บทที่ 2
ทบทวนเอกสาร

2.1 เห็ด (Mushroom)

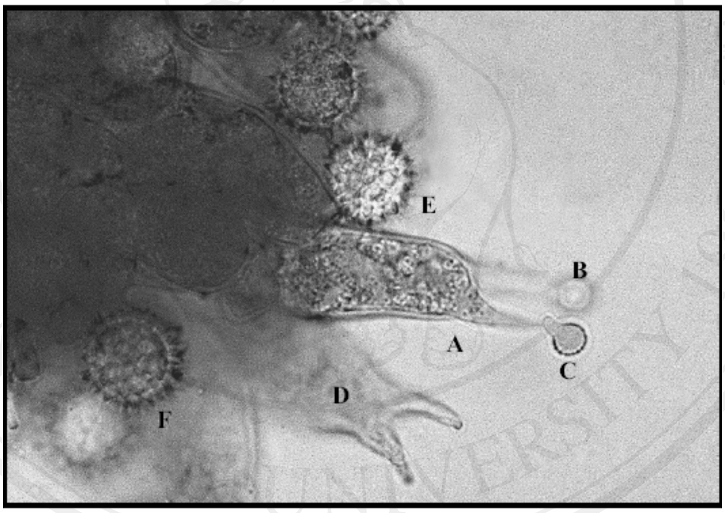
เห็ดจัดเป็นราชนิดหนึ่ง ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญต่อมนุษย์ในด้านต่างๆเช่น เป็นอาหาร เป็นสมุนไพรใช้รักษาโรค เห็ดราใน Class Basidiomycetes (ภาพ 1) เป็นพวกที่มีวิวัฒนาการสูงสุด สมาชิกในclass นี้ได้แก่ พวกที่เรียกว่า เห็ด (mushroom) เช่น เห็ดลูกฝุ่น (puffballs) เห็ดร่างแห (stinkhorns) เห็ดหิ้ง (bracket fungi) เห็ดมีครีบ (gilled fungi, mushroom) เห็ดโบลีตส์ (boletes tube fungi) เห็ดขมิ้น (chanterelles) เห็ดหูหนู (jelly fungi) เห็ดดาวดิน (earth stars) ราสนิม (rust fungi) ราเขม่า (smut fungi) เป็นต้น

ภาพ 1 เห็ดชนิดต่างๆที่อยู่ใน Class Basidiomycetes (Anonymous 1, 2009)

2.1.1 การจัดจำแนกของเห็ด Basidiomycota

เห็ดราในไฟลัม Basidiomycota จัดเป็นเห็ดราชั้นสูง เช่นเดียวกับ Ascomycota มีชื่อสามัญว่า Basidiomycetes หรือ Club Fungi ได้แก่พวกเห็ด Mushroom มีลักษณะสำคัญคือ (พิไลพรรณ, 2525)

1. Hyphae มีผนังกั้น
2. สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์โดยแบ่งเซลล์แบบmeiosis ได้spore 4 spore บนโครงสร้างคล้ายกระบองที่เรียกว่า Basidia เรียกว่า เบสิดิโอสปอร์ (basidiospores) ซึ่งเป็นสปอร์ที่มี1 นิวเคลียส และเป็นชนิดแฮปพลอยด์ (ภาพ 2) อย่างไรก็ตาม Basidiomycota บางชนิดยังสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศอีกด้วย



ภาพ 2 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเห็ดรา Basidiomycetes (Ainsworth, 2004)

A. โครงสร้างภายใต้ครีบเห็ด

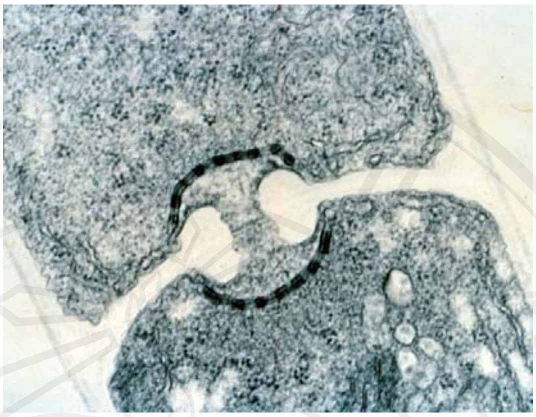
B และ C. basidiospore

D. Basidiumที่ไม่มี spore

E และ F. สปอร์รูปร่างแบบ Spiny spherical

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

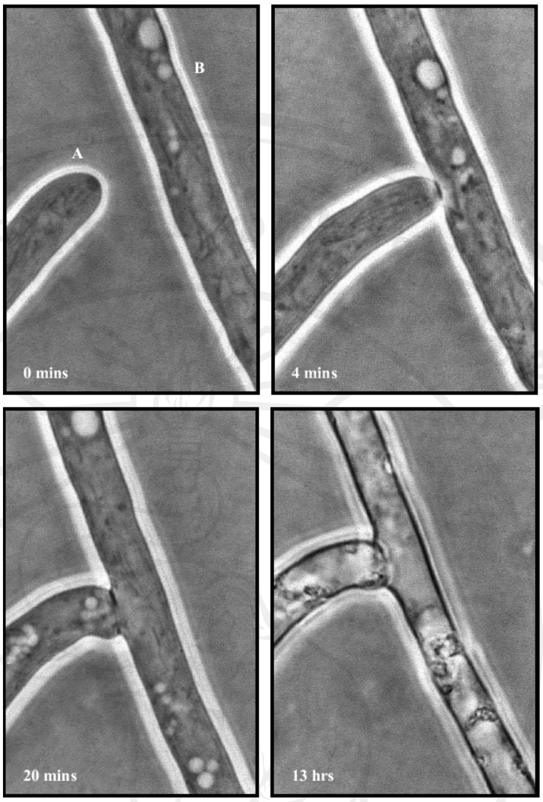
3. เส้นใยมีผนังกันตามขวาง (dolipore septum) (ภาพ 3)



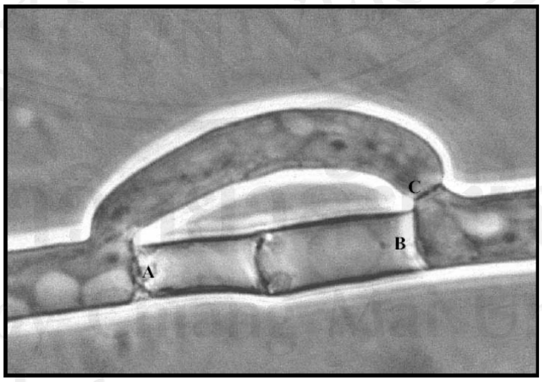
ภาพ 3 Dolipore septum ของเห็ดพวก Basidiomycetes (Anonymous 2,2009)

4. เส้นใยของเชื้อราพวก Basidiomycetes มีการเจริญเป็น 3 ระยะคือ เป็นเส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) เส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) และเส้นใยตติยภูมิ (tertiary mycelium) เส้นใยปฐมภูมิ เป็นเส้นใยที่เกิดจากการงอกของเบสิดิโอสปอร์มาเป็นเส้นใยที่มีผนังกั้นแต่ละเซลล์มี 1 นิวเคลียส ส่วนเส้นใยทุติยภูมิเกิดจากเส้นใยปฐมภูมิสองเซลล์มาแตะกัน จากนั้นไซโทพลาสซึมจากเซลล์หนึ่งไหลเข้ายังอีกเซลล์ (ภาพ 4) หนึ่งเรียกว่า clamp connections (ภาพ 5) ได้เป็นเซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส แต่นิวเคลียสไม่รวมตัวกัน เรียกว่า dikaryotic hypha ส่วนเส้นใยตติยภูมินั้นเกิดจากการเส้นใยทุติยภูมิอัดตัวกันแน่นขึ้นเพื่อเป็น fruiting body ซึ่งในเส้นใยก็ยังคงเป็น dikaryotic cell

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4 การรวมตัวกันของเซลล์เส้นใยที่มีชีวิต 2 เซลล์ (สปีชีส์เดียวกัน)
โดยใช้เวลา 13 ชั่วโมง (Ainsworth,2004)



ภาพ 5 การเกิด clamp connection ในเห็ดพวก Basidiomycetes (Ainsworth,2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2 การดำรงชีวิต

เห็ดราไม่สามารถสังเคราะห์อาหารได้ด้วยตนเอง เนื่องจากไม่มีคลอโรฟิล (chlorophyll) เห็ดจึงดำรงชีวิตอยู่ได้ 3 แบบคือ

1. **Saprophytism** เป็นการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตบนสิ่งมีชีวิตที่ผุพังหรือตายไปแล้ว เช่น *Pholibia* sp., *Boletus* sp. และ *Lentinus lepidius*

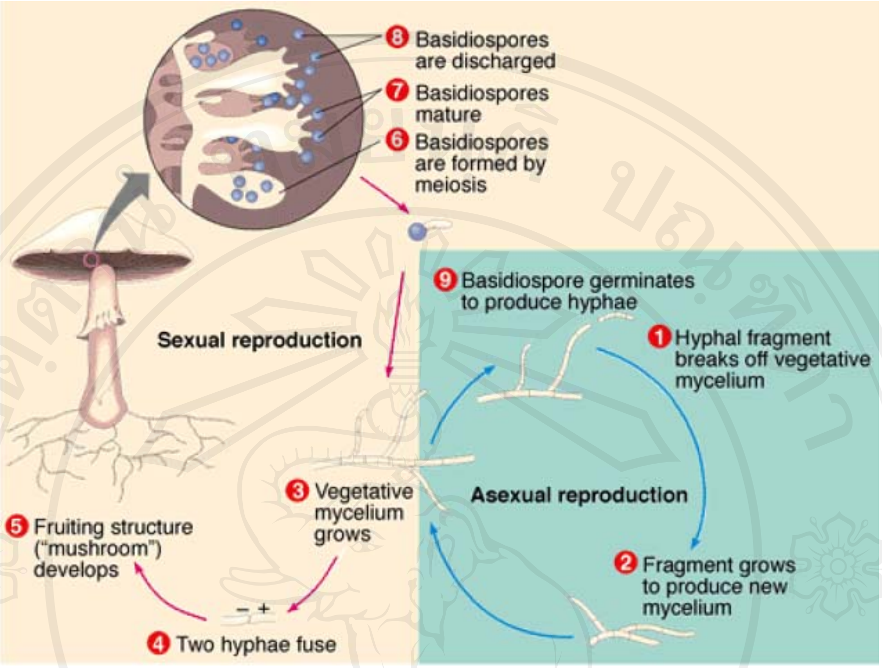
2. **Parasitism** เป็นการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตบนสิ่งมีชีวิตที่ยังมีชีวิตอยู่ เช่น *Polyporus* sp.

3. **Symbiosis** เป็นการดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยกันของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งกับสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งทั้งคู่ได้รับประโยชน์ซึ่งกันและกัน ซึ่งเห็ดที่มีการดำรงชีวิตแบบนี้เรียกว่า มายคอร์ไรซ่า (Mycorrhiza)

2.1.3 วงจรชีวิต

วงจรชีวิตของเห็ด (ภาพ 6) จะเริ่มจาก Basidiospore (haploid) งอกในสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ (ในช่วงนี้สั้น) จากนั้น hypha ที่มีลักษณะเหมือนกัน (undifferentiate) จะเกิดการเข้าคู่กัน เกิดการแลกเปลี่ยนนิวเคลียส (mating type) ไปเป็นระยะที่เรียกว่า plasmogamy ในระยะนี้จะมีนิวเคลียส 2อันใน 1 เซลล์ (dikaryotic) เส้นใยมีการเจริญอย่างรวดเร็วจนเส้นใยรวมตัวกันเป็นดอกเห็ด (dikaryotic) ซึ่ง dikaryons ของbasidiomycetes จะมีช่วงระยะเวลานาน เพื่อผลิตดอกเห็ดในแต่ละปี Karyogamy จะพบในบริเวณปลายของ เซลล์ dikaryotic ซึ่งพบบริเวณครีบเห็ด แต่ละเซลล์จะมีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ทำให้ได้สปอร์ที่มี haploid นิวเคลียส จำนวน 4 สปอร์ บน 1 basidium และเมื่อสปอร์เจริญเติบโตเต็มที่ สปอร์ก็จะถูกปล่อยออกสู่ธรรมชาติโดยลม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 6 วงจรชีวิตของเห็ด (Tortora *et al.*, 2007)

2.1.4 เห็ดโบลีทส์ (Bolete)

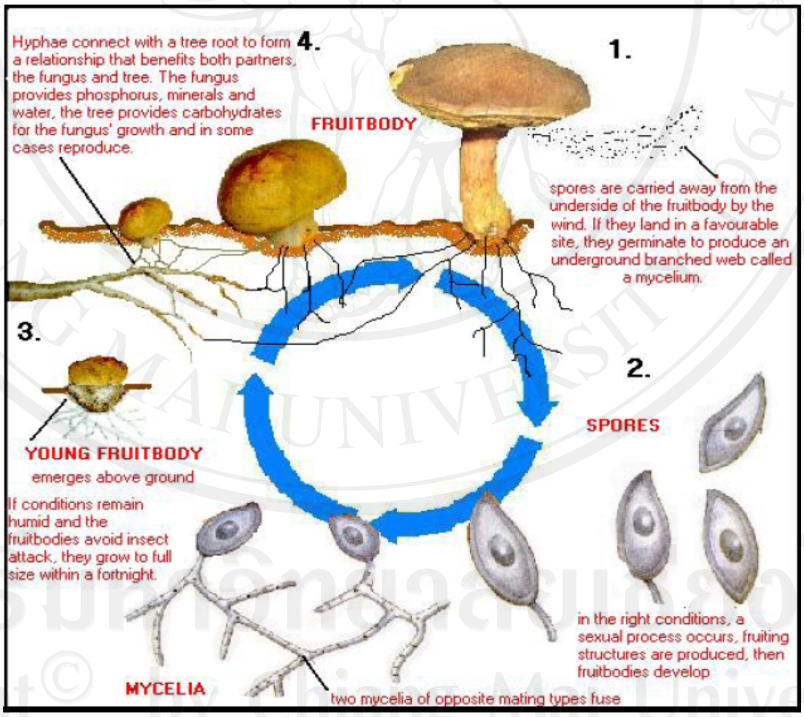
โบลีตส์จัดอยู่ในอาณาจักร *Fungi* ไฟลัม *Basidiomycota* ชั้น *Hymenomycetes* อันดับ*Agaricales* วงศ์ *Boletaceae* (Alexopoulos et *al*., 1996)

โบลีตส์ (Bolete) เป็นเห็ดในไฟลัม Basidiomycota จัดเป็นเห็ดทรงร่ม สร้างสปอร์ในรูใต้หมวกเห็ด ดอกเห็ดมีลักษณะอ่อนนุ่ม ส่วนใหญ่ก้านจะติดอยู่ตรงกลางหมวกเห็ด (Hawksworth *et al*., 1995) คล้ายกับพวก agaric แต่โครงสร้างที่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นท่อ หรือรูที่สามารถแยกออกจากหมวกเห็ดได้อย่างง่าย เห็ดโบลีตส์มีประมาณ 70 สกุล และ 727 ชนิดพบได้ทั่วไปตามป่าหรือสนามหญ้า (Brundrett *et al*., 1996) ส่วนใหญ่จัดเป็นพวกซาโพรบ หรือ ปรสิตกับสิ่งมีชีวิตอื่น และเป็นเอกโตมายคอร์ไรซ่า (ectomycorrhiza) กับพืชบางชนิด ส่วนใหญ่เป็นเห็ดกินได้ มีส่วนน้อยที่มีพิษ (Seehanan *et al*., 2007)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.5 วงจรชีวิตของเห็ดโบลีทส์

สปอร์จะถูกพัดออกไปจากใต้หมวกเห็ดโดยลม หากตกลงในที่ที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการงอกของสปอร์ เรียกว่าเส้นใย ในสภาวะที่เหมาะสมจะเกิดกระบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ การสร้างดอกเห็ดจะถูกสร้างขึ้น เส้นใย 2 เส้นจะเกิดการรวมตัวกัน แล้วเกิดการแลกเปลี่ยนนิวเคลียส เกิดเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียสใน 1 เซลล์ จากนั้นเส้นใยจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วจนรวมตัวเป็นดอกเห็ดบนพื้นดิน เห็ดโบลีทส์พวกที่เป็นเอกโตมายคอร์ไรซ่านั้นเส้นใยจะเจริญเข้าสู่รากของต้นไม้ เป็นความสัมพันธ์ที่ได้ประโยชน์ทั้ง 2 ฝ่าย ระหว่างต้นไม้กับเห็ดรา โดยที่เห็ดจะให้ฟอสฟอรัส แร่ธาตุต่างๆ และ น้ำกับต้นไม้ ส่วนต้นไม้จะให้คาร์โบไฮเดรตกับเห็ดราเช่นเดียวกัน วงจรชีวิตของเห็ดโบลีทส์แสดงในภาพ 7



ภาพ 7 วงจรชีวิตของเห็ดโบลีตส์ (Tortora *et al.*, 2007)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.6 โครงสร้างและลักษณะทั่วไปของเห็ดโบลีตส์ (Wood *et al*., 1998)

ดอกเห็ด ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ (ภาพ 8)

หมวกเห็ด (Pileus)

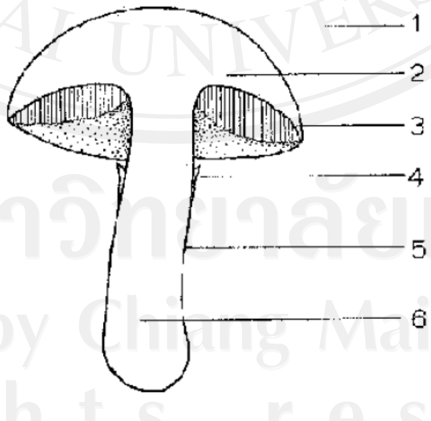
หมวกเห็ดมีขนาด 2-15 cm หมวกเห็ดส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นทรงร่ม (convex) หมวกเห็ดมีสีดำไปถึงสีน้ำตาลชมพู หรือสีแดงสด มักเปลี่ยนสีเมื่อถูกอากาศ ในการจัดจำแนกโบลีตส์ส่วนใหญ่นั้นมักใช้ลักษณะของหมวกเห็ดและผิวเห็ดเป็นหลักสำคัญในการจำแนก

รูหรือท่อ (Pore)

เป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เพราะมีโครงสร้างที่ใช้สร้าง Basidiospore ในโครงสร้างดังกล่าว รูหรือท่อของเห็ดโบลีตส์นั้นจะมีลักษณะอ่อนนุ่ม ชื้น ซึ่งแตกต่างกับเห็ดที่มีรูหรือท่อเช่นเดียวกันอย่างเช่น เห็ดพวก Polypore เห็ดพวกนี้จะมีลักษณะแข็ง แห้ง และมักอยู่กับต้นไม้ ในโบลีตส์ส่วนใหญ่ รูหรือท่อจะแยกออกจากหมวกเห็ดได้ง่ายกว่าเห็ดกลุ่มอื่น รูหรือท่อของเห็ดโบลีตส์ที่ติดอยู่กับก้านนั้นส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นแบบ depress

ก้าน (Stipe)

โบลีตส์ส่วนใหญ่มักมีก้านอยู่ตรงกลาง (central) ซึ่งส่วนใหญ่มักมีรูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) ป่องโคน (bulbous) หรือโคนผอม (tapered)



ภาพ 8 โครงสร้างเห็ดโบลีตส์: 1. Pileus, 2. Pileus trama, 3. Pore, 4. Annulus, 5. Stipe cuticle และ 6. Stipe trama (Wood *et al*., 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 เห็ดห้า (*Phlebopus portentosus*)

เห็ดห้าจัดเป็นมายคอร์ไรซ่า (mycorrhiza) พวกเอกโตมายคอร์ไรซ่า (ectomycorrhiza) อาศัยอยู่กับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัยกัน ส่วนใหญ่เห็ดห้าพบได้ทั่วไปในภาคเหนือและภาคอีสาน ในภาคเหนือจะเรียกว่า เห็ดห้า เพราะเห็ดชนิดนี้ขึ้นบริเวณต้นห้า ส่วนในภาคอีสานจะเรียกเห็ดชนิดนี้ว่า เห็ดผึ้ง เนื่องจากมีสีคล้ายกับน้ำผึ้ง จัดเป็นเห็ดที่มีความนิยมในภาคเหนือและภาคอีสาน พบได้บางฤดูกาลเท่านั้น ซึ่งพบได้ในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนกันยายนของทุกปี เป็นเห็ดที่มีราคาสูง เนื่องจากเห็ดห้าไม่สามารถออกดอกโดยปราศจากพืชอาศัย

พืชอาศัยของเห็ดห้ามีหลายชนิด เช่น ต้นหว้า มะม่วง ลำไย โสนนา สะแก มะกอกน้ำ ยางนา และ ยูคาลิปตัส เป็นต้น (ดีพร้อม, 2550)

ภาพ 9 เห็ดห้า (ก: เห็ดห้า ข: เห็ดห้าที่อยู่รอบรากต้นมะกอกน้ำ และ ค: เส้นใยเห็ดห้าที่อยู่กับรากต้นมะกอกน้ำ (ลูกศรชี้))

2.2.1 อนุกรมวิธานของเห็ดห้า (Segedin and Pennycook, 2001)

Kingdom Fungi

Phylum Basidiomycota

Class Basidiomycetes

Family Boletinellaceae

genus *Phaeogyroporus*

Species *Phaeogyroporus portentosus*

(Berk.& Broome) McNabb

synonym

- *Boletus portentosus* Berk. & Broome
- *Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome)
- *Gyroporus portentosus* (Berk. & Broome) G. Stev.
- *Boletus marginatus* J. Drumm. ex Berk.
- *Phlebopus marginatus* Watling & N.M. Greg.

แต่ปัจจุบันนิยมใช้ *Phlebopus portentosus* เป็นชื่อวิทยาศาตร์แทน *Phaeogyroporus-Portentosus*

2.2.2 ลักษณะโดยทั่วไปของเห็ดห้า (Sanmee., 2004)

ภาพ 10 โครงสร้างเห็ดห้า (1: หมวกเห็ด 2: รูหรือ ท่อ และ 3: ก้าน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมวกเห็ด

เป็นเห็ดที่มีกลางถึงขนาดใหญ่ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 7–12.5 cm หมวกเห็ดมีสีน้ำตาลมะกอก รูปร่างทรงร่ม

รูหรือท่อ

มีความยาว 0.5 cm, มีสี น้ำตาลอ่อน เมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีสีเข้มขึ้น

ก้าน

มีความยาว7.5-13 x 4.5-5.5 cm มีสีน้ำตาล รูปร่างคล้ายกระบอง โดยที่โคนใหญ่กว่าด้านปลาย ผิวขรุขระเป็นรอยย่น มีร่อง เนื้อค่อนข้างหนา เนื้อเยื่อเห็ดมีสีเหลือง

เบสิเดียม

รูปร่างแบบกระบอง มีขนาด 20–34 x 11–13 µm มี 4 spores ต่อ 1 basidium

เบสิดิโอสปอร์

มีรูปร่างรีจนถึงค่อนข้างกลม ผิวเรียบ ผนังบาง มีขนาด 10.0-11.5 x 9.0 มีสีเหลืองอมเขียว - สีน้ำตาลอมเหลือง

2.3 ความสัมพันธ์ของเห็ดห้ากับพืชอาศัย

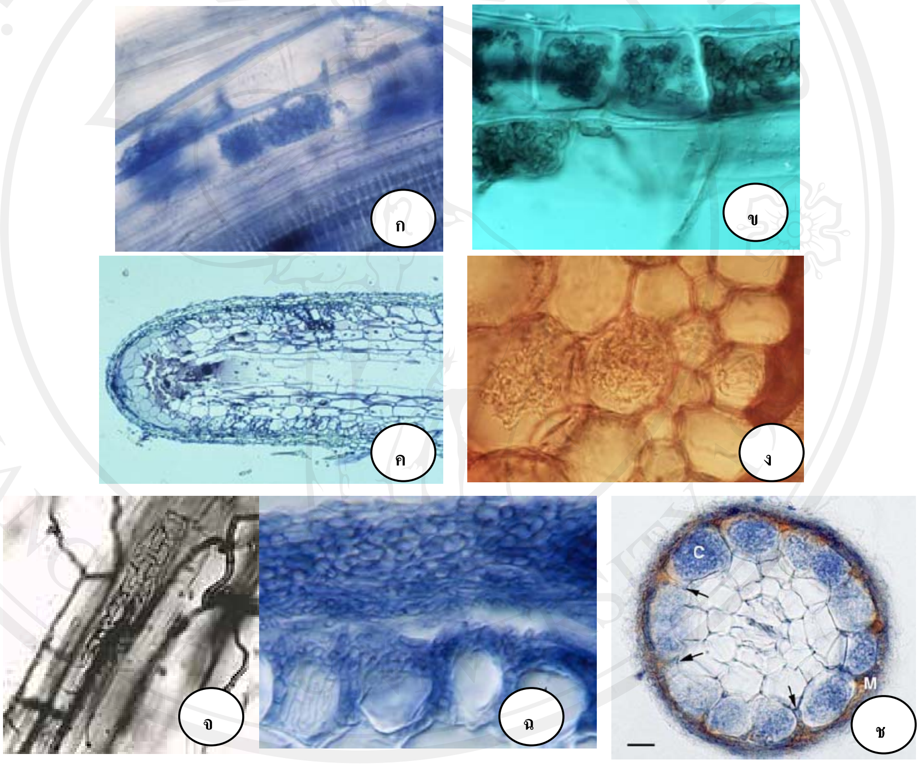
2.3.1 มายคอร์ไรซ่า (Mycorrhiza)

คำว่า Mycorrhiza เป็นคำมาจากภาษากรีกว่า Mykes ซึ่งหมายถึง fungus ซึ่งได้แก่พวกเห็ดราร่วมกับคำว่า rhiza ซึ่งหมายถึง root หรือรากพืช ดังนั้นคำว่า Mycorrhiza จึงหมายถึงความสัมพันธ์ของรากพืชชั้นสูงกับเชื้อราแบบพึ่งพาอาศัยกัน ซึ่งพบได้ทั่วไป ในพืชชั้นสูงถึง 85 % (Hawksworth *et al.*, 1995) ซึ่งเส้นใยของเชื้อราจะเจริญอยู่ในชั้นคอร์เทกซ์ (cortex) ของรากพืชและมีเส้นใยที่ยื่นออกมานอกรากช่วยในการดูดน้ำและแร่ธาตุให้กับพืช ส่วนพืชก็ให้สารอาหารกับเชื้อราจากการสังเคราะห์แสงของพืช (Brundrett *et al.*, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2 ชนิดของมายคอร์ไรซ่า (Brundrett *et al*., 1996)

มายคอร์ไรซ่ามี 7 ประเภท แบ่งตามความแตกต่างของกลุ่มเชื้อรา พืชอาศัย และความแตกต่างทางโครงสร้างของมายคอร์ไรซ่าได้แก่ 1) Endomycorrhiza (vesicular-arbuscular mycorrhiza) 2) Ectendomycorrhiza, 3) Ericoidmycorrhiza 4) Abutoidmycorrhiza 5) Monotropoidmycorrhiza 6) Orchidmycorrhiza และ 7) Ectomycorrhiza (ภาพ 11) ลักษณะของแต่ละชนิดอธิบายดังตาราง 1



ภาพ 11 ประเภทของมายคอร์ไรซ่า (ก: Endomycorrhiza ข: Ericoidmycorrhiza
ค: Ectendomycorrhiza ง: Orchidmycorrhiza จ: Ectomycorrhiza
ฉ: Monotropoidmycorrhiza และช: Abutoidmycorrhiza) (Anonymous 3, 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 ลักษณะสำคัญของมายคอร์ไรซ่าชนิดต่างๆ (Harley and Smith, 1983)

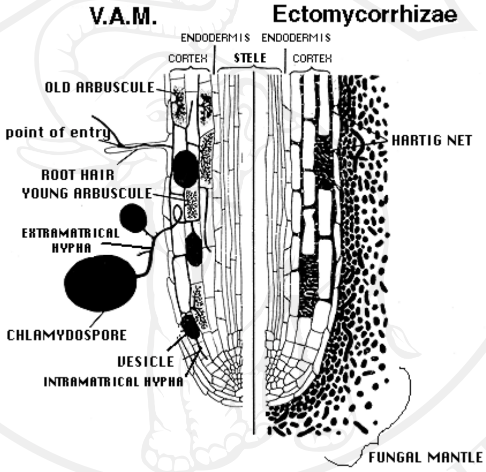
		ชนิดของมายคอร์ไรซ่า						
		VAM	Ectomycorrhiza	Ectendomycorrhiza	Arbutiod	Monotropoid	Ericoid	Orchid
เชื้อรา	มีผนังกั้น	-	+	+	+	+	+	+
	ไม่มีผนังกั้น	+	(+)	-	-	-	-	-
การเข้าเซลล์ของ hyphae		+	-	+	+	+	+	+
Fungal sheath		-	+	+ หรือ -	+	+	-	-
Hartig net		-	+	+	+	+	-	-
Hyphal coils ในเซลล์		+	-	+	+	-	+	+
Haustoria	dichotomous	+	-	-	-	-	-	-
ไม่มี	dichotomous	-	-	-	-	+	-	+ หรือ -
Vesicles ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ		+ (หรือ-)	-	-	-	-	-	-
Achlorophylly		- (หรือ+)	-	-	- (หรือ+)	+	-	+
ประเภทเชื้อรา		Phyco	Basidio Asco Phyco	Basidio Asco	Basidio	Basidio	Asco (Basidio)	Basidio
Host		Bryo Pterido Gymno Angio	Gymno Angio	Gymno Angio	Ericales	Monotropaceae	Ericales	Orchidaceae

(+: มี -: ไม่มี)

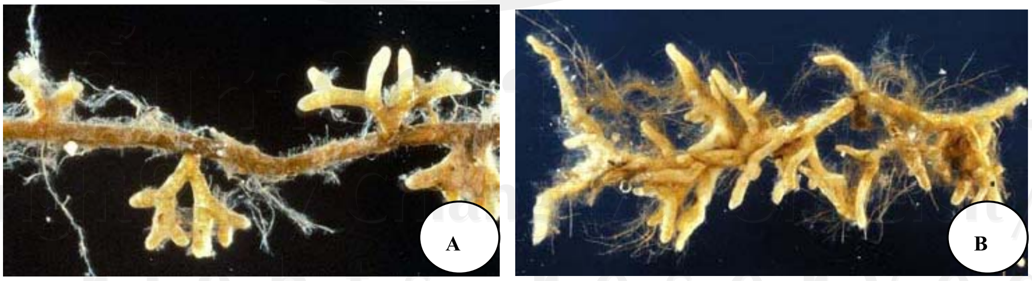
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2.1 Ectomycorrhiza

เป็นมายคอร์ไรซ่าเป็นการอยู่ร่วมกัน ระหว่าง ราชั้นสูง + รากของไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่ม ซึ่งราชั้นสูงได้แก่พวก ascomycete (สร้างสปอร์ในโครงสร้างที่เรียกว่า ascus) และพวก basidiomycete (สร้างสปอร์บนโครงสร้างที่เรียกว่า basidia) โดยเส้นใยของราเอกโตจะเข้าสู่รากพืช แล้วแทรกอยู่ระหว่างเซลล์พืช ในชั้นcortexของพืช (epidermis-endodermis) เส้นใยของราเจริญสานตัวกันเป็นแผ่น (fungal sheath) หรือเป็นเยื่อหุ้ม (mantle) อยู่รอบ ๆ ราก (ภาพ 12) ซึ่งรากพืชที่มีเอกโตมายคอร์ไรซ่าจะมีลักษณะแตกต่างกับรากพืชที่ไม่มีเอกโตมายคอร์ไรซ่าอย่างชัดเจน โดยรากจะมีขนาดใหญ่กว่ารากที่ไม่มีเอกโตมายคอร์ไรซ่า (ภาพ 13)



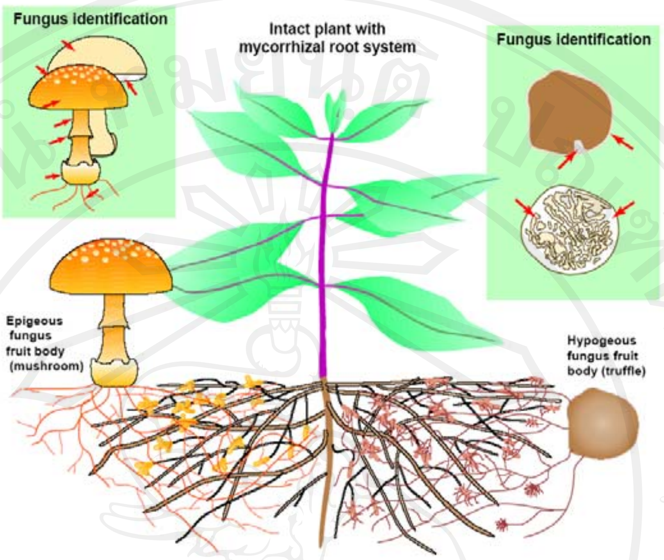
ภาพ 12 ลักษณะการเข้ารากของเชื้อราเอนโดมายคอร์ไรซ่า และเอกโตมายคอร์ไรซ่าและโครงสร้างที่พบได้ในเซลล์พืช (Anonymous 4, 2009)



ภาพ 13 รากพืชที่มีเส้นใยเอกโตมายคอร์ไรซ่าแทรกอยู่ (A: เส้นใย *Suillus brevipes* ที่แทรกอยู่ในรากสน B: เส้นใย *Astraeus pteridis* ที่แทรกอยู่ในรากยูคาลิปตัส (Brundrett *et al*., 2008)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เห็ดที่เป็นเอกโตมายคอร์ไรซ่ามีทั้งที่อยู่บนดิน เราจะเรียกพวกนี้ว่า mushroom ส่วนพวกเห็ดเอกโตมายคอร์ไรซ่าที่เราพบใต้ดินจะเรียกเป็นพวก truffle (ภาพ 14)



ภาพ 14 เอกโตมายคอร์ไรซ่าที่พบบนดินและใต้ดิน (Brundrett *et al.*, 2008)

ราเอคโตมายคอร์ไรซ่ามีมากกว่า 5,000 ชนิด และเจริญร่วมกับพืชหลายชนิดในเขตภูมิอากาศต่าง ๆ ทั่วโลก ส่วนใหญ่ราเอคโตมายคอร์ไรซ่าเป็นราชั้นสูง จัดจำแนกอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes, Gasteromycetes, Ascomycetes และ Phycomycetes (ตาราง 2)

ตาราง 2 ตัวอย่าง เอกโตมายคอร์ไรซ่าและพืชอาศัย (Harley and Smith, 1983)

Fungus	**Host**
Boletus spp.	*Pinus sylvestris*
Boletus spp.	*P. sylvestris*
Boletus spp.	*Picea excelsa*
Cortinarius glaucopus	*P. sylvestris*
Rhizopogon roseolus	*P. virginiana*
R. vinicolor	*P. taeda*
Pisolithus tinctorius	*P. taeda*
Cenococcum graniforme	*P. taeda*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและ การเพาะเห็ดห้า

2.4.1 การเจริญเติบโต (Growth)

การเจริญเติบโตเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน อาจจะเป็นการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ การเพิ่มน้ำหนัก การพัฒนา หรือการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ

การเจริญเติบโตของเห็ดรา ในระดับเซลล์นั้น หมายถึง การที่เซลล์หลายๆ เซลล์เปลี่ยนไปทำหน้าที่ต่างๆ รวมถึงการเพิ่มจำนวนเซลล์และการขยายขนาด ก็จัดเป็นการเจริญเติบโตด้วย (Griffin, 1994) ซึ่งกระบวนการเจริญเติบของราที่เป็นเส้นสายย่อมมีความซับซ้อนกว่าพวกยีสต์

2.4.2 อัตราการเจริญเติบโต

ในการศึกษาเรื่องการเจริญเติบโตนั้น ก็คือการศึกษาถึงอัตราหรือจำนวนของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นระหว่างการบ่ม ซึ่งการหาอัตราค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตนั้นสังเกตโดยการวัดการเจริญเติบโตเทียบกับเวลา ซึ่งหมายถึงการวัดดูการเพิ่มขึ้นของมวลเซลล์ต่อหน่วยของเวลา

2.4.3 วิธีการวัดการเจริญเติบโต มีหลายวิธี เช่น (Lilly and Barnett, 1951)

1. **การวัดน้ำหนักแห้ง (Dry weight)** เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เป็นวิธีที่ง่าย และสามารถวัดการเจริญเติบโตได้ดี แต่มีข้อเสียก็คือไม่สามารถวัดเซลล์ที่มีปริมาณมาก และมีขนาดใหญ่ได้ ไม่สามารถใช้วัดการเจริญในอาหารแข็งได้ รวมทั้งใช้เวลามาก และการวัดจะไม่ต่อเนื่อง
2. **การวัดขนาดของโคโลนี (Linear extension)** เป็นวิธีการที่สามารถทำได้ต่อเนื่อง สามารถใช้วัดในอาหารแข็งได้ แต่ข้อเสียก็คือไม่สามารถวัดในแนวดิ่งได้
3. **การนับจำนวนเซลล์ (Cell number)** ส่วนใหญ่ใช้กับยีสต์โดยใช้ Haemacytometer สามารถวัดทางอ้อมโดยการวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แต่ข้อเสียก็คือ ไม่สามารถแยกเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ออกจากเซลล์ที่ไม่มีชีวิตได้
4. **ความเข้มข้นขององค์ประกอบเซลล์ (Concentration of cell components)** ดูการเปลี่ยนใน chitin และ glucosamine ส่วนใหญ่ใช้การวัดการเจริญของพืช

2.4.4 ปัจจัยสำคัญในการเจริญของเส้นใย

สิ่งแวดล้อมนั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดมาก ซึ่งเห็ดแต่ละชนิดนั้นต้องการปัจจัยเหล่านี้ต่างกันออกไป ได้แก่ อาหารที่ใช้ในการเลี้ยง แร่ธาตุอาหาร ความเป็นกรด – ด่าง ของน้ำและอาหารที่ใช้เลี้ยง อากาศ อุณหภูมิ ความชื้น แสง และสิ่งมีชีวิตที่อยู่รอบข้าง

การแยกเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อราเอกโตมายคอร์ไรซ่า มีความสำคัญในการวิจัย ผู้เชี่ยวชาญทางด้านเห็ดรา นำเห็ดจากธรรมชาติมาทดลองทางสรีรวิทยาของเชื้อที่สนใจเกี่ยวกับปัจจัยทางด้านกายภาพ รวมถึงด้านชีวภาพ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราเอกโต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

มายคอร์ไรซ่าในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เห็ดแต่ละชนิดต้องการและเจริญเติบโตได้ดีที่สุด พร้อมทั้งศึกษาในสภาพสิ่งแวดล้อมจริงควบคู่กันไปด้วย ซึ่งมีความสำคัญมาก

2.4.4.1 ปัจจัยที่มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อราเอกโตมายคอร์ไรซ่า

สารอาหาร

เห็ดและราส่วนใหญ่ ต้องการอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อน และแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเห็ด ธาตุและสารประกอบที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเห็ด แบ่งออกเป็น 4 ประเภท ดังนี้

1. แหล่งคาร์บอน
2. แหล่งไนโตรเจน
3. เกลือและแร่ธาตุต่างๆ
4. สารประกอบอินทรีย์ที่จำเป็นบางชนิด

1. แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเห็ดรา โดยส่วนใหญ่มักใช้ที่ 3–28 % แหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้เลี้ยงเห็ดรามีหลายชนิด เช่น กลูโคส ฟรักโตส กาแลคโตส แมนโนส (Monosaccharide) เซลโลไบโอส แลคโตส มอลโตส ซูโครส (Oligosaccharide) เซลลูโลส เดกซ์ทริน และ แป้ง (Polysaccharide) (Jonathan and Fasidi, 2000)

ธาตุคาร์บอนเมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ในเส้นใยแล้วเซลล์จะนำธาตุคาร์บอนไปสร้างสารที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ใหม่ เช่น เซลลูโลส หรือ นำธาตุคาร์บอนไปใช้ในกระบวนการเมทาโบลิซึมของเซลล์ต่อไป

โดยความต้องการแหล่งของคาร์บอนของเห็ดราแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน การศึกษาผลของคาร์บอนต่อการเจริญเติบโตของ *Psathyerella atroumbonata* ในอาหารเหลว ที่เติมแหล่งคาร์บอน 1% ลงไปในแต่ละอาหารทดสอบ พบว่าเห็ด *P. atroumbonata* เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน ถัดมาเป็น แมนโนส เซลลูโลส และ แมนนิทอล เช่นเดียวกับเห็ดนางรม (*Pleurotus florida*) ที่เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ถัดมาเป็นแมนนิทอล กาแลคโตส และ ฟรักโตส (Jonathan and Fasidi, 2000) เมื่อนำเส้นใยเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) มาเลี้ยงเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนคือ ข้าวฟ่าง ข้าวโพด ข้าวเจ้า และข้าวไรย์ โดยใช้คาร์บอนแต่ละแหล่ง 0.5 mg ต่อ ml ในอาหาร malt extract broth บ่มไว้ 3 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright by Chiang Mai University
All rights reserved

ปรากฏว่าเส้นใยเจริญได้มากที่สุดถึง 9.71 mg/ mlในอาหาร malt extract broth ที่เติม ข้าวฟ่าง ลงไป (Adejoye *et al.*, 2006) สรุปดังตาราง 3

ตาราง 3 แหล่งคาร์บอนที่นำมาใช้เลี้ยงเห็ดรา

แหล่งคาร์บอน	เห็ด	อ้างอิง
Monosaccharide		
- glucose	- *Psathyerella atroumbonata*	Jonathan and Fasidi (2000)
	- *Pleurotus florida*	Adejoye *et al.* (2006)
	- *Boletinus cavipes*	Hatakeyama and Ohmasa (2004)
- fructose	- *Suillus grevilles*	Hatakeyama and Ohmasa (2004)
- galactose	- *P. atroumbonata*	Jonathan and Fasidi (2000)
- mannose	- *P. atroumbonata*	Jonathan and Fasidi (2000)
	- *Suillus luteus*	Hatakeyama and Ohmasa (2004)
Oligosaccharide		
- maltose		
- sucrose		
Polysaccharide	*P. atroumbonata*	Jonathan and Fasidi (2000)
- cellulose		
- dextrin		
- starch		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. แหล่งไนโตรเจน

สูตรอาหารในห้องปฏิบัติการมักจะใช้ เปปโตน กรดอะมิโน เช่น กรดกลูตามิก หรือ เอไมด์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากสารเหล่านี้เส้นใยเห็ดสามารถนำไปใช้ได้ทันที นอกจากนี้ยังมีแหล่งไนโตรเจนอื่นๆที่เส้นใยเห็ดราสามารถนำไปใช้ได้ โดยที่เชื้อเห็ดรา แต่ละชนิดจะมีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตไม่เหมือนกัน เช่น เมื่อหาแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดสกุล *Boletinus* โดยใช้อาหาร Ohta medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างๆ พบว่า เส้นใยเห็ดในสกุล *Boletinus* เจริญได้ดีในอาหาร Ohta medium ที่มี Ammonium tartrate เป็นแหล่งไนโตรเจน (Hatakeyama and Ohmasa, 2004) สรุปดังตาราง 4

ตาราง 4 แหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดรา

แหล่งไนโตรเจน	เห็ด	อ้างอิง
Inorganic sources		
- ammomium nitrate	- *B. cavipes*	Hatakeyama and Ohmasa (2004)
	- *P. florida*	Adejoye *et al*.(2006)
- calcium nitrate	- *P. atroumbonata*	Jonathan and Fasidi (2000)
Complex organic sources		
- yeast extract	- *P. atroumbonata*	Jonathan and Fasidi (2000)
- casein	- *P. florida*	Adejoye *et al*.(2006)
- soya bean	- *Pleurotus ostreatus*	Lbekwe *et al*, 2008
Amino acids		
- Arginine	- *P. florida*	Adejoye *et a*l.(2006)
	- *S. luteus*	Hatakeyama and Ohmasa (2004)
- L- tryptophan	- *P. atroumbonata*	Jonathan and Fasidi (2000)
- glutamic acid	- *S. luteus*	Hatakeyama and Ohmasa (2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เกลือและแร่ธาตุต่างๆ

เกลือและแร่ธาตุต่างๆ จัดเป็นสิ่งที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเห็ด เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง ถ้าหากขาดธาตุดังกล่าว รูปร่างของเห็ดจะเปลี่ยนแปลงไปได้ ซึ่งเซลล์ของเห็ดราไม่ได้ต้องการเกลือและแร่ธาตุต่างๆในปริมาณที่มากเช่นเดียวกับ แหล่งของคาร์บอนและ ไนโตรเจน แต่ขาดไม่ได้ เพื่อที่จะใช้เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ให้ทำงานอย่างสม่ำเสมอ ตัวอย่างอาหารที่มีเกลือและแร่ธาตุในอาหารเช่น Fries medium (Danell, 1994) และ Fungus – host medium agar (Vaario *et al*., 2000) เป็นต้น

4. สารประกอบอินทรีย์บางชนิด (Essential organic compound)

ได้แก่ พวก วิตามิน ช่วยให้เส้นใยเห็ดเจริญเติบโตได้ดี ช่วยในกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ให้เกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ถ้าหากขาดสารต่างๆเหล่านี้เส้นใยอาจจะไม่เจริญเติบโตหรือเจริญช้า ตัวอย่างอาหารที่เติมสารประกอบอินทรีย์พวกวิตามิน ได้แก่ Modified Gamborg medium (Gamborg *et al.*, 1968), Modified SH medium (Laguette *et al*., 2000) และ Murashige & Skoog agar (Danell, 1994) เป็นต้น

อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนกับไนโตรเจน (C:N ratio)

โดยหลักแล้วเชื้อรามีความต้องการคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอัตราส่วนที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเห็ด โดยทั่วไปอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน (C:N ratio) ที่เหมาะกับการเจริญของเส้นใยเห็ดนั้นมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของเห็ดเช่นเดียวกัน เช่นเมื่อหาค่า C:N ratios ที่เหมาะสมของเห็ดนางรมในอาหาร basal medium โดยเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อเห็ดดังกล่าวเจริญได้สูงสุด นำมาทดสอบที่ความเข้มข้น 0.1 ต่อน้ำ 1,000 ml นั้นได้ผลคือ เส้นใยเห็ดนางรม (*Pleurotus florida*) เจริญได้ดีที่สุดที่ อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน เท่ากับ 5:3 (Adejoye, 2006) ส่วนค่า C:N ratios ที่เหมาะสมของเห็ด *Psathyerell atroumbonata* ซึ่งเป็นเห็ดกินได้ คือ 2:3 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว basal medium โดยเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อเห็ดดังกล่าวเจริญได้สูงสุด นำมาทดสอบที่ความเข้มข้นเท่า 0.1 ต่อน้ำ 1,000 ml (Jonathan and Fasidi, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นักจุลชีววิทยาในปัจจุบันได้พยายามพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อราที่ทำการศึกษา ซึ่งสารอาหารจะมีผลต่อสัณฐานวิทยา และสีของโคโลนีของเชื้อรา จากที่กล่าวมาอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปต้องประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ธาตุอื่นๆ และวิตามิน เพื่อเส้นใยเห็ดราจะนำไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึม เชื้อราส่วนใหญ่มักเจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เช่นเส้นใยเห็ด *Morchella* sp. สามารถเจริญในอาหาร PDA และอาหาร malt extract agar medium (MEA) กว่าอาหารชนิดอื่นๆ (Kalm and Kalyoncu, 2008). รวมทั้งเห็ดห้า CMU2100 ก็สามารถเจริญได้บนอาหาร PDA นอกจากนี้เส้นใยเห็ดห้ายังเจริญได้ดีในอาหาร Gambrog , Murashige & Skoog agar (MS) และ MMN medium เมื่อทำการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดห้าในอาหารวุ้น 9 ชนิดโดยวัดการเจริญเติบโตทุก 2 วันโดยการวัดโคโลนีเส้นใยเห็ด (Sanmee, 2004) เส้นใยเห็ดนางรม และ เห็ดฟาง จะมีการเจริญแตกต่างไปในอาหารชนิดต่างๆได้แก่ MEA MS agar และ PDA เห็ดนางรม และ เห็ดฟาง เจริญได้ดีที่สุดในอาหาร MEA (Nasim *et al*, 2001) สรุปดังตาราง 5

ตาราง 5 อาหารที่นำมาใช้เลี้ยงเห็ดรา

อาหาร	เห็ด	อ้างอิง
- PDA	- *Morchella spp*	Kalm and Kalyoncu (2008)
- MEA	- *Morchella spp*	
	- *Pleorotus ostreatus*	Nasim *et al*. (2001)
	- *varies sajar caju*	
	- *Volvariella volvacea*	
- Gambrog - MS agar - MMN medium	*P. portentosus* CMU2100	Sanmee (2004)

pH

pH ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการเจริญของเส้นในเห็ดรา ส่วนใหญ่เชื้อรามักเจริญได้ดีใน pH ใกล้เคียง 7 ค่อนไปทางกรดเล็กน้อย pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อราชนิดต่างๆนั้นขึ้นอยู่กับ ชนิดของเชื้อรา และความต้องการสารอาหารที่จำเป็นในธรรมชาติ กล่าวคือเชื้อราชนิดต่างๆ จะสามารถเจริญได้ดีที่ pH ต่างกัน เช่น *Dendryphiella salina* เจริญได้ดีที่ pH4-6,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Cladosporium herbarium เจริญได้ดีที่ pH 5-6, *Monodictys pelagica* เจริญได้ดีที่ pH 6 และ *Alternaria sp.* เจริญได้ดีที่ pH 6-7 (Garraway and Evans, 1984) ได้ทำการศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญเติบโตของเห็ดพวก ammonia fungi ที่เป็นซาโพรบ และเอกโตมายคอร์ไรซ่า ในอาหารเหลวที่มี pH ต่างๆพบว่า เห็ด amnonia fungi เจริญได้ดีที่ pH 7 และเมื่อนำ เห็ดซาโพรบ และ เอกโตมายคอร์ไรซ่า จำนวน 15 ชนิดมาทำการศึกษาในอาหารเหลวที่มีpH ต่างๆ พบว่า พวกห็ดซาโพรบส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ pH 7 หรือ 8 ส่วนเส้นใยเอกโตมายคอร์ไรซ่าส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ pH 5 หรือ 6 (Yamanaka, 2003) ส่วนเส้นใยบริสุทธิ์เห็ดห้า CMU 2100 เจริญได้ดีที่สุดที่ pH 4 โดยทำการทดลองในอาหารเหลวที่มีpHต่างๆซึ่งอยู่ระหว่าง pH 1–pH 9 (Sanmee, 2004) ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราเอกโตมายคอร์ไรซ่า กับ pH ที่เชื้อสามารถเจริญได้ดี สามารถนำมาใช้ในการจำแนกเห็ดได้ เห็ดในกลุ่ม Agaricales และ Aphyiiophorales ชอบ pHที่เป็นกลาง หรือ 7 ส่วนเห็ดในกลุ่ม order Sclerodermatales ชอบ pH ที่เป็นกรด (Sandari and Adholeya, 2003) สรุปดังตาราง 6

จากที่กล่าวว่า pHเป็นปัจจัยที่สำคัญที่เกี่ยวข้องในการเจริญเติบโต เห็ดพวกเอกโตมายคอร์ไรซ่า ที่ตอบสนองต่อ pH ต่างๆ ช่วยทำให้เข้าใจกฎของ pH substrate ในความสัมพันธ์ของเห็ดและพืชอาศัย (Miles and Trinci, 1983; Watkinson, 1984; Kamminga-Van Wijk ana Prins, 1989)

ตาราง 6 pH ที่เหมาะสมในการเจริญของเห็ดรา

pH	เห็ด	อ้างอิง
pH < 7	*Coriolus hirsutus*	Emelyanova (2005)
	Laccaria laccata	
	Scleroderma cepa	Sandari and Adholeya (2003)
	Pisolithes tinctorius	
	P. portentosus CMU 2100	Sanmee (2004)
pH = 7	*L. amethystine*	Sandari and Adholeya (2003)
	Amanita muscaria	
pH > 7	*Thelephora terrestris*	Sandari and Adholeya (2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ

เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งเชื้อราชนิดต่างๆ จะมีการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่างกัน เช่น *Chrysosporium pannorum* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20˚C, *Thelebolus microsporus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15˚C (Azmi and Seppelt, 1997) เส้นใยบริสุทธิ์เห็ดห้าสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 ˚C ในที่มืด เมื่อทำการทดสอบในอุณภูมิต่างๆ ดังนี้ 20, 25,30 และ 37 ˚C ในอาหาร MMN (modified Melin Norkans) ซึ่งวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเห็ดทุก 2 วัน (Sanmee, 2004) ส่วนใน *Coriolus hirsutus* ซึ่งเป็นพวก wood-rotting พบว่าเห็ดดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-36˚C (Emelyanova, 2005) เช่นเดียวกับเห็ดฟางจะเจริญได้ดีที่อุณหูมิ 35˚C เห็ดนางรม เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ30˚C ส่วนเห็ด *Agrocybe aegerita* เจริญได้ดีที่ 25 หรือ 30˚C และ เห็ดหอม สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ เท่ากับ 20 หรือ 30˚C (Zervakis *et al.,* 2001) สรุปดังตาราง 7

ตาราง 7 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเห็ดรา

อุณหภูมิ	เห็ด	อ้างอิง
11- 20 ˚C	*Chrysosporium pannorum*	
	Thelebolus microsporus	Azmi and Seppelt (1997)
	Lentinula edodes	
21- 30 ˚C	*Pleurotus eryngii*	
	Pleurotus pulmonarius	Zervakis *et al* (2001)
	Lentinula edodes	
	P. portentosus CMU2100	Sanmee (2004)
31- 40 ˚C	*Coriolus hirsutus*	Emelyanova (2005)
	Volvariella volvacea	Zervakis *et al* (2001)

นอกจากปัจจัยข้างต้นแล้วยังมีปัจจัยที่มีผลในการเจริญของเส้นใยอีกหลายด้านได้แก่ ปริมาณO_2 ปริมาณCO_2 และสารพวก non-nutrient บางชนิด (Garraway and Evans, 1984)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 การผลิตหัวเชื้อเอกโตมายคอร์ไรซ่า

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และการคัดเลือกเชื้อแล้วผลิตหัวเชื้อเอกโตมายคอร์ไรซ่าเป็นส่วนสำคัญในการศึกษาเกี่ยวกับเอกโตมายคอร์ไรซ่า (Brundrett *et al*., 1996)

2.5.1 ขั้นตอนการผลิตหัวเชื้อเอกโตมายคอร์ไรซ่า มีขั้นตอนคล้ายกับการเพาะเลี้ยงเห็ดโดยทั่วไป โดยมีขั้นตอนหลักๆ ดังนี้ (บรรณ, 2547)

1. การแยกเชื้อเห็ดให้บริสุทธิ์ โดยการนำเอาดอกเห็ดหรือ สปอร์มาเพาะให้เจริญขึ้นเป็นเส้นใย โดยในขั้นนี้จะเลี้ยงเส้นใยในอาหารวุ้น

การแยกเชื้อเห็ดสามารถทำได้ 2 วิธีคือ

- การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จากสปอร์
- การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อ โดยตัดเยื่อเยื่อของเห็ดมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นในสภาพปลอดเชื้อ

2. การผลิตหัวเชื้อเห็ด เป็นขั้นตอนที่ทำให้มีปริมาณเชื้อมากขึ้น ส่วนใหญ่มักนิยมใช้เมล็ดธัญพืช เนื่องจาก ราคาถูก ดูแลจัดการได้ง่าย

3. การผลิตหัวเชื้อในขี้เลื่อย เป็นการเพิ่มปริมาณเส้นใย โดยให้ลักษณะใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด เพื่อเป็นการส่งเสริมการออกดอกเห็ดนั่นเอง

2.5.2 ชนิดของหัวเชื้อ

1. **หัวเชื้อจากดิน**

โดยการใช้ดินที่อยู่บริเวณรากของต้นไม้ที่มีมายคอร์ไรซ่า มาเป็นหัวเชื้อในการรองก้นหลุมก่อนปลูกพืชอาศัย

2. **หัวเชื้อจากสปอร์**

หัวเชื้อแบบนี้เหมาะกับเห็ดที่มีปริมาณสปอร์มากเช่นเห็ดเผาะ เห็ดกรวด โดยการนำดอกเห็ดที่มีสปอร์แก่มาปั่นหรือบี้ แล้วนำไปรด หรือรองก้นหลุมให้กับต้นไม้

3. **หัวเชื้อจากเส้นใย**

โดยการแยกจากดอกเห็ด มาเลี้ยงในอาหารวุ้น จากนั้นขยายเชื้อในอาหารพวกธัญพืชต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.3 การผลิตหัวเชื้อโดยการใช้เมล็ดธัญพืช

การผลิตหัวเชื้อเอกโตมายคอร์ไรซ่าเป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อราให้มีปริมาณมากขึ้น เพื่อนำไปปลูกให้กับพืชอาศัยต่อไป โดยส่วนใหญ่มักนิยมขยายเชื้อในอาหารพวกธัญพืชเช่น เมล็ดข้าวไรย์ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง (Sanmee, 2004 และ Lamyong *et.al.*, 2007) ข้าวบาร์เลย์ผสมขี้เลื่อย ข้าวผสมขี้เลื่อย เป็นต้น (Ohta and Fujiwara, 2003) สรุปดังตาราง 8

ตาราง 8 อาหารธัญพืชที่นำมาใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดรา

อาหารธัญพืช	เห็ด	อ้างอิง
Sawdust + barley grain (1+1)+ water Sawdust + barley grain (1+1)+ 1/10 S solution	*Boletus* sp.	Ohta and Fujiwara (2003)
Sorghum grain Barley grain Rye grain	*P. portentosus* WPPH2	Sanmee (2004) Lamyong *et.al.* (2007)

การผลิตหัวเชื้อโดยการใช้เมล็ดธัญพืช เป็นวิธีที่นิยมกันมาก แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ เกิดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆได้ง่าย เช่นมี แบคทีเรีย แอกติโนไมซีส ยีสต์ และ เชื้อราอื่นๆติดอยู่ที่เมล็ดธัญพืช ดังนั้นต้องมีการฆ่าเชื้อเมล็ดธัญพืชให้ดีก่อน เพื่อป้องการการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว (Chang and Hayes, 1987)

ได้มีการศึกษาการเพาะเส้นใยเห็ดห้าในประเทศไทยในอาหารธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ rye grain, barley grain, sorghum grain, rubber wood sawdust และ peat – vermiculite โดยใส่เชื้อเห็ดห้าลงไปในอาหารบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และสังเกตการเจริญ เมื่อผ่านไป 1 เดือนพบว่าเส้นใยเห็ดห้าเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร sorghum grain (Sanmee, 2004 และ Lamyong *et.al.*, 2007) การทำหัวเชื้อเห็ด จีนัส*Boletus.* ในอาหารธัญพืชหลายชนิด เช่นข้าวบาร์เลย์ผสมขี้เลื่อย ข้าวผสมขี้เลื่อย ในอัตราส่วนต่างๆ และมีการเติมน้ำ และสารละลาย S solution และการวัดการเจริญของเส้นใยที่เจริญลงไปในอาหารทุก 3 วัน ปรากฏว่า เชื้อเห็ด จีนัส *Boletus.* เจริญได้ดีในข้าวบาร์เลย์ผสมขี้เลื่อย อัตราส่วน 1:1 ที่มีการเติมน้ำลงไป (Ohta and Fujiwara, 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

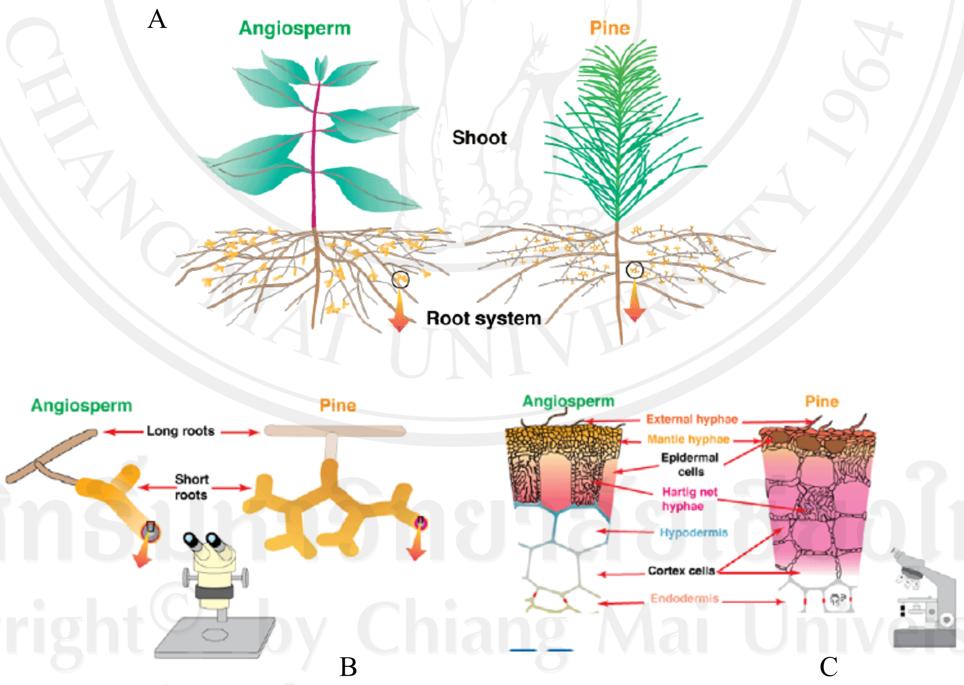
2.5.4 การปลูกเชื้อให้กับพืชอาศัย

ในการปลูกเชื้อให้กับพืชอาศัยนั้นใช้หลักการให้เชื้อเอกโตมายคอร์ไรซ่า ได้มีโอกาสเจอกับรากมากที่สุด ซึ่งการเข้ารากของเชื้อเอกโตมายคอร์ไรซ่านั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและอายุพืชของอาศัยและเชื้อเอกโตมายคอร์ไรซ่า

การเข้าไปอยู่ในรากของเชื้อราเอกโตมายคอร์ไรซ่านั้นจะช่วยให้พืชได้รับฟอสเฟตเพียงพอส่วนรากก็ช่วยให้เชื้อราเอกโตมายคอร์ไรซ่าให้ได้รับสารอาหารอย่างเพียงพอ (Smith and Read, 1997)

2.5.5 การศึกษาการเข้ารากพืชของเชื้อรา

หลังจากปลูกเชื้อเอกโตมายคอร์ไรซ่าให้กับพืชแล้ว ยังต้องมีการศึกษาการเข้ารากพืชของเชื้อรา โดยการนำรากพืชมาย้อมสีแล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Laguette *et al.*, 2000) โดยดูโครงสร้างของเชื้อราที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์พืชในชั้นคอร์เทกซ์และสังเกตการรอดชีวิตของต้นกล้าด้วยดังภาพ 15



ภาพ 15 ขั้นตอนการศึกษาเข้ารากพืชของเชื้อรา A) แสดงระบบรากของพืชชั้นสูง B) และ C) ส่องดูเข้ารากพืชของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Brundrett *et al.*, 2008)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.6 ระยะเวลาการเข้ารากของเชื้อเอกโตมายคอร์ไรซ่า

ระยะเวลาในการเข้ารากของเชื้อเอกโตมายคอร์ไรซ่านั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและอายุพืชของอาศัยและชนิดเชื้อเอกโตมายคอร์ไรซ่า

การเข้าราก *Eucalyptus grandis* และ *E. urophylla* ของเห็ด *Pisolithus* sp. ที่มีพืชอาศัยและแหล่งที่อยู่ต่างกัน จำนวน 29 ตัวอย่าง โดยทดลองภายใต้สภาวะโรงเรือน พบว่า *Pisolithus* sp. ที่เก็บจากบริเวณต้นสนสามารถเจริญเข้าราก *E. grandis* และ *E. urophylla* ได้ 0-5.2% ส่วน *Pisolithus* sp. ที่เก็บจากบริเวณต้นยูคาลิปตัสสามารถเข้าราก *E. grandis* และ *E. urophylla* ได้ ถึง 0.8-89.4 % (Pereira *et al*., 2005) ส่วนการเข้ารากของหัวเชื้อ *Lactarius* sp. ใน ต้น *Pinus pinaster* และ *P. sylvertris* ในสภาวะเรือนทดลอง พบว่าเส้นใยหัวเชื้อเห็ด *Lactarius* sp. ใช้เวลา 4 เดือนในการเข้ารากพืชทั้งสองชนิด (Parlade *et al*., 2004) การเข้าราก *Pinus densiflora* อายุ 11 สัปดาห์ของเชื้อ *Tricholoma matsutake* พบว่าเมื่อทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4สัปดาห์ เส้นใยเชื้อราสามารถเข้าไปอยู่ในเซลลพืชได้ และยังสังเกตเห็นการสร้าง Hartig net ในสัปดาห์ที่ 4 อีกด้วย (Laguette *et al*., 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved