หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเห็ดตับเต่าดำสำหรับเป็นเห็ดเศรษฐกิจอย่างยั่งยืน	
ผู้เขียน	นายจตุรงค์ คำหล้า	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ศ. ดร. สายสมร ลำยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ. ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	Assoc. Prof. Dr. Eric Danell	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้สำรวจเห็ดตับเต่าดำ (*Phlebopus portentosus*) ในภาคเหนือของประเทศไทย ตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช การสร้างดอกเห็ดโดยปราศจากพืชอาศัย และสถานะของเห็ดชนิดนี้ นอกจากนี้ได้ประเมินวิธีการถนอมดอกเห็ดตับเต่าดำสำหรับการขายเชิงพาณิชย์ เก็บรวบรวมตัวอย่างได้ทั้งหมด 18 ตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน ในภาคเหนือของประเทศไทย การบ่งบอกชนิดโดยอาศัยพื้นฐานลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยาซึ่งแสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดสอดคล้องกับการจัดหมวดหมู่ของเห็ดตับเต่าดำ

เมื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดตับเต่าดำจากดอกเห็ดแต่ละดอกที่เก็บได้ และทดสอบการเจริญในห้องปฏิบัติการผลการทดลองพบว่าเส้นใยของเห็ดตับเต่าดำเจริญเติบโตได้ดีที่ 30 องศาเซลเซียส และ pH ที่เหมาะสม คือ 4.0 จากอาหาร 15 ชนิดที่ทดสอบ อาหาร modified Murashige & Skoog และ fungal-host เป็นอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใย กลูโคสและเกลือแอมโมเนียมให้การเจริญเติบโตในแนวรัศมีขนาดใหญ่ที่สุด ทำการตรวจสอบความสามารถในห้องปฏิบัติการในการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) และ siderophore การละลายโลหะที่เป็นพิษที่ต่างกัน (โคบอล (Co) แคดเมียม (Cd) ทองแดง (Cu) ตะกั่ว (Pb) สังกะสี (Zn)) ซึ่งอยู่ในรูปแร่ธาตุที่ไม่ละลายน้ำและความทนทานต่อโลหะ ของเชื้อเห็ดที่เลือกได้แก่ เห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*) เห็ดตับเต่าดำ (*P. portentosus*) เห็ดกรวด (*Pisolithus albus*) และเห็ดลูกฝุ่น (*Scleroderma sinnamariense*) ผลการทดลองพบว่าเชื้อราทดสอบทั้งหมดสามารถผลิต IAA ได้ในอาหารเหลว และ IAA ที่เชื้อราผลิตสามารถกระตุ้นการยืดตัวของ coleoptile และเพิ่มการงอกของเมล็ดและความยาวรากของพืชทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณ IAA สูงที่สุด (65.29±1.17 ไมโครกรัมต่อลิตร) ได้มาจากเชื้อเห็ดตับเต่าดำไอโซเลต CMU51-210-1 หลังจากการเลี้ยง 40 วัน ในอาหารเหลวที่เติมด้วย L-tryptophan 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตร เชื้อเห็ดที่เลือกทดสอบผลิต siderophore ทั้งชนิด catecholate และ hydroxamate และเชื้อเห็ดตับเต่าดำไอโซเลต CMU51-210-1 ผลิต siderophore ชนิด catecholate และ hydroxamate ปริมาณมากที่สุดคือ 236.43±2.34 และ 530.06±3.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เชื้อเห็ดที่ทดสอบทั้งหมดสามารถละลายโลหะที่ไม่ละลายน้ำในรูปของแร่ธาตุได้ โดยมีความแตกต่างกันตามความแตกต่างของชนิดโลหะและสายพันธุ์ของเชื้อเห็ด ดัชนีการละลายและความทนทานต่อโลหะลดลงเมื่อความเข้มข้นของแร่ธาตุโลหะเพิ่มขึ้น เห็ดเผาะแสดงความทนทานต่อโลหะต่ำที่สุด

ทดสอบความสามารถในการผลิตดอกเห็ดตับเต่าดำในสภาวะที่ปราศจากพืชอาศัย โดยใช้เห็ดตับเต่าดำจำนวน 5 ไอโซเลต คือ CMU51-110-1, CMU51-210-2, CMU51-241-1, CMU51-261-1 และ CMU51-320-2 ผลการทดลองพบว่าเส้นใยของเชื้อเห็ดเจริญได้เร็วที่สุดในเมล็ดข้าวฟ่างที่เติมด้วยสารละลาย fungal-host ไพรมอร์เดียของดอกเห็ดเกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิต่ำ ความชื้นสูง และมีช่วงแสง 12 ชั่วโมง เชื้อไอโซเลต CMU51-320-2 ผลิตจำนวนไพรมอร์เดียมากที่สุดกว่าไอโซเลตอื่นๆ ไพรมอร์เดียพัฒนาเป็นดอกเห็ดอ่อนและเจริญเต็มที่ภายใน 8 ถึง 15 วัน ในการทดลองในห้องปฏิบัติการในกระถางปลูกและในถุง การเพาะเลี้ยงพบว่าทั้งจำนวนไพรมอร์เดียสร้างมากที่สุดและผลผลิตดอกเห็ดมากที่สุดได้รับจากการใช้เมล็ดข้าวฟ่างเติมด้วยสารละลาย fungal-host และขี้เลื่อยในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในส่วนการเติมสารละลายพบว่าสารละลาย fungal-host ดีกว่าการเติมสารละลาย modified Murashige & Skoog และวิตามิน การบ่งบอกชนิดของดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้รับการยืนยันด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา

การประเมินสถานะเอคโตไมคอร์ไรซาของเห็ดตับเต่าดำจากการเข้าอาศัยในพืช ในการทดลองระดับโรงเรือนและการวิเคราะห์ไอโซโทปเสถียรของคาร์บอน ($\delta^{13}C$) และไนโตรเจน ($\delta^{15}N$) วัสดุ peat:vermiculite ผสมกับสารละลาย fungal-host เป็นวัสดุที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตหัวเชื้อชนิดเส้นใย ต้นไม้ 6 ชนิด ที่นำมาทดสอบได้แก่ ก่อเดือย (*Castanopsis tribuloides*) ลำไย (*Dimocarpus longan*) มะกอกน้ำ (*Elaeocarpus hygrophilus*) มะม่วง (*Mangifera indica*) สนสามใบ (*Pinus kesiya*) และหว้า (*Syzygium cumini*) ผลการทดลองพบว่าเห็ดตับเต่าดำไอโซเลต CMU51-320-2 สามารถสร้างความสัมพันธ์เอคโตไมคอร์ไรซากับสนสามใบและมะกอกน้ำหลังจากการเพาะเชื้อ 1 และ 3 ปี ตามลำดับ เก็บตัวอย่างเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาจำนวน 57 ตัวอย่าง และเชื้อราซาโพรบจำนวน 25 ตัวอย่างได้จากการเก็บในภาคเหนือของประเทศไทยสำหรับใช้ในการทดลองเปรียบเทียบไอโซโทป พบเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดใหม่ คือ *Scleroderma suthepense* และพบเห็ด *Morganella purpurascens* เป็นครั้งแรกในประเทศไทย ไอโซโทปคาร์บอนและไนโตรเจนเสถียรแยกเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ เอคโตไมคอร์ไรซา ซาโพรบ และเห็ดตับเต่าดำที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปราศจากพืชอาศัย ตัวอย่างเห็ดตับเต่าดำที่เก็บได้จากธรรมชาติจัดอยู่กลุ่มเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา การศึกษาครั้งนี้แสดงได้ว่าเห็ดตับเต่าดำเป็นเอคโตไมคอร์ไรซาแบบ facultative จากการวิเคราะห์การเข้าอาศัยในพืช การวิเคราะห์ไอโซโทปเสถียร และความสามารถในการเกิดดอกในสภาวะปราศจากพืชอาศัย

การถนอมดอกเห็ดตับเต่าดำ 3 กระบวนการ คือ การแช่น้ำเกลือ การทำแห้ง และการแช่แข็ง ได้รับการตรวจสอบ และองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์หลังจากการถนอมได้รับการวิเคราะห์ ผลการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ถนอมอุดมไปด้วยโปรตีน (17.08 ถึง 9.23 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) และคาร์โบไฮเดรต (60.62 ถึง 63.10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) และมีไขมันต่ำ (0.89 ถึง 1.09 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) วิธีการแช่น้ำเกลือลดปริมาณโปรตีนและไขมัน แต่เพิ่มปริมาณคาร์โบไฮเดรตนอกจากนี้ได้ประเมินการทดสอบประสาทสัมผัสของอาหารที่ทำจากผลิตภัณฑ์ที่ถนอมได้แก่ แกงเห็ดตับเต่าดำและซอสเห็ดมะเขือเทศสำหรับสปาเก็ตตี้ ผลการทดลองพบว่า กลิ่น รส เนื้อสัมผัส และสี มีความต่างกันในแต่ละวิธีการถนอม ผลิตภัณฑ์ที่แช่น้ำเกลือมีคะแนนยอมรับโดยรวมสูงที่สุดเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์จากการถนอมอื่นๆ

คำสำคัญ เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา เห็ดตับเต่าดำ การเพาะเลี้ยง สารส่งเสริมการเจริญของพืช สถานะ การถนอมอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Development of Black Bolete (*Phlebopus portentosus*) to be a Sustainable Economic Mushroom	
Author	Mr. Jaturong Kumla	
Degree	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)	
Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Panuwan Chantawannakul	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Eric Danell	Co-advisor

ABSTRACT

This study surveyed black bolete (*Phlebopus portentosus*) in northern Thailand and investigated the suitable growth conditions, plant growth promoting abilities, sporocarp production without a host plant and the status of this mushroom. Moreover, the preservative methods of *P. portentosus* sporocarp for the commercial sale were evaluated. A total of 18 samples were collected from Chiang Mai, Chiang Rai and Lumphun Provinces in northern Thailand. The identification based on morphological and molecular characteristics indicated that all samples were agreed well with the taxonomic of *P. portentosus*.

Pure cultures of *P. portentosus* were isolated from each sporocarp. The results indicated that mycelia of *P. portentosus* grew well at 30°C and the optimum pH was 4.0. Among 15 culture media tested, modified Murashige & Skoog and fungal-host media were the best for mycelial growth. Glucose and ammonium salts produced the largest radial growth. Moreover, the *in vitro* abilities of selected fungi such as *Astraeus odoratus*, *P. portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense*, to produce indole-3-acetic acid (IAA) and siderophore, to solubilize different toxic metal (Co, Cd, Cu, Pb, Zn)-containing isoluble minerals, and metal tolerance were investigated. The result indicated that all fungi were able to produce IAA in liquid medium and fungal IAA could simulate coleoptile elongation, and increase seed germination and root length of tested plant. The highest IAA yield (65.29±1.17 μg ml^{-1}) was obtained from

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

P. portentosus isolate CMU51-210-2 after 40 days of cultivation in liqiud medium supplemented with 4 mg $ml^{-1}$of L-tryptophan. All selected fungi produced both catecholate- and hydroxamate-type siderophores and *P. portentosus* isolate CMU51-210-2 showed the highest yield of catecholate- and hydroxamate-type siderophores 236.43±2.34 and 530.06±3.16 mg l^{-1}, respectively. All selected fungi could solubilize insoluble metal containing minerals which varied for different minerals and fungal species. The solubilization and tolerance indexes decreased when the concentration of metal minerals increased. *Astraeus odoratus* showed the lowest tolerance to metals.

The sporocarp production ability in the absence of a host plant condition of five isolates of *P. portentosus* such as CMU51-110-1, CMU51-210-2, CMU51-241-1, CMU51-261-1 and CMU51-320-2 were examined. The result indicated that the fungal mycelia grew fastest on sorghum grains supplemented with fungal-host solution. The primordia were formed under low temperature, high humidity and a 12 h photoperiod. Fungal isolate CMU51-320-2 produced primordia at higher number than other isolates. The primordia were developed into young sporocarps and matured later within 8–15 days in the *in vitro* culture, pot culture and bag culture experiments. Cultivation experiment indicated that both the highest number of primordial formation and yield of sporocarp were obtained on 1:1 (v/v) of mixed sorghum grains supplemented with fungal host solution and sawdust. As a supplemental solution, fungal host solution was found to be better comparing with Murashige & Skoog and vitamin solutions. The identification of mature cultivated sporocarps was confirmed by both morphological and molecular methods.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ECM status of *P. portentosus* was evaluated by a host range under greenhouse experiment and a stable carbon ($\delta^{13}C$) and nitrogen ($\delta^{15}N$) isotopic evidences analyses. A peat:vermiculite mixed with fungal-host solution was the best solid substrate for mycelial inoculum production. Six plant seedling species such as *Castanopsis tribuloides*, *Dimocarpus longan, Elaeocarpus hygrophilus*, *Mangifera indica*, *Pinus kesiya* and *Syzygium cumini* were tested. The results indicated that *P. portentosus* isolate CMU51-320-2 able to form ECM association with *P. kesiya* and *E. hygrophilus* after one and three years after inoculation. The 57 samples of ECM fungi and 25 samples of saprotophic fungi were collected in northern Thailand for the isotopic

comparison experiment. New spices of ECM fungus, *Scleroderma suthepense* was found and *Morganella purpurascens* was a new report in Thailand. The stable carbon and nitrogen comparisons separated fungal samples into three groups such as ECM fungi, saprotrophic fungi and cultivated *P. portentosus* in the absence of a host plant conditions. The collected *P. portentosus* samples in nature were fall in an ECM group. This study indicated that *P. portentosus* was a facultative ECM fungus by a host range, the stable isotopic evidence and the ability of sporocarp formation without host plant analyses.

Three processes for the preservation of *P. portentosus* sporocarps such as brining, drying and freezing were investigated and chemical composition of preserved product was analyzed. The results indicated that the preserved products are rich in protein (17.08–9.23% dry weight) and carbohydrates (60.62–63.10% dry weight) contents, and low fat (0.89–1.09% dry weight) content. The brining processes decreased protein and fat contents but increased carbohydrate content. Moreover, sensory test of black bolete spicy curry and tomato-mushroom sauce made from the preserved products was evaluated. The results showed that favor, taste, texture and color were changed in different preservative methods. Brining product had the highest overall acceptability scores than other persevered products.

Keywords: Ectomycorrhizal fungi, black bolete, cultivation**,** plant growth promoting substance, status, preservation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved