซเลท ด้วยวิธีการ tissue culture แยกตรงบริเวณเนื้อเยื่อภายในของดอกเห็ดได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื้อเยื่อภายในตรงส่วนก้าน และส่วนครีบ (Tibuhwa, 2012; Sawhasan *et al.,* 2012) นำเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทเป็นตัวแทนในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย

การบ่งชี้อวิทยาศาสตร์ของตัวอย่างเห็ดได้ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา และข้อมูลทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกชนิดของเห็ด เนื่องจากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำได้ค่อนข้างยาก ข้อมูลสัณฐานของเห็ดมีความใกล้เคียงกัน เมื่อนำข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาเห็ดโคนที่บันทึกได้เปรียบเทียบกับข้อมูลสัณฐานวิทยาของ Heim (1977), Pegler and Vanhecke (1994) และพิชญางกูร (2547) พบว่า *Termitomyces* sp. CMUTM001 มีลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกับกับ *T. eurhizus* (syn. *albiceps*) แตกต่างกันตรงขนาดเบสิเดียและสปอร์ (Pegler and Vanhecke, 1994, Tang *et al*., 2006) *Termitomyces* sp. CMUTM002 ข้อมูลลักษณะสัณฐานมีความคล้ายคลึงกับเห็ดโคน *T. cylindricus* (syn. *aurantiacus*) ความแตกต่างคือ CMUTM002 มีขนาดของก้านกว้างกว่า (Pegler and Vanhecke, 1994, Tang *et al*., 2006) *Termitomyces* sp. CMUTM003 ข้อมูลลักษณะสัณฐานมีความคล้ายกับเห็ดโคน *T. clypeatus* ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Heim (1977), Pegler and Vanhecke (1994) และ Tang *et al* (2006) ลักษณะเด่นของเห็ดกลุ่มนี้คือ ดอกอ่อนมีลักษณะกรวยปลายค่อนข้างแหลม และยาว *Termitomyces* sp. CMUTM004 ข้อมูลลักษณะสัณฐานมีความคล้ายกับเห็ดโคน *T. unkowann* และ *T. robustus* แตกต่างกันขนาดของสปอร์ (Heim, 1977, Wei *et al*., 2004) *Termitomyces* sp. CMUTM005 ข้อมูลลักษณะสัณฐานมีความคล้ายคลึงกับเห็ดโคน *T. microcarpus* แตกต่างกันตรงสีของรอยพิมพ์สปอร์ *T. microcarpus* มีสีชมพู

ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในการจำแนกตัวอย่างนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล การทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS 5 ซึ่งมีความจำเพาะกับบริเวณที่ conserve ของเชื้อรา ผลจากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูลพบว่า *Termitomyces* sp. CMUTM003 มีความคล้ายคลึงกับ *T. clypeatus* AB073501 โดยมีค่า bootstrap 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 4 ไอโซเลท คือ *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004 และ CMUTM005 ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ โดยใช้การจัดจำแนกเพียงเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลเพื่อดูความคล้ายคลึงกันเท่านั้น คงต้องมีการศึกษาลักษณะในการเจริญ และสัณฐานวิทยาจากตัวอย่างใน herbarium อื่นๆ ต่อไป ในงานวิจัยได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ด ได้ทำการศึกษาอาหาร อุณหภูมิpH แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม สภาวะที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน 10 ชนิด พบว่า MEA, PDA, YA, YMA และ SEA เป็นอาหารที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนทั้ง 5 ไอโซเลทมากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ พบว่า MEA และ PDA เป็นอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมกับการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน ซึ่งสอดคล้องกับ Tibuhwa (2012) และ Sawhasan *et al.* (2012) ได้เลือกอาหารสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิดนี้มาใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ และศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน ใน MEA อาจมีแหล่งสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเห็ดโคน เช่น peptone นอกจากนี้เห็ดโคนเจริญเติบโตได้ช้าในอาหาร OM, MSA และ FH เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งกับอาหารชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาหารทั้ง 3 ชนิดอาจมีองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นต่อเห็ดโคนในปริมาณที่ไม่เหมาะสม และเห็ดโคนความต้องการใน trace element น้อย นอกจากนี้เมื่อพิจารณาเห็ดกลุ่มย่อยสลายลิกนินพบว่าเห็ดโคนเจริญได้ดีในอาหารสังเคราะห์ต่างๆ เห็ดโคนน้อย (*C. comatus*) เจริญได้ดีในอาหาร MYP medium (Jang *et al.,* 2009) และ *T. microcarpus* เจริญได้ดีบน PDA (Olila *et al.,* 2007) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเส้นใยเห็ดโคนสามารถเจริญได้ดีบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ Zeleke *et al.* (2013) ทำการแยกเชื้อเห็ดโคนบริสุทธิ์จากรังปลวกบนอาหาร MEA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 15 วัน พบว่าเส้นใยเจริญได้ดีบนอาหาร MEA เช่นกัน

เส้นใยเห็ดต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งเชื้อราที่มีบทบาทในการย่อยแต่ละชนิดสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่ต่างกัน พบว่าเส้นใยเห็ดโคน *Termytomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM003, CMUTM004 และ CMUTM005) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20–30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิด คือ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Zeleke *et al.* (2013) ได้สำรวจเห็ดโคนที่ Great Rift Valley ประเทศเอธิโอเปียอุณหภูมิในขณะนั้นคือ 25 องศาเซลเซียส และ พิชญางกูร (2547) ได้รายงานอุณหภูมิที่เห็ดโคนเจริญคือ 20–30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิในการเจริญของเห็ดที่จะย่อยสลายมีความแตกต่างกัน เช่น เห็ด *P. eryngii* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส *P. ostreatus* และ *P. pulmonarius* อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30 องศาเซลเซียส (Zervakis *et al*., 2001) เห็ด *O. radicata* จัดเป็น soil fungi อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25 องศาเซลเซียส (Kim *et al*., 2005) ผลการทดลองแสดงให้เห็นเห็ดมีความต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยแตกต่างกัน แต่ถ้าเป็นเห็ดกลุ่มเดียวกันจะมีความแตกต่างของอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญไม่มากนัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน (*Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus*) พบได้ว่าผลสอดคล้องกับเห็ดอื่นๆ เช่น เห็ด *O. radicata* (Kim *et al*., 2005) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม soil fungi เจริญได้ดีที่ pH 6 เช่นเดียวกัน เห็ด *L. rhinocerus* pH ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 6 (Lai *et al*., 2011) เห็ดโคนน้อย *C. comatus* เจริญได้ดีในช่วง pH 6-8 (Jang *et al*., 2009)

การทดลองแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนบนอาหาร basal medium เส้นใยเห็ดโคน *Termitomyces* sp. CMUTM001 และCMUTM002 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากซูโครส *Termitomyces* sp. CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นฟรุคโตสได้ดี ในขณะที่ *Termitomyces* sp. CMUTM005 ก็เจริญได้ดีบนอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นกัน ในการทดลองนี้ได้ผลเช่นเดียวกับ Kaur (2011) ซึ่งได้ทดลองแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมพบว่าน้ำตาลซูโครส ฟรุคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด *T. sriatus* (Beeli) R. Heim ทำให้เส้นใยเจริญ ได้ดี ส่วนเห็ด *O. radicata* เจริญได้ดีในในไซโลส (Kim *et al.,* 2005) เห็ด *P. atroumbonata* เจริญได้ดีบนอาหารที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ (Ayodele, 2008) จะเห็นได้ว่าเห็ดในแต่ละกลุ่มมีความต้องการของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีน ดังนั้นการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดจะต้องอาศัย ไนโตรเจนเป็นอาหารที่สำคัญด้วยไนโตรเจน ที่เห็ดสามารถนำไปใช้ได้ดีนั้น คือ ไนโตรเจนในรูปอินทรียสารที่ให้ผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดมากที่สุด จะช่วยในการกระตุ้นให้เห็ดออกดอกมากขึ้น และดีขึ้น เส้นใยเห็ดโคนสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ได้ดีกว่ากลุ่มสารประกอบอนินทรีย์ เห็ดโคน *T. striatus* เจริญได้ดีบนอาหารที่มี yeast extract เป็นองค์ประกอบในอาหาร (Kaur, 2011) ซึ่งต่างจากการทดลองนี้ที่ *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* เจริญได้ดีบนอาหารที่มี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาวัสดุอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนในอาหารแข็ง 12 ชนิด พบว่าเส้นใยเห็ดโคนเจริญได้ดีบนอาหารแข็งแต่ละชนิดแตกต่างกัน อาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน คือ ลูกเดือย การทดลองนี้มีผลเช่นเดียวกับ Olila *et al*. (2007) ได้ใช้ลูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เดือยเป็นอาหารธัญพืชเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ดโคนข้าวตอก *T. microcarpus* และการกระตุ้นการเกิดดอกเห็ด การเจริญแบบ linear expansion พบว่าการรวมกลุ่มของเส้นใยในวัสดุอาหารแข็งมีลักษณะที่แตกต่างกันไป การเจริญของเส้นใยบนเมล็ดธัญพืชขึ้นอยู่กับการอัดตัวกันของเมล็ดพืช เส้นใยเห็ดโคนเจริญบนอาหารธัญพืชได้ดีกว่าวัสดุทางการเกษตร โดยเจริญได้ดีบนเมล็ดธัญพืชในกลุ่มลูกเดือย ข้าวบาร์เลย์ เนื่องจากอาหารธัญพืชทั้งสองชนิดนี้มีการแพ็คตัวกันของเมล็ดไม่แน่นจนเกินไป อาหารธัญพืชที่เจริญได้ดีรองลงมาคือ ข้าวฟ่างซึ่งเป็นอาหารธัญพืชที่นิยมไปใช้ในการเพิ่มปริมาณเส้นใย และการผลิตหัวเชื้อ จึงมีการนำข้าวฟ่างไปใช้ในการผลิตหัวเชื้อเห็ดอย่างแพร่หลาย เช่นการผลิตหัวเชื้อเห็ดนางรม *P. ostreatus* อัตราส่วนที่เหมาะสมกับการเจริญคือข้าวฟ่างต่อเดือย ในอัตราส่วน 3:1 (Narh *et al.,* 2011) อาหารธัญพืชกลุ่มข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วเขียวพบว่าเส้นใยเห็ดโคนเจริญช้า เส้นใยเจริญช้า และบางปกคลุมผิวหน้าอาหาร ส่วนอาหารแข็งที่มีการเจริญได้ช้า คือ ขี้เลื่อย และรำข้าว เนื่องจากอาหารมีการแพ็คตัวแน่น เส้นใยไม่สามารถเจริญผ่านช่องว่างผิวอาหารได้ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณเส้นใยบนอาหารแข็งที่มีเมล็ดธัญพืชเป็นองค์ประกอบช่วยส่งเสริมการเพิ่มของเส้นใยได้มากกว่าการเลี้ยงเส้นใยบนอาหารวุ้น และสามารถลดต้นทุนในการเตรียมอาหารสังเคราะห์ได้อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างเห็ดโคน และรังปลวก ในป่าธรรมชาติ และป่าสักบนพื้นที่ปลูก 3 จังหวัด ได้แก่ อำเภอสันทราย และอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอภูซาง จังหวัดพะเยา และ อำเภอชนแดน จังหวัดเพชรบูรณ์ ในช่วงเดือนพฤษภาคม 2552 ถึง พฤศจิกายน 2554 สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 5 ไอโซเลท คือ *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004, CMUTM005 และ *T. clypeatus* และใช้เชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทเป็นตัวแทนในการศึกษา เมื่อนำมาบ่งชี้โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา และข้อมูลทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถบ่งชี้ไอโซเลท *Termitomyces* sp. CMUTM003 คือ *T. clypeatus* แต่ว่ายังไม่สามารถระบุชนิดของเห็ดโคนทั้ง 4 ไอโซเลทได้แก่ *Termitomyces* sp. CMUTM001, CMUTM002, CMUTM004 และCMUTM005 เนื่องจากฐานข้อมูลการศึกษาเห็ดโคนยังไม่เพียงพอ

การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยเห็ดโคน 5 ไอโซเลท บนอาหานวุ้น 10 ชนิด พบว่าเส้นให้เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้น MEA อาหารที่เจริญได้ดีรองลงมา คือ PDA, YA, YMA และ SEA อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนบนอาหาร MEA คือ 25 °C ที่ pH 6 แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมบนอาหาร basal medium มีน้ำตาลฟรุคโตส ซูโครส และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ เปปโตน การศึกษาวัสดุอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนคือ ลูกเดือย และข้าวบาร์เล่ย์ โดยวัดอัตราการเจริญแบบ linear extension

ผู้วิจัยได้พยายามบ่งชนิดเชื้อเห็ดโคน หากมีการศึกษางานวิจัยในด้านนี้ต่อไปควรศึกษาเปรียบเทียบกับแหล่ง herbarium แหล่งอื่นๆ เปรียบเทียบกับข้อมูลที่บันทึกได้เพื่อบ่งชนิดเห็ดโคนควบคู่กับการศึกษาทางด้านอณูชีววิทยาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

สุมาลี พิชญางกูร, 2547. เห็ดโคนและลูกผสม. สามเจริญพาณิชย์ (กรุงเทพ) จำกัด. กรุงเทพมหานคร.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, อุทัยวรรณ แสงวณิช, Morinaga, T., Nishizawa, Y. และ Murakami, Y. 2551. ความหลากหลายของเห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Appetorgbor, M.M., Apetorgbor, A.K. and Nutagor, E. 2005. Utilization and cultivation of edible mushrooms for rural livelihood in Sounthern Ghana. 17th Commonwealth Forestry Conference, Columbo, Srilanka.

Ayodele, S.M. 2008. Studies on vegetative growth requirements of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), an edible mushroom in Nigeria. African Journal of Plant Science 2: 28-33.

Adejoye, O.D. 2009. Growth and yield of *Lentinus squarrosulus* (M.) Singer a Nigerian edible mushroom as affected by supplement. The Internet Journal of Nutrition and Wellness 8: 327-331.

Atlas, R.M. 1993. Alphabetical listing of media, In L. C. Parks (ed). Handbook of Microbiological Media, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Bel, P.J. and Pataragetvit, S. 1982. Edible mushroom in Thailand cultivated by termite, In S.T. Chang and T.H. Quimio (eds.). Tropical Mushroom Biological Nature and Cultivation Method, pp 445-61. The Chinese University Press, Hong Kong:

Boyle, D. 1998. Nutritional factor limiting the growth of *Lentinula edodes* an other white-rot fungi in wood. Soil Biology and Biochemistry 30: 817-823.

Bruhn, J.N., Wetteroff, J.J., Mihail, J.D., Kabrick, J.M. and Pickens, J.B. 2000. Distribution of *Armillaria* species in upland Ozark mountain forest with respect to site, overstory species composition and oak decline. Forest Pathology 30: 43-60.

Brundett, M.C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytologist 154: 275-304.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Chaiyama, V.,Petcharat, V. and Krisaneepaiboon, P. 2007. Some morphological and physiological aspects and cultivation of *Corpinus comatus* (O.F. Mull.) *Gray*. Songklanakarin Jornal of Science and Technology 29: 261-274.

Chang, S.T. and Miles, P.G. 1991. Recents trends in world production of cultivated edible mushrooms. Mushroom Journal 504: 15-18.

Danell, E. 1994. *Canthrellus cibarius*: Mycorrhiza Formation and Ecology. Thesis for Doctor of Philosophy, University of Uppsala, Sweden.

Darlington, J.P.E.C. 1994. Nutrition and evolution in fungus-growing ants: In J.H. Hunt. and Nalepa, C.A. (Eds.). Nourishment and Evalution in Insect Societies, (pp. 105-130), Westview, Boulder, Colorado.

De Araújo, A.A. and Roussos, S. 2002. A technique for mycelial development of ectomycorrhizal fungi on agar medium. Applied Biochemistry and Biotechnology 98-100: 311-318.

De Fine Licht, H.H., Anderson, A. and AANEN, D.K. 2005. *Termitomyces* sp. associated with the termite *Macrotermes natalensis* has a heterothallic mating system and multinucleate cells. Mycological Research 109: 314-318.

Den, B.H.C., Gravendeel, B. and Kuyper, T.W. 2004. An ITS phylogeny of *Leccinum* and an analysis of the evolution of ministellite-like sequence within ITS1. Mycologia 96: 102-118.

Devkota, S. 2006. Yarsagumba; traditional utilization in Dolpa district, Western Nepal, Our nature. An International Biological Journal 4: 48-52.

Donovan, S.E., Eggleton, P. and Bignall, D.E. 2001. Gut content analysis and a new feeding group classification of Termites. Ecological Enthomology 26: 356-366.

Fasidi, I.O. and Akwakwa, D.O. 1996. Growth requirememts of *Volvariella speciosa* (Fr. Ex. Fr.) Sing., a Nigerian mushroom. Food Chemistry 55: 165-168.

Frøslev, T.G., Aanen, D.K., LaessØe, T. and Rosendahl, S. 2003. Phylogenetic and related taxa. Mycological Research 107: 1277-1286.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Frøslev, T. The genus *Termitomyces*. Online (http://www.mycokey.com/BurkinaFaso/*Termitomyces*.htm)

GenBank, (http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html).

Gbolagade, J.S., Fasidi, I.O., Ajayi, E.J. and Sobowale, A.A. 2006. Effect of physio-chemical factor and semi-synthetic media on vegetative growth of *Lentinus submudus* (Berk.) an edible mushroom from Nigeria. Food Chemistry 99: 742-747.

Gosh, S. Paweletz, N. Ghosh, I. 1978. Mitotic asynchrony of multinucleate cells in tissue culture. Chromosoma 65: 293-300.

Guedegbe, H.J., Miambi, E., Pando, A., Roman, J., Houngnandan, P. and Rouland-Lefever, C. 2009. Occurrence of fungi in combs of fungus-growing termites (Isoptera: Termitidae, *Macrotermitinae*). Mycological Research 113: 1039-1045.

Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C. and Pegler, D.N. 1995. Dictionary of the Fungi. CAB Internationnal, Cambridge.

Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. Mycological Research 95: 641-655.

Harsh, N.S.K., Chandra, S. and Uniyal, K. 2011. Screening resistance of *Dalbergia sissoo* clones *Ganoderma lucidum* root rot disease in field conditions. Forest Pathology 41: 221-226.

Heim, R. 1942. Nouvelles Études sur Les Agarics Termitophiles d'Afrique Tropicale. Archives du Muséum Natioanal d'Histoire Naturelle, Séries 6: 1-60.

Heim, R. 1977. Termites et champignons. Société Nouvelle Des Èditions Boubée, France.

Hoeksema, J.D. 2010. Ongoing coevolution in mycorrhizal interaction. New Phytologist 187: 286-300.

Hyodo, F., Inoue, T., Azuma, J.I., Tayasu, I. and Abe, T. 2000. Role of the mutualistic fungus in lignin degradation in fungus-growing termite, *Macrotermes gilvus* (Isopera; *Macrotermitinae*). Soil Biology and Biochemistry 32: 653-658.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Jang, M.J., Lee, Y.H., Liu, J.J. and Ju, Y.C. 2009. Optimal conditions for the mycelia growth of *Corpinus comatus* strains. Microbiology 37: 103-108.

Jansson, L.M. and L, Kutti. 2004. Micronutrients in edible mushrooms. Human Nutrition 5: 1-8.

Johjima, T., Ohkuma, M. and Kudo, T. 2003. Isolation and cDNA cloning of novel hydrogen peroxide dependent phenol oxidase from the basidiomycetes *Termitomyces albuminosus*. Applied Microbiology and Biotechnology 64: 220-225.

Johnson, R.A., Thomas, R.J., Wood, T.G. and Swift, M.J. 1981. The inoculation of the fungus comb in newly founded colonies of the *Macotermitinae* (Isopera) from Nigeria. Journal of National History 15: 751-756.

Jonathan, S.G. and Fasidi, I.O. 2000. Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyerella aroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. Food Chemistry 72: 479-483.

Jones, E.B.G., Walley, A.J.S. and Hywel-Jones, N.L. 1994. A fungus foray to Chiang Mai market in northern Thailand. Mycologist 8: 87-90.

Kalmiş, E. and Kalyoncu, F. 2008. Mycelial Growth rate of some Morels (*Morchella* spp.) in four different microbiological media. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 3: 861-864.

Kamari, B. and Atri, N.S. 2012. Evaluation of north Indian wild edible Termitophilous mushrooms. Libyan Agriculture Research Center Journal International 3: 229-232.

Kansci, G., Mossebo, D.C., Selatsa, A.B. and Fosto, M. 2003. Nutrition content of some mushroom species of the genus *Termitomyces* consumed in Cameroon. Nahrung-Food 47: 213-216.

Kaur, S. 2011. Effect of carbon, nitrogen and trace elements on growth and sporulation of the *Temitomyces striatus* (Beeli) Heim. Journal of Yeast and Fungal Research 2: 127-131.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Kim, S.B., Kim, S.H., Lee, K.R., Shim, J.O., Lee, M.W., Lee, U.Y. and Lee, T.S. 2005. The optimal culture conditions for the mycelia growth of *Oudemansiella radicata*. Microbiology 33: 230-234.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and Stalpers, J.A. 2001. Ainsworth and Bisby's The Fungi 9th eds. CAB International, Wallingford.

Konaté, S., Le-Roux, X., Verdier, B. and Lepage, M. 2003. Effect of under ground fungus-growing termites on carbondioxide emission at the point and landscape-scales in Afican savanna. Funtional Ecology 17: 305-314.

Koné, N.A., Dosso, K., Konaté, Kouadio, J.Y. and Linsenmair, K.E. 2011. Environmental and biological determinants of *Termitomyces* species seasonal fructification in central and southern Côte d'Ivoire. Insectes Sociaux 58: 371-382.

Korb, J. and Aanen, D.K. 2003. The evolation of uniparental transmission of fungal symbionts in fungus-growing termites (*Macrotermitinae*). Behavioral Ecology and Sociobiology 53: 65-71.

Kües, U. and Liu, Y. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. Appled Microbiology and Biotechnology 54: 141-152.

Kumla, J., Bussaban, B., Suwannarach, N., Lumyong, S. and Danell, E. 2012. Basidiome formation of an edible wild, putatively ectomycorrhizal fungus, *Phlebopus portentosus* without host plant. Mycologia 104: 597–603.

Kumla, J., Danell, E., Bussaban, B. and Lumyong, S. 2011. Suitable growth conditions and nutrition factors on *in vitro* culture of *Phlebopus portentosus* (Boletales). Chiang Mai Journal of Science 38: 156-159.

Lai, W.H., Siti-Murni, M.J., Fauzi, D., Mazni, O.A. and Saleh, N.M. 2011. Optimal conditions for mycelia growth of *Lignosus rhinoserus*. Microbiology 39: 92-95.

Largent, D.L., Johnson, D. and Walting, R. 1977. How to identify Mushroom to Genus: Microscopic Features. Mad River Press, Eureka.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Leuhold, R.H., Badertscher, S. and Imboden, H. 1989. The inoculation of newly formed comb with *Termitomyces* in *Macrotermes* colonies (Isopera: *Macrotermitinae*). Insect Societies 36: 328-338.

Lodge D.J., Ammirati, J.F., O'Dell, T.E., Mueller, G.M. 2004. Collecting and describing macrofungi. In: G.M. Mueller, G.F. Bills, Foster MS. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods., Elsevier Academic Press, Oxford, 777 p.

Mamiro, D.P. and Royse, D.J. 2007. The influence of spawn type and strain on yield, size and mushroom solids content of *Agaricus bisporus* produced on non-composed and spent mushroom compost. Biosource Technology 99: 3205-3212.

Martin, M.M. and Martin, J.S. 1978. The distribution and origins of the cellulytic enzymes of the higher termite, *Macrotermes natalensis*. Physiological Zoology 52: 11-21.

Masamba, K.G. and Kazombo-Mwale, R. 2010. Determination and comparison of nutrient and mineral contents between cultivated and indigenous edible mushroom in Central Malawi. African Journal of Food Science 4: 176-179.

Matsumoto, T. 1976. The role of termites in an equaral rain forest ecosystem of west Malaysia. I. Population density, biomass, carbon, nitrogen and calorific content and respiration rate. Ooecologia 22: 153-178.

Mendil, D., Uluözlü, O.D., Tüzen, M., Hasdemir, E. and Sari, H. 2005. Trace metal levels in mushroom samples from Ordu, Turkey. Food Chemistry 91: 463-467.

Montovani, T.R.D., Linde, G.A. and Colauto, N.B. 2007. Effect of nitrogen sources to cassava fiber and carbon to nitrogen ratio *Agaricus brasiliensis* growth. Canadian Journal of Microbiology 53: 139-145.

Mueller, U.G., Gerardo, N.M., Anen, D.K., Diana, L.S. and Schultz, T.R. 2005. The evolution of agriculture in insects. Annual Reviews, Ecology and Evolution 36: 563-595.

Mueller, G.M., Schmit, J.P. and Leacock, P.R. 2007. Global diversity and distribution of macrofungi. Biodiversity and Conservation 16: 37-48.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Narh, D.L., Obodai, M., Baka, D. and Dzomeku, M. 2011. The efficacy of sorghum and millet grains in spawn production and carpophores formation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex. Fr) Kummer. International Food Research Journal 18: 1143-1148.

Nobre, T., Kone, N.A., Konate, S., Linsinmair, KE and Anen, D.K. 2011. Dating the fungus-growing termite mutualism shows a mixure between ancient codiversification and recent symbionts dispersal across divergent host. Molecular Ecology 20: 2619-2627.

Oghenekaro, A.O., Okhuoya, J.A. and Akpaja, E.O. 2009. Growth of *Lentinus squarrosulus* M. Singer on sawdust of different tropical tree species. African Journal of Food Science 3: 7-10.

Ohkuma, M., Maeda, Y., Johjima, T. and Kudo, T. 2001. Lignin degradation and roles of white fungi: study of an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation, RIKEN review, Focused on Ecomolecular Science Research 42: 40-45.

Okane, I. and Nakagiri, A. 2007. Taxonomy of an anamorphic xylariaceous fungus from a termite nest found together with *Xylaria angulosa*. Mycoscience 48: 240–249.

Olila, D., Kyeyune, G., Kasaba, J.D., Kisovi, L. and Munishi, P.K.T. 2007. Assessment of potential for domestication of *Termitomyces microcarpus*: an indigenous edible and medicinal mushroom from Lake Victoria Basin. Agricultural Journal 2: 627-631.

Pegler, D.N. (1977). A preliminary agaric flora of east Africa. Kew, Aditional Series 6: 611-615.

Pegler, D.N. and Vanhaeke, M. 1994. *Termitomyces* of south-east asia. Kew Bulletin 49: 717-736.

Phutela, U.G and Phutela, R.P. 2012. Effect of Physical and chemical factors on growth *Calocybe indica* (P&C). International Journal of Advanced Life Sciences 2: 8-16.

Pokhrel, C.P., Yadav, R.K.P. and Ohga, S. 2009. Effect of physical factors and synthesis media on mycelia growth of *Lyophyllum decastes*. Journal of Ecobiotechnology 1: 46-50.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Razak, D.L.A., Abdulah, N., Johari, N.M.K. and Sabaratnam, V. 2012. Comparative study of mycelia growth and sporophore yield of *Auricularia polytica* (Mont.) Sacc on selected palm oil wastes as fruiting substrate. Applied Microbiology and Biotechnology 97: 3207-3213.

Rizzo, D.M. and Slaughter, G.W. 2001. Root disease and canopy gaps in developed areas of Yosemite Valley, California. Forest Ecology and Management 146: 159-167.

Rouland-Lefévre, C., Lenoir, F. and Lepage, M. 1991. The role of symbiotic fungus in digestive metabolism of several species of fungus-growing termites. Comparative Biochemistry and Physiology 99: 657-663.

Sangvichien, E. and Taylor-Hawksworth, P.A. 2001. *Termitomyces* mushroom: a tropical delicacy. Mycologist 15: 31-33.

Sawhasan, P., Worapong, J., Flegel, T.W. and Vinijsanun. 2012. Fungal partnerships stimulate growth of *Termitomyces clypeatus* stalk mycelium *in vitro*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28: 2311-2318.

Sleaford, F., Bignell, D.E. and Eggleton, P. 1996. A pilot analysis of gut contents in termites from the Mbalmayo Forest Reserve, Cameroon. Ecological Entomology 21: 279-288.

Shim, S.M., Oh, Y.H., Lee, K.R., Kim, S.H., Im, K.H., Kim, J.W., Lee., U.Y., Shim, J.O., Shim, M.J., Lee, M.W., Ro, H.S., Lee, H.S. and Lee, T.S. 2005. The characteristics of cultural conditions for the mycelia growth of *Macrolepiota procera*. Microbiology 33: 15-18.

Srivastava, B., Dwived, A.K. and Andey, V.N.P. 2011. Ethnobotanical survey, distribution and utilization of *Termitomyces* species in Gorakhpur forest division. Plant Science Feed 1: 28-33.

Sornuwat, Y., Vongkaluang, C. and Takematsu, Y. 2004. Systematic key to termites of Thailand. Kasetsart Journal: Natural Science 38: 349-368.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Sornuwat, Y., and Thienhirum, S. 2005. Potential species of fungus-growing termites for termite mushroom production in Thailand. Proceeding of 43rd Kasetsart University Annual Conferrence, Thailand, pp. 713-720.

Swofford, D.L. 1999. PUAP*–phylogenetic analysis using parsimony (*and other method), version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.

Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P., Nevo, E. and Vukojević, J. 2006. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidase production by selected *Pleurotus* species. Enzyme and Microbial Technology 38: 65-73.

Tang, B.H., Wei, T.L. and Yao, Y.J. 2006. Revision of *Termitomyces* species originally described from China. Mycotaxon 95: 285-293.

Teoh, Y.P., Don, M.M. and Ujang, S. 2011. Assessment of the propoties, utilization and preservation of rubber wood (*Hevea brasiliensis*) in Malaysia. The Japan Wood Research Society 57: 255-266.

Terakunpisut, J., Gajaseni, N. and Hongprayoon, C. 2007. Local knowledge of ethnic on termite mushroom conservation at Huai Khayeng, Kanchanaburi, Thailand. Western Thong Pha Phum., pp. 444-449.

Thomson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence aligment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25: 4876-4882.

Thongthummachat, S. 2009. The study of soil properties in wild-mushroom grown in Dong Yai community forest Wapipathum district, Maha Sarakham Province. Rajabhat Maha Sarakham University Journal 3: 9-17.

Tibuwa, D.D. 2011. Substrate specificity and phenology of macrofungi community at the University of Dar es Salaam main campus, Tanzania. Journal of Applied Bioscience 46: 3173-3184.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Tibuhwa, D.D. 2012. *Termitomyces* species from Tanzania, their cultural propoties and unequalled basidiospores. Jounal of Biology and Life Science 3: 140-159.

Vaario, L.M., Tanaka, M., Ide, Y., Gill, W.M. and Suzuki, K. 1999. *In vitro* ectomycorrhiza formation between *Abies firma* and *Pisolithus tinctorius*. Mycorrhiza 9: 177-183.

Vargas-Isla, R. and Ishigawa, N.K. 2008. Optimal conditions of *in vitro Lentinus straigosus* edible mushroom isolated in Bracilian Amazon. Mycoscience 49: 215-219.

Watanabe, Y., Owusu-Sekyere, E., Masunaga, T., Buri, M.M., Idowu-Oladele, O. and Wakatsuki, T. 2010. Teak (*Tectona grandis*) growth as influenced by soil physicochemical properties and other site condition in Ashaanti, Ghana. Journal of Food and Agriculture and Environment 8: 1040-1045.

Wei, T.Z., Yao, Y.J., Wang, B. and Pegler, D.N. 2006. A revision of *Sinotermitomyces*, a synonym of *Termitomyces* (*Agaricales*). Fungal Diversity 21: 225-237.

Wei, T.Z., Yao, Y.J., Wang, B. and Pegler, D.N. 2004. *Termitomyces bulborhizus*. novel from China, with a key to allied species. Mycological Research 108: 1458-1462.

Weitz, H.J., Ballard, A.L., Campbell, C.D. and Killham, K. 2001. The effect of culture conditions on mycelia growth and luminescence of naturally bioluminescence fungi. FEMS Microbiology Letters 202: 165-170.

Wu, C.Y., Liang, Z.C., Lu, C.P. and Wu, S.H. 2008. Effect of carbon and nitrogen sources on the production and carbohydrate composition of exopolysaccharide by submerged culture of *Pleurotus citrinopileatus*. Journal of Food and Drug Analysis 16: 61-67.

Zeleke, J., Gessesse, A. and Abate, D. 2013. Substrate-utilization properties of *Termitomyces* culture isolated from termite mound in Great Rift Valley Region of Ethiopia. Journal of Natural Sciences Research 3: 16-21.

Zervakis, G., Philippoussis, A., Ioannidou, S. and Diamantopoulou, P. 2001. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. Folia Microbiologica 46: 231-234.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Zang, M. 1981. *Sinotermitomyces*, a new genus of *Amanitaceae* from, Yunnan, China. Mycotaxon 13: 171-174.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารที่ใช้ทดสอบการเจริญของเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดโคน

1. Fungal-host medium (g/l:w/v) (Vaario *et al*., 1999)

KNO_3	2.5	กรัม
$(NH_4)H_2PO_4$	0.3	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.4	กรัม
$CaCl_2.\ 2H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_47H_2O$	0.015	กรัม
Na_2EDTA	0.02	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.0001	กรัม
H_3BO_3	0.0005	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.001	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.0001	กรัม
KI	0.001	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.0002	กรัม
$CoCl_2.6H_2O$	0.0001	กรัม
Myo-inositol	0.1	กรัม
Thiamine HCl	0.005	กรัม
Charcoal	0.3	กรัม
Glucose	10	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. Malt extract agar (g/l:w/v) (Hawksworth *et al*., 1995)

Malt extract	20	กรัม
Glucose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	มิลลิลิตร

ผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

3. Hagem medium (g/l:w/v) (Kalmiş and Kayoncu, 1994)

Malt-extract	4	กรัม
Yeast-extract	4	กรัม
Glucose	5	กรัม
NH_4Cl	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.15	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	มิลลิลิตร

ผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. Murashige & Skook agar (g/l:w/v) (Danell, 1994)

Stock 1 (g/l:w/v)

NH_4NO_3	16.5	กรัม
KNO_3	19	กรัม
Distilled water	1	มิลลิลิตร

Stock 2 (g/l:w/v)

$MgSO_4.7H_2O$	3.1	กรัม
$MnSO_4.H_2O$	1.090	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.860	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.0025	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

Stock 3 (g/l:w/v)

$CaCl_2.\ 2H_2O$	4.4	กรัม
KI	0.083	กรัม
$CoCl_2.6H_2O$	0.0025	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

Stock 4 (g/l:w/v)

K_2HPO_4	1.7	กรัม
H_3BO_3	0.620	กรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

Stock 5 (g/l:w/v)

$FeSO_4 7H_2O$	2.784	กรัม
Na_2EDTA	3.724	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Stock 6 (g/l:w/v)

Inositol	2	กรัม
Nicothenic acid	0.01	กรัม
Pyridoxine HCl	0.01	กรัม
Thiamine HCl	0.002	กรัม
Glycine	0.04	กรัม
Distilled water	985	มิลลิลิตร

แหล่งคาร์บอน

Glucose	30	กรัม
Agar	15	กรัม

ขั้นตอนเตรียมสารละลาย

Stock 1-5	10	มิลลิลิตร
Stock 1	2	มิลลิลิตร
Stock 2	2	มิลลิลิตร
Stock 3	2	มิลลิลิตร
Stock 4	2	มิลลิลิตร
Stock 5	2	มิลลิลิตร
Stock 6	5	มิลลิลิตร

ผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นปรับมาตรรวมเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

5. Oat meal agar (g/l:w/v) (Park, 2000)

Oat meal	60	กรัม
Agar	15	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Distilled	1000	มิลลิลิตร

นำข้าวโอ๊ตไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นกรองเอาน้ำข้าวโอ๊ตแล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมกับวุ้น ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

6. Potato Dextrose Agar (ยี่ห้อ RCI LABSCAN)

Potato dextrose broth	26.5	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

7. Modified, Sabouraud agar (g/l:w/v) (ดัดแปลงจาก Atlas, 1993)

Glucose	20	กรัม
Peptone	10	กรัม
Aagar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ดัดแปลงส่วนผสมโดยเติมน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม จากปริมาตรเดิม 40 กรัม ผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. Soil extract agar (g/l:w/v) (Atlas, 1993)

Soil-extract	400	มิลลิลิตร
Yeast extract	1.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำดินตัวอย่างมาแช่น้ำ 1000 ml จากนั้น กรองเศษวัสดุดินออก เศษรากไม้ ก้อนกรวดต่างๆ ผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 ประมาณ 15-20 นาที นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

9. Yeast-extract agar (g/l:w/v) (Atlas, 1993)

Yeast-extract	4.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Malt-extract	4.0	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled	1000	มิลลิลิตร

ผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. yeast-extract-malt-extract agar (g/l:w/v) (Atlas, 1993)

Malt-extract	3.0	กรัม
Yeast-extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

11. Basal medium (g/l:w/v) (Kumla *et al*., 2011)

Glucose	10	กรัม
Yeast-extract	0.2	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.05	กรัม
$FeSO_4 7H_2O$	0.01	กรัม
K_2HPO_4	0.05	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.05	กรัม
$(NH_4)H_2PO_4$	1.5	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

12. การเตรียมแหล่งอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

เตรียมแหล่งคาร์บอน 7 ชนิด ได้แก่ glucose, fructose, maltose, mannitol, starch, sucrose และ xylose ชั่ง 1.5 กรัม เติมแทน (NH_4) H_2PO_4 ผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

13. การเตรียมแหล่งอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

เตรียมแหล่งไนโตรเจน 7 ชนิด ได้แก่ Bovine serum albumin (fraction V), egg albumin, peptone, soybean meal, urea และ KNO_3 เติมแทน $(NH_4)H_2PO_4$ ผสมสารที่เตรียมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เท่ากับ 5.6 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

14. **สารเคมีที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติเห็ดห้า**

14.1 Congo Red: สารละลาย 1 % (Largent *et al*., 1977)

เตรียมสาร congo red 1 กรัม ผสมในน้ำปริมาตร 1.5 กรัม จากนั้นทำการกรอง

14.2 Potassium Hydroxide (KOH): สารละลายเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (Largent *et al*., 1977)

เตรียมสาร KOH 5 กรัม ผสมในน้ำปริมาตร 95 มิลลิลิตร

14.3 Melzer's reagent (Largent *et al*., 1977)

Iodine	1.5	กรัม
Potassium-Iodine	5	กรัม
Chacoal Hydate	100	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในน้ำอุ่น ห้ามต้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	จันทร์จิรา วิริยา
วัน เดือน ปี เกิด	10 กรกฎาคม 2529
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสันทรายวิทยาคม ปีการศึกษา 2543 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย ปีการศึกษา 2546 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุล-ชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2552
ผลงาน	1) นำเสนอผลงานโปสเตอร์ และได้รับเผยแพร่ในงานประชุม International Symposium on Fungal Biodiversity and Resources และงานประชุม RGJ Seminar Series LXXVII Fungal Biodiversity and Biotechnology ระหว่างวันที่ 12-13 พฤศจิกายน 2553 ณ โรงแรมวังคำ จังหวัดเชียงราย ประเทศไทย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved