วารสารเกษตรนเรศวร
ISSN : 0859-3027
ISSN (Online) : 2730-356X

บทความวิจัย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิดในสภาพปลอดเชื้อ

ธนภักษ์ อินยอด[1]* ธนากร ลัทธิ์ถีระสุวรรณ[2] ขนิษฐา ชวนะนรเศรษฐ์[1] ธนภัทร เติมอารมย์[1] ชาตรี กอนี[1] สุริมา ญาติโสม[1] สุจิตรา บัวลอย[1] และ ปิยะดา เอี่ยมประสงค์[1]

[1]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) 35 หมู่ 3 อ. คลองหลวง จ.ปทุมธานี
[2]มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ อ.ร้องกวาง จ.แพร่ 54140
*Corresponding author: Tanapuk@tistr.or.th
(Received March 9, 2021; Revised May 18, 2021; Accepted June 5, 2021)

บทคัดย่อ

เห็ดตับเต่า (*Phlebopus portentosus*) และเห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*) เป็นเห็ดป่าเอตโตไมคอร์ไรซาที่เกิดตามธรรมชาติ นิยมนำมาบริโภคอย่างแพร่หลายและมีราคาสูง เนื่องจากพบเฉพาะช่วงฤดูฝน และยังไม่สามารถนำมาเพาะในระบบโรงเรือนเหมือนเห็ดเศรษฐกิจทั่วไปได้ งานวิจัยนี้จึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดตับเต่า และเห็ดเผาะ โดยการทดสอบชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 ชนิด ได้แก่ Potato Dextose Agar (PDA), Potato Glucose Agar (PGA), Modified Potato Glucose Agar (mPGA), Malt Agar (MA), Malt Extract Agar (MEA), Modified Melin-Norkran Medium (MMN), Oat Agar (OA), Yeast Extract Agar (YEA) และ Potato Carrot Agar (PCA) ภายใต้ระดับอุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเส้นใยของเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง PCA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.220±0.05 และ 0.298±0.06 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ ลักษณะเส้นใยหนาและเจริญได้อย่างต่อเนื่อง เมื่อนำเส้นใยเห็ดทั้ง2 ชนิด มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารชนิดเหลว คือ PCB, PGB และ MMN ที่ระดับความเป็นกรด- ด่าง 5 ระดับ ได้แก่ pH 5, 6, 7, 8 และ 9 พบว่า เส้นใยเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCB และ PGB ที่ระดับ pH 6 โดยมีปริมาณมวลชีวภาพเท่ากับ 0.514±0.011 และ 0.226±0.003 กรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งการศึกษานี้เป็นขั้นตอนแรกในการเพิ่มปริมาณเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา สำหรับปลูกถ่ายเชื้อลงในพืชอาศัย เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสให้สามารถสร้างดอกเห็ดในสวนป่าชุมชนในอนาคต

คำสำคัญ: เห็ดตับเต่า, เห็ดเผาะ, เอคโตไมคอร์ไรซา, สภาวะการเจริญ

NARESUAN AGRICULTURE JOURNAL
ISSN : 0859-3027
ISSN (Online) : 2730-356X

Research Article

The Study of Optimum Growth Condition in Some Ectomycorrhizal Mushroom In Vitro

Tanapak Inyod[1]*, Thanakorn Lattirasuvan[2], Khanitha Chawananorasest[1], Thanapat Toemarrom[1], Chatree Konee[1], Surima Yatsom[1], Suchitra Bualoi[1] and Piyada Eamprasong[1]

[1]Thailand institute of Scientific and Technological Research (TISTR). 35 Mu 3, Amphoe Khlong Luang, Pathum Thani
[2]Maejo University Phrae Campus. Rong Kwang, Phrae, 54140
*Corresponding author: Tanapuk@tistr.or.th
(Received March 9, 2021; Revised May 18, 2021; Accepted June 5, 2021)

Abstract

Phlebopus portentosus and *Astraeus odoratus* were ectomycorrhiza fungi found in natural forests. They became the most popular consumer and found expensive wild edible mushrooms since they were rarely grown only on rainy season and were unable to be cultivated normally in the mushroom green house. For this reason, in this study of suitable growth conditions of *P. portentosus* and *A. odoratus* were cultivated on 9 cultures medium including Potato Dextose Agar (PDA), Potato Glucose Agar (PGA), Modified Potato Glucose Agar (mPGA), Malt Agar (MA), Malt Extract Agar (MEA), Modified Melin-Norkran Medium (MMN), Oat Agar (OA), Yeast Extract Agar (YEA) and Potato Carrot Agar (PCA), incubated at 20, 25, 30 and 35 °C. They were exhibited significantly different ($P \leq 0.05$) between *P. portentosus* and *A. odoratus* with the highest growth rate mycelia of 0.220±0.05 and 0.298±0.06 cm./day, respectively on PCA medium, at 25 °C. Thereafter, they were cultured on the liquid medium of PCB, PGB and MMN broth in different pH values (pH 5, 6, 7, 8, 9), they were found continuosly growing with thick rhizomorph mycelium. Moreover, the best growth rate of *P. portentosus* was found in PCB while that rate of *A. odoratus* found in PGB, at pH 6 with the biomass content of 0.514±0.011 g /100 ml and 0.226±0.003 g /100 ml, respectively. This research presents the first important steps in increasing of ectomycorrhizal mushrooms for inoculatation in host plants and this will lead to the number of future success for social and communities in forest plantations.

Keywords: *Phlebopus portentosus*, *Astraeus odoratus*, Ectomycorrhiza, Growth condition

บทนำ

การศึกษาวิจัยเห็ดป่าไมคอร์ไรซาเป็นการอนุรักษ์ทรัพยากรชีวภาพ รวมทั้งการนำเชื้อเห็ดสายพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์สำหรับพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนร่วมกับการฟื้นฟูพื้นที่ป่าไม้ต่อไปในอนาคตนั้น โดยเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซานอกจากจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าไม้แล้ว ยังสามารถสร้างดอกเห็ดที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ และหลายชนิดสามารถนำมาประกอบเป็นอาหารได้ เช่น เห็ดตับเต่า (*P. portentosus* (Berk. and Broome) Boedijn), เห็ดเผาะ (*A. odoratus* C. Phosri, R.Watling, M.P. Martin and A.J.S. Whalley) , เห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps* Corner and Bas.), เห็ดระโงกเหลือง (*A. hemibapha* (Berk. and Broome) Sacc.) และเห็ดตะไคลเขียว (*Russula virescens* (Schaeff.) Fr.) เป็นต้น ในปัจจุบันนี้จึงเป็นที่ยอมรับกันว่า เห็ดเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีคุณภาพ ราคาถูก มีกลิ่นและรสชาติดี ดอกเห็ดบางชนิดยังมีคุณค่าสำคัญทางยา (สุรางค์ และคณะ, 2554; สุรชัย และคณะ, 2560) ในประเทศไทยพบเห็ดไมคอร์ไรซาอยู่ร่วมกับไม้ยืนต้น ดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยเกื้อกูลกัน (symbiosis) ในระบบนิเวศป่าเต็งรัง ได้แก่ ไม้เต็ง (*Shorea obtusa* Wall.), รัง (*S. siamensis* Miq.), เหียง (*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. ex Miq.), พลวง (*Dipterocarpus tuberculatus* Roxb.), และมะค่าโมง (*Afzelia xylocarpa* Craib.) (สมจิตร, 2549; Chalermpongse, 1992)

ลักษณะทั่วไปของเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) คือ เห็ดราที่อาศัยอยู่บริเวณเซลล์ภายนอกของผิวรากพืช โดยเส้นใยประสานจับตัวกันแน่น หนาประมาณ 20-40 ไมโครเมตร ปกคลุมผิวรากคล้ายรากฝอยเรียกว่าแผ่นแมนเทิล (mantle sheath) เส้นใยบางส่วนของแมนเทิลจะเจริญบนเซลล์พื้นผิว (epidermis) ประสานกันเป็นกลุ่มของเส้นใยคล้ายร่างแห (rhizomorph) มีสีต่างกัน เช่น สีขาว สีทอง สีเหลือง สีน้ำตาล สีแดง สีดำ (Brundrett et al., 2006) ช่วยดูดซับน้ำและธาตุอาหารให้แก่พืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุฟอสฟอรัส ในขณะที่รากพืชจะปลดปล่อยอินทรีย์สาร เช่น คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และกรดอะมิโนให้กับเห็ดรา ลักษณะดังกล่าวนี้จึงเป็นเสมือนกลไกสำคัญในการมีชีวิตอยู่รอดทั้งเห็ดและพืช ทำให้พืชสามารถเจริญได้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ (Kumar, 1988; Nopamornbodi, 1955)

เห็ดตับเต่า และเห็ดเผาะเป็นเห็ดป่าไมคอร์ไรซาที่เกิดตามธรรมชาติ ไม่สามารถนำมาขยายเลี้ยงในระบบโรงเรือนเหมือนเห็ดเศรษฐกิจทั่วไป โดยเฉพาะการเลี้ยงเส้นใยให้บริสุทธิ์ในสภาพปลอดเชื้อ สารอาหารที่เพาะเลี้ยงเป็นสิ่งจำเป็นในการเจริญของเส้นใย ทั้งสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ โดยทั่วไปเชื้อไมคอร์ไรซาสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และเซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญต่อการเจริญของไมคอร์ไรซานั้นจะอยู่ในรูปของอนินทรีย์ไนโตรเจน (France & Reid, 1982; Harley & Smith, 1983; Ek et al., 1994)

ดังนั้นในการเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ดป่าเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมหลายประการ เช่น อุณหภูมิ, ความชื้น, ความเป็นกรด-ด่าง, สารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น (Bilay et al., 2000) ซึ่งเป็นปัจจัยที่เชื้อใช้ในการเจริญเติบโต และต้องมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเส้นใย โดยทำให้เส้นใยมีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว คุณภาพดี และใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้นลง จุดประสงค์ของงานวิจัยฉบับนี้จึงศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดตับเต่า และเห็ดเผาะ บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ และทดสอบสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและเพิ่มปริมาณเส้นใย (biomass) สำหรับใช้ปลูกถ่ายเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาลงในพืชอาศัย เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสให้สามารถสร้างดอกเห็ดในสวนป่าชุมชนได้ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างเห็ดที่นำมาศึกษา

เก็บตัวอย่างเห็ดเผาะในพื้นที่ป่าชุมชนบ้านบุญแจ่ม ตำบลน้ำเลา อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่ และตัวอย่างเห็ดตับเต่าจาก ตำบลคลองห้า อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี การคัดเลือกดอกเห็ดสำหรับนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยเลือกดอกที่มีลักษณะที่ดี ดอกเห็ดสมบูรณ์ หมวกดอกกลม ขอบเรียบ อายุไม่แก่และไม่อ่อนเกินไป ก้านดอกแข็งแรง มีสีตรงตามที่ต้องการ และไม่มีแมลงหรือเชื้ออื่นติดมา (Figure 1)

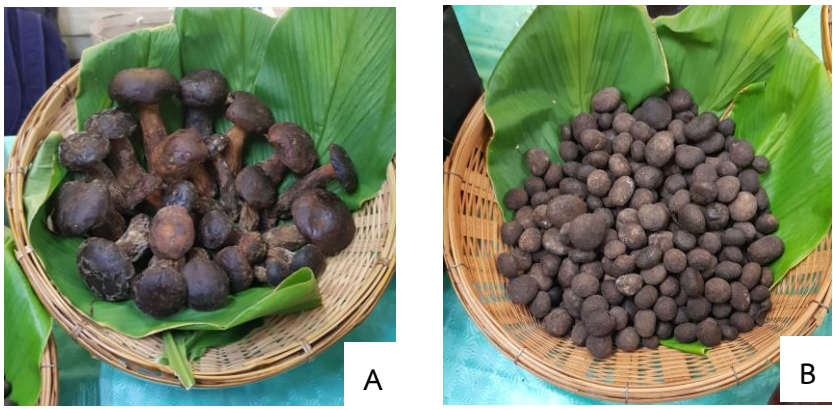

Figure 1 Fruiting body of *P. portentosus* (A) and *A. odoratus* (B) were collected form Klong Ha Subdistrict, Pathum Thani and Ban Boonjam community, Phrae Province, respectively.

การศึกษาชนิดของอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา

การเลี้ยงเชื้อเห็ดตับเต่า และเห็ดเผาะ บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เพื่อศึกษาอัตราการเจริญของเส้นใย และคัดเลือกชนิดอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเชื้อเพื่อนำเส้นใยไปใช้ประโยชน์ต่อไปนั้น การทดลองได้ดำเนินการเลี้ยงเชื้อเห็ดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 9x1.5 เซนติเมตร โดยชนิดอาหารแข็งที่ทดสอบมี 9 ชนิด ได้แก่ Potato Dextose Agar (PDA) (Difco™, France), Potato Glucose Agar (PGA) (Difco™, France), Modified Potato Glucose Agar (mPGA; PGA+ 0.5% Malt Extract) (Difco™, France), Malt Agar (MA) (Himedia, India), Malt Extract Agar (MEA) (Difco™, France), Modified Melin-Norkrans Medium (MMN) (Molina & Palmer, 1982), Oat Agar (OA) (Himedia, India), Yeast Extract Agar (YEA) (Himedia, India) และ Potato Carrot Agar (PCA) (Himedia, India) วัดการเจริญของเส้นใย (เซนติเมตร) บนอาหารแต่ละชนิดในแนวรัศมีทุก 7 วัน จนเส้นใยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS version 9.1 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ประกอบด้วย 9 ทรีตเมนต์ 3 ซ้ำต่อทรีตเมนต์ โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเอคโตไมคอร์ไรซา

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะ โดยคัดเลือกสูตรอาหารที่เส้นใยเจริญได้ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 จากนั้นนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทใส่จานเพาะเลี้ยงปริมาตร 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น นำ

cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะบริเวณรัศมีรอบนอกของเส้นใยแม่เชื้อ ใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นจำนวน 1 ชิ้น วางลงบนอาหารที่เตรียมไว้ เลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 20, 25, 30 และ35 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของเส้นใย (เซนติเมตร) บนอาหารแต่ละชนิดในแนวรัศมีทุก 7 วัน วางแผนการทดลอง*แบบสุ่ม*แบ*บสมบูรณ์* (completely randomized design, CRD) ประกอบด้วย 4 ทรีตเมนต์ 5 ซ้ำต่อทรีตเมนต์ วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS version 9.1 โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบสภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเอคโคไมคอร์ไรซา

จากการทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะบนอาหารแข็ง พบว่าเส้นใยเห็ดสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ PCA, PGA และ MMN ดังนั้นจึงได้นำอาหารดังกล่าวมาใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อเห็ดในรูปแบบของอาหารเหลว คือ Potato Carrot Broth (PCB), Potato Glucose Broth (PGB) และ Modified Melin-Norkrans medium (MMN Broth) พร้อมทั้งศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเหลวที่เหมาะสมในการเลี้ยงเส้นใยเห็ด โดยมีระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ทดสอบจำนวน 5 ระดับ ได้แก่ pH 5, 6, 7, 8 และ 9 นำ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะบริเวณรัศมีรอบนอกของเส้นใยบนจานอาหาร ใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นจำนวน 3 ชิ้นต่อขวด ใส่ลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลนปากขวด ปิดด้วยจุกสำลีและหุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเห็ดตับเต่าเป็นเวลา 10 วัน และเห็ดเผาะเป็นเวลา 20 วัน ทำการตรวจวัดปริมาณมวลชีวภาพ (biomass) โดยนำอาหารเหลวที่มีเส้นใยเห็ดมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ด้วยระบบปั๊มสุญญากาศ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง รอจนกระทั่งกระดาษกรองไม่มีน้ำหยด นำเส้นใยที่ผ่านการกรองมาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกข้อมูลน้ำหนักแห้งของเส้นใย นำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS version 9.1 โดยวางแผนการทดลอง*แบบสุ่ม*แบ*บสมบูรณ์* (completely randomized design, CRD) ประกอบด้วย 3 ทรีตเมนต์ 5 ซ้ำต่อทรีตเมนต์ โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

ผลและวิจารณ์

ผลการทดสอบชนิดของอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา

จากการทดสอบการเจริญของเส้นใยเห็ดตับเต่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 ชนิด ได้แก่ PDA, PGA, mPGA, MA, MEA, MMN, Oat, YEA และ PCA พบว่าเส้นใยเห็ดตับเต่าสามารถเจริญได้ที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ PGA (Figure 2) ในทางสถิติไม่มีความแตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.253±0.020 และ 0.249±0.020 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Nguyen et al. (2017) ได้ทำการศึกษาแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดป่าในประเทศเวียดนาม พบว่าเห็ดป่าทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ *Phlebia* sp., *Ganoderma* sp., *Tricholoma* sp., *Polyporus* sp., *Panus* sp., *Pleurotus* sp., และ *Phlebopus* sp. สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PGA ลักษณะเส้นใยมีความหนาและเส้นใยเห็ดเจริญได้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากการทดลองยังพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เส้นใยเจริญได้ดีรองลงมา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ได้แก่อาหาร MMN และ MA มีอัตราการเจริญของเส้นใยเฉลี่ยเท่ากับ 0.237±0.040 และ 0.223±0.030 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ โดยเส้นใยมีลักษณะหนา สีขาวขุ่น ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ YEA เห็ดตับเต่าเจริญได้ช้าที่สุด เท่ากับ 0.096±0.020 เซนติเมตรต่อวัน ลักษณะเส้นใยบางสีขาว ไม่สามารถเจริญต่อได้เต็มจานเพาะเลี้ยง และแห้งตายในที่สุด (Table 1, Figure 4A) สอดคล้องกับงานวิจัยของ นัยนา (2545) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์เห็ดป่าทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ เห็ดตะไคลเขียว เห็ดครก เห็ดตับเต่า เห็ดเผาะ เห็ดระโงกขาว และเห็ดไผ่ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN และ PDA เส้นใยของเห็ดตับเต่าสามารถเจริญได้ดีที่สุด

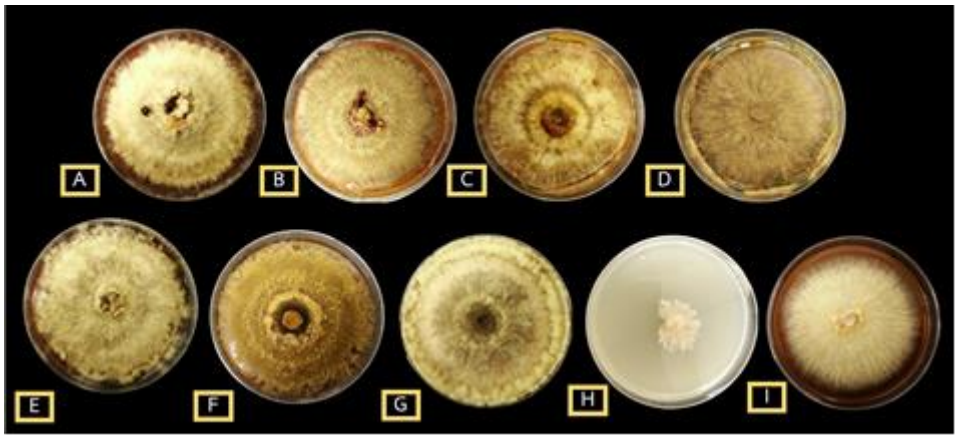

Figure 2 Morphology of *P. portentosus* mycelium on different culture media at 25 ^{0}C for 28 days; A = PDA, B = PGA, C = mPGA, D = MMN, E = MA, F = MEA, G = OA, H = YEA, I = PCA.

ส่วนผลการทดสอบการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 ชนิด พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (Figure 3) โดยเส้นใยของเห็ดเผาะสามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA มีอัตราการเจริญเฉลี่ย 0.411 ±0.060 เซนติเมตรต่อวัน รองลงมาคืออาหาร MMN และ PGA เส้นใยเจริญเท่ากับ 0.200±0.040 และ 0.193±0.040 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ และพบว่าสามารถเจริญได้เกือบทุกชนิดอาหาร ยกเว้นอาหารเลี้ยงเชื้อ YEA เส้นใยมีการเจริญน้อยที่สุดเท่ากับ 0.063 ±0.020 เซนติเมตรต่อวัน (Table 1, Figure 4B) จากการทดลองเส้นใยเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะให้ผลการเจริญของเส้นใยไปแนวทางเดียวกันคืออาหาร PCA และ PGA มีอัตราการเจริญของเส้นใยดีที่สุด เนื่องจากมีสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุ โดยในอาหารทั้ง 2 ชนิด มีองค์ประกอบของน้ำตาลเดกซ์โทรส และมันฝรั่ง เป็นแหล่งคาร์บอนที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด สอดคล้องกับ พุทธ์สวัสดิ์ และคณะ (2559) พบว่าน้ำตาลเดกซ์โทรส มีผลต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ด ทำให้เส้นใยเห็ดยานางมีน้ำหนักแห้งมากที่สุด และสอดคล้องกับงานวิจัยของ วสันณ์ และผลิวัลย์ (2542) พบว่ากลูโคสและแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับเลี้ยงเห็ดหนังกลอง (*Macrolepiota garcilenta* (Krombh.) Moser) นอกจากนี้มีรายงานว่า แครอทที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร PCA มีสารอะมิโน แอซิด เช่น อาร์จีนีน (arginine), อะลานีน (alanine), ไกลซีน (glycine), เมไทโอนีน (methionine) และ ทริปโตเฟน (tryptophan) (Hinako et al., 2019) เป็นแหล่งไนโตรเจน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Das et al. (2015) ที่ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันต่อปริมาณมวลชีวภาพของเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* Mont.) พบว่าอาหารที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบส่งผลให้ปริมาณมวลชีวภาพของเห็ดขอนขาวเพิ่มขึ้นจาก 0.34±0.04 เป็น 0.90±0.63 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบ

กับชุดควบคุม ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ YEA เส้นใยมีการเจริญต่ำที่สุดเนื่องจากไม่มีสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของเส้นใย

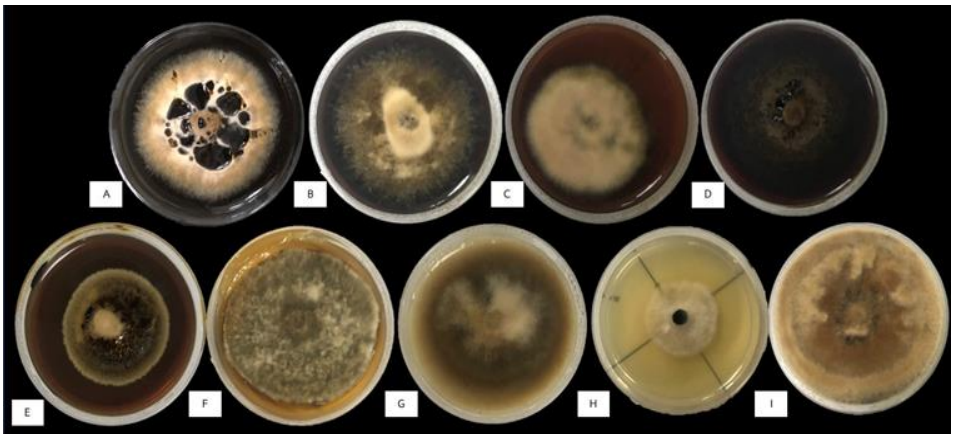

Figure 3 Morphology of *A. odoratus* mycelium on different culture media at 25 ^{0}C for 45 days; A = PDA, B = PGA, C = mPGA, D = MMN, E = MA, F = MEA, G = OA, H = YEA, I = PCA

Table 1 Mycelium growth rate (cm/day) of *P. portentosus* and *A. odoratus* on different culture mediums.

mediums	Mycelium growth (cm/day)	
	P. portentosus	*A. odoratus*
PDA	0.211±0.020^{b}	0.113±0.020^{cd}
PGA	0.249±0.020^{a}	0.193±0.040^{b}
mPGA	0.204±0.030^{b}	0.086±0.010^{cd}
MMN	0.237±0.040^{ab}	0.200±0.040^{b}
MA	0.223±0.030^{ab}	0.090±0.020^{cd}
MEA	0.147±0.030^{c}	0.126±0.030^{c}
OA	0.208±0.040^{b}	0.133±0.040^{c}
YEA	0.096±0.020^{d}	0.063±0.020^{d}
PCA	0.253±0.020^{a}	0.411±0.060^{a}
%CV	**	**
F-test	10.56	20.51

Note: Numbers followed by the same letter in vertical do not significantly different from each other at 95% by DMRT test.

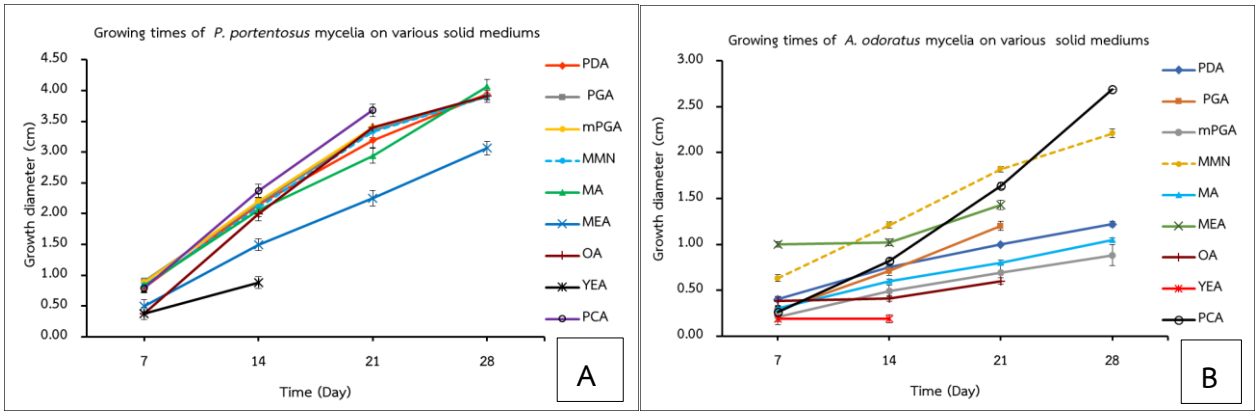

Figure 4 Growing times of ectomycorrhiza mycelium (cm/days) on 9 different culture mediums (A) *P. portentosus* and (B) *A. odoratus.*

ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อปริมาณเส้นใยเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Carrot Agar (PCA) ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 4 ระดับ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เส้นใยของเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะสามารถเจริญได้ในทุกอุณหภูมิ แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เส้นใยเจริญดีที่สุด มีลักษณะหนา เจริญขึ้นตามแนวรัศมีบนผิวหน้าของอาหาร (Figure 5A, B) โดยมีระยะเวลาการเจริญของเส้นใยดังแสดงใน Figure 6A, B โดยเส้นใยเห็ดตับเต่าสามารถเจริญได้ดีที่สุดมีอัตราการเจริญเฉลี่ยเท่ากับ 0.222±0.05 เซนติเมตรต่อวัน รองลงมาคือ อุณหภูมิ 30, 35 และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีอัตราการเจริญของเส้นใยเฉลี่ยเท่ากับ 0.163±0.04, 0.118±0.03 และ 0.090±0.02 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ (Figure 7A) ส่วนเส้นใยของเห็ดเผาะมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.298±0.06 เซนติเมตรต่อวัน รองลงมาคือ อุณหภูมิ 35, 30 และ 20 องศาเซลเซียส เฉลี่ยเท่ากับ 0.180±0.04, 0.155±0.03 และ 0.090±0.02 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ (Figure 7B) จากการทดลองเลี้ยงเส้นใยเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจากเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะสามารถพบได้ในธรรมชาติช่วงต้นฤดูฝน โดยมีอุณหภูมิผิวดินเฉลี่ย 27 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิใต้ดินเฉลี่ย 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย (วัชรี และคณะ, 2553) สอดคล้องกับงานวิจัยของจารุณี และศุลิเชษฐ์ (2556) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดตับเต่า 8 สายพันธุ์ และเห็ดเผาะ 2 สายพันธุ์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเส้นใยของเห็ดทั้ง 2 ชนิด สามารถเจริญดีที่สุด ในระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และรายงานของ วัชรี (2556) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะ (*A. hygrometricus* Morgan) บนอาหารแข็งวุ้นและอาหารแข็งเมล็ดธัญพืช ที่ระดับอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเลี้ยงเส้นใยเห็ดเผาะมากที่สุด ในขณะที่ Kumla et al. (2020) พบว่าการเจริญของเส้นใยเห็ดตับเต่า (*P. spongiosus*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ L-MMN ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เส้นใยมีการเจริญเติบโตดีที่สุด

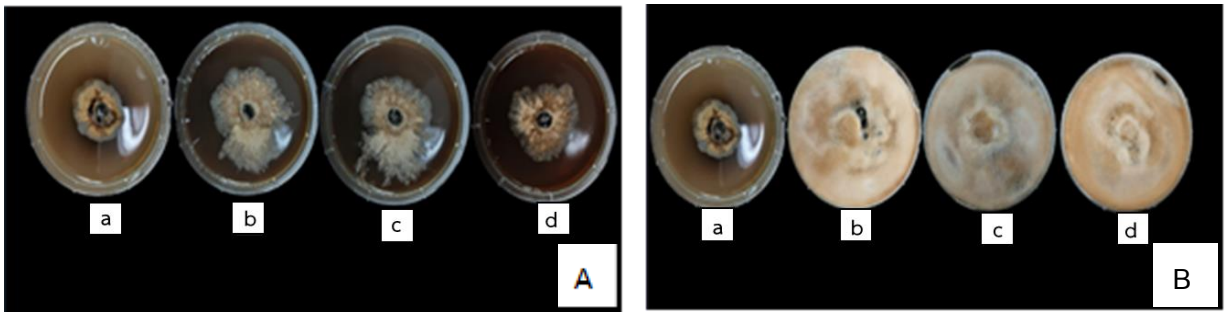

Figure 5 Mycelium morphology of *P. portentosus* for 21 days (A) and *A. odoratus* for 45 days (B) on PCA media at different temperature; a= 20 °C, b= 25 °C, c= 30 °C and d= 35 °C.

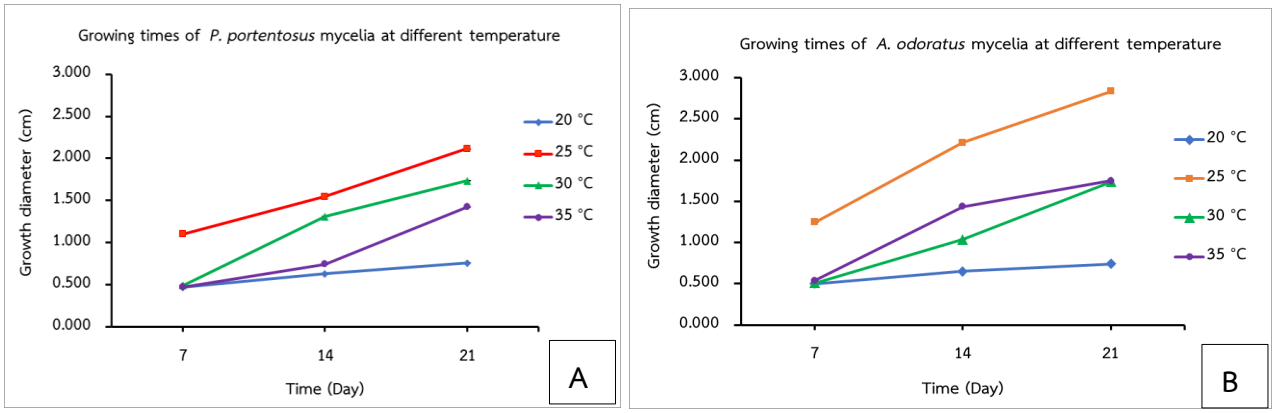

Figure 6 Growing times of ectomycorrhiza mycelium (cm/day) on PCA media at different temperatures; (A) *P. portentosus* and (B) *A. odoratus*.

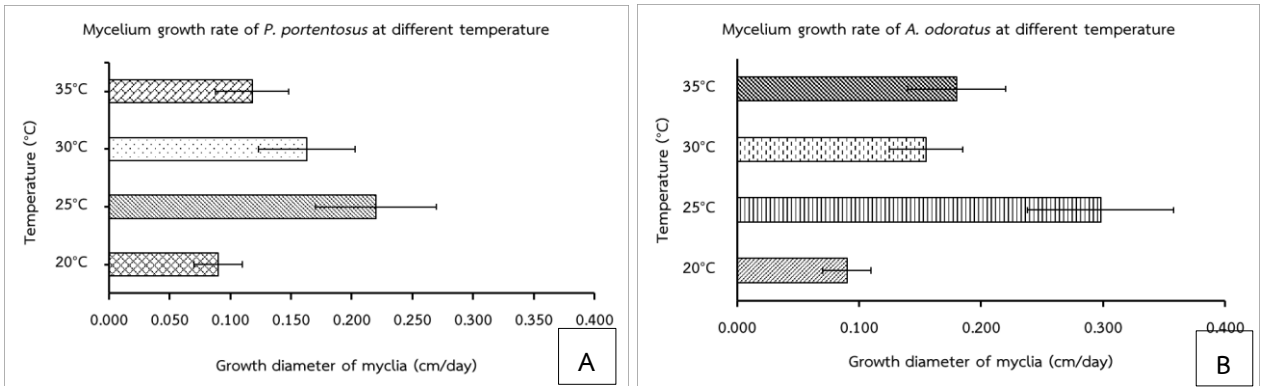

Figure 7 Mycelium growth rate of ectomycorrhiza (cm/day) on PCA media at different temperatures; (A) *P. portentosus* and (B) *A. odoratus*.

ผลการทดสอบสภาพความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา

จากการทดสอบระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว PCB, PGB และ MMN ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเส้นใยเห็ดตับเต่าสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCB ที่ระดับ pH 6 มีปริมาณมวลชีวภาพ (biomass) ของเส้นใยเฉลี่ย 0.514±0.011 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อ PGB ที่ระดับ pH 8 และอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ที่ระดับ pH 6 ให้ปริมาณเส้นใยของเห็ดเฉลี่ย 0.404±0.007 และ 0.190±0.017

กรัมต่อ100 มิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 8) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kibar & Peksen (2011) ศึกษาการเจริญของเส้นใยในเห็ด *Lactarius pyrogalus* และ *L. controversus* พบว่าที่ระดับ pH 5.5-6.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลการเจริญของเส้นใยดีที่สุด และรายงานของ Nhi et al. (2017) พบว่าที่ระดับ pH 4-6 เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดตับเต่า (*P. spongiosus*) ในประเทศเวียดนาม แตกต่างจากงานวิจัยของ Kumla et al. (2011) ศึกษาสูตรอาหารและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) พบว่าที่ระดับ pH 4 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญของของเส้นใยเห็ดตับเต่ามากที่สุด

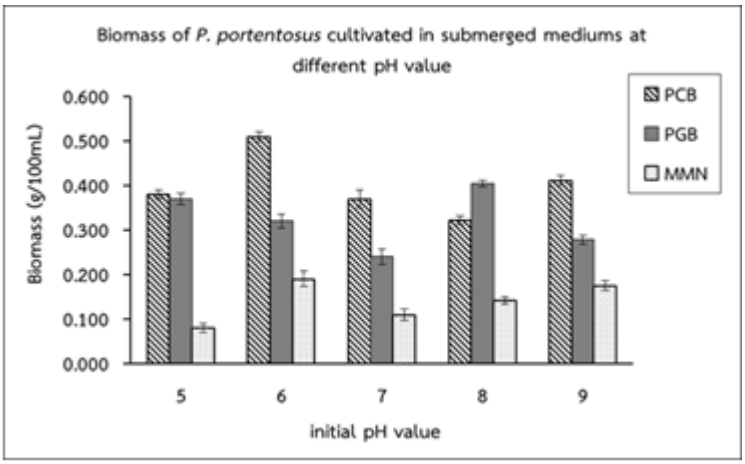

Figure 8 Biomass of *P. portentosus* cultivated in submerged mediums: PCB, PGB and MMN at different pH value for 10 days

ส่วนผลการเลี้ยงเส้นใยเห็ดเผาะ พบว่าเส้นใยเห็ดสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ PGB ที่ระดับ pH 6 โดยมีปริมาณมวลชีวภาพของเส้นใยเห็ด 0.226±0.003 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร รองลงมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCB ที่ระดับ pH 7 มีปริมาณมวลชีวภาพของเส้นใยเฉลี่ย 0.050±0.002 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร (Figure 9) สอดคล้องกับรายงานของ Suwannasai et al. (2020) ศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะ (*A. sirindhorniae*) พบว่าที่ระดับ pH 6 มีปริมาณเส้นใยมากที่สุด 45.7±2.2 mg และสอดคล้องกับ วัชรี และคณะ (2553) ศึกษาการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพ ในพื้นที่บ้านสะลวง อำเภอแม่แตง และอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ อาหารที่มีค่า pH 5 - 6 เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะมากที่สุด นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคสในระดับ pH 5.8-6.5 เหมาะสมในการเลี้ยงเห็ด *Lactarius deliciosus,* และ*Russula sanguinaria* (Lazarevic et al., 2016) จากการทดลองพบว่าเส้นใยเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะสามารถเจริญได้ดีที่ระดับ pH 6 ซึ่งเป็นระดับ pH ใกล้เคียงกับสภาพ pH ของดินในธรรมชาติที่มีความเป็นกรดอ่อนถึงกลาง (กรมพัฒนาที่ดิน, 2551) สอดคล้องกับพิทักษ์ (2557) ทำการศึกษาความหลากหลายของเห็ดในป่าดิบแล้ง เขตอุทยานแห่งชาติภูพาน จังหวัดสกลนคร พบว่าอัตราการเกิดของเห็ดในป่าดิบแล้ง พบมากสุดในบริเวณที่ดินมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5-6.5 เช่นเดียวกันกับรายงานของ ลีลา และอภิชัย (2552) ที่ได้ทำการวิจัยเห็ดโคนกับปลวกและการเพาะเลี้ยงเห็ดโคน โดยพบว่าบริเวณที่พบเห็ดโคน ดินมีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ที่ 6.2-6.5

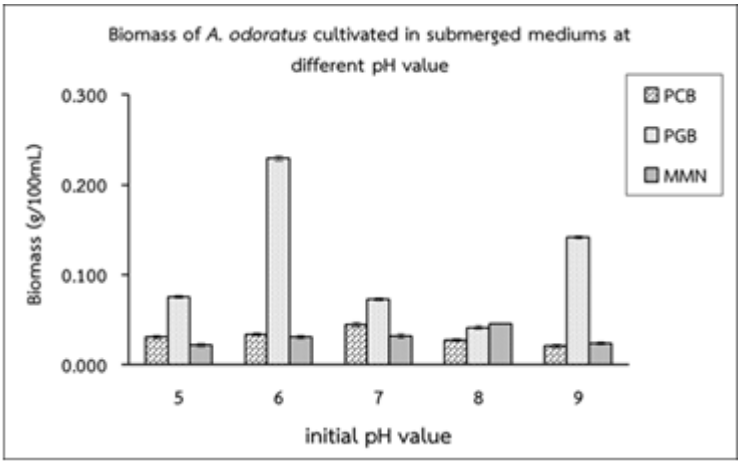

Figure 9 Biomass of *A. odoratus* cultivated in submerged mediums:PCB, PGB and MMN at different pH value for 20 days.

สรุป

การศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดตับเต่า (*P. portentosus*) และเห็ดเผาะ (*A. odoratus*) โดยเลี้ยงเส้นใยบนอาหารแข็งและอาหารเหลวชนิดต่างๆ ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน เพื่อคัดเลือกชนิดของอาหารและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม พบว่าเส้นใยของเห็ดตับเต่าและเห็ดเผาะสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Potato Carrot Agar (PCA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.220±0.05 และ 0.298±0.06 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ โดยเส้นใยของเห็ดสามารถเจริญได้อย่างต่อเนื่องและมีลักษณะเส้นใยหนา และเมื่อนำเชื้อเห็ดทั้ง 2 ชนิด มาเลี้ยงเพิ่มขยายปริมาณในอาหารเหลว เส้นใยเห็ดตับเต่าเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCB ที่ระดับ pH 6 ส่วนเส้นใยเห็ดเผาะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ PGB ที่ระดับ pH 6 โดยมีปริมาณมวลชีวภาพเท่ากับ 0.514±0.011 กรัม/100 มิลลิลิตร และ 0.226±0.003 กรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ การทดลองดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อเห็ดป่าให้ได้ปริมาณและคุณภาพ เพื่อนำเส้นใยเห็ดใส่ลงในกล้าไม้พืชอาศัยสำหรับปลูกป่า ปลูกเห็ด เป็นแหล่งอาหารให้กับชุมชนอย่างยั่งยืนในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก.) ในการสนับสนุนทุนวิจัย ในการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเห็ดไมคอร์ไรซา (เห็ดตับเต่า เห็ดเผาะ) เพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจชุมชนอย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. (2551). *ลักษณะและสมบัติของชุดดิน.* สืบค้น 25 พฤษภาคม 2564, จาก http : //www. ldd. go. th/thaisoils-museum/pldesc/centravKs.htm

จารุณี ภิลุมวงค์, และศุลิเชษฐ์. (2556). *โครงการวิจัยและพัฒนาเห็ดท้องถิ่นเพื่อเป็นแหล่งอาหารและรายได้สำหรับชุมชนในที่สูง* (รายงานฉบับสมบูรณ์). เชียงใหม่: สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน).

พิทักษ์ วงษ์ชาลี. (2557). *ความหลากหลายของเห็ดในป่าดิบแล้ง* (พิมพ์ครั้งที่ 1). สกลนคร: มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร.

พุทธ์สวัสดิ์ พันทะวง, ยุวดี ชูประภาวรรณ, บุญส่ง เอกพงษ์, และบุบผา ใจเที่ยง. (2559). ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดยานางิ. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*, 3(9), 125-131.

นัยนา ทองเจียม. (2545). การเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์เห็ดป่ากินได้ในสูตรอาหารชนิดต่างๆ. ใน สำนักวิชาการป่าไม้ (บ.ก.), *รายงานการประชุมวิชาการไม้ป่า ประจำปี 2545* (น. 177-185). กรุงเทพฯ: สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

ลีลา กญิกนัน, และอภิชัย หมู่ก้อน. (2552). *เห็ดโคนกับปลวกและการเพาะเลี้ยงเห็ดโคน* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้.

วัชรี หาญเมืองใจ. (2556). ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเผาะ (*Astreaus hygrometricus* Morgan) บนอาหารแข็งวุ้นและอาหารแข็งเมล็ดธัญบุรี. *วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 22(3), 93-101.

วัชรี หาญเมืองใจ, ประเสริฐ หาญเมืองใจ, และอัครสิทธิ์ บุญส่งแท้. (2553). *การอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ความหลากหลายของเห็ดป่า ในพื้นที่สะลวง อำเภอแม่แตง และอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ (ปีที่ 2).* เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

วสันณ์ เพชรรัตน์, และผลิวัลย์ ขุนทอง. 2542. การเพาะเห็ดป่า VII เห็ดหนังกลอง (*Macrolepiota gracilenta* (Krombh.). *วารสารวิทยาศาสตร์สงขลานครินทร*, 21, 33-39.

สมจิตร อยู่เป็นสุข. (2549). *ไมคอร์ไรซา* (พิมพ์ครั้งที่ 1). เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรชัย รัตนสุข, เพ็ญนภา ชูศรีเมือง, และรุจิเรข บุญกาพิมพ์. (2560). ความหลากหลายระดับชนิดพันธุ์ของเห็ดกินได้ในป่ามหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด. *การเกษตรราชภัฏ*, 16(2), 27-32.

สุรางค์ เธียรหิรัญ, สุกัญญานี แชประเสริฐ, วีรณา สมพีร์วงศ์, และนิรดา แป้นนางรอง. (2554). *ความหลากหลายของเห็ดราในพื้นที่ป่าภาคเหนือ* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักงานความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ กรมป่าไม้.

Bilay, V. T., Solomko, E. F., & Buchalo, A. S. (2000). Growth of edible and medicinal mushrooms on commercial agar media. In Griensven, V. (ed.), *Science and cultivation of edible fungi* (pp. 779-782). Rotterdam: Balkema.

Brundrett, M. C., (2006). Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. *Soil Biology journal*, 38(9), 281-298.

Chalermpongse, A. (1992). Biodiversity of Ectomycorrhizal Fungi in the Dipterocarp Forest of Thailand. In *Bio – Refor Tsukuba Workshop* (pp. 143-145). Tsukuba: Tsukuba University.

Das, A. R., Brothakur, M., Saha, A. K., Joshi, S. R., & Das, P. (2015). Growth of mycelial biomass and fruit body cultivation of *Lentinus squarrosulus* collected from home garden of Tripura in Northeast India. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 3(4), 17-19.

Ek, H., Anderson, S., Arnebrant, K., & Soderstrom, B. (1994). Growth and assimilation of NH4+ and No3- by *Paxillus involutus* in association with *Betula pendula* and *Picea abies* as affected by substrate pH. *New Phytologist Journal*, 128, 629-637.

France, R. C., & Reid, C. P. P. (1982). Interaction of nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhiza. *Canadian Journal of Botany*, 61, 964-984.

Harley, J. L., & Smith, S. E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic Press.

Hinako, I., Hiroe, K., & Hiroshi, U. (2019). Effects of methods on free amino acid contents in vegetables. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 65, 264-271.

Kibar, B., & Peksen, R. (2011). Mycelial growth requirements of *Lactarius pyrogalus* and *Lactarius controversus*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(28), 5107-5114.

Kumar, D. (1988). Mycorrhizae; A complete system for nutrient mobilization and cycling. In A. Mahadevan, N. Raman & K. Natarajan (eds.), *Mycorrhizae for Green Asian 1st Asian Conference Mycorrhizae* (pp. 329-332). Madras: Madras University.

Kumla, J., Danell, E., & Bussaban, B. (2011). Suitable growth conditions and nutrition factors on In Vitro culture of *Phlebopus portentosus* (Boletales). *Chiang Mai Journal of Science,* 38(1), 156-159.

Kumla, J., Suwannarach, N., & Lumyong, S. (2020). A new report on edible tropical bolete, *Phlebopus sponggiosus* in Thailand and its fruiting body formation without the need for a host plant. *Mycobiology*, 48(4), 263-275.

Lazarevic, J., Stojicic, D., & Keca, N. (2016). Effects of temperature, pH and carbon and nitrogen sources on growth of *in vitro* cultures of ectomycorrhizal isolates from *Pinus heldreichii* forest. *Forest Systems*, 25(1), 48-58.

Molina, R., & Palmer, J.G. (1982). Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In N.C., Schenck (Eds.), *Methods and Principles of Mycorrhizal Research.* (pp. 115-129). Minnesota: The American Phytopathological Society.

Nhi, L. T. T., Hieu, T. C., Hanh, P. M., Tan, B. V., Hoang, P. N. D., & Quyen, H. B. T. (2017). Mycelial cultivation of *Phlebopus spongiosus*, an edible ectomycorrhizal mushroom in southern Vietnam. *Journal of Science*, 7(1), 14-21.

Nguyen, X. H., Le, H. T., Tran, T. T., Luong, T. M. N., & Pham, T. H. (2017). Isolation and study on pure culture of wild edible mushrooms collected from provinces in the southeast region of Vietnam. *Journal of Science and Technology,* 55(1), 122-133.

Nopamornbodi, O. (1995). Effect of mycorrhizae on plant growth and soil fertility. In *International Training Course on Soil Management Technique "Fertility Improvement".* Khonkaen: ADRC and JICAS ADRC.

Suwannasai, N., Dokmai, P., Yamada, A., Watling, R., & Phosri, C. (2020). First ectomycorrhizal syntheses between *Astraeus sirindhorniae* and *Dipterocarpus alatus* (Dipterocarpaceae), pure culture characteristics and molecular detection. *Biodiversitas*, 21(1), 231-238.