



กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

การพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อให้ได้คอร์เดเซปินสูง

Varietal Improvement and Cultivation Technology of  
*Cordyceps militaris* for Higher Production of Cordycepin

(นางสาวนันทินี ศรีจุมปา)

(Miss Nantinee Srijmpa)

ปี 2565

## บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัย การพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อให้ได้คอร์เดเซปินสูง  
Varietal Improvement and Cultivation Technology of *Cordyceps militaris*  
for Higher Production of Cordycepin

### ชื่อคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ	1. นางสาวนันทินี ศรีจุมปา	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
ผู้ร่วมโครงการ	2. นางสาวธามาศ ณ น่าน	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
	3. นางสาวสุปัน ไม้ตัดจันทร์	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
	4. นางสาวบุญปิยธิดา คล่องแคล่ว	ศูนย์วิจัยพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย
	5. นางสาวอรุณทัย ซาววา	สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	6. นางสาวรัชฎาภรณ์ ทองเหม	สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	7. นายอนุสรณ์ วัฒนกุล	สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	8. นางสาวรัตนพร นรรัตน์	มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์ เชียงราย
	9. นายธรากร มณีรัตน์	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
	10. นางสาวพรพนช มีกุล	ศูนย์วิจัยพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย

### งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563-2564 งบประมาณที่ได้รับ 801,935 บาท  
ระยะเวลาทำการวิจัย ตั้งแต่ ตุลาคม 2562 ถึง ธันวาคม 2564

### สรุปโครงการวิจัย

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ คอร์เดเซปิน (cordycepin) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้แก่ ยับยั้งการเกิดเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีสารยับยั้งการเหนียวนำไปให้เม็ดเลือดแดงแตก และการย่อยสลายไขมัน ปริมาณสารออกฤทธิ์ในเห็ดถั่งเช่าสีทองขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ สายพันธุ์ วิธีการเพาะเลี้ยง สูตรอาหาร สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ แสง และปัจจัยอื่นๆ การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดหรือสายพันธุ์ได้ในระยะเวลาอันสั้น การพัฒนาพันธุ์ทำได้โดยการผสมและคัดเลือกพันธุ์ การศึกษาเทคโนโลยีที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองซึ่งได้แก่ วัสดุเพาะเช่นแหล่งคาร์บอนจากข้าวชนิดต่างๆและธัญพืชบางชนิด โปรตีนจากแหล่งต่างๆ รวมทั้งผลของความยาวคลื่นแสงที่ต่างๆกันต่อผลผลิตและสารสำคัญในถั่งเช่าสีทอง และความเป็นไปได้ในการผลิตถั่งเช่าในสภาพไม่ควบคุมอุณหภูมิ จะทำให้ได้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการผลิตถั่งเช่าคุณภาพ สำหรับเผยแพร่แก่ผู้สนใจ

ต่อไป ซึ่งการพัฒนากระบวนการผลิตถั่งเช่าสีทองเชิงพาณิชย์ สามารถต่อยอดและถ่ายทอดองค์ความรู้ให้แก่กลุ่มเกษตรกร หรือผู้ที่สนใจต้องการผลิตถั่งเช่าสีทองเพื่อการค้า

### วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อพัฒนาสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองโดยการผสมพันธุ์ให้ได้เห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตเร็ว ให้ผลผลิตคุณภาพดีและมีคอร์เดเซปินสูง เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงในประเทศไทย และจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดและฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง
2. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองที่มีประสิทธิภาพ ให้ผลผลิตและคอร์เดเซปินสูง
3. เพื่อขยายผลเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิตและสารสำคัญสูง โดยถ่ายทอดองค์ความรู้ให้แก่เกษตรกรและผู้สนใจ

### ระเบียบวิธีวิจัย

รวบรวมสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองจากแหล่งผลิตต่างๆภายในประเทศได้ 7 ไอโซเลทนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม นำสายพันธุ์ที่รวบรวมได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลทมาเพาะในอาหารแข็งเพื่อประเมินผลผลิต ลักษณะดอกเห็ดและสารสำคัญเพื่อคัดเลือกเป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ ทดสอบเทคโนโลยีการผลิตได้แก่ ชนิดธัญพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง สูตรอาหาร ตลอดจนอิทธิพลของแสงชนิดต่างๆต่อผลผลิตและสารคอร์เดเซปิน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ของการเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองบนพื้นที่สูงในสภาพไม่ควบคุมอุณหภูมิเพื่อลดต้นทุนการผลิต มีการขยายผลโครงการโดยการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการและอบรมออนไลน์หลักสูตร เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง

### ผลการวิจัย

1. จากการรวบรวม เปรียบเทียบลักษณะและประเมินผลผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง ที่รวบรวมจากแหล่งผลิตในประเทศจำนวน 11 สายพันธุ์ คัดเลือกเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ 5 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและสารสำคัญสูง ได้แก่ CR1, CR3, CR5, CM1 และ CM2 ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์
2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 7 ไอโซเลท พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *ITS-UM* ตำแหน่งที่ 43 ในเห็ดถั่งเช่าตัวอย่างรหัส O จากเบส A เป็นเบส G สำหรับยีน *V9* ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการจัดทำแผนผังพันธุกรรมทั้งสองยีนไม่แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม
3. สร้างลูกผสมโดยนำพ่อแม่พันธุ์ไปคัดแยกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว และจับคู่ผสมแบบสปอร์เดี่ยว ลูกผสมสายพันธุ์คัดเลือกที่ผ่านการประเมินผลผลิตจำนวน 22 คู่ผสม นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญพบว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองลูกผสมจากการปรับปรุงพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและที่มีสารคอร์เดเซปินสูง จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ CR1-9 x CR3-9 และ CM1-10 x CR 3-4
4. การเปรียบเทียบชนิดธัญพืช 7 ชนิด พบว่าลูกเดือยเป็นธัญพืชเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิตและสารคอร์เดเซปินสูงที่สุด

5. จากการเปรียบเทียบสูตรอาหาร 5 สูตร พบว่า สูตรที่ 5 เพิ่มรายละเอียดให้ค่าประสิทธิภาพการผลิตมากที่สุด เท่ากับ 82.87 เปอร์เซ็นต์ จึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ อย่างไรก็ตามควรประยุกต์ใช้สูตรอาหารที่ 5 ร่วมกับสูตรอาหารที่ 1 เนื่องจากสูตรอาหารที่ 1 ให้สารสำคัญคอร์เตซปินและอะดีโนซีนสูง
7. การให้แสง LED สีเขียวในช่วงการกระตุ้นดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองจะให้ทั้งผลผลิตและสารคอร์เตซปินและอะดีโนซีนในระดับดีกว่าแสงสีอื่น
8. เปรียบเทียบการผลิตถั่งเช่าสีทองในสภาพที่ควบคุมและไม่ควบคุมอุณหภูมิ พบว่าบนพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 900 เมตรขึ้นไป สามารถเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองในห้องที่ไม่ควบคุมอุณหภูมิได้ตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงกุมภาพันธ์
9. ได้ขยายผล เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองให้เกษตรกรและผู้สนใจโดยการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ 1 ครั้ง มีผู้เข้ารับการฝึกอบรมจำนวน 30 คน และจัดฝึกอบรมออนไลน์ผ่านระบบ zoom cloud meeting จำนวน 1 ครั้ง มีผู้เข้ารับการฝึกอบรม 27 คน

### **ข้อมูลใหม่ที่ค้นพบจากงานวิจัย**

1. การให้แสง LED สีเขียวในช่วงการกระตุ้นดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองจะให้ทั้งผลผลิตและสารคอร์เตซปินและอะดีโนซีนในระดับดีกว่าแสงสีอื่น
2. ลูกผสมของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิตและสารคอร์เตซปินสูง จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ CR1-9 x CR3-9 และ CM1-10 x CR 3-4
3. บนพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 900 เมตรขึ้นไป สามารถเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองในห้องที่ไม่ควบคุมอุณหภูมิได้ตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงกุมภาพันธ์

### **ประโยชน์ที่ได้รับจากผลงานวิจัย**

1. ได้เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิตและสารคอร์เตซปินสูง
2. ได้ลูกผสมเห็ดถั่งเช่าสีทอง 2 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและสารคอร์เตซปินสูง
3. เกษตรกรและผู้สนใจได้รับการถ่ายทอดองค์ความรู้เรื่องการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง

**กลุ่มเป้าหมายที่นำผลงานไปใช้ประโยชน์** กลุ่มเกษตรกรเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองจังหวัดเชียงราย และพื้นที่ใกล้เคียง หรือผู้ประกอบการธุรกิจผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

### **ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย**

ควรมีการวิจัยต่อไปนี้

1. ศึกษาผลการวิจัยเชิงทดลองทางคลินิก (clinical trials) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของถั่งเช่าสีทองในการป้องกันรักษาโรคต่างๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าและคุณค่าของเห็ดถั่งเช่าสีทอง
2. ควรศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดถั่งเช่าเพื่อไม่ให้เกิดการกลายพันธุ์

## บทคัดย่อ

ผลผลิตและปริมาณสารออกฤทธิ์ในเห็ดถั่งเช่าสีทองนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ สายพันธุ์ วิธีการเพาะเลี้ยง สูตรอาหาร แสง และปัจจัยอื่นๆ โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง การพัฒนาพันธุ์โดยการผสมและคัดเลือกพันธุ์ พัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองที่มีประสิทธิภาพ และขยายผลเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิตและสารสำคัญสูง มีผลการทดลองดังนี้ DNA ของเห็ดถั่งเช่าสีทองจากแหล่งต่างๆ 7 ไอโซเลท ทดสอบกับไพรเมอร์สากลจำนวน 4 คู่ พบว่า คู่ไพรเมอร์ ITS1-UM2+ITS2-UM2 และ V9U+V9R สามารถให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ มีประสิทธิภาพในการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน ITS-UM ตำแหน่งที่ 43 ในเห็ดถั่งเช่าตัวอย่างรหัส O จากเบส A เป็นเบส G สำหรับยีน V9 ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการจัดทำแผนผังพันธุกรรมทั้งสองยีนไม่แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่รวบรวมได้ 11 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเพาะทดสอบผลผลิตและวิเคราะห์สารคอร์เดเซปินสามารถคัดเลือก 5 สายพันธุ์ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์และผสมพันธุ์โดยใช้เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ได้ลูกผสมที่ผ่านการประเมินผลผลิตและสารคอร์เดเซปินจำนวน 2 สายพันธุ์ เทคโนโลยีการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตและสารคอร์เดเซปินสูงประกอบไปด้วย การใช้ลูกเต๋อยเป็นวัสดุเพาะ โดยเติมอาหารสูตร MMN (Melin Norkans medium) การให้แสงไฟจากหลอดแอลอีดีสีเขียว ในช่วงกระตุ้นการเกิดดอกเห็ด นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองในสภาพไม่ควบคุมอุณหภูมิได้บนพื้นที่สูงตั้งแต่ 900 เมตรจากระดับน้ำทะเล พบว่าถ้าเพาะในช่วงตุลาคม-กุมภาพันธ์จะให้ผลผลิตใกล้เคียงกับการเพาะในห้องควบคุมอุณหภูมิ มีการขยายผล เทคโนโลยีการผลิตถั่งเช่าสีทองเพื่อให้ได้คอร์เดเซปินสูงผ่านการการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการและการฝึกอบรมออนไลน์

## Abstract

Yield and active compound in *Cordyceps militaris* depend on many factors including varieties, media and growing condition. This project aimed to study on DNA barcoding of *C. militaris*, varietal improvement, cultivation technology and technology transferring. The results of the study were as follow; DNA of seven isolates of *Cordyceps militaris* were tested with four pairs of universal primers. ITS1-UM2+ITS2-UM2 and V9U+V9R gave better single DNA strand. Genetic relationship was analysed and it was found that in isolate O there was a substitution of A by G at 43 position of ITS-UM gene. There was no difference of nucleotide sequence from V9 gene. The phylogenetic analysis indicated that there is no genetic distance within seven isolates of *C. militaris*. Varietal improvement program was done by collecting 11 isolates from different places and grew on media to evaluate yield and cordycepin content. Five isolates were selected as parents using mono-mono crossing technique. Two hybrids which high yield and high content of cordycepin were selected. Cultivation technology for high yield and high content of cordycepin consist of using millet as substrate, adding MMN (Melin Norkans medium) in millet and during stroma development apply green LED light. Moreover, *C. militaris* cultivation can be grown at above 900 MASL under uncontrolled condition during October – February. Cultivation technology was transferred through a workshop training course and online training course.

## กิตติกรรมประกาศ

ขอบพระคุณหน่วยงานสนับสนุนงานวิจัยและหน่วยงานต้นสังกัด ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในทุกด้าน ขอบพระคุณผู้อำนวยการแผนงานวิจัย นางชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ผู้อำนวยการแผนงานวิจัยย่อย ดร. มัลลิกา แก้ววิเศษ และทีมงาน ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ การปรับปรุงแก้ไขวิธีดำเนินงานของโครงการให้สามารถบรรลุตัวชี้วัดตามที่กำหนด ขอบคุณผู้ร่วมงานวิจัยทุกท่านที่ช่วยปฏิบัติงานในกิจกรรมต่างๆ รวมทั้งผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ได้แก่ คุณนิภาภรณ์ นันทา คุณชนากร แก้วแก่น เจ้าหน้าที่จากมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์ นางสาวทิพวรรณ ปัญญาสิทธิ์ นางสาวพัชรินทร์ ยศปิ่นตา นักวิชาการเกษตร คุณพวงเพชร เหลืองสุวรรณ คุณนิยม พันธุ์รัตน์ คุณเกตุชญา พรหมเมืองดี คุณสรพงษ์ คำพร นางอุรา เนตรสุวรรณ นางฉวีวรรณ สุริยนต์ พนักงานราชการของศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ที่ช่วยปฏิบัติงานทดลองและรวบรวมข้อมูลในระหว่างปฏิบัติงานทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	5
Abstract	6
กิตติกรรมประกาศ	7
สารบัญ	8
สารบัญภาพ	9
สารบัญตาราง	10
บทที่ 1 บทนำ	11
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	13
บทที่ 3 ผลการศึกษา	25
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	29
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	-



## สารบัญภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 1 การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการหลักสูตร เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย วันที่ 11 มีนาคม 2564	27
ภาพที่ 2 การฝึกอบรมออนไลน์หลักสูตร เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง วันที่ 3 ธันวาคม 2564	27
ภาพที่ 3 เอกสารแผ่นพับ เรื่อง เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง	28

กรมวิชาการเกษตร

## สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 โพรเมอ์ที่ใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด	16

กรมวิชาการเกษตร

## บทที่ 1 บทนำ

### 1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

#### วิสัยทัศน์

#### พันธกิจ

### 2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน (โปรดเลือกเฉพาะยุทธศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับหน่วยงานของท่าน)

- ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง

เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ

- ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน

เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก

- ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์

คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษ และภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม

- ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม

สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาสให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ

- ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน

- ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ

การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

### 3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 และโปรดระบุแผนงาน/โครงการให้สอดคล้องกับโปรแกรมของแผน ววน.

โปรแกรมตามแผน ววน.	งบประมาณ (บาท)
โครงการวิจัย การพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อให้ได้คอร์เดเซปินสูง	
ปีงบประมาณ 2563	516,972
ปีงบประมาณ 2564	284,963

#### 4. รายละเอียดโครงการ

##### ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ คอร์ดเซปิน (cordycepin) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้แก่ ยับยั้งการเกิดเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีสารยับยั้งการเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดแดงแตก และการย่อยสลายไขมัน ปริมาณสารออกฤทธิ์ในเห็ดถั่งเช่านั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ สายพันธุ์ วิธีการเพาะเลี้ยง สูตรอาหาร สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ แสง และปัจจัยอื่นๆ การศึกษาตีเอ็นเอบาร์โค้ดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดหรือสายพันธุ์ได้ในระยะเวลาอันสั้น การพัฒนาพันธุ์ทำได้โดยการผสมและคัดเลือกพันธุ์ การศึกษาเทคโนโลยีที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง ซึ่งได้แก่ วัสดุเพาะเช่นแหล่งคาร์บอนจากข้าวชนิดต่างๆและธัญพืชบางชนิด โปรตีนจากแหล่งต่างๆ รวมทั้งผลของแสงไฟแอลอีดีสีต่างๆ ต่อผลผลิตและสารสำคัญในถั่งเช่าสีทอง และความเป็นไปได้ในการผลิตถั่งเช่าในสภาพไม่ควบคุมอุณหภูมิ จะทำให้ได้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการผลิตถั่งเช่าคุณภาพ สำหรับเผยแพร่แก่ผู้สนใจต่อไป ซึ่งการพัฒนากระบวนการผลิตถั่งเช่าสีทองเชิงพาณิชย์ สามารถต่อยอดและถ่ายทอดองค์ความรู้ให้แก่กลุ่มเกษตรกร หรือผู้ที่สนใจต้องการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อการค้า

##### วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อพัฒนาสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองโดยการผสมพันธุ์ให้ได้เห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตเร็ว ให้ผลผลิตคุณภาพดีและมีคอร์ดเซปินสูง เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงในประเทศไทย และจัดทำตีเอ็นเอบาร์โค้ดและฐานข้อมูลตีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง
- 2) เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองที่มีประสิทธิภาพ ให้ผลผลิตและคอร์ดเซปินสูง
- 3) เพื่อขยายผลเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิตและสารสำคัญสูง โดยถ่ายทอดองค์ความรู้ให้แก่เกษตรกรและผู้ที่เกี่ยวข้อง

##### ขอบเขตการศึกษา

ครอบคลุมการจัดทำตีเอ็นเอบาร์โค้ดและฐานข้อมูลตีเอ็นเอบาร์โค้ดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง การผสมพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีสารคอร์ดเซปินสูง ตลอดจนพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อให้ได้ผลผลิตคุณภาพและมีปริมาณสารคอร์ดเซปินสูง สำหรับถ่ายทอดให้เกษตรกรและผู้ที่เกี่ยวข้อง

##### นิยามศัพท์

นิยามศัพท์เฉพาะ เป็นการให้ความหมายคำศัพท์ ที่นำมาใช้ในการวิจัย หรือของตัวแปร ให้เกิดความเข้าใจตรงกันระหว่างผู้อ่านงานวิจัยกับผู้วิจัย ดังนั้นคำที่ควรเขียนเป็นนิยามศัพท์เฉพาะเป็นคำที่ผู้วิจัยกล่าวถึงบ่อยครั้ง หรือคำที่มีความหมายเฉพาะ เพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจตรงกับผู้วิจัยว่าคำนั้นๆ หมายถึงอะไร เช่น เกษตรกร หมายถึง ผู้ที่ประกอบอาชีพในการทำนา ทำไร่ ทำสวน หรือเลี้ยงสัตว์ ในปี พ.ศ. 2554

## บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

### 1. วิธีการดำเนินการวิจัย

#### กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง

##### การทดลองที่ 1.1 การรวบรวมและประเมินผลผลิตและลักษณะเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ต่างๆ

##### วิธีการดำเนินงาน

###### - อุปกรณ์

1. สายพันธุ์เชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่รวบรวมจากแหล่งผลิตต่างๆ ภายในประเทศ
2. งานแก้วเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ด, หลอดทดลอง, ขวดแก้วเพาะเลี้ยงขนาด 16 ออนซ์พร้อมฝา
3. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow) และอุปกรณ์แยกเลี้ยงเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองในห้องปฏิบัติการ
4. อาหารแยกเชื้อบริสุทธิ์ เพิ่มปริมาณ และเพาะเลี้ยงเห็ดได้แก่ อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) Potato Dextrose Broth (PDB) และอาหาร Modified Melin Norkans Medium (MMN) และอาหารแข็งใช้เพาะเลี้ยงเห็ดคือข้าวหอมมะลิ
5. ตู้ฆ่าเชื้ออุปกรณ์เครื่องแก้ว ตู้อบแห้งชนิดเป่าลมร้อน และหม้อนึ่งความดันไอน้ำ
6. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ด และสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์สารสำคัญ
7. อุปกรณ์บันทึกข้อมูล เช่น กล้องถ่ายภาพ เครื่องวัดความชื้นของสีดอกเห็ด เวอร์เนีย

###### - วิธีการทดลอง

- 1) รวบรวมเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ต่างๆ จากแหล่งผลิตภายในประเทศ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดแต่ละสายพันธุ์ด้วยกล้องถ่ายภาพ
- 2) นำดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่มีลักษณะดี ไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารวุ้น PDA หรือ MMN บ่มเชื้อไว้ในห้องมืด อุณหภูมิ 20 - 22 องศาเซลเซียส นาน 7-10 วัน ให้เส้นใยของเห็ดเจริญบนอาหารวุ้น จึงเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารแข็ง PDA
- 3) เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองบนอาหารวุ้น PDA และการให้ผลผลิตของเห็ดแต่ละสายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งคือ ข้าวหอมมะลิ 40 กรัมเติมสารละลาย MMN 40 มิลลิตรในขวดแก้วขนาด 16 ออนซ์
- 4) นึ่งฆ่าเชื้ออาหารแข็งด้วยหม้อนึ่งไอน้ำความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที รอให้อาหารเย็นลงใช้เลี้ยงเส้นใยเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากนั้นบ่มเชื้อไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ 20 - 22 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญเต็มอาหาร นำไปวางใต้แสงไฟความเข้ม 600 - 1000 ลักซ์ 12 ชั่วโมง/วันเพื่อกระตุ้นการสร้างดอกเห็ดเป็นเวลา 6 สัปดาห์
- 5) คัดเลือกเห็ดสายพันธุ์ที่มีศักยภาพอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ ใช้เกณฑ์การคัดเลือกดังนี้ เส้นใยเห็ดมีการเจริญเติบโตรวดเร็ว มีเส้นใยหนาแน่น ให้ผลผลิตดอกเห็ดสูง ให้ดอกหรือสปอร์มาที่มีสีส้มทองสดใส ขนาดสม่ำเสมอ ไม่มีการแตกแขนงที่ส่วนปลายของหมวกดอก และสารสำคัญสูงได้จากการประเมินปริมาณสารคอร์เดเซปิน และอะดีโนซีนซึ่งวิเคราะห์จากดอกเห็ดอบแห้งบดผงละเอียด
- 6) เก็บรักษาเชื้อเห็ดสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกไว้ด้วยวิธีการที่เหมาะสม สำหรับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างลูกผสมในขั้นตอนต่อไป

- การบันทึกข้อมูล ได้แก่ ข้อมูลการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหารวุ้น PDA ลักษณะของดอกเห็ด ขนาดดอก

เห็ดหรือสโตรมา (ความกว้างและความยาว) น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของผลผลิต และอาหารเพาะเลี้ยง ปริมาณ สารคอร์เดซิปีน อะดีโนซีน ข้อมูลสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

- เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ต.ป่าอ้อดอนชัย อ.เมือง จ.เชียงราย

## การทดลองที่ 1.2 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเห็ดถึงเข้าสู่ทอง

วิธีการดำเนินงาน

- อุปกรณ์

- |                    |                                   |
|--------------------|-----------------------------------|
| 1. หม้อนึ่งความดัน | 5. spectrophotometer centrifuge   |
| 2. ตู้แช่แข็ง      | 6. ชุดถ่ายภาพ UV transilluminator |
| 3. ม้านฝรั่ง       | 7. สารเคมีในการสกัด DNA           |
| 4. กลูโคส          |                                   |

วิธีการ รวบรวมสายพันธุ์เห็ดถึงเข้าสู่ทองจากแหล่งต่างๆ นำมาสกัด DNA และเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ตรวจสอบ DNA และทำลำดับนิวคลีโอไทด์

แบบและวิธีการทดลอง ไม่มีแผนการทดลองทางสถิติ

- วิธีการทดลอง

1. รวบรวมสายพันธุ์เห็ดถึงเข้าสู่ทองจากแหล่งผลิตต่างๆในประเทศได้จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ CM1 CM2 CR O SP OH และ B นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)
2. เพาะเห็ดถึงเข้าสู่ทองแต่ละสายพันธุ์ โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง ได้แก่ข้าวหอมมะลิ 25 กรัม บรรจุในขวดแก้ว ขนาด 8 ออนซ์ และเติมสารละลาย MMN ขวดละ 25 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เลี้ยงโดยใช้เส้นใยเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ 20 - 22 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญเต็มวัสดุ นำไปวางใต้แสงไฟที่ความเข้มแสง 600 - 1,000 ลักซ์ ให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน เพื่อกระตุ้นการสร้างดอกเห็ดเป็นเวลา 6 สัปดาห์
3. สกัดดีเอ็นเอด้วย 2 วิธีการ ดังนี้

3.1 การสกัดดีเอ็นเอจาก stroma ของเห็ดถึงเข้าสู่

นำตัวอย่างดอกเห็ดถึงเข้าสู่มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2552) ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งดอกเห็ดถึงเข้าสู่ 1 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแบ่ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมารวมที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform:Isoamyl alcohol(24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol(24:1) 750

ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAC 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA(10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2 สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดถึงเข้าด้วยชุด DNasecure Plant Kit (TIANGEN)

3.2.1 ใช้เส้นใย 1/2 เพลท บดด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ตักตัวอย่างใส่ในหลอด Microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร

3.2.2 เติม Buffer LP1 400 ไมโครลิตร และ RNaseA (10mg/ml) 6 ไมโครลิตร Vortex ให้เข้ากัน 1 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (15 - 25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที

3.2.3 เติม Buffer LP2 130 ไมโครลิตร Vortex ให้เข้ากัน 1 นาที

3.2.4 นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำใสใส่หลอด Microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

3.2.5 เติม Buffer LP3 (เติม Ethanol ก่อนใช้) 1.5 เท่าของน้ำใสที่ได้ Vortex เบาๆ ให้เข้ากัน 15 วินาที

3.2.6 วาง Spin Columns CB3 ลงใน Collection Tube 2 มิลลิลิตร ดูดน้ำใสใส่ลงไปใน Spin Columns CB3

3.2.7 นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทน้ำใสข้างล่างทิ้งและวาง Spin Columns CB3 กลับลงใน Collection Tube

3.2.8 เติม Buffer PW (เติม Ethanol ก่อนใช้) 600 ไมโครลิตร ลงใน Spin Columns CB3 แล้วนำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เทน้ำใสข้างล่างทิ้ง (ทำซ้ำ 2 รอบ)

3.2.9 Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ Spin Columns CB3 แห้ง

3.2.10 ย้าย Spin Columns CB3 ลงในหลอด Microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Buffer TE 50-200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-25 นาที

3.2.11 นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

3.2.12 เก็บ DNA ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

4. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 4 ไมโครลิตร 10x PCR buffer((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 8 ไมโครลิตร 25 mM MgCl<sub>2</sub> 8 ไมโครลิตร 2mM dNTP 8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10 uM) ตามตารางที่ 2 (ลำดับที่ 1 - 4) อย่างละ 4 ไมโครลิตร DreamTaq DNA polymerase ยี่ห้อ Thermo (0.5 unit) 0.5 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 100 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene

Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ

#### 5. การทำชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ (PCR purification)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit ยี่ห้อ Invitrogen ดังนี้ นำพีซีอาร์ 100 ไมโครลิตร มาเติม PureLink® Binding Buffer (B2) จำนวน 1 เท่า คือ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดของเหลวใส่ลงใน PureLink® Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วปั่นคอลัมน์ให้แห้งอีกรอบนาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นชะผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

#### 6. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบผล PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

#### ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
1. ITS1-UM2	TAACAAGGTTTCCGTAGGTG	Avin <i>et al.</i> , 2014
2. ITS2-UM2	CTTAAGTTCAGCGGGTAGTC	Avin <i>et al.</i> , 2014
3. IGS1-UM4	AGTAACTGACTTCAATTTCCGAGC	Avin <i>et al.</i> , 2014
4. IGS1-UM5	ATCCGCTGAGGTTAAGCCCT	Avin <i>et al.</i> , 2014
5. V6U	TTAGTCGGTCTCGGAGCA	Mouhamadou <i>et al.</i> , 2008
6. V6R	TGACGACAGCCATGCAAC	Mouhamadou <i>et al.</i> , 2008
7. V9U	CCGTGATGAACTAACCGT	Mouhamadou <i>et al.</i> , 2008
8. V9R	TTCCAGTACAAGCTACCT	Mouhamadou <i>et al.</i> , 2008

-การบันทึกข้อมูล

บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

- เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2563

สถานที่ดำเนินการ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย และ สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

#### การทดลองที่ 1.3 การปรับปรุงพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิตและคอร์เตซินสูง

วิธีการดำเนินงาน

- อุปกรณ์



1. สายพันธุ์เชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองผ่านการคัดเลือกและมีประสิทธิภาพการผลิตและสารสำคัญสูง จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ CR1 CR3 CR5 CM1 CM2
2. งานแก้วเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ด, หลอดทดลอง, ขวดแก้วเพาะเลี้ยงขนาด 16 ออนซ์พร้อมฝา
3. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow) และอุปกรณ์แยกเลี้ยงเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองในห้องปฏิบัติการ
4. อาหารแยกเชื้อบริสุทธิ์ เพิ่มปริมาณ และเพาะเลี้ยงเห็ดได้แก่ อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) Potato Dextrose Broth (PDB) และอาหาร Modified Melin Norkans Medium (MMN) และอาหารแข็งใช้เพาะเลี้ยงเห็ดคือข้าวหอมมะลิ
5. ตู้อบฆ่าเชื้ออุปกรณ์เครื่องแก้ว ตู้อบแห้งชนิดเป่าลมร้อน และหม้อนึ่งความดันไอน้ำ
6. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ด และสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์สารสำคัญ
7. อุปกรณ์บันทึกข้อมูล เช่น กล้องถ่ายภาพ เครื่องวัดความชื้นของสื่อดอกเห็ด และเวอร์เนีย

- วิธีการทดลอง

- แบบและวิธีการทดลอง ไม่มีแผนการทดลองทางสถิติ

วิธีปฏิบัติการทดลอง

(1) รวบรวมสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองจากแหล่งต่างๆ อย่างน้อย 7 สายพันธุ์ นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารข้าวหอมมะลิผสมอาหาร MMN และกระตุ้นการสร้างสโตรมา คัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต และคอร์เดเซปिनสูง เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สร้างลูกผสม

(2) คัดแยกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว สายพันธุ์ละ 10 เส้นใยนิวเคลียส ผสมพันธุ์แบบสปอร์เดี่ยว (Mono-mono crossing) โดยจับที่ละคู่ผสมแบบพบกันหมด

(3) นำลูกผสมเห็ดถั่งเช่าสีทองมาเลี้ยงบนข้าวหอมมะลิผสมอาหาร MMN โดยเลี้ยงในที่มืดนาน 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญเต็มอาหารเพาะเลี้ยง นำไปวางใต้แสงไฟที่ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ นาน 12 ชั่วโมง/วัน เพื่อกระตุ้นการสร้างดอกเห็ดเป็นเวลา 6 สัปดาห์

(4) ประเมินผลผลิตและปริมาณคอร์เดเซปินของลูกผสมที่ได้ เพื่อคัดเลือกลูกผสมที่ให้สารคอร์เดเซปินสูง สำหรับใช้เป็นสายพันธุ์ใหม่แนะนำแก่เกษตรกรต่อไป

-การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูล ได้แก่ ข้อมูลการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหารวุ้น PDA ลักษณะของดอกเห็ด ขนาดดอกเห็ด (ความกว้างและความยาว) น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของผลผลิต และอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ปริมาณสารคอร์เดเซปิน ข้อมูลสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

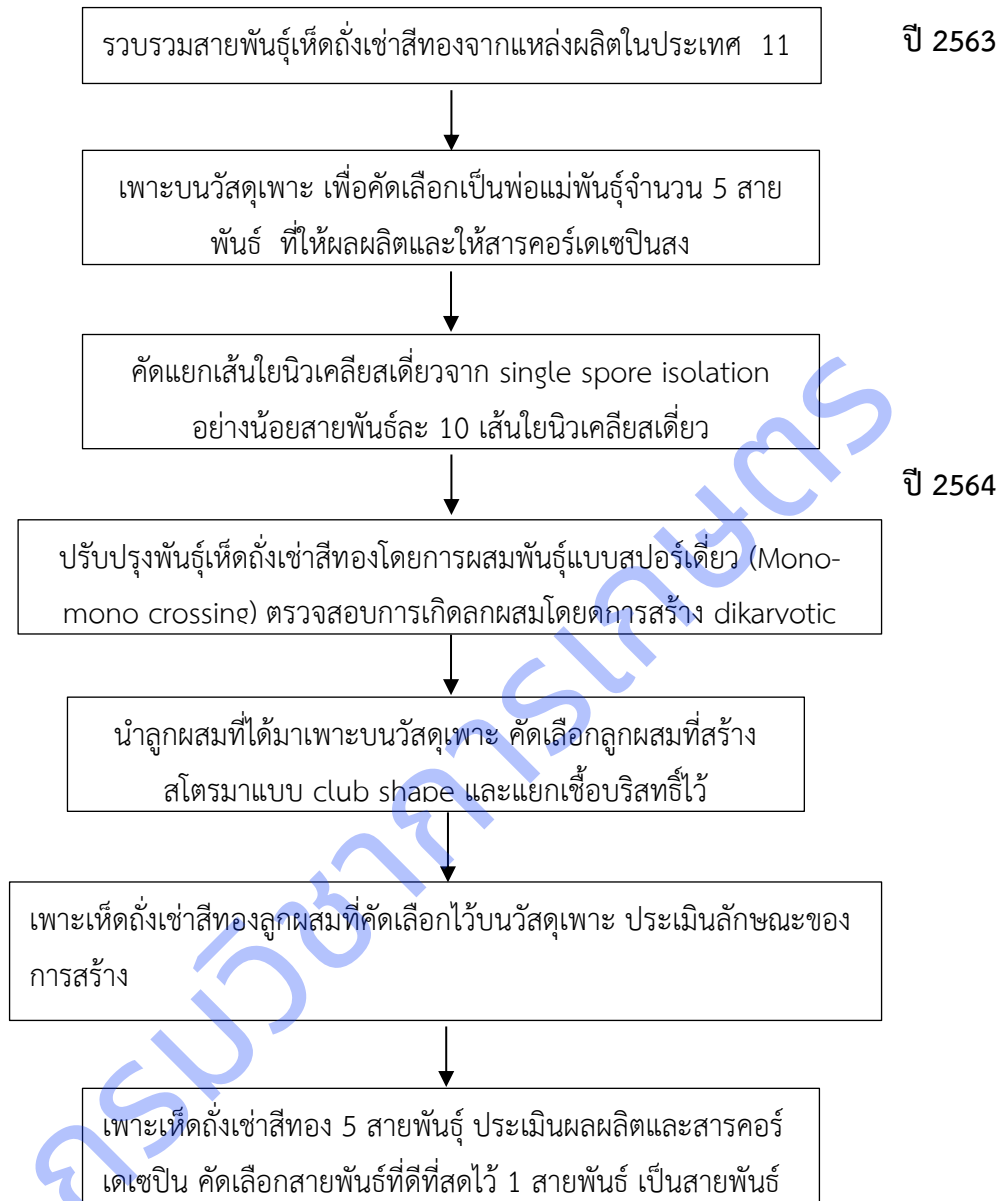
**เกณฑ์การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์** ดังนี้ สายพันธุ์ที่เส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองมีการเจริญเติบโตรวดเร็ว มีเส้นใยหนาแน่น ให้ผลผลิตดอกเห็ดสูง ให้ดอกหรือสโตรมารูปทรงกระบอก (Club shape) ที่มีสีส้มทองสดใส ขนาดสม่ำเสมอ ไม่มีการแตกแขนงที่ส่วนปลายของหมวกดอก และมีสารสำคัญสูงจากการประเมินปริมาณสารคอร์เดเซปิน /อะดีโนซีน ซึ่งวิเคราะห์จากดอกเห็ดอบแห้งบดผงละเอียด

- เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด ธันวาคม 2564

- สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ต.ป่าอ้อดอนชัย อ.เมือง จ.เชียงราย

ขั้นตอนการคัดเลือกพันธุ์และผสมพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง  
ขั้นตอน

ระยะเวลา



กิจกรรมที่ 2 เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อให้ได้คอร์เดเซปินสูง

การทดลองที่ 2.1 ชนิดของธัญพืชเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิตและสารคอร์เดเซปินสูง

วิธีการดำเนินงาน

วางแผนการทดลองแบบ RCB 7 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ (จำนวน 10 ขวด/ซ้ำ) โดยกรรมวิธี คือ ชนิดธัญพืช ได้แก่

1. ข้าวกล้องหอมมะลิ
2. ข้าวขาวหอมมะลิ
3. ข้าวเจ้า
4. ข้าวเหนียว
5. ข้าวญี่ปุ่น
6. ข้าว กข 43

3. ข้าวไรซ์เบอร์รี่

7. ลูกเดือย

4. ข้าวขาวเสาไห้

- นำเมล็ดธัญพืชใส่ในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ ขวดละ 25 กรัม แล้วเติมสารละลาย MMN (ภาคผนวก) ขวดละ 25 กรัม สำหรับลูกเดือยจะต้องแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน ก่อนนำไปล้างทำความสะอาดแล้วจึงบรรจุขวด เติมสารละลาย MMN นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที

- เตรียมหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยเลี้ยงเส้นใยในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 7,800 - 8,400 รอบ/ชั่วโมง โดยเขย่า 2 ชั่วโมง และหยุด 1 ชั่วโมง นาน 6 วัน นำเชื้อเหลวเทลงบนวัสดุเพาะขวดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเชื้อในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ 20 - 22 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยของเห็ดถั่งเช่าเจริญเติบโตเต็มอาหาร นำไปวางไว้ใต้แสงไฟที่ความเข้มแสง 600 - 1,000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการสร้างดอกเห็ด (stroma) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

- บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ได้แก่ วัดความยาว ชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด รวมทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งวัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

- วิเคราะห์ปริมาณคอร์เตเซพินและอะดีโนซีนในผลผลิตโดยวิธี High Performances Liquid Chromatography (HPLC) ที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์ความเลิศด้านสมุนไพรและการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

## การทดลองที่ 2.2 สูตรอาหารชนิดต่างๆต่อผลผลิตและสารคอร์เตเซพินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

วิธีการดำเนินงาน

- อุปกรณ์

- |                                 |                       |
|---------------------------------|-----------------------|
| 1. หม้อนึ่งความดัน              | 6. เครื่องชั่ง        |
| 2. ตู้เขี่ยเชื้อ                | 7. เวอร์เนียคาลิเปอร์ |
| 3. เชื้อพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง | 8. ข้าวขาวหอมมะลิ     |
| 4. สารเคมี                      | 9. ผงวุ้น             |
| 5. ขวดเลี้ยงเชื้อ               | 10. มันฝรั่ง          |

- วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ (จำนวน 10 ขวด/ซ้ำ) ประกอบด้วย

สูตรที่ 1 น้ำตาลทรายแดง 10 กรัม เปปโตน 10 กรัม ดีเกลือ 0.5 กรัม วิตามินบี 1 จำนวน 4 เม็ด / น้ำ 1 ลิตร

สูตรที่ 2 กลูโคส 7.5 กรัม เปปโตน 3.75 กรัม ผงดักแด่ 7.5 กรัม ปุ๋ยสูตร 0-52-34 0.75 กรัม ดีเกลือ 0.38 กรัม / น้ำ 1 ลิตร

สูตรที่ 3 น้ำตาลทรายแดง 30 กรัม ยีสต์ 7.5 กรัม ไข่ไก่ 7.5 กรัม นมสด 75 กรัม นมผง 11.25 กรัม

วิตามินบี 1 จำนวน 15 เม็ด / น้ำ 1 ลิตร

สูตรที่ 4 เปปโตน 10.2 กรัม ผงดักแด้ 25.5 กรัม ปุ๋ยสูตร 0-52-34 1.125 กรัม ดีเกลือ 0.9 กรัม / น้ำ 1 ลิตร

สูตรที่ 5 control สูตรอาหาร MMN (Modified Melin Norkran medium) (ภาคผนวก)

- นำเมล็ดข้าวขาวหอมมะลิใส่ในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ ขวดละ 25 กรัม และเติมด้วยสูตรอาหารทั้ง 5 กรรมวิธี จำนวน 25 มิลลิลิตรต่อขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที

- เตรียมหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยเลี้ยงเส้นใยในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 7,800 - 8,400 รอบ/ชั่วโมง โดยเขย่า 2 ชั่วโมง และหยุด 1 ชั่วโมง นาน 6 วัน นำเชื้อเหลวเทลงบนวัสดุเพาะขวดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเชื้อในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ 20 - 22 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยของเห็ดถั่งเช่าเจริญเติบโตเต็มอาหาร นำไปวางไว้ใต้แสงไฟที่ความเข้มแสง 600 - 1,000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการสร้างดอกเห็ด (stroma) เป็นเวลา 6 สัปดาห์

- บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่าสีทองบนสูตรอาหารแต่ละชนิดทุกสองสัปดาห์ ตั้งแต่เริ่มให้แสง ปกติจนถึงเวลาเก็บเกี่ยวดอกเห็ด

- บันทึกข้อมูลความยาวดอกเห็ด ชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด รวมทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งวัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง วิเคราะห์สารคอร์เดเซปินในผลผลิตของแต่ละกรรมวิธี นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาที่ดำเนินการ เริ่มต้น ตุลาคม 2562 - สิ้นสุด กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย

### การทดลองที่ 2.3 อิทธิพลของไฟแอลอีดีสีต่างๆต่อผลผลิตและปริมาณสารคอร์เดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง วิธีการดำเนินงาน

- วิธีดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย

วางแผนการทดลองแบบ RCB 6 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ (20 ขวดทดลอง/กรรมวิธี) โดยกรรมวิธีคือ แสงจากหลอด LED ที่มีสีต่างกัน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง

1. เตรียมชั้นสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง และติดตั้งไฟ LED (LED strip 220v 5050 14w 60led (IP67) RGB เหนือชั้นวางขวดทดลอง ให้ได้สีของไฟตามกรรมวิธีที่กำหนด สีของไฟ กำหนดโค้ด ตาม RGB Color Codes Chart โดยอ้างอิง [https://www.rapidtables.com/web/color/RGB\\_Color.html](https://www.rapidtables.com/web/color/RGB_Color.html)

กรรมวิธีมีดังนี้

กรรมวิธีที่	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 3
1.	แสงสีน้ำเงิน (Hex #3333FF) (R G B ; 51 51 255)	แสงสีน้ำเงิน (Hex #3333FF) (R G B ; 51 51 255)

2.	แสงสีชมพู (Hex #FF33FF) (R G B ; 255 51 255)	แสงสีชมพู (Hex #FF33FF) (R G B ; 255 51 255)
3.	แสงสีเขียว (Hex #00990C) (R G B ; 0 153 0)	แสงสีเขียว (Hex #00990C) (R G B ; 0 153 0)
4.	แสงสีเหลือง (Hex #FFFF66) (R G B ; 255 255 102)	แสงสีเทอร์คอยส์ (Hex # 00FFFF) (R G B ; 0 255 255)
5.	แสงสีแดง (Hex #CC000) (R G B ; 204 0 0)	แสงสีม่วง (Hex #B266FF) (R G B ; 178 102 255)
6.	แสงสีขาว (Hex #FFFFFF) (R G B ; 255 255 255)	แสงสีขาว (Hex #FFFFFF) (R G B ; 255 255 255)

โดยกรรมวิธีของการทดลองครั้งที่ 2 เหมือนการทดลองครั้งที่ 1 แต่ปรับความเข้มของแสงให้ค่าความร้อนลดลง

## 2. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองบนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA)

นำเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง ที่ได้รับจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจังหวัดเชียงใหม่ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ซึ่งประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม กลูโคส 20 กรัม และผงวุ้น 18 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อทิ้งให้เย็นแล้วใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง วางลงบนจานอาหารด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

## 3. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB)

ส่วนประกอบที่ใช้ทำอาหารเหลว PDB คือ มันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เตรียมโดยต้มมันฝรั่งที่หั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในน้ำกลั่นจนกระทั่งสุกและกรองเอาเฉพาะน้ำต้มมันฝรั่ง และปรับปริมาตรโดยเติมน้ำให้เท่ากับ 1 ลิตร เติมน้ำตาลกลูโคส คนให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน ตวงอาหารที่เตรียมเสร็จใส่ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารขวดละ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ด้วยแรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่ออาหาร PDB เย็นลง ใช้ Cork Borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรเจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองให้ได้ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใย ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและใส่ลงในขวดอาหารเหลว ขวดละประมาณ 3 ชิ้น แล้วนำขวดไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 7,800 - 8,400 รอบ/ชั่วโมง โดยเขย่า 2 ชั่วโมง และหยุด 1 ชั่วโมง นาน 6 วัน ในห้องมืดที่มีอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส

## 4. การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารแข็ง

ใช้ข้าวหอมมะลิที่เติมด้วยอาหาร Modified Melin Norkans medium (MMN) เป็นวัสดุเพาะอาหาร MMN 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

4.1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>      250 มก.      4.6 FeEDTA      20 มก.

4.2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500	มก.	4.7	Glucose	10	กรัม
4.3	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	150	มก.	4.8	Malt extract	3	กรัม
4.4	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50	มก.	4.9	Thiamine HCl	0.1	ไมโครกรัม
4.5	NaCl	25	มก.	4.10	น้ำกลั่น	1	ลิตร

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงโดยใช้ข้าวหอมมะลิ 25 กรัม บรรจุในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ และเติมสารละลาย MMN ขวดละ 25 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที

#### 5. การปลูกเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองบนอาหารแข็ง

นำเชื้อบริสุทธิ์เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB มาเทลงในขวดเพาะเลี้ยง ขวดละประมาณ 5 มล. โดยทำในตู้เขี่ยเชื้อ ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

6. ระบายบ่มเส้นใย นำขวดเพาะเลี้ยงไปวางในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ 20 - 22 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญเต็มวัสดุ

7. กระตุ้นการสร้าง stroma (ดอกเห็ด) โดยนำขวดเพาะเลี้ยงไปวางใต้แสงไฟ LED สีต่างๆตามกรรมวิธีที่กำหนด ให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

8. เก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 8 สัปดาห์ โดยการนำทั้งวัสดุเพาะและดอกเห็ดออกจากขวด บันทึกจำนวนดอกเห็ด/ขวด ขนาดของดอกเห็ดโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดตรงกึ่งกลางดอกเห็ด) และความยาวของดอกเห็ด บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดและวัสดุเพาะเลี้ยงของแต่ละกรรมวิธี

9. วัดสีของดอกเห็ดด้วยเครื่องวัดสียี่ห้อ FRU Model WR-18 ซึ่งใช้ระบบสี CIE L\*a\*b\* (CIEAB) โดยระบบสี CIEAB เป็นระบบการวัดสีที่คำนึงถึงองค์ประกอบ 3 ประการ คือ Light source คือแหล่งกำเนิดแสง ; Color object คือ วัตถุมีสี และ Observer คือ ผู้สังเกตการณ์ โดย L\* ใช้กำหนดค่าความสว่าง (Lightness) L = 0 สีที่ได้จะมีมืดเป็นสีดำ L = 100 สีที่ได้จะสว่างเป็นสีขาว

a\* ใช้กำหนดสีแดงหรือสีเขียว; a เป็น + วัตถุมีสีออกแดง a เป็น - วัตถุมีสีออกเขียว;

b\* ใช้กำหนดสีเหลืองหรือสีน้ำเงิน b เป็น + วัตถุมีสีออกเหลือง b เป็น - วัตถุมีสีออกน้ำเงิน

10. อบแห้งดอกเห็ดและวัสดุเพาะด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

11. วิเคราะห์ปริมาณคอร์เตซอลและอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง โดยบดตัวอย่างเป็นผงแล้วส่งวิเคราะห์โดยวิธี High Performances Liquid Chromatography (HPLC) ที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์ความเลิศด้านสมุนไพรและการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

### การทดลองที่ 2.4 เปรียบเทียบการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองในสภาพที่ควบคุมและไม่ควบคุมอุณหภูมิ

#### วิธีการดำเนินงาน

เพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารแข็ง โดยเฉพาะเลี้ยงในสภาพไม่ควบคุมอุณหภูมิที่ความสูงสองระดับได้แก่ที่โครงการพัฒนาอดอยตุง (920 เมตรจากระดับน้ำทะเล) และ ที่ ศวพ.กส. เชียงราย (วาวี 1,200 เมตร) เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในสภาพควบคุมอุณหภูมิที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ทำการทดสอบทั้งหมด 20 ครั้ง ดังนี้

ครั้งที่ 1 ระหว่าง 6 ธ.ค. 62 – 4 ก.พ. 63  
 ครั้งที่ 2 ระหว่าง 3 ม.ค. 63 – 3 มี.ค. 63  
 ครั้งที่ 3 ระหว่าง 6 ก.พ. 63 – 7 เม.ย. 63  
 ครั้งที่ 4 ระหว่าง 5 มี.ค. 63 – 5 พ.ค. 63  
 ครั้งที่ 5 ระหว่าง 16 เม.ย. 63 – 15 มิ.ย. 63  
 ครั้งที่ 6 ระหว่าง 28 พ.ค. 63 – 29 ก.ค. 63  
 ครั้งที่ 7 ระหว่าง 26 มิ.ย. 63 – 24 ส.ค. 63  
 ครั้งที่ 8 ระหว่าง 23 ก.ค. 63 – 21 ก.ย. 63  
 ครั้งที่ 9 ระหว่าง 21 ส.ค. 63 – 19 ธ.ค. 63  
 ครั้งที่ 10 ระหว่าง 23 ก.ย. 63 – 24 พ.ย. 63

ครั้งที่ 11 ระหว่าง 15 ต.ค. 63 – 15 ธ.ค. 63  
 ครั้งที่ 12 ระหว่าง 18 พ.ย. 63 – 18 ม.ค. 64  
 ครั้งที่ 13 ระหว่าง 25 ธ.ค. 63 – 23 ก.พ. 64  
 ครั้งที่ 14 ระหว่าง 22 ม.ค. 64 – 22 มี.ค. 64  
 ครั้งที่ 15 ระหว่าง 18 ก.พ. 64 – 20 เม.ย. 64  
 ครั้งที่ 16 ระหว่าง 19 มี.ค. 64 – 15 พ.ค. 64  
 ครั้งที่ 17 ระหว่าง 30 เม.ย. 64 – 29 มิ.ย. 64  
 ครั้งที่ 18 ระหว่าง 21 พ.ค. 64 – 19 ก.ค. 64  
 ครั้งที่ 19 ระหว่าง 18 มิ.ย. 64 – 18 ส.ค. 64  
 ครั้งที่ 20 ระหว่าง 16 ก.ค. 64 – 14 ก.ย. 64

วิธีปฏิบัติการทดลองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองบนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA)

นำเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง ที่ได้รับจากฟาร์มเพาะเลี้ยงจังหวัดเชียงใหม่ มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ซึ่งประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม กลูโคส 20 กรัม และผงวุ้น 18 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อทิ้งให้เย็น ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟ ฆ่าเชื้อแล้ว เชียเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง วางลงบนจานอาหารด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

2. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB)

ส่วนประกอบที่ใช้ทำอาหารเหลว PDB คือ มันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เตรียมโดยต้มมันฝรั่งที่หั่นเป็นลูกเต๋ารายขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในน้ำกลั่นจนกระทั่งสุกและกรองเอา เฉพาะน้ำต้มมันฝรั่ง และปรับปริมาตรโดยเติมน้ำให้เท่ากับ 1 ลิตร เติมน้ำตาลกลูโคส คนให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน ตวงอาหารที่เตรียมเสร็จใส่ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารขวดละ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ด้วยแรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่ออาหาร PDB เย็นลง ใช้ Cork Borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรเจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองให้ได้ชั้นวุ้นที่มีเส้นใย ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและใส่ลงในขวดอาหารเหลว ขวดละประมาณ 3 ชั้น แล้วนำขวดไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 7,800 - 8,400 รอบ/ชั่วโมง โดยเขย่า 2 ชั่วโมง และหยุด 1 ชั่วโมง นาน 6 วัน ในห้องมืดที่มีอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส

3. การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารแข็ง

ใช้ข้าวหอมมะลิที่เติมด้วยอาหาร Modified Melin Norkans medium (MMN) เป็นวัสดุเพาะอาหาร MMN 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

4.1 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	250 มก.	4.6 FeEDTA	20 มก.
4.2 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500 มก.	4.7 Glucose	10 กรัม
4.3 MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	150 มก.	4.8 Malt extract	3 กรัม

4.4	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50	มก.	4.9	Thiamine HCl	0.1	ไมโครกรัม
4.5	NaCl	25	มก.	4.10	น้ำกลั่น	1	ลิตร

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงโดยใช้ข้าวหอมมะลิ 25 กรัม บรรจุในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ และเติมสารละลาย MMN ขวดละ 25 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที

4. การปลูกเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองบนอาหารแข็ง นำเชื้อบริสุทธิ์เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB มาเทลงในขวดเพาะเลี้ยง ขวดละประมาณ 5 มล. โดยทำในตู้เชื้อเชื้อ ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

5. ระบายบ่มเส้นใย นำขวดเพาะเลี้ยงไปวางในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ 20 - 22 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญเต็มวัสดุ

6. กระตุ้นการสร้าง stroma (ดอกเห็ด) โดยนำขวดเพาะเลี้ยงไปวางใต้แสงไฟ LED ให้แสงไม่น้อยกว่า 700 ลักซ์ 12 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ศวพ.กส.เชียงราย โครงการพัฒนาออยตุงและสภาพควบคุมอุณหภูมิที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย

7. เก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 8 สัปดาห์ โดยการนำทั้งวัสดุเพาะและดอกเห็ดออกจากขวด บันทึกจำนวนดอกเห็ด/ขวด ขนาดของดอกเห็ดโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดตรงกึ่งกลางดอกเห็ด) และความยาวของดอกเห็ด บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดและวัสดุเพาะเลี้ยงของแต่ละกรรมวิธี

- นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบ และวิเคราะห์ผลทางสถิติ

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย โครงการพัฒนาออยตุง อ.แม่ฟ้าหลวง และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย (วาวี) อ.แม่สรวย จ.เชียงราย

### กิจกรรมที่ 3 การขยายผลเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อให้ได้คอร์เดเซปินสูง

#### 3.1 การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ หลักสูตร เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง

วิธีการดำเนินงาน

1. จัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ (on site) หลักสูตร เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย อ.เมือง จ. เชียงราย เมื่อวันที่ 11 มีนาคม 2564

2. จัดฝึกอบรม หลักสูตร เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยฝึกอบรมออนไลน์ผ่านระบบ zoom cloud meeting ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย เมื่อวันที่ 3 ธันวาคม 2564

#### 3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

ไม่มี  มี ได้รับอนุมัติเมื่อวันที่..... (โปรดแสดงหลักฐานในภาคผนวก)

เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....



## บทที่ 3 ผลการศึกษา

### 3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

สรุปผลการดำเนินงานที่ทำได้จริง โดยให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของโครงการ (สรุปภาพรวมของโครงการ)

1. การรวบรวม เปรียบเทียบลักษณะและประเมินผลผลิตของเห็ดถั่งเช่าสีทอง ซึ่งรวบรวมจากแหล่งผลิตภายในประเทศ จำนวน 11 สายพันธุ์ สามารถคัดเลือกเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ 5 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและสารสำคัญสูง ได้แก่ CR1, CR3, CR5, CM1 และ CM2 ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ใหม่

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 7 ไอโซเลท พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน ITS-UM ตำแหน่งที่ 43 ในเห็ดถั่งเช่าตัวอย่างรหัส O จากเบส A เป็นเบส G สำหรับยีน V9 ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการจัดทำแผนผังพันธุกรรมทั้งสองยีนไม่แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม

3. สร้างลูกผสมโดยนำพ่อแม่พันธุ์ไปคัดแยกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวและจับคู่ผสมแบบสปอร์เดี่ยว ลูกผสมสายพันธุ์คัดเลือกที่ผ่านการประเมินผลผลิตจำนวน 22 คู่ผสม นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ พบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองลูกผสมจากการปรับปรุงพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและมีสารคอร์เดเซปินสูง จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ CR1-9 x CR3-9 และ CM1-10 x CR3-4

4. เปรียบเทียบการใช้ยู่พืช 7 ชนิด ได้แก่ ข้าวกล้องหอมมะลิ ข้าวขาวหอมมะลิ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวขาวเสาไห้ ข้าวญี่ปุ่น ข้าว กข. 43 และลูกเดือย พบว่าลูกเดือยเป็นยู่พืชเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิต และสารคอร์เดเซปินสูงที่สุด

5. การเปรียบเทียบสูตรอาหาร 5 สูตร พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ 5 คือ MMN (Modified Melin Norkran medium) ให้ค่าประสิทธิภาพการผลิตมากที่สุด เท่ากับ 82.87 เปอร์เซ็นต์ จึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้ เนื่องจากต้นทุนการผลิตต่ำ และวิธีการเตรียมไม่ยุ่งยาก อย่างไรก็ตามควรประยุกต์ใช้สูตรอาหารที่ 5 ร่วมกับสูตรอาหารที่ 1 (ประกอบด้วย น้ำตาลทรายแดง 10 กรัม เปปโตน 10 กรัม ตีเกลือ 0.5 กรัม วิตามินบี 1 จำนวน 4 เม็ด / น้ำ 1 ลิตร) เนื่องจากสูตรอาหารที่ 1 ให้สารสำคัญคอร์เดเซปินและอะดีโนซีนสูง

6. การให้แสง LED สีเขียวในช่วงการกระตุ้นดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองจะให้ทั้งผลผลิตและสารคอร์เดเซปิน และอะดีโนซีนในระดับดีกว่าแสงสีอื่น

7. เปรียบเทียบการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองในสภาพที่ควบคุมและไม่ควบคุมอุณหภูมิ พบว่าบนพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 900 เมตรขึ้นไป สามารถเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองในห้องที่ไม่ควบคุมอุณหภูมิได้ตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงกุมภาพันธ์

8. ได้ขยายผล เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองให้เกษตรกร และผู้สนใจโดยการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ 1 ครั้ง มีผู้เข้ารับการฝึกอบรมจำนวน 30 คน และจัดฝึกอบรมออนไลน์ผ่านระบบ zoom cloud meeting จำนวน 1 ครั้ง มีผู้เข้ารับการฝึกอบรมรวม 27 คน

### 3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วย นับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วย นับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
1. องค์ความรู้	1	เรื่อง	1. องค์ความรู้	1	เรื่อง	เรื่องเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง (แม่พันธุ์)	เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิตและสารคอร์เดเซปินสูงช่วยเพิ่มมูลค่าผลผลิต
2. ต้นแบบเทคโนโลยี			2. ต้นแบบเทคโนโลยี				
2.1 ระดับภาคสนาม	-	ต้นแบบ	2.1 ระดับภาคสนาม	-	ต้นแบบ	-	-
2.2 ระดับห้องปฏิบัติการ	2	สายพันธุ์	2.2 ระดับห้องปฏิบัติการ	2	สายพันธุ์	ลูกผสมเห็ดถั่งเช่าสีทอง 2 สายพันธุ์ (CR1-9 x CR3-9 และ CM1-10 x CR3-4)	สายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองจากการปรับปรุงพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและสารคอร์เดเซปินสูง

### 3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output) ต่อ

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
4. กระบวนการใหม่	1	กระบวนการ	การผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง ในสภาพไม่ควบคุม อุณหภูมิ	1	กระบวนการ	พื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล ตั้งแต่ 900 เมตรขึ้นไป สามารถเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองในห้องที่ไม่ควบคุม อุณหภูมิได้ตั้งแต่เดือน ตุลาคมถึงกุมภาพันธ์	ประหยัด พลังงานและ ลดต้นทุนการผลิต ช่วยลด ภาวะโลกร้อน
8. ผลงานตีพิมพ์	1	เรื่อง	อิทธิพลของไฟแอลลีตีสี ต่างๆ ต่อผลผลิตและ ปริมาณสารคอร์เดเซปิน ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง	1	เรื่อง	ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ ในวารสารวิชาการเกษตร (ภายในปี 2565)	นักวิจัยได้ ข้อมูลต้นแบบ การใช้ไฟ แอลอีตีเพื่อเพิ่ม ปริมาณ สารสำคัญใน การผลิตเห็ด ถั่งเช่าสีทอง

### 3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
องค์ความรู้ เรื่องเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง เป็นชุดข้อมูลที่เกษตรกร หรือผู้ประกอบการสามารถนำไปต่อยอดใช้สำหรับการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อเสริมสร้างรายได้หรือพัฒนาเชิงการค้า	2564
บทความวิชาการ เรื่องอิทธิพลของไฟแอลลีตีสีต่างๆต่อผลผลิตและปริมาณสารคอร์เดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง นักวิจัยได้ข้อมูลต้นแบบเรื่องการใช้ไฟแอลลีตีเพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญในเห็ดถั่งเช่าสีทอง	2565
ลูกผสมเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิต และมีสารสำคัญสูง ได้ขยายผลแก่กลุ่มเกษตรกร อ.แม่ลาว จ.เชียงรายและพื้นที่ใกล้เคียงใช้ในการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่า	2565

\*ผลลัพธ์ : ผลสำเร็จที่เกิดจากการนำผลผลิต (Output) ไปต่อยอด การเปลี่ยนรูปของผลผลิตไปสู่รูปแบบที่ใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง หรือการเคลื่อนผลผลิตไปสู่กิจกรรมที่ต่อเนื่อง ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Change) ที่ปรากฏชัด และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม

### 3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านเศรษฐกิจ : ผู้เพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองสามารถใช้สายพันธุ์ใหม่และเทคโนโลยีการผลิตช่วยสร้างรายได้ให้เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 15%	2565
ด้านสังคม : ช่วยส่งเสริมคุณภาพชีวิตและความเป็นอยู่ของผู้เพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองให้ดีขึ้น เนื่องจากมีรายได้เพิ่ม	2565
ด้านสิ่งแวดล้อม : เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงในสภาพไม่ควบคุมอุณหภูมิช่วยประหยัดพลังงาน และลดต้นทุนการผลิต รวมทั้งลดภาวะโลกร้อน	2565
ด้านสาธารณสุข : เห็ดถั่งเช่าสีทองมีสารสำคัญที่มีสรรพคุณช่วยบำรุงสุขภาพ ช่วยให้ผู้บริโภคลดความเสี่ยงจากการเจ็บป่วย ส่งผลให้ประหยัดงบประมาณด้านการรักษา และสาธารณสุข	2566

\* ผลกระทบ : ผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงตามผลลัพธ์ (Results of the change) ซึ่งวัดได้อย่างชัดเจนและมีหลักฐานปรากฏชัด (Evidence-based) ทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม ทั้งที่วัดในเชิงปริมาณได้และไม่ได้ ผลกระทบอาจเป็นได้ทั้งทางบวกและทางลบ

### 3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

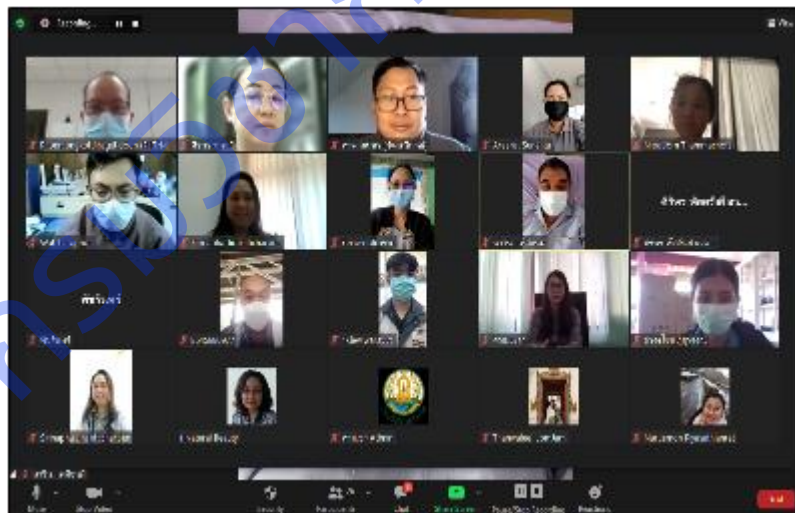
วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดแนบหลักฐานเชิงประจักษ์การนำผลงานไปใช้ประโยชน์)  
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- จัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่องเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง 1 ครั้ง เมื่อวันที่ 11 มีนาคม 2564 มีผู้เข้าร่วมฝึกอบรม 30 คน



ภาพที่ 1 การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการหลักสูตร เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง  
ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย วันที่ 11 มีนาคม 2564

- จัดฝึกอบรมออนไลน์ เรื่องเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง 1 ครั้ง เมื่อวันที่ 3 ธันวาคม 2564 มีผู้เข้าร่วมอบรม 27 คน



ภาพที่ 2 การฝึกอบรมออนไลน์หลักสูตร เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง วันที่ 3 ธันวาคม 2564

ด้านนโยบาย -

ด้านสังคม -

# ด้านเศรษฐกิจ

- เกษตรกรหรือผู้สนใจที่ได้รับการฝึกอบรมได้นำองค์ความรู้เรื่อง เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองไปประกอบอาชีพ เกิดการสร้างงาน สร้างรายได้ให้ครอบครัว

# ด้านวิชาการ

- บทความวิชาการ เรื่อง อิทธิพลของไฟแอลลีตีส์ต่างๆ ต่อผลผลิตและปริมาณสารคอร์เดเซียนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการเกษตร เป็นข้อมูลเทคโนโลยีการผลิตให้ผู้เพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองนำไปปรับใช้ และเป็นข้อมูลวิชาการสำหรับนักวิจัยเพื่อศึกษาต่อยอดได้
- จัดทำแผนพับเรื่อง เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง เพื่อเผยแพร่แก่ผู้สนใจทั่วไป

**เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง**

**วัตถุประสงค์**  
ผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองคุณภาพดีเพื่อจำหน่ายในตลาดการค้าและเพื่อการบริโภคในประเทศและต่างประเทศ

**ขั้นตอนการผลิต**  
1. การเตรียมวัสดุเพาะ  
2. การหมักวัสดุเพาะ  
3. การบรรจุวัสดุเพาะ  
4. การฆ่าเชื้อวัสดุเพาะ  
5. การ инокуляция  
6. การบ่มเชื้อ  
7. การเก็บเกี่ยว  
8. การอบแห้ง  
9. การบรรจุภัณฑ์  
10. การกระจายสินค้า  
11. การตลาด

**ข้อมูลเชิงเทคนิค**  
- วัสดุเพาะ: ข้าวสาร 1 กก., รำข้าว 1 กก., ขี้เถ้า 1 กก.  
- อุณหภูมิ: 22-25 °C  
- ระยะเวลา: 7-10 วัน  
- อุณหภูมิอบแห้ง: 60-70 °C  
- ระยะเวลาอบแห้ง: 24-48 ชั่วโมง

**ข้อมูลเชิงพาณิชย์**  
- ราคาขายปลีก: 150 บาท/กก.  
- ราคาขายส่ง: 120 บาท/กก.  
- ระยะเวลาการเก็บเกี่ยว: 7-10 วัน

ภาพที่ 3 เอกสารแผนพับ เรื่อง เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง พิมพ์ครั้งที่ 1 พ.ศ. 2564 จำนวน 500 ฉบับ

## บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

### สรุปผล

ประเมินผลผลิตและลักษณะเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 11 สายพันธุ์เพื่อคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่ให้ผลผลิตและสารสำคัญสูงได้ 5 สายพันธุ์ คือ CR1 CR3 CR5 CM1 CM2 ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สร้างลูกผสม โดยวิธีคัดแยกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว และจับคู่ผสมแบบพบกันหมด คัดเลือกลูกผสมที่ผ่านการประเมิน ได้ 22 คู่ผสม วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญพบว่า ลูกผสมที่ให้ผลผลิตและคอร์เดเซปินสูง 2 สายพันธุ์คือ CR1-9 x CR3-9 และ CM1-10 x CR3-4

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 7 ไอโซเลท เพื่อใช้ประโยชน์ในการตรวจพิสูจน์สายพันธุ์ พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน ITS-UM ตำแหน่งที่ 43 ในเห็ดถั่งเช่าสีทองตัวอย่างรหัส O จากเบส A เป็นเบส G สำหรับยีน V9 ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการจัดทำแผนผังพันธุกรรมทั้งสองยีนไม่แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม

เปรียบเทียบการใช้ธัญพืช 7 ชนิด ได้แก่ ข้าวกล้องหอมมะลิ ข้าวขาวหอมมะลิ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวขาวเสก ให้ ข้าวญี่ปุ่น ข้าวขาวกข. 43 และลูกเดือย พบว่าลูกเดือยเป็นธัญพืชเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ให้ผลผลิต และสารคอร์เดเซปินสูงที่สุด

การเปรียบเทียบสูตรอาหาร 5 สูตร พบว่า สูตรที่ 5 คืออาหาร MMN (Modified Melin Norkran medium) ให้ค่าประสิทธิภาพการผลิตมากที่สุด เท่ากับ 82.87 เปอร์เซ็นต์ จึงเหมาะสำหรับการนำไปใช้เนื่องจากต้นทุนการผลิตต่ำ และวิธีการเตรียมไม่ยุ่งยาก อย่างไรก็ตามควรประยุกต์ใช้สูตรอาหารที่ 5 ร่วมกับสูตรอาหารสูตรที่ 1 (น้ำตาลทรายแดง 10 กรัม เปปโตน 10 กรัม ดีเกลือ 0.5 กรัม วิตามินบี 1 จำนวน 4 เม็ด / น้ำ 1 ลิตร) เนื่องจากสูตรอาหารที่ 1 ให้สารสำคัญคอร์เดเซปิน และอะดีโนซีนสูง

การให้แสง LED สีเขียวในช่วงการกระตุ้นดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองจะให้ทั้งผลผลิต และสารคอร์เดเซปินและอะดีโนซีนในระดับดีกว่าแสงสีอื่น

เปรียบเทียบการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองในสภาพที่ควบคุมและไม่ควบคุมอุณหภูมิ พบว่าบนพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 900 เมตรขึ้นไป สามารถเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองในห้องที่ไม่ควบคุมอุณหภูมิได้ตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงกุมภาพันธ์

การขยายผล เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองให้เกษตรกรและผู้สนใจ โดยการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ 1 ครั้ง มีผู้เข้ารับการฝึกอบรมจำนวน 30 คน และจัดฝึกอบรมออนไลน์ผ่านระบบ zoom cloud meeting จำนวน 1 ครั้ง มีผู้เข้ารับการฝึกอบรมรวม 27 คน

อภิปรายผล จากการทดลองในกิจกรรมที่ 1 และ 2 มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยพบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะผลผลิตดอกเห็ดที่มีความไม่สม่ำเสมอในแต่ละรอบการผลิต ซึ่งอาจจะเกิดจากการต่อเชื้อเห็ดหลายรอบ หรืออาจเกิดจากลักษณะจำเพาะของเห็ดชนิดนี้

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

ควรมีการวิจัยต่อไปดังนี้

1. ศึกษาผลการวิจัยเชิงทดลองทางคลินิก (clinical trials) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของถั่งเช่าสีทองในการป้องกันรักษาโรคต่างๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าและคุณค่าของเห็ดถั่งเช่าสีทอง
2. ศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อไม่ให้มีการกลายพันธุ์
3. ทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ในฟาร์มเกษตรกร

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

การรวบรวมเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองได้จำนวนไม่มาก เนื่องจากมีข้อจำกัดของงบประมาณ ทำให้ไม่สามารถเก็บรวบรวมสายพันธุ์จากต่างประเทศเพื่อใช้ในการศึกษา

กรมวิชาการเกษตร

## เอกสารอ้างอิง

อรุณทัตย์ ซาววา, สุภาวดี ง้อเหรียญ, อัญชลี ศรีสุวรรณ, ประพิศ วงเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118

กรมวิชาการเกษตร