รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุดปี 2563

----

1. **แผนงานวิจัย** : แผนบูรณาการวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนาการเพาะเห็ดที่มีศักยภาพ (โครงการวิจัยเดี่ยว)
3. **ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย)** : การศึกษาเทคนิคการเพาะเห็ดเผาะ

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Study on *Astraeus odoratus* Cultivation

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง นางสาวนันทินี ศรีจุมปา[1/]

   ผู้ร่วมงาน นางสุธามาศ ณ น่าน[1/] นายไว อินต๊ะแก้ว[1/]

   นางสุวลักษณ์ ชัยชูโชติ[2/]

5. **บทคัดย่อ**

การศึกษาเทคนิคการเพาะเห็ดเผาะ ดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ระหว่างปี 2560-2563 โดยรวบรวมเห็ดเผาะจากป่าเต็งรังในเขตจังหวัดเชียงราย พะเยา เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แม่ฮ่องสอน และอุตรดิตถ์ ในช่วงฤดูฝนระหว่างเดือนพฤษภาคม – กรกฎาคม ของแต่ละปี นำเห็ดเผาะมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้น potato dextrose agar (PDA) ปี 2560 ได้ 11 ไอโซเลท ปี 2561 ได้ 6 ไอโซเลท ปี 2562 ได้ 5 ไอโซเลทและปี 2563 ได้ 8 ไอโซเลท ทดสอบอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์เห็ดเผาะที่เก็บตั้งแต่ปี 2560 – 2563 รวม 19 ไอโซเลท โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเห็ดเมื่ออายุ 20 วัน พบว่าเชื้อเห็ดเผาะแต่ละไอโซเลท มีอัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีลักษณะการเจริญทางเส้นใยต่างกัน

ทดสอบการเจริญของเชื้อเห็ดเผาะ 3 ไอโซเลท ได้แก่ สะเมิง 60 ปาย 60 และ ลำพูน 60 บนอาหารสังเคราะห์ 5 ชนิด คือ Modified Melin Norkans medium (MMN), Pachlewski medium (PACH), Ferry & Das (FDA), Fries medium และ Potato dextrose agar (PDA) พบว่าเชื้อเห็ดเผาะเจริญบนอาหาร PDA และ Fries ได้ดีกว่าอาหารชนิดอื่น

ใช้หัวเชื้อเห็ดเผาะ 3 แบบ ได้แก่ หัวเชื้อจากดอกเห็ด เชื้ออาหารเหลว และ soil inoculum สำหรับปลูกเชื้อแก่กล้ายางนาในเรือนทดลองและต้นยางนาในแปลงทดลอง หัวเชื้อทั้งสามแบบทำให้เกิดมัยคอร์ไรซ่ากับรากของต้นยางนา การติดเชื้อ (infection) ของเชื้อเห็ดเผาะบนรากต้นยางนาจากแปลงที่ได้รับการปลูกเชื้อคิดเป็นร้อยละ 91.3 ของรากที่สุ่มตรวจ และปริมาณเส้นใยที่พบค่อนข้างหนาแน่น เส้นใยที่พบส่วนมากจะเป็นexternal hyphae และพบลักษณะ clamp connection สำหรับรากของต้นยางนาจากแปลงที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อพบรากมีเส้นใยเชื้อราติดอยู่คิดเป็น 14.7 % ของรากที่นำมาตรวจ และมีปริมาณเส้นใยเพียงเล็กน้อย

พบลักษณะmantle sheath และ hartig net ภายในเซลล์รากพืช ซึ่งเป็นลักษณะที่ยืนยันการเป็นเอ็คโตมัยคอร์รัยซ่าของเชื้อเห็ดเผาะกับรากยางนา

ในปี 2562 และ 2563 ติดตามการสร้างดอกเห็ดเผาะในแปลงยางนาที่ได้รับการปลูกเชื้อเมื่อปี 2561 แต่ยังไม่พบการเกิดดอกเห็ดเผาะในแปลงทดลอง ทั้งนี้อาจจะเนื่องจาก 2 สาเหตุคือปริมาณเส้นใยที่เจริญร่วมกับรากพืชอาศัยมีไม่มากเพียงพอ ถึงแม้ว่าจากการตรวจสอบรากของพืชทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อเห็ดพบว่ามีเชื้อเห็ดเจริญร่วมด้วย และอีกสาเหตุคือสภาพแวดล้อมยังไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นดอกเห็ด ซึ่งได้แก่ปริมาณน้ำฝน มีฝนตกน้อยกว่าค่าเฉลี่ยปกติ แต่จะยังติดตามการเกิดดอกเห็ดในแปลงทดลองต่อไป

Abstract

Study on cultivation of *Astraeus odoratus* was carried out at Chiangrai Horticulture Research Center during 2017 – 2020. Collect fruit bodies of *A. odoratus* from Dipterocarp forests in Chiangrai, Phayao, Chiangmai, Lamphun, Lampang, Mae Hong Son and Uttaradit during rainy season from May to July. Fruit bodies of specimens were isolated to obtain pure cultures on potato dextrose agar (PDA). Number of pure cultures which were isolated in 2017, 2018, 2019 and 2020 were 11, 6, 5 and 8 isolates, respectively. Growth of 19 isolates of those collected in 2017-2020 were compared on PDA by measuring of colony diameter after 20 days growing at room temperature. It was found that there were significant differences in growth rate and mycelial characteristics of each isolate.

Three isolates of *A. odoratus*; Samoeng 60 Pai 60 and Lamphun 60 were tested on different five media including Modified Melin Norkans medium (MMN), Pachlewski medium (PACH), Ferry & Das (FDA), Fries medium and PDA. All isolates grew well on PDA and Fries media.

Three types of inoculum including dried sporocarps with spores, liquid inculum and soil inoculum were applied to *Dipterocarpus alatus* seedlings in greenhouse and 2- year old *D. alatus* trees in the field. Mycorrhizae were found on roots inoculated with all types of

---

รหัสการทดลอง 01-153-60-01-00-00-02-60

1/ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ต.ป่าอ้อดอนชัย อ.เมือง จ.เชียงราย

2/ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

inoculum. Infection percentages of *A. odoratus* on roots were examined using microscope. Roots of Inoculated plants were colonized at 91.3 % of sampled roots while roots of control plants were found 14.7% colonized. Most of mycelium were external hyphae with clamp connection. Mantle sheath and hartig net which were special characteristics of ectomycorrhizal symbiosis were found on colonized roots.

In 2019 and 2020 fruit body of *A odoratus* hasn't been presented underneath the host trees which were inoculated since 2018. There might be two main reasons; firstly, there was not enough of mycelia colonized on roots, secondly, there was not sufficient soil moisture to induce fruit body due to less rain. However, since the experimental field is in the center, fruit body of *A odoratus* will be observed in the following year.

6. คำนำ

เห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*) หรือในภาคเหนือเรียก เห็ดถอบเป็นเห็ดที่นิยมรับประทานกันมากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปรกติจะขึ้นในป่าเต็งรังช่วงต้นฤดูฝนและมีราคาแพงมาก โดยเฉพาะช่วงต้นฤดูอาจจะราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 700 บาท เห็ดเผาะนอกจากจะนำเห็ดสดมาปรุงอาหารแล้วยังสามารถเพิ่มมูลค่าโดยการแปรรูปแบบบรรจุกระป๋อง ปัจจุบันยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ (th.wikipedia.org/wiki/เห็ดเผาะ 3 เมษายน 2557) เห็ดเผาะอยู่ในวงค์ Lycoperdaceae จัดเป็นเห็ดประเภทเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza : ECM) มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับรากพืชชั้นสูงโดยจะสร้างเส้นใยสานกันห่อหุ้มบริเวณผิวของรากแขนงมีลักษณะเป็นแผ่นเรียกว่าแผ่นแมนเทิล (mantle sheath) เส้นใยที่สานกันแทรกตัวอยู่ระหว่างเซลล์รากในชั้นคอร์เท็กซ์ เรียกว่า ฮาร์ติกเน็ต (hartig net) เส้นใยบางส่วนยื่นออกนอกรากช่วยในการดูดน้ำและธาตุอาหารให้แก่พืช ซึ่งเชื้อเห็ดจะมีความเฉพาะเจาะจงกับรากฝอย (rootlets) ของพืชอาศัย ไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เป็นดอกเห็ดได้บนอาหารสังเคราะห์ เห็ดเผาะที่มีจำหน่ายในท้องตลาดเป็นเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งในแต่ละปีจะถูกเก็บมาเพื่อบริโภคและจำหน่ายทั้งดอกอ่อนและดอกแก่ ซึ่งเป็นการทำลายพันธุ์เห็ดเนื่องจากยังไม่สร้างสปอร์เพื่อขยายพันธุ์ นอกจากนี้การที่พื้นที่ป่าเต็งรังซึ่งเป็นป่าที่พบเห็ดเผาะขึ้นตามธรรมชาตินั้นลดลงจากการบุกรุกป่า ยิ่งทำให้พื้นที่การหาเห็ดเผาะลดลงไปด้วย

ถึงแม้ว่าเอคโตไมคอร์ไรซาจะไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เป็นดอกเห็ดได้บนอาหารสังเคราะห์แต่ก็สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดอกเห็ดได้บนอาหารสังเคราะห์ เช่น MMN (Modified Melin Norkans medium; โดย Marx, 1969) FDA (Ferry & Das, 1968) หรือ PACH (Pachlewski medium; โดย Pachlewski and Pachlewski, 1974) เป็นต้น

การปลูกเชื้อเอคโตไมคอร์ไรซาลงในกล้าไม้สามารถทำได้ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการในสภาพปลอดเชื้อหรือผลิตหัวเชื้อในปริมาณมากเพื่อใช้ปลูกเชื้อลงกล้าไม้ การปลูกเชื้อECM ในสภาพปลอดเชื้อทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อECM ในอาหารเลี้ยงเชื้อและนำเมล็ดพันธุ์พืชที่ได้รับการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดแล้ววางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้น

ใยของ ECM เจริญอยู่ เมื่อรากพืชงอกออกจากเมล็ดแล้วรากก็จะแตะกับเชื้อ ECM โดยตรง (Brundrettet al., 1996) การผลิตหัวเชื้อ ECM ในปริมาณมาก นิยมผลิตเพื่อใช้ปลูกเชื้อลงในกล้าไม้ มี 2 รูปแบบ คือ หัวเชื้อจากสปอร์ และ หัวเชื้อจากเส้นใย การใช้สปอร์เป็นหัวเชื้อเหมาะสำหรับ ECM ที่มีดอกเห็ดขนาดใหญ่ เช่น Pisolithus และ Scleroderma (Castellano, 1994) ทำโดยเก็บดอกเห็ดที่บานเต็มที่จากธรรมชาติมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส จากนั้นก็นำดอกเห็ดแห้งใส่ในถุงพลาสติกและบีบให้เป็นชิ้นเล็กๆด้วยมือ (ไม่ใช้เครื่องบดตัวอย่างเนื่องจากอาจจะมีผลต่อความมีชีวิตของสปอร์) หัวเชื้อสปอร์นี้นำไปปลูกลงบนกล้าไม้ได้หลายรูปแบบเช่น ละลายในน้ำและนำไปรดลงในกล้าไม้ หรืออาจจะนำไปผสมกับสารเฉื่อยและทำเป็นเม็ด สำหรับรองก้นหลุมในขณะปลูกกล้าไม้เป็นต้น การผลิตหัวเชื้อในรูปเส้นใยทำได้โดยแยกให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์ของ ECM และเพิ่มปริมาณเส้นใยในอาหารสังเคราะห์ จากนั้นก็นำเส้นใยมาใช้เป็นหัวเชื้อโดยตรง หรืออาจจะต้องผสมกับสารอื่น เช่น hydrogel, peat-vermiculite หรือ เมล็ดธัญพืชบางชนิด (Marx and Kenney, 1982) นันทินีและคณะ (2552) รายงานว่าสามารถแยกเชื้อเห็ดตับเต่าและขยายเชื้อลงบนเมล็ดข้าวฟ่างและนำไปปลูกลงรากของต้น มะกอกน้ำ และพบดอกเห็ดตับเต่าหลังปลูกเชื้อไปแล้ว 3 ปี

การศึกษาเรื่องนี้ จะทำให้ทราบถึงเทคนิคการผลิตหัวเชื้อเห็ดเผาะ วิธีการและเทคนิคการเพาะเชื้อเห็ดเผาะลงในกล้าไม้ การสร้างแผ่นแมนเทิลของเห็ดเผาะบนรากพืชอาศัย สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและชักนำให้เกิดดอกเห็ด ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นแนวทางในการเพาะเห็ดเผาะลงบนกล้าพืชอาศัย เพื่อนำไปปลูกเพิ่มปริมาณเห็ดในธรรมชาติ สร้างแรงจูงใจในการสร้างป่าเพื่อเพาะเห็ดเผาะซึ่งอาจจะสามารถพัฒนาการผลิตเห็ดเผาะในเชิงพาณิชย์ต่อไปซึ่งนอกจากจะได้เห็ดเป็นอาหารแล้วยังเป็นการเพิ่มพื้นที่ป่าอีกด้วย

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

ต้นกล้ายางนา อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA MMN PACH FDA และ Fries medium (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก) ถุงเพาะชำ สารเคมีในห้องปฏิบัติการสำหรับทำ clearing และ staining

- วิธีการ

ในการทดสอบการปลูกเชื้อเห็ดเผาะด้วยหัวเชื้อ (inoculum) แบบต่าง ๆ เพื่อหาวิธีที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพ วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ มี 2 ต้นทดลองต่อซ้ำ ใช้ต้นยางนาสำหรับการศึกษา กรรมวิธีประกอบด้วยชนิดหัวเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ ดอกเห็ดแก่หั่นละเอียดผึ่งให้แห้งในร่มที่อุณหภูมิห้อง เส้นใยเห็ดเผาะเลี้ยงในอาหารเหลวผสมน้ำ และ เส้นใยเห็ดเผาะเลี้ยงในอาหารเหลวผสมดิน โดยมีการไม่ปลูกเชื้อเป็นกรรมวิธีควบคุม

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างเห็ดเผาะจากแหล่งต่าง ๆ ของจังหวัดเชียงรายและจังหวัดใกล้เคียง โดยจะเก็บในช่วงต้นฤดูฝน ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม ความถี่ในการเก็บตัวอย่างขึ้นกับการกระจายตัวของฝน

ตัวอย่างเห็ดที่เก็บนำมาบันทึกลักษณะทางกายภาพของเห็ดและความสัมพันธ์กับรากพืชอาศัย ดำเนินการในปี 2560 2561 2562 และ 2563

2. แยกเชื้อเห็ดเผาะบนอาหารสังเคราะห์ให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์ โดยวิธีการ tissue culture จากดอกเห็ด เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารสังเคราะห์ไว้สำหรับการทดสอบ เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ด isolates ต่างๆ บนอาหารสังเคราะห์ MMN และอาหารอื่นเพื่อเลือก isolate ที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดสำหรับการศึกษาต่อไป ดำเนินการในปี 2560 2561 2562 และ 2563

3. เพาะกล้าต้นยางนาในถุงเพาะชำขนาดกลาง และปลูกกล้ายางนาในแปลงทดลอง เพื่อใช้เป็นพืชทดสอบสำหรับปลูกเชื้อเห็ดเผาะ

4. ทดสอบการปลูกเชื้อเห็ดเผาะด้วยหัวเชื้อ (inoculum) แบบต่าง ๆ เพื่อหาวิธีที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพ ดำเนินการในปี 2561 และ 2562

5. ศึกษาการเข้าอาศัยในรากของพืชอาศัย

5.1 หลังจากปลูกเชื้อลงบนกล้าพืชอาศัยแล้ว 6 เดือน นำรากของกล้าพืชอาศัยมาล้างให้สะอาด และตรวจสอบการเข้าอยู่อาศัยของเห็ดเผาะด้วยตาเปล่า เนื่องจากรากพืชที่มี ECM อาศัยอยู่นั้นจะต่างจากรากปกติในเรื่องของสี ความหนา และการแตกแขนง ดำเนินการในปี 2561 – 2563

5.2 หาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (infection) ของเห็ดเผาะบนกล้าพืช โดยตัดรากออกเป็นชิ้น ให้มีความยาว ชิ้นละ 1 – 1.5 เซนติเมตร นำมา clearing โดยการต้มด้วย KOH 10% ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง และย้อมสีด้วย trypan blue และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สุ่มชิ้นส่วนของรากที่ย้อมสีแล้ว 50 ชิ้นวางลงบนแผ่นสไลด์ ครั้งละ 5 ชิ้น นับจำนวนชิ้นส่วนของรากที่พบว่ามีเชื้อเห็ดเผาะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแต่ละชุดการทดลอง เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ ดำเนินการในปี 2561 - 2563

6. ศึกษาการสร้างดอกเห็ดของพืชอาศัยที่ได้รับการปลูกเชื้อ ในสภาพแปลงโดยปลูกยางนาเพื่อใช้เป็นพื้นที่ทดลอง แล้วนำเชื้อเห็ดเผาะที่ได้จากการเลี้ยงขยายบนอาหารสังเคราะห์นำไปปลูกเชื้อลงบนต้นยางนาและติดตามการสร้างดอกเห็ดเผาะในแปลงทดลอง ดำเนินการในปี 2561 – 2563

- **การบันทึกข้อมูล**

1. ลักษณะดอกเห็ดเผาะที่เก็บได้
2. อัตราการเจริญเติบโตทางเส้นใยของเห็ดเผาะแต่ละไอโซเลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ
3. ลักษณะการสร้างแผ่นแมนเทิลและฮาร์ติกเน็ตของเห็ดเผาะบนรากพืชอาศัย
4. การเกิดดอกเห็ดเผาะในเรือนทดลองและในแปลงทดลอง
5. อุตุนิยมวิทยา เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณน้ำฝน

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2563

ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย

สถานที่เก็บตัวอย่างเห็ด ป่าเต็งรังในเขตจังหวัดเชียงราย พะเยา ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน

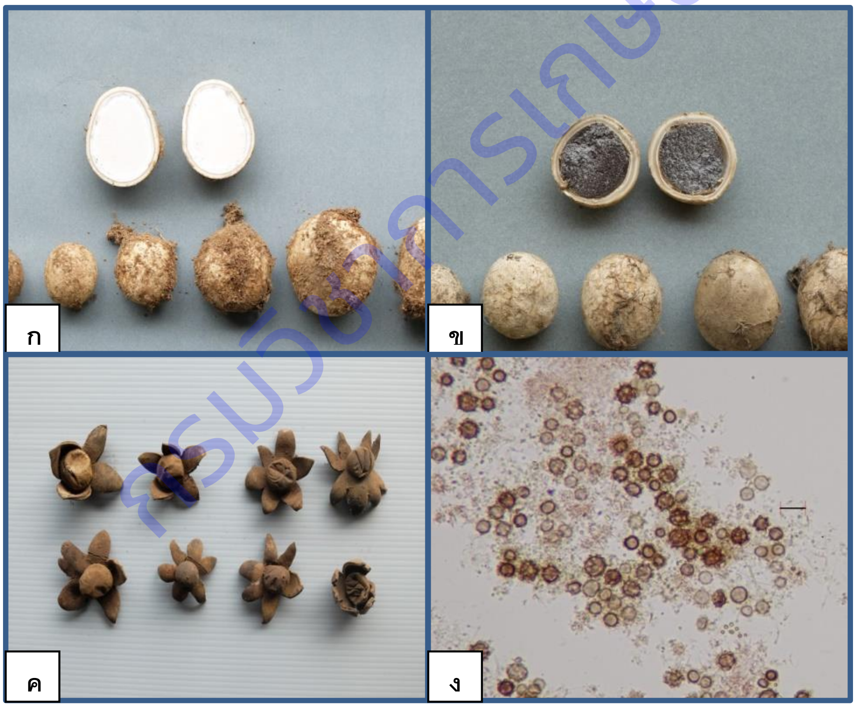
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ตัวอย่างเห็ดเผาะในการศึกษา

เก็บตัวอย่างเห็ดเผาะจากป่าเต็งรังในเขตจังหวัดเชียงรายและใกล้เคียง ในฤดูฝนตั้งแต่เดือนพฤษภาคม – กรกฎาคม ของแต่ละปี เพื่อนำดอกเห็ดเผาะมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้น Potato dextrose agar (PDA) นำเชื้อแต่ละไอโซเลททดสอบอัตราการเจริญเติบโตเพื่อเลือกไอโซเลทที่มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดสำหรับพัฒนาทำหัวเชื้อ

ลักษณะทั่วไปของเห็ดเผาะ

ดอกเห็ดเผาะมีรูปร่างกลมจนถึงกลมแป้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 - 3 เซนติเมตร ระยะดอกอ่อนพบฝังอยู่ใต้ผิวดิน เมื่อดอกแก่จึงเจริญโผล่พ้นผิวดินขึ้นมา เวลาฝนตกชะหน้าดินออกจะเผยให้เห็นดอกเห็ดสีขาวนวล สปอร์มีรูปร่างค่อนข้างกลม สีน้ำตาล ผิวขรุขระและมีหนาม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 – 10 ไมโครเมตร แต่ส่วนมากขนาด 4 - 8 ไมโครเมตร (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ลักษณะดอกเห็ดเผาะในระยะต่างๆ (ก) ดอกอ่อน ข้างในมีสีขาว
(ข) ดอกแก่สปอร์มีสีดำ (ค) ดอกเห็ดเผาะแก่ ผนังชั้นนอกแตกออกเป็น
แฉก 4-8 กลีบ และ (ง) สปอร์เห็ดเผาะ

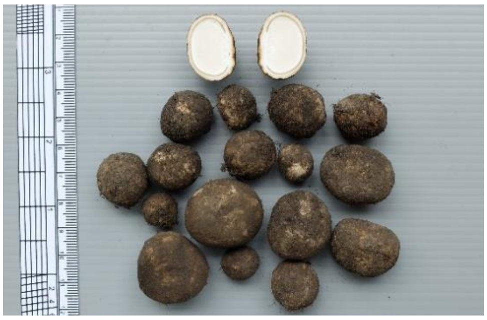
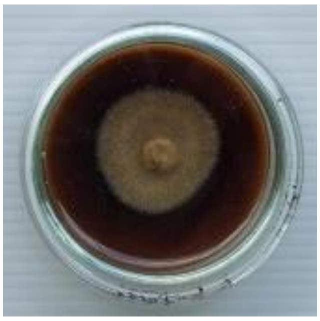
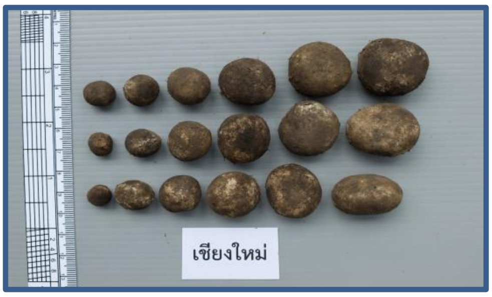
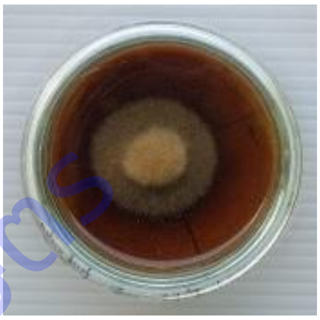
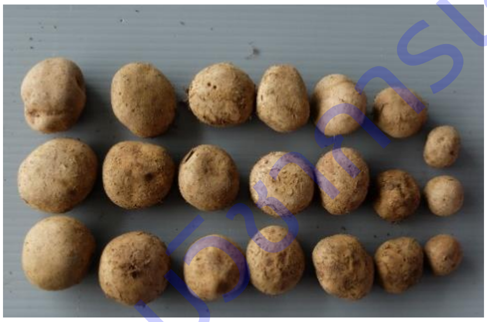
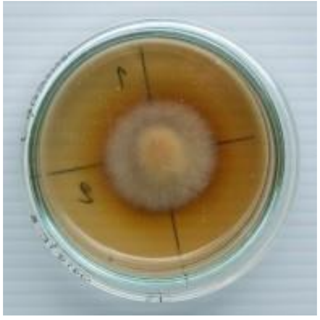
สำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดเผาะในป่าเต็งรัง (ภาพที่ 2) ปี 2560 รวบรวมเห็ดเผาะจากจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน อำเภอปาย จ.แม่ฮ่องสอน และจ.อุตรดิตถ์ นำเห็ดเผาะมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้น PDA (potato dextrose agar) ได้ 11 ไอโซเลท ได้แก่ ลำพูน 1, ลำพูน 3, เชียงใหม่ 1, เชียงใหม่ 2, แม่แจ่ม 1, แม่แจ่ม 2, สะเมิง 1, สะเมิง 2, ปาย 1, ปาย 3 และอุตรดิตถ์ 3 (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 2 สำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดเผาะในป่าเต็งรัง

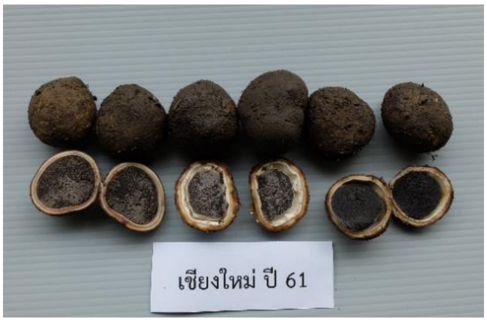
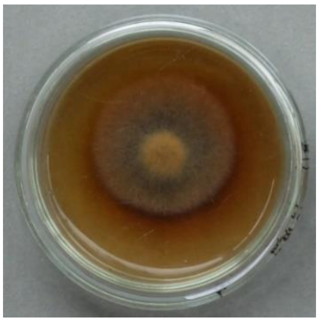
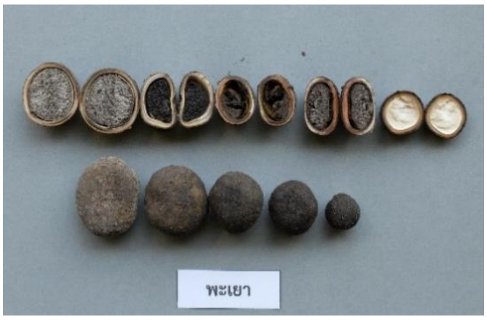
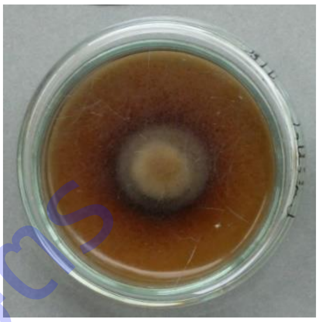
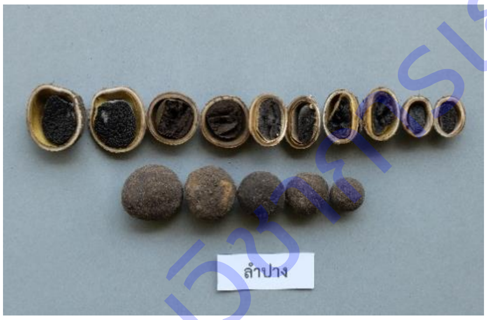
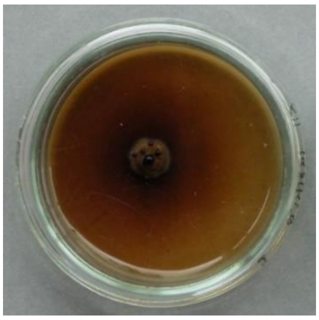
ปี 2561 นำเห็ดเผาะจากแหล่งต่างๆ 4 แหล่งคือ พะเยา ลำปาง ลำพูน และ เชียงใหม่ นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท ได้แก่ เชียงใหม่ 61, พะเยา 61, ลำปาง 61, จำผักกูด 61, ลำพูน 61, เชียงคำ 2 -61 (ภาพที่ 4)

ปี 2562 นำเห็ดเผาะจากแหล่งต่างๆ 3 แหล่งคือ พะเยา ลำปาง ลำพูน นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลท ได้แก่ ลำพูน 62-1, ลำพูน 62-2, ลี้ 62, งาว 62 และ แม่ใจ 62 (ภาพที่ 5)

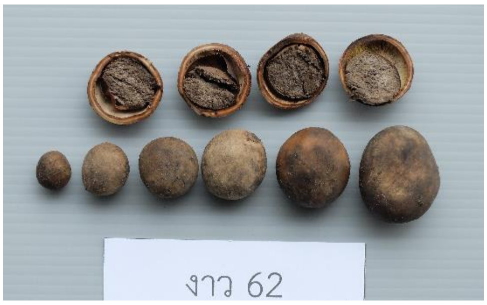
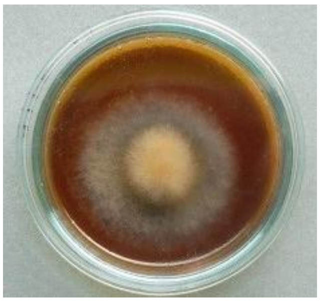
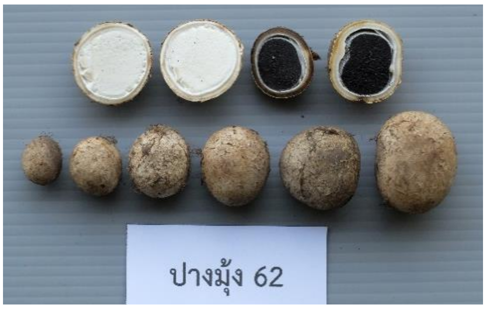
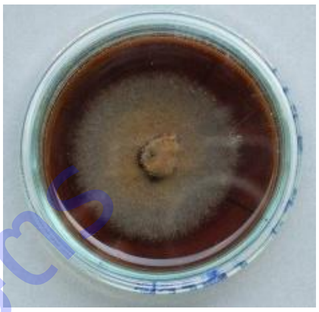
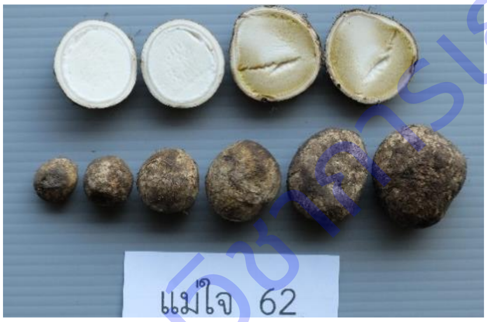
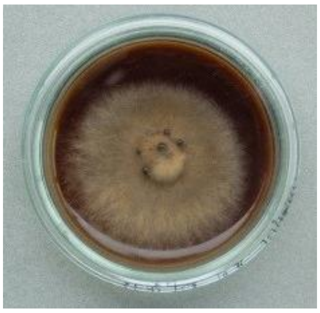
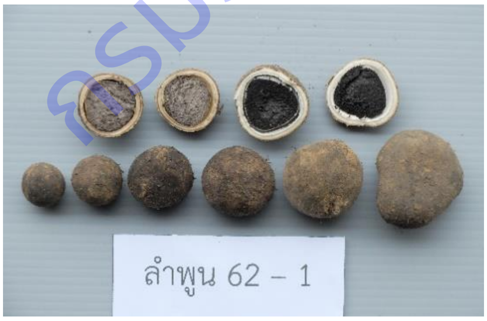
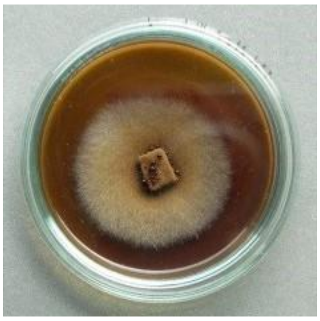
ปี 2563 นำเห็ดเผาะจากแหล่งต่างๆ ของเชียงราย เชียงใหม่ และ ลำพูน นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลท ได้แก่ ปางกอก 63, แม่สาด 63, พุทธมณฑล 63, ศวส.ชร. 63-2, ศวส.ชร. 63-3, ศวส.ชร. 63-4, ฝาง 63 และลำพูน 63 (ภาพที่ 6)

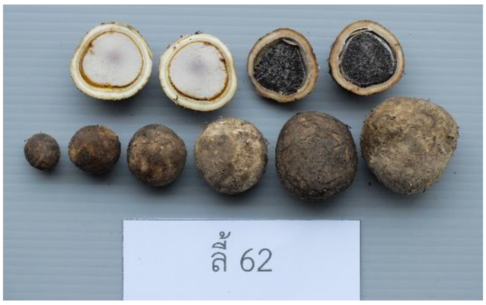
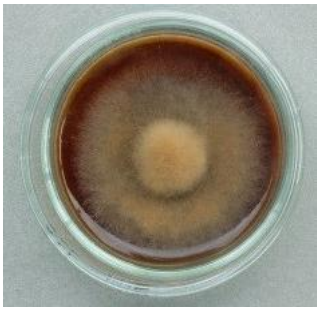
Collection ปี 2560		
เชียงใหม่ 1 60		
เชียงใหม่ 2 60		
อุตรดิตถ์ 1 60		

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะดอกเห็ดเผาะจากแหล่งที่เก็บในปี 2560 และลักษณะเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Potato dextrose agar

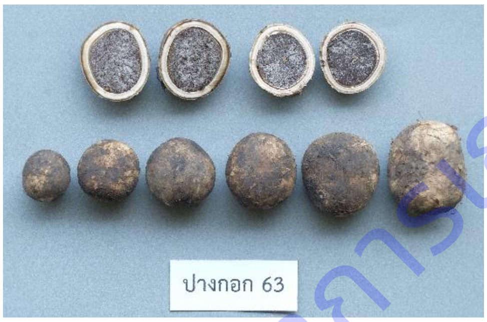
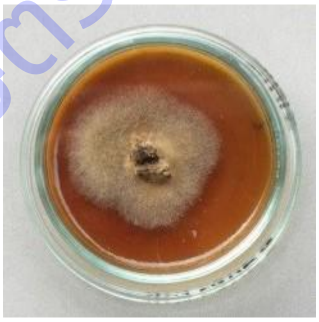
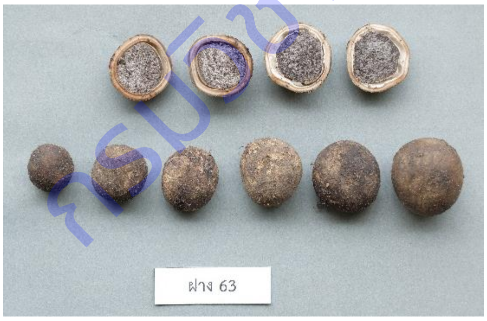
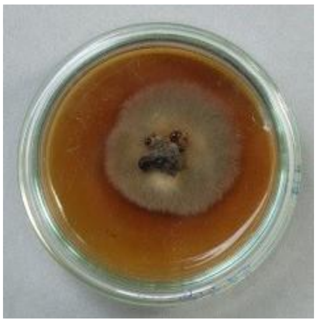
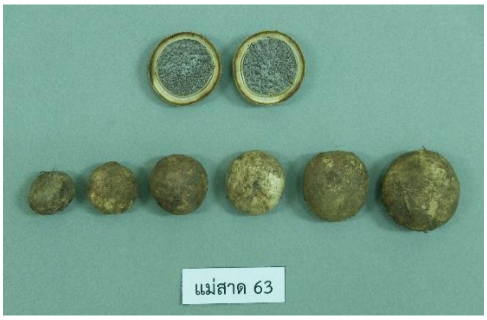
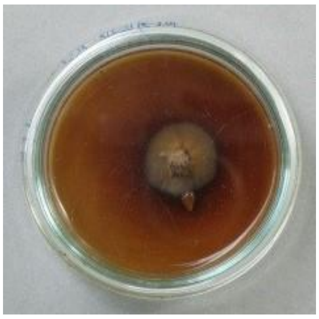
Collection ปี 2561		
เชียงใหม่ 61	 เชียงใหม่ ปี 61	
พะเยา 61		
ลำปาง 61		

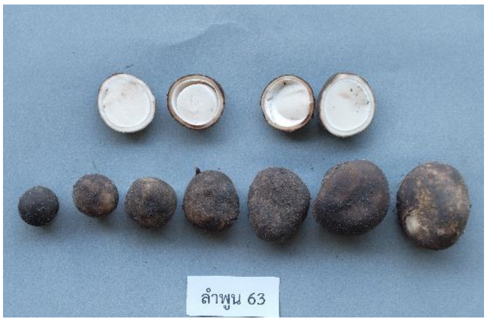
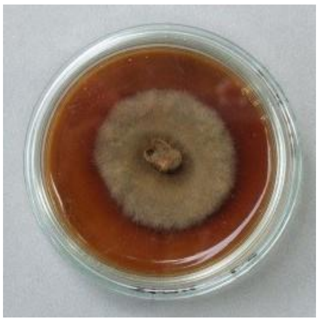
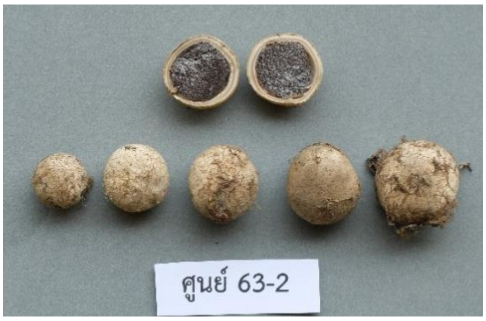
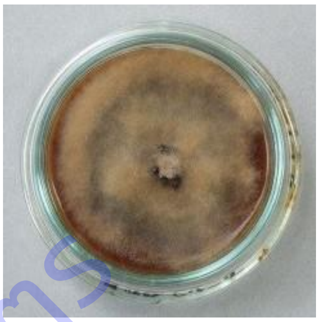
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะดอกเห็ดเผาะจากแหล่งที่เก็บในปี 2561 และลักษณะเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Potato dextrose agar

Collection ปี 2562		
งาว 62		
ปางมุ้ง 62		
แม่ใจ 62		
ลำพูน 62-1		

ลี้ 62		

ภาพที่ 5 แสดงลักษณะดอกเห็ดเผาะจากแหล่งที่เก็บในปี 2562 และลักษณะเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Potato dextrose agar

Collection ปี 2563		
ปางกอก 63		
ฝาง 63		
แม่สาด 63		

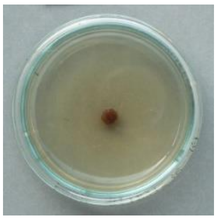
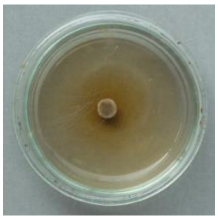
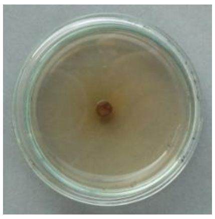
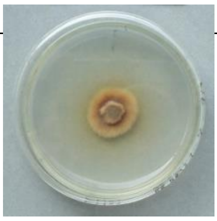
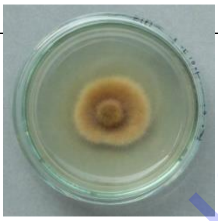
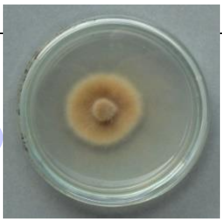
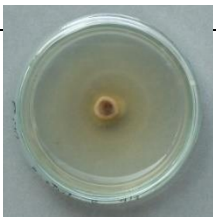
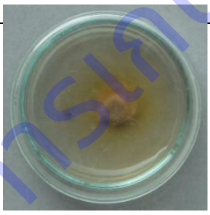
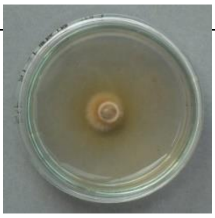
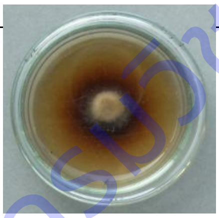
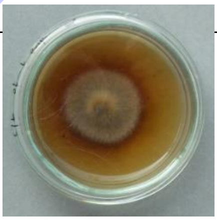
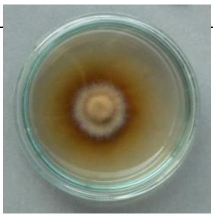
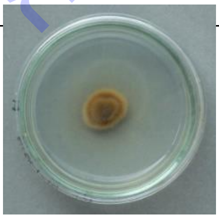
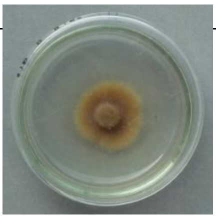
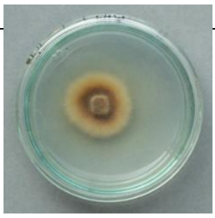
ลำพูน 63		
ศูนย์ 63-2		

ภาพที่ 6 แสดงลักษณะดอกเห็ดเผาะจากแหล่งที่เก็บในปี 2563 และลักษณะเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Potato dextrose agar

พบว่าเชื้อเห็ดเผาะแต่ละไอโซเลท มีอัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ต่างกัน และมีลักษณะการเจริญทางเส้นใยต่างกัน เชื้อเห็ดเผาะบางไอโซเลทเส้นใยเจริญราบไปกับผิววุ้นได้แก่ ไอโซเลท เชียงใหม่ 1 -60 ปางมุ้ง 62 แม่ใจ 62 หรือ ลำพูน 62-1 ในขณะที่บางไอโซเลทเส้นใยฟู โคโลนีนูนได้แก่ เชียงใหม่ 2-60 อุตรดิตถ์ 1 -60 งาว 62 ลี้ 62 เป็นต้น

2. การเจริญของเชื้อเห็ดเผาะบนอาหารชนิดต่างๆ

ทดสอบการเจริญของเชื้อเห็ดเผาะ 3 ไอโซเลท ได้แก่สะเมิง60 ปาย60 และลำพูน 60 บนอาหารสังเคราะห์ 5 ชนิด คือ Modified Melin Norkans medium (MMN, Marx 1969), Pachlewski medium (PACH, Pachlewski & Pachlewski 1974), Ferry & Das (FDA, 1968), Fries medium for spore germination (Fries 1978) และ Potato dextrose agar (PDA) (รายละเอียดสูตรอาหารอยู่ในภาคผนวก) ซึ่งก็พบว่าเชื้อเห็ดเผาะเจริญบนอาหาร PDA และ Fries ได้ดีกว่าอาหารชนิดอื่น (ภาพที่ 7)

สูตรอาหาร	สะเมิง 60	ปาย 60	ลำพูน 60
PACH			
Fries			
FDA			
PDA			
MMN			

ภาพที่ 7 การเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะไอโซเลทต่างๆบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ (อายุ15 วัน)

ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดเผาะที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ของปี 2560 และ 2561 รวม 9 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อของปี 2560 จำนวน 3 ไอโซเลทคือ สะเมิง 60 ปาย 60 และลำพูน 60 และเชื้อเห็ดเผาะของปี 2561 จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ เชียงใหม่ 61 พะเยา 61 เชียงคำ 1-61 เชียงคำ 2-61 ลำปาง 61 และจำผักกูด 61 โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA และ MMN วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเมื่อเชื้ออายุ 14 และ 20 วัน ผลดังตารางที่ 1

พบว่าเชื้อเห็ดเผาะแต่ละไอโซเลท มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกัน เชื้อเห็ดเผาะเกือบทุกไอโซเลทมีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA ได้ดีกว่าอาหาร MMN ซึ่ง PDA เป็นอาหารที่มีส่วนประกอบไม่มาก เตรียมง่ายและราคาถูกกว่าอาหาร MMN เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงและขยายเชื้อเห็ดเผาะ เชื้อไอโซเลทเชียงใหม่ 61 และ ลำปาง 61 มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น

ตารางที่ 1 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเห็ดเผาะไอโซเลทปี 2560 และ 2561 เลี้ยงบนอาหาร PDA และ MMN

ไอโซเลท	อายุ 14 วัน (ซ.ม.)		อายุ 20 วัน (ซ.ม.)	
	PDA	MMN	PDA	MMN
สะเมิง 60	2.55 c	1.92 bcd	3.68 abc	2.28 cde
ปาย 60	2.92 abc	2.51 ab	3.9 ab	2.97 ab
ลำพูน 60	1.49 d	1.69 cd	3.0 bc	2.02 e
เชียงใหม่ 61	3.39 a	2.77 a	4.67 a	3.38 a
พะเยา 61	1.93 d	2.23 abc	3.18 bc	2.65 bcd
เชียงคำ 1-61	1.66 d	1.45 d	2.63 c	2.05 e
เชียงคำ 2-61	2.95 abc	2.38 abc	3.6 abc	2.68 bc
ลำปาง 61	3.12 ab	1.87 bcd	4.58 a	2.15 de
จำผักกูด 61	2.73 bc	2.18 abc	3.97 ab	3.08 ab
c.v. (%)	15.2	22.8	17.7	10.7

นำเชื้อบริสุทธิ์เห็ดเผาะที่เก็บตั้งแต่ปี 2560 – 2563 รวม 19 ไอโซเลท นำมาทดสอบอัตราการเจริญเติบโต โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเห็ดเมื่ออายุ 20 วัน พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่า เชื้อเห็ดเผาะที่เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อบริสุทธิ์ของปี 2560 จากทั้งหมด 11 ไอโซเลทมีเพียง ไอโซเลทปาย 60 เท่านั้น ที่มีชีวิตรอดจนถึงปี 2563 ถึงแม้จะผ่านการ sub-culture หลายครั้งแต่กลับมีอัตราการเจริญทางเส้นใยดีที่สุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของอนุสรณ์และคณะ (2548) ที่พบว่า เชื้อเห็ดเผาะที่เลี้ยงไว้และทำการย้ายลงอาหารใหม่เป็นประจำมีแนวโน้มปรับตัวเข้ากับอาหารและเจริญเร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในบางไอโซเลทกลับพบว่าเมื่อมีการต่อเชื้อหลายครั้ง จะอ่อนแอลงเรื่อยๆและหยุดการเจริญเติบโตในที่สุด ไอโซเลทพุทธมณฑล 63 ซึ่งเก็บตัวอย่างในปี 2563 มีอัตราการเจริญทางเส้นใยต่ำสุด (ตารางที่ 2) เชื้อบริสุทธิ์ของปี 2561 จำนวน 8 ไอโซเลท รอดชีวิตจนถึงปี 2563 เพียง 3 ไอโซเลท คือ ลำปาง61 ลำพูน61และพะเยา61 และเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดเผาะที่เก็บตัวอย่างในปี 2562 จำนวน 5 ไอโซเลท และ 1 ไอโซเลท ซื้อเห็ดเผาะจากตลาดนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์พบว่ายังมีชีวิตรอดจนถึงปี 2563 ทุกไอโซเลท

ตารางที่ 2 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเห็ดเผาะไอโซเลทต่างๆ เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 20 วัน

ปีที่เก็บ	ชื่อไอโซเลท	Rank	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (cm.)
2560	ปาย 60	1	4.92 a
2561	ลำปาง 61	2	4.46 b
2561	ลำพูน 61	10	3.56 f-i
2561	พะเยา 61	5	4.14 bcd
2562	ลำพูน 62-2	15	3 jk
2562	งาว 62	18	2.56 l
2562	น่าน 62	16	2.66 kl
2562	ตลาด 62-2	9	3.7 e-h
2562	แม่ใจ 62	3	4.44 b
2562	แม่ฮ่องสอน 62	11	3.48 f-i
2563	ปางกอก 63	17	2.6 l
2563	ฝาง 63	4	4.26 bc
2563	พุทธมณฑล 63	19	1.44 m
2563	แม่สาด 63	14	3.2 ij
2563	ลำพูน 63	6	4.02 cde
2563	ศูนย์ 63-1	8	3.8 d-g
2563	ศูนย์ 63-2	7	3.84 def
2563	ศูนย์ 63-3	13	3.36 hij
2563	ศูนย์ 63-4	12	3.4 ghi
c.v. (%)			8.2

3. การพัฒนาหัวเชื้อเห็ดเผาะ

เตรียมหัวเชื้อเห็ดเผาะ 3 แบบ สำหรับปลูกลงบนรากต้นยางนา

แบบที่ 1. หัวเชื้อจากดอกเห็ดเผาะ

นำดอกเห็ดเผาะแก่มาหั่นเป็นชิ้นบางและผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 8) และใช้เป็น inoculum โดยนำดอกเห็ด(พร้อมสปอร์) ที่แห้ง นำไปฝังบริเวณรอบๆ root zone ของต้นยางนา

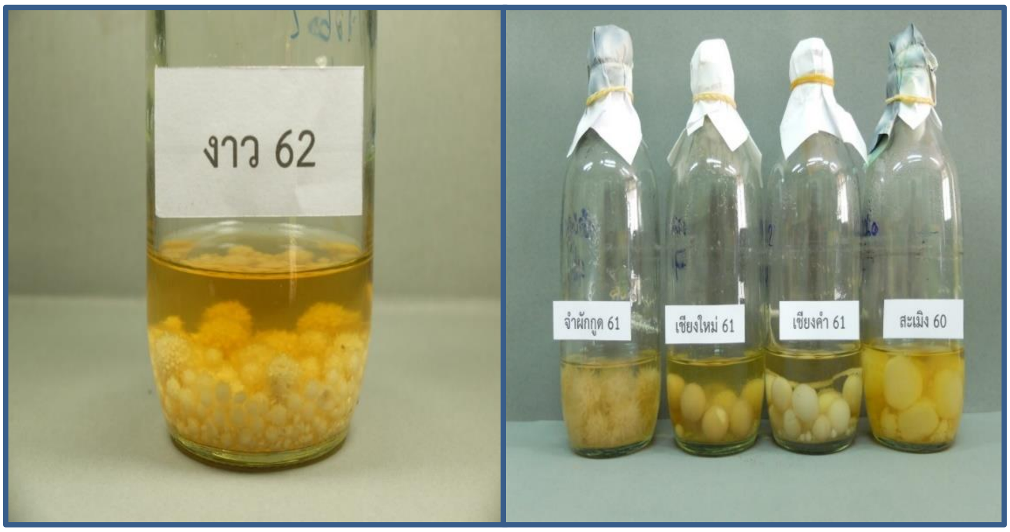
ภาพที่ 8 การเตรียมหัวเชื้อเห็ดเผาะจากดอกเห็ด

แบบที่ 2 หัวเชื้อในอาหารเหลว

เลี้ยงเชื้อเห็ดเผาะในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB ; รายละเอียดในภาคผนวก) ในสภาพกึ่งนิ่ง (semi-stationary) โดยเขย่าเชื้อบนเครื่องเหวี่ยงความเร็วรอบ 90 RPM นาน 2 ชั่วโมงสลับกับหยุด 1 ชั่วโมงพบว่าเชื้อเห็ดมีการเจริญเติบโตได้ดี เส้นใยเชื้อเห็ดเจริญและจับกันเป็นก้อนขนาดต่างๆ ดังภาพที่ 9 หัวเชื้อเหลวนี้นำไปใช้โดยการนำเชื้อเหลว 1 ขวด (จากอาหารเหลว 200 ม.ล.) ปั่นในน้ำสะอาด 500 ม.ล. แล้วนำไปราดลงบนกล้ายางนาหรือต้นยางนา

แบบที่ 3 Soil inoculum

เตรียมเชื้อเห็ดเผาะในอาหารเหลว PDB เมื่อเชื้อเหลวอายุ 1 เดือน นำเชื้อเหลวมาปั่นในน้ำสะอาด 500 ม.ล. แล้วจึงนำมาคลุกเคล้ากับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปใช้เป็น soil inoculum โดยใช้ปลูกเชื้อกับต้นยางนาในแปลงทดลอง อัตรา soil inoculum 1 กิโลกรัม/ต้นทดลอง



ภาพที่ 9 ลักษณะเชื้อเห็ดเผาะอายุ 1 เดือน ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Potato dextrose broth

ข้อดีและข้อเสียของหัวเชื้อแต่ละแบบ

1. หัวเชื้อจากดอกเห็ด ข้อดีคือเตรียมง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่ยุ่งยากซับซ้อน ข้อเสียคือ มีระยะเวลาค่อนข้างจำกัดเฉพาะในฤดูกาลที่เห็ดเผาะออกดอก และดอกเห็ดหายาก หรือถ้าซื้อก็มีราคาสูง
2. หัวเชื้อเหลว ข้อดีคือ เตรียมได้ตลอดทั้งปี ข้อเสียคือ ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์หลายอย่าง ได้แก่ หม้อนึ่งความดัน ตู้เขี่ยเชื้อ เครื่องเขย่า และคนทำจะต้องเรียนรู้เทคนิคการแยกเชื้อและขยายเชื้อเห็ด
2. Soil inoculum ข้อดีคือ เตรียมได้ตลอดทั้งปี และชะลอการนำไปใช้ได้ ข้อเสียเช่นเดียวกับเชื้อเหลว และมีค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมในการนึ่งฆ่าเชื้อดิน และอาจจะมีปัญหาในการขนส่งเพราะเชื้อดินหนัก ขนส่งในปริมาณมากไม่สะดวก

4. การปลูกเชื้อเห็ดเผาะให้แก่พืชอาศัย

ปลูกเชื้อเห็ดเผาะแก่พืชอาศัยคือต้นยางนา โดยปลูกเชื้อในต้นกล้า และต้นยางนาอายุ 2 ปี ในแปลงทดลอง (ภาพที่ 10)

(ก) (ข)

ภาพที่ 10 (ก) ต้นกล้ายางนาอายุ 1 ปี ในถุงดำ และ (ข) ต้นยางนาอายุ 2 ปี

แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ปลูกเชื้อด้วยดอกเห็ดแห้ง และปลูกด้วยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว

ในต้นกล้า ใช้เชื้อจากดอกเห็ดแห้ง 10 กรัม/ต้น และใช้เชื้อเหลว 1 ขวดปั่นในน้ำสะอาด 500 มล. และปลูกเชื้ออัตรา 200 มล./ถุง

สำหรับต้นยางนาในแปลงทดลอง ปลูกเชื้อด้วย inoculum 3 แบบ คือ 1) ใช้เชื้อจากดอกเห็ดแห้ง 20 กรัม/ต้น ขุดฝังบริเวณ root zone ของต้นยางนา และรดน้ำให้ชุ่ม 2) การใช้เชื้อเหลว ทำโดยขุดบริเวณรอบชายพุ่มของต้นยางนาให้พบรากฝอยและนำหัวเชื้อเหลว 500 มล. ราดให้รอบ กลบดิน และรดน้ำให้ชุ่ม คลุมโคนต้นด้วยฟางแห้งเพื่อรักษาความชื้น 3) ปลูกด้วย soil inoculum อัตรา 1 กิโลกรัม/ต้น หลังปลูกเชื้อ รดน้ำให้ชุ่มและคลุมโคนต้นด้วยฟางแห้งเพื่อรักษาความชื้น

หมายเหตุ การปลูกเชื้อในแต่ละกรรมวิธี ไม่สามารถทำพร้อมกันได้ เพราะมีข้อจำกัดในการผลิต inoculum

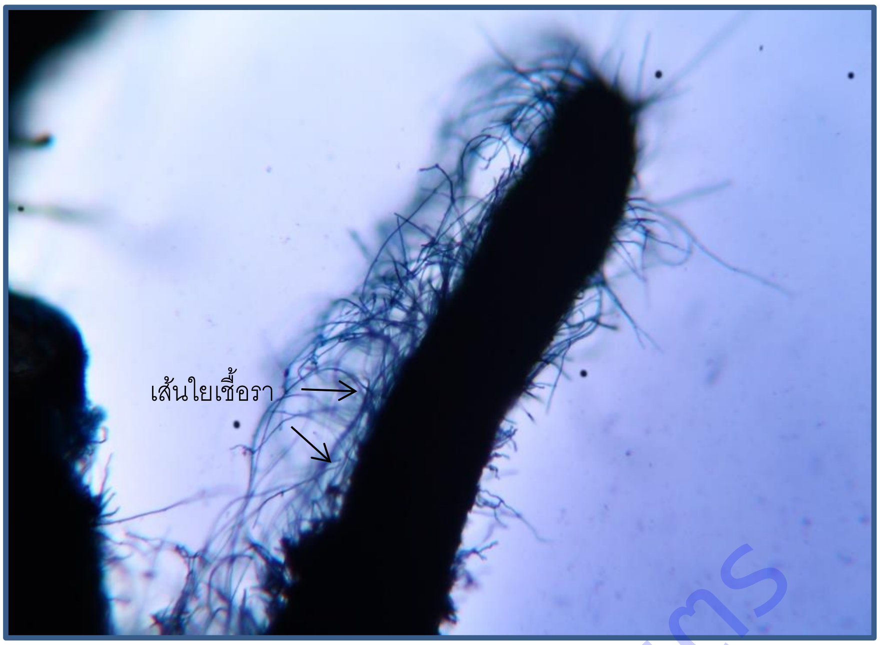
5. การตรวจสอบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อเห็ดเผาะกับรากยางนา

หลังจากปลูกเชื้อเห็ดเผาะไปแล้ว 6 เดือน ทำการตรวจสอบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อเห็ดเผาะกับรากยางนา โดยทำการตรวจสอบสองวิธี ได้แก่

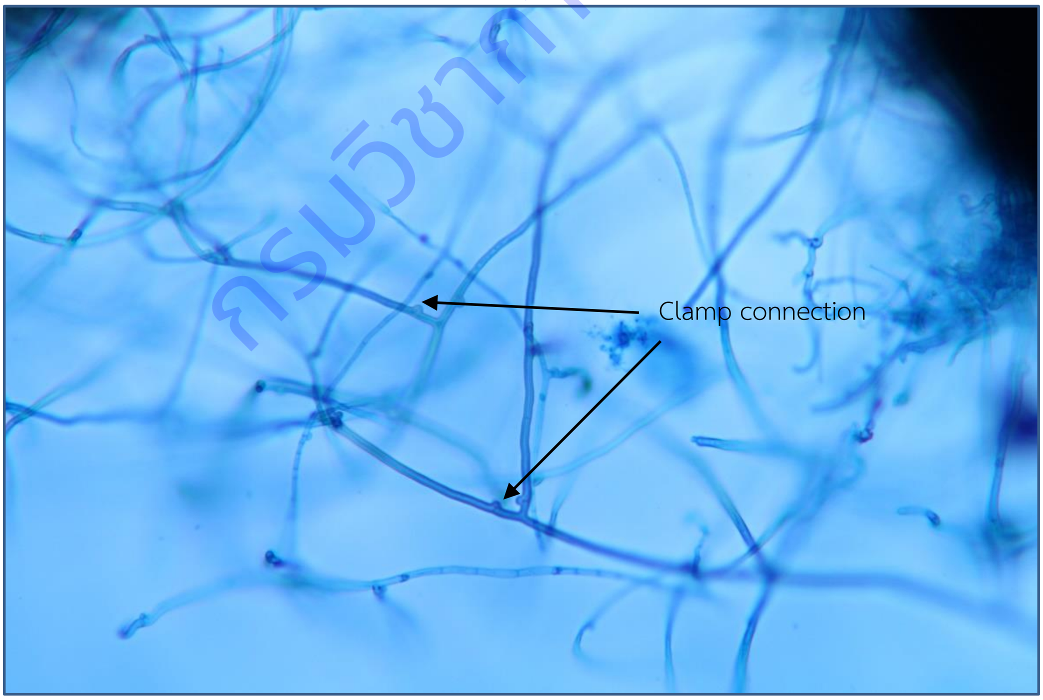
5.1 หาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (infection) ของเห็ดเผาะบนรากพืชอาศัยโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างรากต้นยางนาจากแปลงทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อเห็ดเผาะและจากแปลง control (ไม่ใส่เชื้อเห็ด) ตัดรากออกเป็นชิ้นให้มีความยาวชิ้นละ 1 – 1.5 เซนติเมตร นำมา clearing โดยการต้มด้วย KOH 10% ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง และย้อมสีด้วย trypan blue และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า รากของต้นยางนาจากแปลงที่ได้รับการปลูกเชื้อเห็ดพบเส้นใยเชื้อราอยู่ติดกับรากเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 11) คิดเป็นร้อยละ 91.3 ของรากที่สุ่มตรวจ และปริมาณเส้นใยที่พบค่อนข้างหนาแน่น เส้นใยที่พบส่วนมากจะเป็น external hyphae และพบลักษณะ clamp connection ของเส้นใย (ภาพที่ 12) สำหรับรากของต้นยางนาจากแปลงที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อพบว่าบางรากมีเส้นใยเชื้อราติดอยู่คิดเป็น 14.7 % ของรากที่นำมาตรวจ (ตารางที่ 3) และมีปริมาณเส้นใยเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การพบเส้นใยเชื้อราบนรากต้นยางนา (หลังการปลูกเชื้อ 6 เดือน)

	Roots with mycelium (%)	Roots without mycelium (%)
ต้นยางนาที่ได้รับการปลูกเชื้อเห็ดเผาะ	91.3	8.7
ต้นยางนา control (ไม่ปลูกเชื้อเห็ดเผาะ)	14.7	85.3

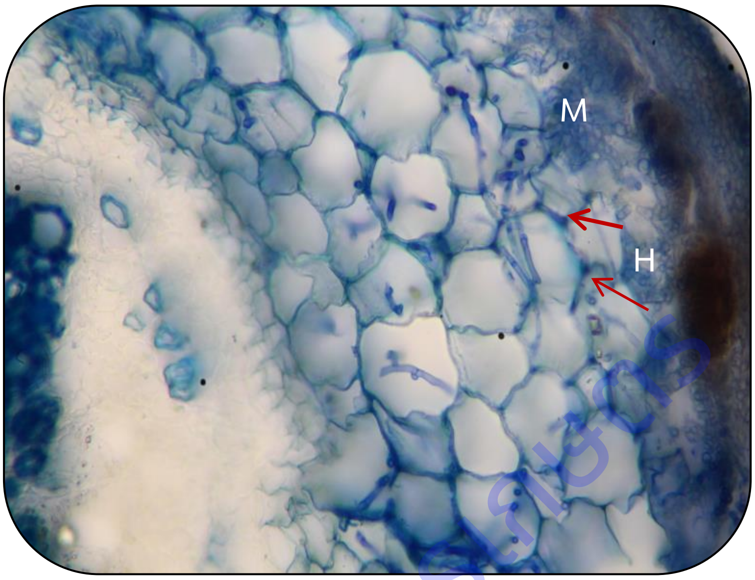

เส้นใยเชื้อรา

ภาพที่ 11 รากของต้นยางนาที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญร่วมด้วยอย่าง


Clamp connection

ภาพที่ 12 ลักษณะของ clamp connection ของ external
hyphae ของเชื้อเห็ดเผาะ

5.2 ศึกษาการสร้างแผ่นแมนเทิลและฮาร์ติกเน็ตของเห็ดเผาะบนรากพืชอาศัยโดยการตัดรากแบบ free hand cross section ทำการ clearing ด้วยการต้มใน KOH 10% ย้อมสีด้วย Lactophenol cotton blue แล้วนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมปาวด์พบลักษณะmantle sheath และ hartig net ภายในเซลล์รากพืช (ภาพที่ 13) ซึ่งเป็นลักษณะที่ยืนยันการเป็นเอ็คโตมัยคอร์รัยซ่าของเชื้อเห็ดเผาะกับกล้ายางนา



ภาพที่ 13 แสดง mantle sheath (M) และ hartig net (H ลูกศร)
ของเชื้อเห็ดเผาะในรากกล้ายางนา

6. การเกิดดอกเห็ดเผาะในแปลงทดลอง

ติดตามการสร้างดอกเห็ดเผาะในแปลงยางนาที่ได้รับการปลูกเชื้อเมื่อปี 2561 ในช่วงฤดูฝนของปี 2562 และ 2563 แต่ยังไม่พบการเกิดดอกเห็ดเผาะในแปลงทดลอง ทั้งนี้อาจจะเนื่องจาก 2 สาเหตุคือปริมาณเส้นใยที่เจริญร่วมกับรากพืชมีไม่มากเพียงพอ ถึงแม้ว่าจากการตรวจสอบรากของพืชทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อเห็ดพบว่ามีเชื้อเห็ดเจริญร่วมด้วยแล้วก็ตาม และอีกสาเหตุคือสภาพแวดล้อมยังไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นดอกเห็ด ได้แก่ปริมาณน้ำฝน ซึ่งสุพัตรา (2561) รายงานว่าการเกิดดอกเห็ดเผาะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณน้ำฝน (1587.5 มิลลิเมตร) และ ความชื้นในดิน (18-28%) แต่ในแปลงทดลองที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ในปี 2562 มีปริมาณน้ำฝนทั้งปี 836.5 มิลลิลิตรและปี 2563 มีปริมาณน้ำฝนทั้งปีเพียง 1334.5 ม.ล. (ตารางผนวก 1)

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณที่พบเห็ดเผาะที่อำเภอแม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งดินจะเป็นดินลูกรัง เนื้อดินเป็นดินทรายปนดินร่วน มีกรวด หินหรือเศษหินปะปน นำมาวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในดินเปรียบเทียบกับดินแปลงทดลองที่ปลูกต้นยางนาในบริเวณศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ซึ่งเป็นดินร่วนปนดินเหนียว ได้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4 จะเห็นว่าดินจากอำเภอแม่แจ่มแหล่งที่เก็บเห็ดเผาะในธรรมชาติมีปริมาณ

ธาตุอาหาร (N, P, K, Ca) ใกล้เคียงกับดินในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ยกเว้นค่าแมกนีเซียมที่ดินของอำเภอแม่แจ่มมีค่าสูงกว่าที่ศวส.เชียงรายประมาณ 7 เท่า และธาตุเหล็กของดินในศวส.เชียงรายมีค่าสูงกว่าที่แม่แจ่มประมาณ 6 เท่า แต่ยังไม่สามารถระบุได้ถึงความสัมพันธ์ของการเกิดเห็ดเผาะกับปริมาณธาตุอาหารในดิน เนื่องจากยังไม่พบดอกเห็ดเผาะเกิดขึ้นในแปลงทดลอง

ตารางที่ 4 ปริมาณธาตุอาหารในดินบริเวณที่พบเห็ดเผาะจาก อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ และแปลงทดลอง
ในศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย

รายการ	สถานที่เก็บตัวอย่างดิน		
	อ.แม่แจ่ม จุดที่ 1	อ.แม่แจ่ม จุดที่ 2	ศวส.เชียงราย
pH	6.6	5.6	5
อินทรียวัตถุ (%)	3.45	2.18	2.24
ไนโตรเจนทั้งหมด (%)	0.17	0.11	0.11
Avai P (mg/kg)	26	4	27
Avai K (mg/kg)	138	110	74.4
แคลเซียม (mg/kg)	968	488	466
แมกนีเซียม (mg/kg)	204	212	33.85
เหล็ก (mg/kg)	17.09	17.61	132

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. เชื้อบริสุทธิ์เห็ดเผาะที่แยกได้จากดอกเห็ดแต่ละไอโซเลทมีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เมื่อต่อเชื้อในอาหารสังเคราะห์ ไปหลายครั้ง เชื้อบางไอโซเลทจะหยุดชงักการเจริญเติบโต

2. การปลูกเชื้อเห็ดเผาะแก่พืชอาศัยสามารถใช้เชื้อ 3 แบบ คือ เชื้อจากดอกเห็ด และเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลว potado dextrose broth และ soil inoculum หัวเชื้อทั้ง 3 แบบ ทำให้เกิดมัยคอร์ไรซีกับรากยางนาได้ แต่มีข้อดีข้อเสียต่างกัน คือ หัวเชื้อจากดอกเห็ด ข้อดีคือเตรียมง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่ยุ่งยากซับซ้อน ข้อเสียคือ มีระยะเวลาค่อนข้างจำกัดเฉพาะในฤดูกาลที่เห็ดเผาะออกดอก และดอกเห็ดหายาก หรือถ้าซื้อก็มีราคาสูง หัวเชื้อเหลว ข้อดีคือ เตรียมได้ตลอดทั้งปี ข้อเสียคือ ต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์หลายอย่าง ได้แก่ หม้อนึ่งความดัน ตู้เขี่ยเชื้อ เครื่องเขย่า และคนทำจะต้องเรียนรู้เทคนิคการแยกเชื้อและขยายเชื้อเห็ด สำหรับ Soil inoculum ข้อดีคือ เตรียมได้ตลอดทั้งปี และชะลอการนำไปใช้ได้ ข้อเสียเช่นเดียวกับเชื้อเหลว และมีค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมในการนึ่งฆ่าเชื้อดิน และอาจจะมีปัญหาในการขนส่งเพราะเชื้อดินหนัก ขนส่งในปริมาณมากไม่สะดวก

3. ถึงแม้ว่าจะพบลักษณะไมคอร์ไรซีกับรากพืชแต่ก็ยังไม่พบดอกเห็ดในแปลงทดลอง ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากปริมาณเส้นใยเห็ดที่อยู่ร่วมกับรากพืชยังมีปริมาณน้อยและสภาพแวดล้อม เช่นปริมาณความชื้นในดินมีน้อยจนไม่สามารถกระตุ้นการเกิดดอกเห็ดได้

4. ควรศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยสภาพแวดล้อม (ecological specificity) โดยละเอียดถึงปัจจัยสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิตที่มีผลต่อการเจริญและการเกิดไมคอร์ไรซ่ากับรากพืชและการพัฒนาเป็นดอกเห็ดเผาะ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ความสำเร็จในการปลูกเชื้อเห็ดเผาะให้กับพืชอาศัยจะส่งเสริมการปลูกป่า เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับประชาชนในพื้นที่ปลูกป่า ช่วยให้โครงการปลูกป่าประสบความสำเร็จ เพราะประชาชนจะรู้คุณค่า หวงแหน และช่วยกันดูแลรักษาป่าไม้ให้อยู่อย่างยั่งยืน ดังนั้นราเอ็คโตมัยคอร์ไรซ่าจึงเป็นยุทธศาสตร์หนึ่งที่จะช่วยทำให้โครงการปลูกป่าฟื้นฟูสภาพแวดล้อมของประเทศให้ประสบความสำเร็จได้

11. คำขอบคุณ(ถ้ามี)

ขอขอบคุณ คุณวิลาสลักษณ์ ว่องไว สวพ.1 ช่วยประสานงานการเก็บตัวอย่างเห็ดเผาะ จ.เชียงใหม่และจ.แม่ฮ่องสอน ขอขอบคุณ คุณพัชรินทร์ ยศปินตา คุณพวงเพชร เหลืองสุวรรณ คุณนิยม พันธุรัตน์ คุณเกตุชญา พรมเมืองดี คุณสรพงษ์ คำพร พนักงานราชการของศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ที่ช่วยปฏิบัติงานทดลอง รวบรวมข้อมูลในระหว่างปฏิบัติงานทดลอง

12. เอกสารอ้างอิง

ทนุวงศ์ แสงเทียน. 2534. *Ectomycorrhiza ของไม้ยางนา (Dipterocarpus alatus Roxb.) และผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของกล้าไม้.* วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิตบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิรนาม. เห็ดเผาะ. สืบค้นเมื่อวันที่ 3 เมษายน 2557. http:// th.wikipedia.org/wiki/

นันทินี ศรีจุมปา ไว อินต๊ะแก้ว บัณฑิต จันทร์งาม. 2552. การเพาะเห็ดตับเต่าที่รับประทานได้. หนังสือเห็ดไทย 2552 : 47-57.

สุพัตรา เจริญภักดี บดีรัฐ. 2561. นิเวศวิทยาของเห็ดเผาะในพื้นที่มหาวิทบาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี* ปีที่ 20 ฉบับที่ 3 กันยายน – ธันวาคม . 124 – 133.

อนิวรรต เฉลิมพงษ์. 2539. *เห็ดเอคโตไมคอร์ไซาที่ช่วยในการปลูกป่าภาคอีสาน*. กรุงเทพมหานคร : สำนักวิชาการกรมป่าไม้.

อนุสรณ์ ทองวิเศษ สมปอง เตชะโต และวสันณ์ เพชรรัตน์. 2548. *การเจริญเติบโตของเส้นใยและการเกิดไมคอร์ไรซ่าของเห็ดเผาะ*. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 64 หน้า

Brundrett, M.; N..Bougher; B. Dell; T. Grove and N. Malajczuk. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32 Canberra : Pirie.

Castellano, M.A. 1994. Current status of outplanting studies using ectomycorrhiza- inoculated forest trees. In : Pfleger, F. and B. Linderman. (ed.) A Reappraisal of Mycorrhizae in Plant Health. The American Phytopathological Society, St. Paul, 261-281. Cited in : Brundrett, M., N. Bougher; B. Dell; T. Grove and N. Malajczuk. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture.. ACIAR Monograph 32. Canberra : Pirie.

Ferry, B.W. and M. Das. 1968. Carbon nutrition of some mycorrhizal *Boletus* species. *Transactions of the British Mycological Society* 51: 795-798.

Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophicmycorrhizal fungi on the resistance of pineroots topathogenic infections, I, Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59 : 153-163.

Marx, D.H. and D.S. Kenny.. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum, In : Schenck, N.C.(ed.) Methods and Principles of Mycorrhizal research. American Phytopathological Society, St Paul, 131-146.

Pachlewski, R. and J. Pachlewski. 1974. Studies on Symbiotic Properties of Mycorrhizal fungi of Pine *(Pinus silvertris L.)* with the Aid of the Method of Mycorrhizal Synthesis in Pure Cultures on Agar. Forest Research Institute, Warsaw, Poland. Cited in : Brundrett, M.; N..Bougher; B. Dell; T. Grove and N. Malajczuk. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32.Canberra : Pirie.

Transactions of the British Mycological Society.55 : 157 – 160.

13. ภาคผนวก

ผนวก 1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดเผาะ

Potato dextrose agar (PDA)

1.	มันฝรั่ง	200 กรัม
2.	น้ำตาลกลูโคส	20 กรัม
3.	ผงวุ้น	15 กรัม
4.	น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร (1 ลิตร)

วิธีเตรียมอาหาร

1. ชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม และหั่นมันฝรั่งเป็นลูกเต๋าขนาดลูกบาศก์เซนติเมตร
2. ต้มมันฝรั่งจนกระทั่งสุก ไม่ควรต้มจนเนื้อมันฝรั่งเละ เพราะจะทำให้อาหารขุ่น
3. กรองเอาเฉพาะน้ำต้มมันฝรั่ง และเติมน้ำปรับให้ปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร
4. ต้มด้วยไฟอ่อน เติมน้ำตาลกลูโคส และผงวุ้น คนให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน
5. ตวงอาหารที่เตรียมเสร็จใส่ขวดแก้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ด้วยแรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6. อาหารแข็ง PDA ใช้สำหรับแยกเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ และเพิ่มปริมาณเส้นใยของเชื้อเห็ดเผาะ

อาหารเหลว PDB (Potato Dextrose Broth)

1.	มันฝรั่ง	200 กรัม
2.	น้ำตาลกลูโคส	20 กรัม
3.	น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร (1 ลิตร)

วิธีเตรียมอาหาร

1) ชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม และหั่นมันฝรั่งเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2) ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นจนกระทั่งสุก ไม่ควรต้มจนเนื้อมันฝรั่งเละ เพราะจะทำให้อาหารขุ่น
3) กรองเอาเฉพาะน้ำต้มมันฝรั่ง และปรับปริมาตรโดยเติมน้ำให้เท่ากับ 1 ลิตร
4) ต้มด้วยไฟอ่อน เติมน้ำตาลกลูโคส คนให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน
5) ตวงอาหารที่เตรียมเสร็จใส่ขวดแก้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ด้วยแรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

อาหาร Modified Melin Norkans medium (MMN, Marx 1969), Pachlewski medium (PACH, Pachlewski & Pachlewski 1974), Ferry & Das (FDA, 1968), และ Fries medium for spore germination (Fries 1978)

ตารางผนวก 1 ส่วนประกอบของสูตรอาหารต่างๆที่ใช้ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดเผาะ

Ingredient	MMN[1]	PACH[2]	FDA[3]	Fries[4]
Mineral nutrients (mg/L w/v)				
$(NH_4)_2HPO_4$	250			
NH_4Cl			500	
$C_4H_{12}N_2O_6$*		500		1000
KH_2PO_4	500	1000	500	200
$MgSO_47H_2O$	150	500	500	100
$CaC1_22\ H_2O$	50	50		26
NaC1	25			20
Fe EDTA	20	20		
$FeSo_47H_2O$				1
H_3BO_3		2.8		
$MnC1_22H_2O$		3.0		
$MnSO_4H_2O$				0.81
$ZnSo_47H_2O$		2.3		0.88
$CuC1_22H_2O$		0.63		
$Na_2Mo_42\ H_2O$		0.27		
Carbohydrate source (g/L w/v)				
Maltose		5		
Glucose	10	20	20	4
Malt extract	3		5	1
Vitamins (µg/L)				
Thiamine HCl	0.1	0.1		
Agar (g/L w/v)				

Range	8.0-15.0			
pH				
Adjusted pH to	5.8	5.4	5.0	5.5

Notes: 1 = Modified Melin Norkans medium (Marx 1969),

2 = Pachlewski medium (Pachlewski & Pachlewski 1974), 3 = Ferry & Das (1968),

4 = Fries medium for spore germination (Fries 1978), *= ammonium tartrate

ตารางผนวกที่ 2 ปริมาณน้ำฝนแต่ละเดือนที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ปี 2562 และ 2563 (ข้อมูลจากสถานีอุตุนิยมวิทยา เชียงราย)

เดือน	ปี 2562 (มิลลิลิตร)	ปี 2563 (มิลลิลิตร)
มกราคม	51.4	0
กุมภาพันธ์	0	0
มีนาคม	0	5.6
เมษายน	13.5	100.7
พฤษภาคม	131.2	104.3
มิถุนายน	43.1	219.1
กรกฎาคม	190.3	220.4
สิงหาคม	286.1	397.7
กันยายน	63.2	231.1
ตุลาคม	25.3	32.2
พฤศจิกายน	13.9	32.4
ธันวาคม	18.5	-
รวมทั้งปี	836.5	1334.5