



# การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด ( PRESERVATION OF MUSHROOM CULTURES )

เอกสารนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการความรู้ ปีงบประมาณ 2562  
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ



กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด  
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ  
กรมวิชาการเกษตร

# การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด

## (Preservation of Mushroom Cultures)

เอกสารฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการความรู้ ปีงบประมาณ 2562

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

# คำนำ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยกลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด มีหน้าที่หลักในการวิจัยและพัฒนาเห็ดในหลากหลายด้าน ทั้งการคัดเลือก ปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้เห็ดพันธุ์ดี การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มผลผลิต มีความเหมาะสมกับสภาพพื้นที่ การค้นคว้าหาวิธีการเพาะเห็ดชนิดใหม่ รวมไปถึงวิธีการอนุรักษ์และเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด โดยการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดให้มีความถูกต้องและเหมาะสมเป็นอีกปัจจัยสำคัญหนึ่งในกระบวนการเพาะเห็ดที่มีประสิทธิภาพ เพื่อให้ได้ผลตอบแทนที่มากขึ้นหรือสามารถลดต้นทุนการผลิต ปัจจุบันการเพาะเห็ดเป็นการค้าได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เกษตรกรทั้งรายใหญ่และรายย่อยมีความสนใจทั้งทางด้านเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มผลผลิต การเลือกใช้วัสดุเพาะที่หลากหลาย ตลอดจนวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดที่เหมาะสม เพื่อความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ของเชื้อ และความเสถียรของสายพันธุ์ เอกสารการจัดการความรู้ฉบับนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อถ่ายทอดองค์ความรู้สำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดด้วยวิธีต่าง ๆ ในการเก็บรักษาแต่ละชนิด ตลอดจนวิธีการปรับใช้วัสดุ อุปกรณ์ที่หาได้ง่าย ต้นทุนไม่สูง สำหรับเผยแพร่ให้นักวิจัย นักศึกษา ตลอดจนเกษตรกรและผู้สนใจ เพื่อให้เข้าใจกระบวนการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดและนำไปปรับใช้ได้อย่างเหมาะสม กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด หวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจ และเป็นข้อมูลที่สามารถนำไปอ้างอิงและต่อยอดงานวิจัยได้ในอนาคตต่อไป

คณะทำงานการจัดการความรู้  
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ  
มิถุนายน 2562

# สารบัญ

บทที่		หน้า
1	การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	1
	ความสำคัญของการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	1
	วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	1
2	การเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ด	3
	ความสำคัญของการเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ด	3
	วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ด	4
	การควบคุมคุณภาพของเชื้อพันธุ้เห็ดที่เก็บรักษา	6
3	การปรับใช้วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ดให้เหมาะสม	9
	1. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ดบนอาหารวุ้น	9
	2. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ดในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	10
	3. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ดในซีลีเยอ	11
4	วิธีเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ดชนิดต่าง ๆ	14
	1. เชื้อพันธุ้เห็ดสกุลนางรม	14
	2. เชื้อพันธุ้เห็ดหูหนู	16
	3. เชื้อพันธุ้เห็ดกระด้าง	17
	4. เชื้อพันธุ้เห็ดฟาง	19
	5. เชื้อเห็ดชนิดอื่น ๆ	23
5	บทสรุป	25
	เอกสารอ้างอิง	26

# สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดบนอาหารวุ้น	10
2	การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อบรรจุในขวดแก้ว	11
3	การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดในซีลี้อยนิ่งฆ่าเชื้อบรรจุในขวดแก้ว	12
4	การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางในขวดแก้ว	21

# สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดด้วยวิธีต่าง ๆ	13

# บทที่ 1

## การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

### ความสำคัญของการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ประเทศไทยจัดอยู่ในพื้นที่เขตร้อนชื้น จึงมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ทั้งพืช สัตว์รวมไปถึงสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหรือที่เรียกโดยทั่วไปว่าจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น เห็ด รา แบคทีเรีย ไวรัส ยีสต์ เป็นต้น ปัจจุบัน จุลินทรีย์เหล่านี้มีความสำคัญและถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลากหลายด้าน โดยเฉพาะการศึกษาเทคโนโลยีทางชีวภาพ เพื่อสนับสนุนการเกษตร สิ่งแวดล้อม อุตสาหกรรมทางการแพทย์ เกษษกรรม สาธารณสุข การผลิตอาหารหรือ อุตสาหกรรมต่าง ๆ รวมไปถึงการนำไปศึกษาและวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ในหลาย ๆ สาขา โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถแยกจนได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้ว ต้องมีการเก็บรักษาที่ถูกต้อง เพื่อใช้เป็นเชื้อต้นแบบ (Type cultures) เชื้ออ้างอิง (Reference cultures) และเชื้อใช้งาน (Working culture) โดยหลักการสำคัญของการเก็บรักษา จำเป็นต้องคำนึงถึงการอนุรักษ์เชื้อ พันธุกรรมที่มีประโยชน์เหล่านี้ ให้สามารถคงความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ คงสภาพหรือคงความ มีคุณสมบัติเฉพาะตัว สำหรับการนำไปใช้และศึกษาวิจัยในด้านอื่น ๆ

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ควรมีการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวโมเลกุล หรือลักษณะทางการเกษตรต่าง ๆ และจัดเก็บอย่างเป็นระบบ เพื่ออนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพสำหรับการศึกษาและใช้ประโยชน์ทางด้านต่าง ๆ อย่างยั่งยืน และเป็นแหล่งหน่วยพันธุกรรมจุลินทรีย์ธรรมชาติที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ นำมา ศึกษา คัดเลือก ปรับปรุงพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์สำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ได้ตามความต้องการ

### วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ จำเป็นต้องเลือกใช้วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ ถูกต้องและเหมาะสมกับเชื้อชนิดนั้นๆ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ สามารถเก็บได้นานโดยไม่สูญเสียพันธุ์ กลายพันธุ์ หรือสูญเสียคุณสมบัติเฉพาะของจุลินทรีย์ชนิดนั้นไป โดยทั่วไป วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ มี 6 วิธี ดังนี้ (Smith and Onions, 1994)

1. การเก็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture media) เป็นการเก็บเชื้อระยะสั้น มีการถ่ายเชื้อทุก 6 เดือน เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด แต่ต้องระมัดระวัง เรื่องการกลายพันธุ์ของเชื้อและการปนเปื้อนจากการย้ายเชื้อในแต่ละครั้ง
2. การเก็บภายใต้น้ำมันแร่ (Mineral oil) การเก็บด้วยวิธีนี้สามารถ เก็บรักษาเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes, Zygomycetes และ Basidiomycetes ได้นานถึง 10 ปี ส่วนเชื้อราในกลุ่ม Oomycetes เก็บได้เพียง 2 ปี
3. การทำให้แห้ง (Drying) การทำให้เชื้อจุลินทรีย์แห้งในวัสดุต่าง ๆ เช่น กระดาษกรองที่ปลอดเชื้อ ดิน ทราาย ซิลิกาเจล และบนแผ่นเจลลาดิน เป็นการหยุดการเจริญของเชื้อ ส่วนใหญ่ใช้เก็บเชื้อราซึ่งทนต่อความแห้งได้ดี รวมถึงยีสต์และแบคทีเรียบางชนิด
4. การเก็บในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (Sterilized distilled water) วิธีนี้ สามารถเก็บสปอร์ในรูปสปอร์แขวนลอย (spore suspension) หรือชิ้นวุ้น ที่มีเชื้อเจริญอยู่ เชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ เก็บรักษาได้ดีด้วยวิธีนี้
5. การเก็บในสภาพเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation) เป็นวิธีการเก็บไว้ใน ถังบรรจุไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ  $-196^{\circ}\text{C}$  วิธีนี้เหมาะกับการเก็บรักษา เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด และสามารถเก็บเชื้อได้นานกว่า 10 ปี
6. การทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying หรือ lyophilization) เป็นหลักการนำน้ำออก ลดความชื้นจากเซลล์จุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์อยู่ใน สภาพแห้งทำให้อัตราเมตาบอลิซึมต่ำลง แต่ยังมีชีวิตอยู่และสามารถเก็บ เชื้อไว้ได้นานมากกว่า 10 ปี ข้อดีของวิธีนี้ คือ เหมาะสำหรับการเก็บรักษา เชื้อจำนวนมากและเก็บรักษาได้นาน ส่วนข้อด้อย คือ มีค่าใช้จ่ายสูงในการ ซื้ออุปกรณ์และเครื่องมือ

อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาจุลินทรีย์ไม่มีวิธีใดวิธีเดียวที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ ทุกชนิด การเก็บรักษาจุลินทรีย์ ควรคำนึงถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ต้องการเก็บ วัตถุประสงค์ ในการเก็บ ความพร้อมของเครื่องมืออุปกรณ์ ความชำนาญของบุคลากร งบประมาณที่ใช้ ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ ควรเก็บเชื้อทุกชนิดสำรองไว้อย่างน้อย 1 - 2 ชุด ด้วยวิธีหรือสถานที่ที่แตกต่างกัน เพื่อป้องกันการสูญเสียเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทั้งจาก เหตุการณ์ไม่คาดคิดและภัยธรรมชาติต่าง ๆ



## บทที่ 2

# การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด

### ความสำคัญของการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด

เห็ด เป็นเชื้อรากลุ่มหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย และสามารถนำผลลัพธ์จากการย่อยสลายไปใช้ในการเจริญ เห็ดรับประทานได้หลายชนิดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากมีโปรตีน กากใยสูง ปราศจากไขมัน อีกทั้งประกอบด้วยวิตามินและกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งเป็นประโยชน์ทางด้านสุขภาพของมนุษย์ มีบันทึกการนำเห็ดมาประกอบอาหาร เป็นยารักษาโรค หรือนำไปแปรรูปเพื่อการค้ามาอย่างยาวนาน ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาวิจัยถึงคุณประโยชน์ด้านอื่น ๆ ของเห็ด เช่น ประโยชน์ของเห็ด ทางด้านการแพทย์ การนำไปใช้เป็นส่วนประกอบทางด้านเครื่องสำอาง ตลอดจนการสกัดสารสำคัญในเห็ดบางชนิด เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร เช่น สารควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่าง ๆ เป็นต้น

ในประเทศไทยเห็ดที่ทำการศึกษามากเป็นเห็ดที่สามารถพบได้ในธรรมชาติของไทย แต่บางชนิดเป็นสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ สายพันธุ์เห็ดเหล่านี้เมื่อผ่านการศึกษา ค้นคว้า วิจัย แล้ว จำเป็นต้องมีวิธีการเก็บรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสม ควบคุมคุณภาพให้เชื้อบริสุทธิ์ ไม่ให้เกิดการกลายพันธุ์ หรือเกิดการปนเปื้อน ซึ่งอาจส่งผลให้อัตราการเจริญ หรือความสามารถในการให้ผลผลิตลดลง เกิดความผิดปกติของดอกเห็ด ตลอดจนเชื้อเห็ดไม่สามารถให้ผลผลิตได้

ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด มีวัตถุประสงค์เพื่อการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน โดยจำเป็นต้องคำนึงถึงควมมีชีวิต การเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ไม่พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ มีความเสถียรของเชื้อพันธุ์ ไม่สูญเสียลักษณะทางพันธุกรรม ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยา (Chang and Miles, 2004) โดยวิธีการเก็บรักษาแบบต่างๆ เพื่อนำมาเลี้ยงหรือเพิ่มจำนวนภายหลัง อาจด้วยการจำกัดอากาศ อุณหภูมิ สารอาหารและน้ำ ช่วยให้เกิดรักษาให้นานและคงคุณภาพไว้ให้มากที่สุด

## วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสามารถเก็บได้หลายวิธี แต่ละวิธีต่างมีประสิทธิภาพและข้อจำกัดแตกต่างกัน ควรพิจารณาถึงวัตถุประสงค์ของการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดเพื่อการนำไปใช้ เช่น เพื่อเป็นต้นแบบไว้ใช้อ้างอิง เพื่อเก็บไว้เป็นเชื้อสำรอง เพื่อเป็นเชื้อใช้งานสำหรับงานวิจัยหรือให้บริการ ซึ่งควรเป็นเชื้อที่ใหม่ มีอายุการเจริญที่เหมาะสมและพร้อมใช้งาน รวมถึงเครื่องมือและความพร้อมทุกด้านในการทำงาน โดยระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาอาจแบ่งเป็น 3 ระยะ ดังนี้

**1. การเก็บรักษาเชื้อเห็ดระยะสั้น** วิธีการที่นิยมใช้กันคือ การย้ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มเลี้ยงเส้นใยระยะแรกในอุณหภูมิที่เหมาะสมของเห็ดแต่ละชนิด แล้วเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 20 - 25°C และมีการถ่ายเชื้อเป็นระยะ โดยปกติสามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 6 เดือน เป็นวิธีการปฏิบัติทั่วไปในการเก็บรักษาจุลินทรีย์สามารถใช้เก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดได้ในระยะสั้น และอาจนำเชื้อบนอาหารร่วนไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่าระหว่าง 10 - 15°C หรือลดปริมาณน้ำตาลในอาหารร่วนลงครึ่งหนึ่ง เพื่อช่วยยืดอายุในการเก็บรักษา แต่ไม่เหมาะกับการเก็บรักษาเชื้อเห็ดในกลุ่มที่ต้องการอุณหภูมิสูงในการดำรงชีวิต การเก็บรักษาเชื้อบนอาหารร่วนมีข้อดีคือเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย วัสดุ อุปกรณ์ที่นำมาใช้หาได้ง่าย ราคาไม่สูงมาก แต่มีข้อด้อยที่ต้องใช้เวลา แรงงานมากในการเตรียมอาหาร และต้องใช้พื้นที่มากในการเก็บหลอดหรือขวดเชื้อ นอกจากนี้ อาจเกิดการสับเปลี่ยนในการเขียนรหัสหรือชนิดของเห็ด และการต่อเชื้อลงอาหารใหม่บ่อยครั้ง สามารถเพิ่มโอกาสในการกลายพันธุ์ของเชื้อเห็ดและเกิดการปนเปื้อนจากการย้ายเลี้ยงบ่อยๆ ได้

**2. การเก็บรักษาเชื้อเห็ดระยะกลาง** วิธีที่นิยมกันคือเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดบนวัสดุเพาะซีลี้อย และ ในน้ำกลั่น การเก็บรักษาเชื้อเห็ดบนวัสดุเพาะซีลี้อย โดย Joseph (1998) รายงานการเตรียมวัสดุเพาะซีลี้อยที่ใช้ในการเก็บรักษาซึ่งประกอบด้วย ซีลี้อยไม้เนื้อแข็ง 80% รำข้าวสาลี 15% และ ยิบซั่ม 5% ให้ความชื้น บรรจุลงขวด หนึ่งขวดเชื้อที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 121°C ใส่เชื้อเห็ดจนเส้นใยเจริญคลุมเต็มอาหารซีลี้อย วิธีการนี้สามารถเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 6 - 8°C ได้นานกว่า 1 ปี และการเก็บรักษาเชื้อเห็ดในน้ำกลั่นหนึ่งขวดเชื้อเป็นวิธีที่แนะนำว่ามีประสิทธิภาพดี วิธีการนี้ Joseph (1998) อ้างถึงรายงานการใช้น้ำกลั่นหนึ่งขวดเชื้อเก็บรักษาเชื้อราสาเหตุโรคเป็นครั้งแรกโดย Castellani ในปี 1939 ต่อมา มีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านใช้วิธีการนี้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ อาทิ McGinnis *et al.*

(1974) รายงานการเก็บรักษาเชื้อรา ยีสต์ แบคทีเรีย และแอกติโนมัยซีส ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิห้องได้ตั้งแต่ 12 - 60 เดือน และ Odds ในปี 1991 เก็บรักษาเชื้อยีสต์สาเหตุโรคทั้งหมดนี้สามารถเก็บไว้ได้นานมากกว่า 3 ปี โดยไม่มีการเสื่อมของเชื้อ การเก็บรักษาเชื้อเห็ดระยะกลาง นอกจากเก็บบนวัสดุเพาะเชื้อแล้วและการเจาะขึ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ใส่ลงไป ในขวดน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว การเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้นและปิดทับด้วยน้ำมันหรือน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อเห็ดได้ด้วย เช่น เห็ดฟางที่เจริญอยู่บนอาหารวุ้นเมื่อปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์สามารถเก็บไว้ได้นาน 6 เดือน (ยงยุทธ์และคณะ, 2525)

**3. การเก็บรักษาเชื้อเห็ดระยะยาว** โดยเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดในสภาพเยือกแข็งที่อุณหภูมิ  $-196^{\circ}\text{C}$  หรือ  $-384^{\circ}\text{F}$  ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นการเก็บรักษาที่หยุดกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อ ในกระบวนการเก็บมีขั้นตอนต้องลดอุณหภูมิเพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์ อัตราการทำให้เย็นควรเป็นไปอย่างช้า ๆ (Cooling) และควบคุมให้ได้ประมาณ  $1^{\circ}\text{C}$  ต่อนาที จนลงมาถึง  $-40$  หรือ  $-50^{\circ}\text{C}$  แล้วจึงทำให้เยือกแข็งอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิต้องการ วิธีการนี้โดยทั่วไปมีการใช้กลีเซอรอล (Glycerol) ความเข้มข้น 5 - 10% เป็นสารป้องกันความเย็น (Cryoprotective agents) เพื่อลดความเสียหายต่อเซลล์ในขณะที่เก็บรักษาเชื้อ และเมื่อต้องการนำเชื้อขึ้นจากถังไนโตรเจนเหลว ต้องมีการหลอมละลายตัวอย่าง (Thawing) เพื่อลดความเสียหายของเซลล์ในระยะของการทำให้ละลายและช่วยให้เชื้อมีอัตราการฟื้นตัวที่ดี วิธีการเก็บรักษาเชื้อในถังไนโตรเจนเหลวได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่ง เนื่องจากสามารถลดอัตราการสูญเสียเซลล์ระหว่างการเก็บ ช่วยในการรักษาความคงที่ทางพันธุกรรมของเชื้อได้ดี และสามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 30 ปี แต่มีข้อควรระวังคือต้องรักษาปริมาณไนโตรเจนเหลวที่เหมาะสมภายในถังอยู่เสมอ เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้มีความสม่ำเสมอ โดยวิธีการนี้มีข้อด้อยคือ จำเป็นต้องใช้วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือที่มีราคาสูง ต้องใช้บุคลากรที่มีทักษะและความชำนาญในการเก็บรักษาเชื้อ

## การควบคุมคุณภาพของเชื้อพันธุ์เห็ดที่เก็บรักษา

การควบคุมคุณภาพของเชื้อพันธุ์เห็ดในแหล่งจัดเก็บเป็นสิ่งที่สำคัญมาก การควบคุมคุณภาพที่ดีนำไปสู่การมีชีวิตของเชื้อ ความแข็งแรง ความบริสุทธิ์หรือปลอดจากการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น และไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม วิธีการในการควบคุมคุณภาพจำเป็นต้องคำนึงถึงคุณสมบัติ ดังนี้

1. **ความมีชีวิต (Viability)** หลังจากการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดด้วยวิธีต่าง ๆ ตามที่กล่าวมาข้างต้น จำเป็นต้องมีการตรวจสอบความมีชีวิตหรือสภาพมีชีวิตของเห็ดชนิดนั้น ๆ วิธีเบื้องต้นในการตรวจสอบเชื้อเก็บรักษาทั้ง 3 ระยะ คือ เมื่อย้ายเชื้อเห็ดมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ โคลนิน (Colony) ที่เจริญขึ้นต้องมีลักษณะดีเหมือนเชื้อพันธุ์เดิม มีการเจริญของเชื้อที่สม่ำเสมอ รวมถึงสีของเส้นใยและอัตราการเจริญต้องไม่แตกต่างกับข้อมูลการเจริญของเชื้อพันธุ์เดิมก่อนการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาเพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อพันธุ์เห็ดที่เก็บรักษาในเห็ดหลายชนิด เช่น Singh *et al.* (2004) ตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อเห็ดที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวสาลีและเก็บภายในถังไนโตรเจนเหลวจำนวน 11 ชนิด คือ เห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus* และ *A. bitorquis*) เห็ดสกุลนางรม (*Pleurotus flabellatus*, *P. sajor-caju*, *P. ostreatus* และ *P. sapidus*) เห็ดหูหนู (*Auricularia polytricha*) เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) เห็ด *Morchella esculenta* และเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) โดยเมื่อนำเชื้อขึ้นมาเลี้ยงบนอาหาร Wheat Extract Agar (WEA) พบว่า เห็ดหูหนูและเห็ดฟางสภาพความมีชีวิตลดลง 10% หลังการเก็บรักษาภายในถังไนโตรเจนเหลวตั้งแต่ 6 - 42 เดือน ในขณะที่ เชื้อเห็ดอีก 9 ชนิด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพความมีชีวิต นอกจากนี้ Zaghi *et al.* (2017) ทดสอบความมีชีวิตในการเก็บรักษาเชื้อเห็ดกระดุม (*A. subrufescens*) ในสภาพเย็นยิ่งยวด โดยเลี้ยงเชื้อด้วย 2 กรรมวิธี คือ เลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA ผสมซูโครสความเข้มข้น 0 10 และ 20% แล้วเจาะชิ้นวุ้นใส่ลงในหลอดเก็บเชื้อ (Cryotubes) และเลี้ยงบนเมล็ดข้าวสาลีผสมซูโครสความเข้มข้น 0 10 และ 20% และเก็บลงในหลอดเก็บเชื้อ นำหลอดเก็บเชื้อทั้ง 2 กรรมวิธีเดิมสารละลายซูโครสที่ความเข้มข้น 0 15 30 และ 45% เพื่อเป็นสารป้องกันความเย็น แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20°C และ -75°C เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ปี พบว่า การเก็บเชื้อเห็ดกระดุมที่อุณหภูมิ -20°C ในสารป้องกันความเย็นทุกความเข้มข้น เป็นระยะเวลา 1 ปี ไม่มีประสิทธิภาพในการเก็บเชื้อเห็ดกระดุม ทั้งที่เจริญบนอาหาร PDA และเมล็ดข้าวสาลี ในขณะที่การเก็บเชื้อเห็ดกระดุม

ที่อุณหภูมิ  $-75^{\circ}\text{C}$  เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ปี ในสารป้องกันความเย็นความเข้มข้น 15 30 และ 45% มีประสิทธิภาพในการคงความมีชีวิตของเห็ดกระดุม โดยกรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อในเมล็ดข้าวสาลี แม้ไม่เติมสารป้องกันความเย็นแต่เชื้อเห็ดยังสามารถเจริญคงความมีชีวิตอยู่ได้

**2. ความบริสุทธิ์ (Purity)** การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดด้วยวิธีที่เหมาะสมกับเห็ดแต่ละชนิดมีส่วนช่วยในการคงความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์อีกทางหนึ่ง เนื่องจาก การเก็บรักษาด้วยวิธีที่เหมาะสมสามารถคงสภาพความมีชีวิต เชื้อสามารถฟื้นตัว เจริญได้ดีเมื่อนำมาขยายเลี้ยง และในสภาพการเก็บรักษาเชื้อในบางวิธีสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม เมื่อนำเชื้อเห็ดที่เก็บรักษามาขยายเลี้ยงเพื่อทดสอบสภาพความมีชีวิต สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อเห็ดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในเบื้องต้น เช่น สีของเส้นใย ลักษณะการเจริญของเส้นใยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือลักษณะต่าง ๆ ของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การปนเปื้อนไม่เพียงแต่เชื้อราหรือแบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถปนเปื้อนในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดเท่านั้น เชื้อเห็ดชนิดอื่นที่ไม่ตรงกับชนิดของเห็ดที่ต้องการเก็บรักษาถือเป็นการปนเปื้อนได้เช่นเดียวกัน

**3. ความคงตัวหรือความเสถียรของสายพันธุ์ (Stability) และความสามารถในการเกิดดอก (Productivity)** วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดที่เหมาะสม ต้องช่วยลดโอกาสในการเกิดความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมขึ้น การตรวจสอบความตรงตามสายพันธุ์ในระยะการเจริญของเส้นใยอาจตรวจสอบได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ความหนาแน่นของเส้นใย ลักษณะการเดินของเส้นใย รูปร่างของโคโลนี สีของเส้นใย เป็นต้น การตรวจสอบความสามารถในการเกิดดอกจำเป็นต้องเพาะเห็ดชนิดนั้น ๆ ภายหลังจากการเก็บรักษามาเป็นระยะเวลาหนึ่ง เพื่อยืนยันว่าเชื้อพันธุ์เห็ดชนิดนั้นที่เก็บรักษา ยังมีความสามารถในการเกิดดอกและมีลักษณะตรงตามสายพันธุ์ดั้งเดิมก่อนการเก็บรักษาทั้งด้านคุณภาพ เช่น รสชาติ สี กลิ่น และด้านปริมาณ เช่น รูปร่าง ขนาดและน้ำหนัก ตลอดจนความสามารถในการใช้วัสดุเพาะจนกระทั่งเปิดดอกเก็บผลผลิต ในปัจจุบันการตรวจสอบความตรงตามสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลถูกนำมาใช้เพื่อลดระยะเวลาในการตรวจสอบและมีความแม่นยำสูง โดย Singh *et al.* (2004) ตรวจสอบการเก็บรักษาเชื้อเห็ดกระดุม เห็ดสกุลนางรม เห็ดหูหนู เห็ดหอม เห็ด *Morchella* และเห็ดฟาง ที่เก็บภายในถังไนโตรเจนเหลวตั้งแต่ 6 - 42 เดือน ด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และ Internal Transcribed Spacers (ITS) พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมระหว่างการเก็บรักษา

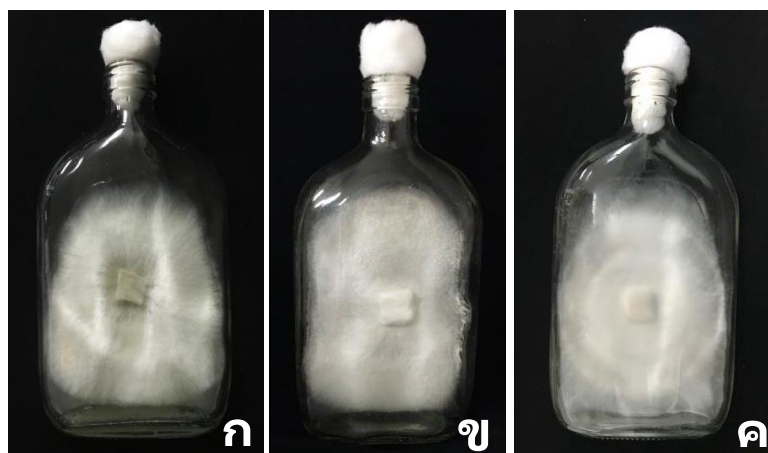
เชื้อพันธุ์เห็ดแบบการเก็บระยะสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อและแบบการเก็บระยะยาวในถังไนโตรเจนเหลว เมื่อทดสอบความสามารถในการออกดอก พบว่าหลังการเก็บเชื้อไว้ 30 เดือน ไม่ส่งผลกระทบต่อการผลิต (น้ำหนัก) ของเห็ดที่เก็บรักษา และ Zaghi *et al.* (2017) ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเห็ดกระดุม (*A. subrufescens*) ที่เลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA และที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวสาลี แล้วเก็บรักษาด้วยเทคนิค cryopreservation ที่อุณหภูมิ  $-75^{\circ}\text{C}$  เป็นระยะเวลา 2 ปี โดยใช้เทคนิค PCR-RAPD พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเห็ดกระดุมชนิดนี้

## บทที่ 3

### การปรับใช้วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดให้เหมาะสม

การเลือกวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดด้วยวิธีใดก็ตาม เป้าประสงค์หลักของการเก็บรักษา เพื่อรักษาคุณลักษณะของเชื้อพันธุ์เห็ดที่ต้องการโดยคงสภาพเดิมไว้ให้มากที่สุด ตอบสนองต่อความต้องการในการใช้งานของผู้ใช้ เช่น การเก็บรักษาเชื้อเพื่อเป็นเชื้อต้นแบบ เชื้ออ้างอิง เชื้อใช้งาน สำหรับงานวิจัยหรือให้บริการ ต้องการเก็บในระยะสั้น/ระยะยาว รวมถึงความพร้อมด้านแรงงาน อุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่ การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ควรใช้วิธีการเก็บให้เหมาะสมต่อความต้องการของเห็ดแต่ละชนิดและการใช้งาน คำนึงค่าต่อการลงทุนในแง่ของเกษตรกรควรเลือกใช้วิธีการที่ไม่ยุ่งยาก ลงทุนน้อยที่สุด และในส่วนของภาครัฐที่จำเป็นต้องมีการเก็บรักษาไว้เป็นแหล่งเชื้อพันธุ์หรือเพื่อการอนุรักษ์ ต้องมีการเก็บรักษาในระยะยาว ใช้วิธีการเก็บหรือใช้เทคโนโลยีขั้นสูง โดยเห็ดแต่ละชนิดอาจมีการปรับใช้วิธีการเก็บรักษาให้เหมาะสมที่แตกต่างกันไป เช่น

1. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดบนอาหารร่วน (ภาพที่ 1) เป็นวิธีที่ง่าย มีค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาน้อย เป็นวิธีที่สะดวกและนิยมใช้กันโดยทั่วไปทั้งการเก็บภายในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นเชื้อใช้งานสำหรับงานวิจัยและสามารถดัดแปลงไว้ใช้ถ่ายทอดสู่เกษตรกร โดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอุณหภูมิที่เหมาะสมกับเห็ดแต่ละชนิดก่อน แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 - 25 °C อย่างไรก็ดีตาม วิธีการนี้สามารถเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดได้เพียงระยะเวลาสั้น ๆ ไม่เกิน 2 - 6 เดือน ขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด แล้วย้ายเก็บลงในอาหารร่วนใหม่ แต่การย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่บ่อย ๆ นั้น อาจส่งผลให้เชื้อพันธุ์เห็ดกลายเป็นพันธุ์ได้ง่าย และต้องอาศัยความชำนาญของผู้เก็บรักษาในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ ดังนั้น การเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดในอาหารร่วนจึงควรตรวจสอบอยู่เสมอ เพื่อลดความสูญเสียจากการมีเชื้ออื่นปนเปื้อนและอาหารร่วนแห้ง ซึ่งส่งผลให้เชื้อเห็ดที่เก็บรักษาตาย



ภาพที่ 1 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ดบนอาหารวุ้น (ก) เห็ดสกุลนางรม (ข) เห็ดกระด้าง และ (ค) เห็ดหูหนู

2. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ดในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 2) ภายหลังกการเลี้ยงเชื้อเห็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อในอุณหภูมิที่เหมาะสมกับเห็ดแต่ละชนิดจนเชื้อเจริญได้ดีแล้ว เจาะชิ้นวุ้น ใส่ขวดน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง โดยการนิ่งฆ่าเชื้อแต่ละครั้งระยะเวลาห่างกัน 24 ชม. นำขวดเก็บเชื้อไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ประมาณ 25 - 30 °C วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและได้รับความนิยมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ด เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ใช้อุปกรณ์ที่หาได้ง่าย ต้นทุนไม่สูง เชื้อเห็ดหลายชนิดนิยมเก็บโดยใช้วิธีนี้ นอกจากนี้ การเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ดในน้ำกลั่น เมื่อนำเชื้อที่เก็บรักษามาย้ายเลี้ยงบนอาหาร เชื้อยังสามารถกลับมาเจริญได้ดี แม้มีการเก็บเชื้อมาเป็นระยะเวลา 2 - 5 ปี อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีข้อควรระวังคือ **ไม่ควรใส่น้ำกลั่นในขวดจนสูงเกินไป** เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อเจริญขึ้นมาถึงด้านบนฝาขวด ทำให้เชื้อเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย แต่ไม่ควรน้อยเกินไปและต้องหมั่นตรวจเช็คการระเหยของน้ำ





ภาพที่ 2 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อบรรจุในขวดแก้ว

(ก) เห็ดสกุลนางรม (ข) เห็ดกระด้าง และ (ค) เห็ดหูหนู

**3. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดในซีลี้อย** (ภาพที่ 3) วิธีการนี้มีลักษณะคล้าย การจำลองสภาพในธรรมชาติของเชื้อเห็ดที่มักเจริญกินเนื้อไม้ สามารถพักตัวอยู่ได้นานและ เก็บรักษาเป็นระยะเวลาาน การเก็บเชื้อในซีลี้อยมีส่วนผสมที่ประกอบด้วยน้ำและซีลี้อย ไม้ไผ่ส่วนประกอบอื่น เช่น รำข้าว หรือดีเกลือ เพราะต้องการให้เชื้อค่อย ๆ เจริญกิน สารอาหารของเนื้อไม้อย่างช้า ๆ ปรับให้มีความชื้นพอเหมาะโดยใช้วิธีการตรวจสอบความชื้น เช่นเดียวกับการผสมซีลี้อยสำหรับการเพาะเห็ดถั่ง แต่ในเชื้อเห็ดบางชนิดที่เจริญช้าอาจมี การเติมน้ำต้มมันฝรั่งลงในซีลี้อยเล็กน้อย เพื่อเพิ่มสารอาหารและช่วยให้เส้นใยเห็ด มีความ แข็งแรงมากขึ้น บรรจุซีลี้อยใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อ ตัดขึ้นวันย้ายเชื้อลงซีลี้อย นำไปเลี้ยงไว้ที่ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเห็ดแต่ละชนิดจนเชื้อเจริญเต็มซีลี้อย แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิห้องที่ประมาณ 25 - 30°C วิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดได้นาน 2 - 5 ปี และ ควรใส่ซีลี้อยประมาณหนึ่งในสามส่วนของขวดที่ต้องการเก็บ เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อเจริญ ขึ้นมาถึงด้านบนฝาขวด ซึ่งทำให้เชื้อเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย



ก

ข



ค

ภาพที่ 3 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดในซีลี้อย่างหม่าเชื้อบรรจุในขวดแก้ว (ก) เห็ดสกุลนางรม (ข) เห็ดกระด้าง และ (ค) เห็ดหูหนู

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดบนอาหารวุ้น ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อและในวัสดุขี้เลื่อยที่บรรจุในขวดแก้ว เป็นการปรับใช้วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับการเก็บรักษาที่หาได้ง่าย ต้นทุนไม่สูง โดยเฉพาะเชื้อพันธุ์เห็ดที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อและวัสดุขี้เลื่อย เป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดที่ได้ระยะเวลานานกว่าการเก็บรักษาเชื้อบนอาหารวุ้น สามารถนำไปถ่ายทอดให้กับเกษตรกรได้ง่าย โดยการเก็บเชื้อทั้ง 2 วิธี สามารถยืดระยะเวลาในการถ่ายเชื้อ อายุในการเก็บ ลดปัญหาการเสียเวลา แรงงาน และการกลายพันธุ์ของเชื้ออันเนื่องมาจากการถ่ายเชื้อบ่อยครั้ง ได้มากกว่าการเก็บเชื้อบนอาหารวุ้น ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไป โดยเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดด้วยวิธีต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีการเก็บรักษา	ต้นทุน		อายุการเก็บรักษา	การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
	วัสดุอุปกรณ์	แรงงาน		
1. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดบนอาหารวุ้น	ต่ำ	สูง	2 - 6 เดือน	ง่าย
	ต่ำ	ต่ำ/ปานกลาง	2 - 5 ปี	ปานกลาง
2. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดในน้ำกลั่น	ต่ำ	ต่ำ/ปานกลาง	2 - 5 ปี	ปานกลาง
3. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดในขี้เลื่อย				

## บทที่ 4

### วิธีเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดชนิดต่าง ๆ

#### 1. เชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรม

สุวลักษณ์ และประไพศรี (2545) ได้ทดสอบการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรม เป็นระยะเวลา 24 เดือน ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ในน้ำมันแร่หนึ่งฆ่าเชื้อ (พาราฟินเหลว) และเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-75^{\circ}\text{C}$  และการเก็บบนอาหารวุ้นมีการถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน ตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ เลี้ยงเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมบนอาหาร PDA ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ บ่มเส้นใยที่อุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$  อายุ 7 วัน
2. การเตรียมภาชนะเก็บเชื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยงและเก็บเชื้อเห็ด ขวดเก็บเชื้อใช้ขวดไวแอลขนาด 8 แตรม บรรจุอาหาร PDA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดและอาหารที่ใช้เก็บรักษา
3. การเก็บรักษาเชื้อเห็ด การเก็บรักษาในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ในน้ำมันแร่หนึ่งฆ่าเชื้อ (พาราฟินเหลว) และเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-75^{\circ}\text{C}$  ทำโดยเจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ย้ายชิ้นวุ้นจำนวน 10 ชิ้น ใส่ลงในขวดเก็บเชื้อที่บรรจุน้ำกลั่น น้ำมันแร่ หรือกลีเซอรอล 10% ซึ่งผ่านการหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำขวดเก็บเชื้อบรรจุน้ำกลั่นหรือน้ำมันแร่ เก็บในห้องอุณหภูมิ  $20^{\circ}\text{C}$  ยกเว้นขวดเก็บเชื้อบรรจุกลีเซอรอล 10% เก็บในตู้แช่แข็ง ส่วนการเก็บเชื้อบนอาหารวุ้นทำการย้ายชิ้นวุ้น 1 ชิ้น เลี้ยงในหลอดแก้วทดสอบบนอาหาร PDA บ่มเส้นใยให้เจริญที่อุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$  ก่อนเก็บในห้องอุณหภูมิ  $20^{\circ}\text{C}$  และถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน
4. การควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษา เชื้อเห็ดที่เก็บรักษาต้องนำไปทดสอบความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ที่ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน และความสามารถในการเกิดดอก โดยย้ายชิ้นวุ้นจากการเก็บแต่ละวิธีจากทั้ง 4 วิธี วางบนอาหาร PDA ปริมาณ 20 มล. ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ 10 จาน สำหรับขวดเก็บเชื้อบรรจุ

กลีเซอรอล 10% ที่เก็บในตู้แช่แข็ง ต้องนำมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 37 °C ก่อน แล้วย้ายเลี้ยงบ่มเส้นใยและสังเกต การเจริญที่อุณหภูมิ 25°C ภายในเวลา 7 วัน เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของ เส้นใยเห็ดหลังเก็บรักษา และจากเส้นใยเห็ดที่พื้นตัว ย้ายเลี้ยงเส้นใยบนอาหาร PDA สำเร็จรูปที่อุณหภูมิ 25°C วัดการเจริญของเส้นใยเพื่อตรวจสอบความ บริสุทธิ์และความแข็งแรงของเส้นใย จากนั้นทดสอบความสามารถในการเกิด ดอกของเส้นใย เตรียมเชื้อเพาะบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อใน ขวดแก้วแบน บ่มที่อุณหภูมิ 25°C อายุ 10 วัน นำไปเพาะในวัสดุประกอบด้วย ขี้เลื่อย ผสมรำละเอียด น้ำตาลทราย ยิบซัมและดีเกลือ ความชื้น 60 - 70% บรรจุในถุงพลาสติกทึบร้อนนึ่งฆ่าเชื้อ เพาะทดสอบในโรงเรือนสภาพธรรมชาติ บนที่ก้นน้ำหนักดอกเห็ดและหาค่าเฉลี่ยต่อก่อนวัสดุ

5. **ผลการเก็บรักษา** พบว่าการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมในน้ำกลั่นนึ่ง ฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในน้ำมันแร่หนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -75°C มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาแตกต่างกัน โดยเส้นใยที่เก็บในน้ำกลั่นนึ่ง ฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง พบการระเหยของน้ำและพบการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นแต่ยังสามารถแยกเชื้อต่อให้บริสุทธิ์ได้ การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้ปฏิบัติงานได้ง่ายกว่า การเก็บในน้ำมันแร่หนึ่งฆ่าเชื้อซึ่งพบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นมากกว่าและ ความเหนอะหนะของน้ำมัน แต่มีข้อควรคำนึงเกี่ยวกับปริมาณน้ำที่ใช้เก็บต้อง ให้สัมพันธ์กับระยะเวลาการเก็บ สำหรับการเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -75°C หากผู้เก็บเชื้อมีความพร้อมเรื่องวัสดุอุปกรณ์ถือเป็นวิธีการที่ปฏิบัติได้ สะดวก ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น การเก็บรักษาเชื้อทั้ง 3 วิธี ช่วยยืด ระยะเวลาในการถ่ายเชื้อ อายุในการเก็บ ลดปัญหาการเสียเวลา แรงงาน และ การกลายพันธุ์ของเชื้ออันเนื่องมาจากการถ่ายเชื้อบ่อยครั้งจากวิธีเก็บบน อาหารร่วนและถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไป

## 2. เชื้อพันธุ์เห็ดหูหนู

เชื้อเห็ดหูหนูใช้วิธีการเก็บรักษาแบบเดียวกับเห็ดสกุลนางรม (สวลักษณ์ และ ประไพศรี, 2545) ในระยะเวลาการเก็บ 24 เดือนในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ในน้ำมันแร่นิ่งฆ่าเชื้อ เก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-75^{\circ}\text{C}$  และเก็บบนอาหารวุ้นโดยถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือนตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ เลี้ยงเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดหูหนูบนอาหาร PDA ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ บ่มเส้นใยที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  อายุ 10 วัน
2. การเตรียมภาชนะเก็บเชื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยงและเก็บเชื้อเห็ด ขวดเก็บเชื้อใช้ ไวแอลขนาด 8 แตรม ใช้อาหาร PDA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดและอาหารที่ใช้เก็บรักษา
3. การเก็บรักษาเชื้อเห็ด การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ในน้ำมันแร่นิ่งฆ่าเชื้อ และเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-75^{\circ}\text{C}$  ทำโดยเจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ย้ายขึ้นวุ้นจำนวน 10 ชิ้น ใส่ลงในขวดเก็บเชื้อที่บรรจุน้ำกลั่น น้ำมันแร่ หรือกลีเซอรอล 10% ซึ่งผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เก็บในห้องอุณหภูมิ  $20^{\circ}\text{C}$  ยกเว้นขวดเก็บเชื้อบรรจุกลีเซอรอล 10% เก็บในตู้แช่แข็ง ส่วนการเก็บบนอาหารวุ้นย้ายขึ้นวุ้น 1 ชิ้นเลี้ยงในหลอดแก้วทดสอบบนอาหาร PDA บ่มเส้นใยให้เจริญที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  ก่อนเก็บในห้องอุณหภูมิ  $20^{\circ}\text{C}$  และถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน
4. การควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษา เชื้อเห็ดที่เก็บรักษาต้องนำไปทดสอบความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ที่ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน และความสามารถในการเกิดดอก โดยย้ายขึ้นวุ้นจากการเก็บแต่ละวิธีจากทั้ง 4 วิธี วางบนอาหาร PDA ปริมาณ 20 มล. ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ 10 จาน สำหรับขวดเก็บเชื้อบรรจุกลีเซอรอล 10% ที่เก็บในตู้แช่แข็ง ต้องนำมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  ก่อน แล้วย้ายเลี้ยงบ่มเส้นใยและสังเกตการเจริญที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  ภายในเวลา 10 วัน เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเส้นใยเห็ดหลังเก็บรักษา และจากเส้นใยเห็ดที่ฟื้นตัว ย้ายเลี้ยงบนอาหาร PDA สำเร็จรูปที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  วัดการเจริญของเส้นใยเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และความ

แข็งแรงของเส้นใย จากนั้นทดสอบความสามารถในการเกิดดอกของเส้นใย เตรียมเชื้อเพาะบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในขวดแก้วแบน บ่มที่ อุณหภูมิ 30°C อายุ 14 วัน นำไปเพาะในวัสดุประกอบด้วย ขี้เลื่อย ผสม รำละเอียด น้ำตาลทราย ยิบซัมและดีเกลือ ความชื้น 60-70% บรรจุใน ถุงพลาสติกทึบร้อนนึ่งฆ่าเชื้อ เพาะทดสอบในโรงเรือนสภาพธรรมชาติ บันทึก น้ำหนักดอกเห็ดและหาค่าเฉลี่ยต่อก้อนวัสดุ

- 5. ผลการเก็บรักษา** พบว่า การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดหูหนูในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในน้ำมันแร่ฆ่าเชื้อ และเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -75°C เป็นเวลา 24 เดือน แต่ละวิธีมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาแตกต่างกัน โดยเส้นใยที่เก็บ ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง พบการระเหยของน้ำและพบการปนเปื้อนจาก เชื้ออื่นแต่ยังสามารถแยกเชื้อต่อให้บริสุทธิ์ได้ ส่วนการเก็บในน้ำมันแร่ฆ่า เชื้อพบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นมากกว่าการเก็บวิธีนี้ในเชื้อพันธุ์เห็ด ชนิดอื่น สำหรับการเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -75°C ไม่พบการปนเปื้อนจาก เชื้ออื่น การเก็บรักษาเชื้อทั้ง 3 วิธี ช่วยยืดระยะเวลาในการถ่ายเชื้อ อายุในการ เก็บ ลดปัญหาการเสียเวลา แรงงาน และการกลายพันธุ์ของเชื้ออันเนื่องมาจาก การถ่ายเชื้อบ่อยครั้งจากวิธีการเก็บบนอาหารวันและถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ ทุก 6 เดือน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไป

### 3. เชื้อพันธุ์เห็ดกระด้าง

สุวลักษณ์ และคณะ, 2546 ; สุวลักษณ์. 2548 ทดสอบวิธีการเก็บเชื้อพันธุ์ เห็ดกระด้างโดยเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บบนอาหารขี้เลื่อยนึ่งฆ่าเชื้อและเก็บบนอาหารวันมี การถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน ตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ เลี้ยงเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดกระด้างบนอาหาร PDA ใน จานแก้วเลี้ยงเชื้อ บ่มเส้นใยที่อุณหภูมิ 30°C อายุ 7 วัน
2. การเตรียมภาชนะเก็บเชื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยงและเก็บเชื้อเห็ด ขวดเก็บเชื้อใช้ ไวแอลขนาด 8 แตรม ใช้อาหาร PDA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดและอาหารที่ใช้ เก็บรักษา คือ อาหาร PDA และอาหารขี้เลื่อย

3. **การเก็บรักษาเชื้อเห็ด** การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทำโดยเจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเห็ดกระด้างเจริญอยู่ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. และย้ายชิ้นวุ้นหนึ่งชิ้นเลี้ยงบนอาหาร PDA ปริมาณ 5 มล. ในขวดเก็บเชื้อ บ่มเส้นใยให้เจริญที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ปิดทับผิวหน้าด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เก็บในห้องอุณหภูมิ 25°C ส่วนการเก็บในซีลี้อย่างนิ่งฆ่าเชื้อ ทำโดยย้ายชิ้นวุ้นหนึ่งชิ้นเลี้ยงบนซีลี้อย่างนิ่งฆ่าเชื้อที่บรรจุในขวดเก็บเชื้อ (เตรียมจากซีลีอย่น้ำหนัก 3 กรัม ปรับความชื้นด้วยน้ำและนิ่งฆ่าเชื้อ) บ่มเส้นใยให้เจริญที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน เก็บในห้องอุณหภูมิ 25°C และ วิธีการเก็บเชื้อบนอาหารวุ้น ทำการย้ายชิ้นวุ้นหนึ่งชิ้นเลี้ยงบนอาหาร PDA ปริมาณ 5 มล. ในขวดเก็บเชื้อ บ่มเส้นใยให้เจริญที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน เก็บในห้องอุณหภูมิ 25°C ซึ่งต้องมีการถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน
4. **การควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษา** เชื้อเห็ดที่เก็บรักษาถูกนำไปทดสอบความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ที่ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน และการทดสอบความสามารถในการเกิดดอก โดยย้ายชิ้นวุ้นจากแต่ละวิธีการเก็บทั้ง 3 วิธี วางบนอาหารปริมาณ 20 มล. ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ 10 จาน บ่มเส้นใยและสังเกตการเจริญที่อุณหภูมิ 30°C ภายในเวลา 10 วัน เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเส้นใยเห็ดหลังเก็บรักษา และจากเส้นใยเห็ดที่พื้นผิว ย้ายเลี้ยงบนอาหาร PDA สำเร็จรูปที่อุณหภูมิ 30°C วัดการเจริญของเส้นใยเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และความแข็งแรงของเส้นใย จากนั้นทดสอบความสามารถในการออกดอกของเส้นใยเตรียมเชื้อเพาะบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อในขวดแก้วแบน บ่มที่อุณหภูมิ 30°C อายุ 7-8 วัน นำไปเพาะในวัสดุประกอบด้วย ซีลี้อย ผสมรำละเอียด น้ำตาลทราย ยิบซัมและดีเกลือ ความชื้น 60-70% บรรจุในถุงพลาสติกทึบร้อนนิ่งฆ่าเชื้อ เพาะทดสอบในโรงเรือนสภาพธรรมชาติ บันทึกน้ำหนักดอกเห็ดและหาค่าเฉลี่ยต่อก้อนวัสดุ
5. **ผลการเก็บรักษา** พบว่า เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดกระด้างจากวิธีเก็บในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ และเก็บบนอาหารซีลี้อย่างนิ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 24 เดือน ยังคงความมีชีวิตและมีการเจริญของเส้นใยบนอาหารที่ทดสอบ และเมื่อนำเส้นใยมาเพาะ



ทดสอบ เส้นใยเห็ดที่เก็บรักษายังคงออกดอกให้ผลผลิตได้เช่นเดียวกับเส้นใยที่เก็บบนอาหารวุ้นซึ่งมีถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน ดังนั้น ทั้ง 2 วิธีการ จึงใช้เก็บรักษาเส้นใยเห็ดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดระยะเวลา แรงงานในการย้ายเชื้อต่อทุก 6 เดือน ลดการเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น และลดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์

#### 4. เชื้อพันธุ์เห็ดฟาง

เห็ดฟางเป็นเห็ดที่เจริญได้รวดเร็ว แต่มักพบปัญหาความอ่อนแอของเชื้อและการกลายพันธุ์ได้ง่ายเมื่อเก็บรักษาเชื้อเป็นเวลานาน จากการศึกษาและทดสอบวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางเพื่อให้ได้เชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่มีความบริสุทธิ์ มีความเสถียร มีอายุยืนยาว และคงสภาพความมีชีวิตเช่นเดียวกับพันธุ์เดิม มีวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ได้หลากหลายวิธี แต่วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่นิยมใช้และเกษตรกรผู้เพาะเห็ดสามารถปฏิบัติได้ คือ 1) การเก็บรักษาบนอาหารวุ้น และ 2) การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ โดยวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางทั้งสองวิธี มีขั้นตอนการดำเนินงาน การควบคุมคุณภาพ และผลการเก็บรักษา ดังนี้

1. การเตรียมเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ เลี้ยงเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบนอาหาร PDA ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ บ่มเส้นใยที่อุณหภูมิ 30°C อายุ 5 วัน

##### 2. การเก็บรักษาเชื้อเห็ด

1) การเก็บรักษาบนอาหารวุ้น ตัดชิ้นอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง ย้ายลงอาหาร PDA ใหม่ ทุก 1 2 4 8 และ 12 สัปดาห์อย่างต่อเนื่อง (อัจฉราและศุภนิത്യ, 2546)

2) การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทดสอบวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่เก็บในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 โดยทดสอบเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง No. 2 5 และ 6 (เป็นเชื้อพันธุ์บริการของศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย) โดยการนำชิ้น PDA ขนาด 5 มม. ที่มีเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบริสุทธิ์เจริญอยู่จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อในขวดไวแอลขนาด 12 แตรม ที่ได้ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แต่ละครึ่งห่างกัน

24 ชม. แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้อุณหภูมิ 35°C เก็บรักษาเป็นเวลา 1 3 6 12 และ 18 เดือน (อัจฉราและประไพศรี, 2543)

### 3. การควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษา

1) ตรวจสอบเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่ย้ายเลี้ยงลงอาหาร PDA ใหม่ทุก 1 2 4 8 และ 12 สัปดาห์ โดยการสังเกตลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDA จากนั้น ทดสอบการเกิดดอกโดยการเพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักในโรงเรือน และทดสอบสภาพความมีชีวิต

2) ตรวจสอบเชื้อพันธุ์เห็ดฟางจากการเก็บรักษาในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่ 1 3 6 และ 12 เดือน โดยการเพาะเลี้ยงกับวัสดุหมัก 3 สูตร คือ สูตรที่ 1 ขี้เถ้าหมัก สูตรที่ 2 ฟางข้าวและขี้เถ้าหมัก และสูตรที่ 3 ขี้เถ้าและขี้เถ้าหมัก ในระบบโรงเรือนที่ จ. พระนครศรีอยุธยาและจังหวัดอื่น ๆ

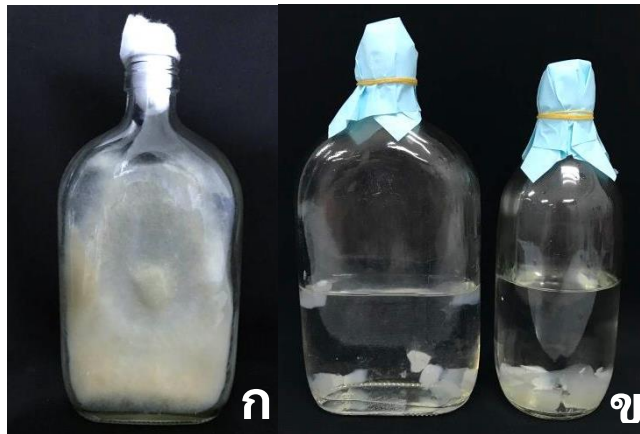
### 4. ผลการเก็บรักษา

1) การเก็บรักษาบนอาหารวุ้น จากการย้ายเชื้อพันธุ์เห็ดฟางลงอาหาร PDA ใหม่ทุก 1 สัปดาห์ต่อเนื่องกันจำนวน 7 ครั้ง เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางยังคงเจริญและมีรูปแบบโคโลนีเหมือนเชื้อพันธุ์เดิม แต่หากเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบนอาหาร PDA นานกว่า 3 สัปดาห์ เมื่อย้ายลงอาหาร PDA ใหม่ มักพบโคโลนีที่มีเพียงเส้นใยอาหาร ซึ่งเป็นเส้นใยเจริญนอนราบบนผิวหน้าอาหาร PDA ไม่มีเส้นใยอากาศ นอกจากนี้การเก็บเชื่อนาน 8 และ 12 สัปดาห์ แล้วย้ายเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางลงอาหาร PDA พบทั้งโคโลนีที่มีเพียงเส้นใยอาหาร ไม่มีเส้นใยอากาศ และพบโคโลนีที่มีเส้นใยครบทั้ง 2 ชนิด และเมื่อทดสอบเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่มีเส้นใยทั้ง 2 ชนิด พบว่า สามารถเกิดดอกได้ โดยการเพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักในโรงเรือนและให้ผลผลิตไม่ต่างจากผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงก่อนการเก็บรักษา

2) การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า เชื้อพันธุ์ No. 6 ที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นปลอดเชื่อนาน 12 เดือน ให้ผลผลิตได้ดีไม่ต่างกับที่เก็บไว้ 3 และ 6 เดือน ในทำนองเดียวกันกับการทดสอบเพาะเลี้ยงกับขี้เถ้า ขี้เถ้าหมัก ที่ จ.นราธิวาส ได้ผลผลิตไม่ต่างกัน

ส่วนการทดสอบกับฟางข้าวและขี้เถ้าหมัก ที่ จ.สุพรรณบุรี ได้ผลผลิตไม่ต่างกันจากการใช้เชื้อพันธุ์เห็ดเก็บรักษาในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 3 และ 6 เดือน และเมื่อทดสอบการเกิดดอกของเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง No. 5 ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 18 เดือน โดยการเพาะเลี้ยงกับวัสดุหมักในโรงเรือนพบว่า เชื้อเห็ดฟางสามารถให้ผลผลิตได้ดีเช่นเดิม

เชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่มีการย้ายต่อเส้นใยลงอาหาร PDA ใหม่หลาย ๆ ครั้ง มักพบโคลนที่มีเพียงเส้นใยอาหาร ซึ่งเส้นใยเจริญได้ช้ามาก ไม่เหมาะสำหรับการนำไปเพาะเลี้ยงเป็นการค้า การเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบนอาหาร PDA ไว้เป็นเวลานาน อาหาร PDA มักแห้งส่งผลให้เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางแห้ง และทำให้เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางตายหรือสูญเสียประสิทธิภาพบางอย่างไปด้วย การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบนอาหาร PDA ไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25-35°C ส่งผลให้อาหารที่เก็บเชื้อพันธุ์เห็ดฟางมักแห้งเร็วกว่าอาหารที่เก็บเชื้อพันธุ์เห็ดชนิดอื่นที่พักไว้ในห้องบ่มอุณหภูมิต่ำ อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบนอาหาร PDA มักใช้เก็บเชื้อพันธุ์เห็ดฟางเป็นระยะเวลาสั้น ๆ ไม่เกิน 3 สัปดาห์ เพื่อนำไปใช้งานขยายเส้นใยเชื้อพันธุ์ (ภาพที่ 4 (ก) )



ภาพที่ 4 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางในขวดแก้ว (ก) เก็บบนอาหารรุ้น (ข) เก็บในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง

สำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางเพื่อการค้า ลดต้นทุน จากการใช้อาหาร PDA ที่มีค่าใช้จ่ายในการเตรียมและต้องมีการถ่ายเชื้อพันธุ์เห็ดอย่างต่อเนื่อง โดย อัจฉรา (2553) ทำการตรวจสอบเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นปลอดเชื้อตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 - 2553 จำนวนกว่า 80 เชื้อพันธุ์ (เชื้อพันธุ์ที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยนำขึ้นมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ใหม่ เมื่อน้ำในขวดไวแอลระเหยไปเหลือเพียง 20%) พบว่า เชื้อพันธุ์ยังมีชีวิตและโคโลนีของเชื้อพันธุ์เห็ดฟางยังมีทั้งเส้นใยอาหารและเส้นใยอากาศสมบูรณ์ เมื่อทดสอบการเกิดดอกของเชื้อพันธุ์เห็ดฟางทั้งที่กรมวิชาการเกษตรและที่ฟาร์มจากการทดสอบของเกษตรกร พบว่าหลายเชื้อพันธุ์มีประสิทธิภาพดีในการให้ผลผลิตและสามารถนำเชื้อพันธุ์เห็ดฟางนั้นมาทดแทนเชื้อพันธุ์เห็ดฟางพันธุ์เดิมที่ประสิทธิภาพการเกิดดอกเสื่อมลง วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นอกจากการใช้ขวดไวแอลที่มีขนาดเล็กและอาจหาซื้อได้ยากในบางพื้นที่ ยังสามารถตัดแปลงขวดเก็บเชื้อมาเป็นขวดแก้วกลมหรือขวดแก้วแบนได้ดังภาพที่ 4 (ข) โดยขวดที่บรรจุน้ำต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แต่ละครั้งนึ่งฆ่าเชื้อห่างกัน 24 ชม. แต่ไม่ควรใส่น้ำกลั่นในขวดจนสูงเกินไปหรือน้อยเกินไป แล้วตัดชิ้นวุ้นใส่ลงไปขวดได้ประมาณ 15 – 20 ชิ้น วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน ต้นทุนไม่สูง ถ่ายทอดสู่เกษตรกรได้ และสามารถเก็บเชื้อได้เป็นระยะเวลาานาน แต่ควรตรวจสอบการระเหยของน้ำภายในขวดเป็นระยะ ซึ่งอาจส่งผลให้เชื้อตายได้หากน้ำภายในขวดระเหยจนหมด

การเก็บรักษาเชื้อเห็ดฟาง นอกจากการเก็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำกลั่นแล้ว วิธีการเก็บรักษาเชื้อเห็ดฟางในไนโตรเจนเหลวเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้ และสามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดได้ยาวนานกว่า 30 ปี (Joseph, 1977) โดยสุวลักษณ์ (2551) ศึกษาวิธีการลดอุณหภูมิและการหลอมละลายตัวอย่าง เพื่อใช้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางในไนโตรเจนเหลวจากเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง 2 สายพันธุ์ (เบอร์ 6 และ เบอร์ 8) โดยใช้วิธีการลดอุณหภูมิตัวอย่าง 2 วิธี คือ C1 : แช่แข็งในตู้เย็น  $-80^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ C2 : แช่ในแอลกอฮอล์และน้ำแข็งแห้งเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 12 และ 18 เดือน แล้วนำมาหลอมละลายตัวอย่าง 2 วิธี คือ T1 : วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ( $25 - 27^{\circ}\text{C}$ ) จนหลอมละลาย และ T2 : แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 2 – 3 นาที พบว่า เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางเบอร์ 6 ที่ลดอุณหภูมิตัวอย่างด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ ยังคงมีชีวิต 100% ยกเว้น กรรมวิธีที่ลดอุณหภูมิตัวอย่างโดยแช่ในแอลกอฮอล์และน้ำแข็งแห้งเป็นเวลา

4 ชั่วโมง แล้วหลอมละลายตัวอย่างโดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25 – 27°C (C2T1) หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 18 เดือน เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางมีชีวิตรอดลงเหลือ 60% อย่างไรก็ตามเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางเบอร์ 6 ที่ผ่านการทดลองด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ ยังสามารถเจริญและเกิดดอกได้ สำหรับเชื้อพันธุ์เห็ดฟางเบอร์ 8 จากกรรมวิธีการเก็บรักษาต่าง ๆ หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางเบอร์ 8 ยังคงมีชีวิต 100% สามารถเกิดดอกได้ และหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 12 และ 18 เดือน เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางมีชีวิตรอดอยู่ระหว่าง 60 – 100% และสามารถเกิดดอกให้ผลผลิตได้

## 5. เชื้อเห็ดชนิดอื่น ๆ

นอกจากเห็ดสกุลนางรม เห็ดหูหนู เห็ดกระด้าง และเห็ดฟางแล้วยังมีเห็ดชนิดอื่น ๆ ที่ได้รับการวิจัยเพื่อการเก็บรักษาเชื้อเห็ดอย่างมีประสิทธิภาพด้วย อาทิ

### เชื้อเห็ดขอนขาว

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดขอนขาวในระยะสั้น ๆ ใช้วิธีเก็บเส้นใยภายใต้ น้ำกลั่น บนเมล็ดข้าวฟ่างและบนอาหารขี้เลื่อย ถ้าย่อยทุก 6 เดือน ให้ผลดีตามลำดับ (ประไพศรี และอัญชลี, 2543) การควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษา ทำการวัดอัตราการเจริญของเส้นใยและเพาะทดสอบผลผลิตจากเส้นใยที่เก็บรักษาในแต่ละวิธี สำหรับการเก็บบนอาหาร PDA และภายใต้ไขมันแร่ พบอาการเสื่อมของเชื้อเห็ดทำให้ลักษณะหมวกดอกผิดปกติไม่สมบูรณ์

### เชื้อเห็ดหลินจือ

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดหลินจือใช้วิธีเก็บเส้นใยไว้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่อุณหภูมิตู้เย็น (0 - 14°C เฉลี่ย 4.2°C) ได้เป็นเวลา 1 และ 2 ปี โดยไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ การมีชีวิตรอด การเจริญของเส้นใยที่อุณหภูมิ 30°C และการให้ผลผลิตใกล้เคียงกับแม่เชื้อก่อนการเก็บรักษา (นิรนาม, 2546) ส่วนการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 - 35°C เฉลี่ย 29.5°C) และอุณหภูมิห้องเย็น (18 - 28°C เฉลี่ย 22.7°C) มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ และการปนเปื้อนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเก็บรักษา

### **เชื้อเห็ดแครง**

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดแครงในระยะสั้น ๆ (1 - 6 เดือน) โดยการเก็บในน้ำกลั่นให้ผลดีที่สุด (รัฐพล และคณะ, 2551) ซึ่งการควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษาทำการวัดความมีชีวิตรอดและวัดอัตราการเจริญของเส้นใยที่เก็บรักษา และการเก็บในน้ำมันแร่ บนอาหาร PDA และ ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ให้ผลดีตามลำดับ

### **เชื้อเห็ดถั่ว หรือเห็ดโคนน้อย**

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดถั่วหรือเห็ดโคนน้อยบนอาหาร PDA (รัฐพล และคณะ, 2551) ใช้เก็บรักษาเชื้อเห็ดในระยะสั้น ๆ (1 - 6 เดือน) ที่ได้ผลดีที่สุด การควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษาทำการวัดความมีชีวิตรอดและวัดอัตราการเจริญของเส้นใยที่เก็บรักษา สำหรับการเก็บในน้ำกลั่นใช้ได้ผลเช่นกัน แต่หากพิจารณาถึงความง่ายในการปฏิบัติงานของวิธีการและระยะเวลาเก็บรักษาแล้ว การเก็บรักษาบนอาหาร PDA สามารถปฏิบัติได้ง่ายกว่า และการเก็บรักษาในน้ำมันแร่ พบว่าการรอดชีวิตของเชื้อลดลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษา ส่วนการเก็บรักษาที่  $-20^{\circ}\text{C}$  เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ใช้ไม่ได้กับเชื้อพันธุ์เห็ดถั่วหรือเห็ดโคนน้อยเนื่องจากเส้นใยเห็ดไม่สามารถรอดชีวิตได้

## บทสรุป

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเก็บบนอาหารวุ้นและถ่ายเชื้อเป็นระยะ การเก็บในน้ำ การเก็บในวัสดุ และการเก็บในไนโตรเจนเหลว ซึ่งแต่ละวิธีใช้เก็บเชื้อพันธุ์เห็ดได้ในระยะเวลาที่แตกต่างกันทั้งระยะสั้น ระยะปานกลาง และระยะยาว การเลือกใช้วิธีการเก็บรักษาอย่างถูกต้องและเหมาะสมต่อเชื้อพันธุ์เห็ดแต่ละชนิดต้องสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการใช้งานและความพร้อมของแหล่งที่เก็บรักษา เพื่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดอย่างมีประสิทธิภาพ โดยยังคงความมีชีวิต (Viability) ความบริสุทธิ์ของเชื้อ (Purity) ความเสถียรของสายพันธุ์ (Stability) และความสามารถในการเกิดดอก (Productivity) ของเชื้อพันธุ์เห็ด ในการเก็บรักษาต้องมีการควบคุมคุณภาพ โดยตรวจสอบความมีชีวิตด้วยการนับจำนวนเชื้อพันธุ์เห็ดเก็บรักษาที่ฟื้นตัว (Recovery) การแยกชนิดและการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ วัตถุประสงค์ของเส้นใยและตรวจสอบการปนเปื้อน และการทดสอบความเสถียรและความสามารถในการเกิดดอก โดยนำไปเพาะเลี้ยง เป็นวิธีการยืนยันได้เป็นอย่างดีว่าเชื้อพันธุ์เห็ดที่เก็บรักษา ยังคงสภาพความแข็งแรงสามารถให้ผลผลิตได้ตรงตามลักษณะที่ดีของพันธุ์เห็ดชนิดนั้นๆ และในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยตรวจสอบ ทั้งความบริสุทธิ์และการตรงตามชนิดของเชื้อพันธุ์เห็ดที่เก็บรักษา ซึ่งสามารถช่วยย่นระยะเวลาในการตรวจสอบและสามารถตรวจสอบหลายตัวอย่างในคราวเดียวกันได้

## เอกสารอ้างอิง

- นิรนาม. 2546. พัฒนาวิธีการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์เห็ด. หน้า 163. ใน : สรุปผลงานวิจัย ปี 2545. ตามยุทธศาสตร์แผนงานวิจัย ปี 2546 ของกรมวิชาการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ประไพศรี พิทักษ์ไพรวิน และอัญชลี เชียงกุล. 2543. วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดขอนขาว. หน้า 38. ใน : บทความย่อและสรุปผลการดำเนินงาน ประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร ปี 2543. วันที่ 8-10 มีนาคม 2543. ณ โรงแรมลองบีช จ. เพชรบุรี.
- ยงยุทธ์ สายฟ้า สัญชัย ตันตยาภรณ์ สุธีรา โสภิตกุล และโอภาส มิตรมานะ. 2525. การทดลองเก็บเชื้อเห็ดฟางระยะยาวภายใต้น้ำมันแร่ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2525. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. หน้า 1-7.
- รัฐพล ศรประเสริฐ สุพิชชา ชัยวงศ์ผิน วชิราภรณ์ พิกุลทอง และอนงคณ์ หัมพานนท์. 2551. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) และเห็ดโคนน้อย (*Coprinus* sp.)
- สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ และประไพศรี พิทักษ์ไพรวิน. 2545. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมและเห็ดหูหนู. หน้า 61-75. ใน : เห็ดไทย 2545. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย.
- สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวิน พิมพ์กานต์ อร่ามพงษ์พันธ์ สุทธิณี เจริญคิด และสมพงษ์ อังโฆรัมย์. 2546. ผลของวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ต่อการเจริญและผลผลิตเห็ดกระด้าง. 2546. หน้า 44. ใน : เอกสารรายงานผลการปฏิบัติงานวิจัยรายกิจกรรมประจำปี 2546. การประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ปี 2546. วันที่ 7-9 มีนาคม 2546. ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จ. ชลบุรี.
- สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ. 2548. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสด หรือเห็ดลม หรือเห็ดกระด้างในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อและบนอาหารซีลี้อย่างหนึ่งฆ่าเชื้อ. ข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด ปีที่ 10 ฉบับที่ 1 (มกราคม-เมษายน 2548) : 3-6.



- สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ. 2551. การเก็บรักษาเชื้อเห็ดฟางในไนโตรเจนเหลว. หน้า 451 – 458. ใน : เอกสารเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 46 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. วันที่ 29 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์ 2551.
- อัจฉรา พยัพพานนท์ และ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ. 2543. การมีชีวิตรอดของเชื้อเห็ดฟางใน น้ำกลั่น. เอกสารประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. วันที่ 8-10 มีนาคม 2543. โรงแรมลองบีช อ.ชะอำ จ. เพชรบุรี. หน้า 37.
- อัจฉรา พยัพพานนท์ และ ศุภนิത്യ หิรัญประดิษฐ์. 2546. การเก็บรักษาเชื้อเห็ดฟางบน อาหารแข็ง. การประชุมวิชาการประจำปี 2546. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. วันที่ 7 – 9 มีนาคม 2546. โรงแรมแอมบาสเตอร์ซิตี จอมเทียน จ.ชลบุรี. หน้า 46.
- อัจฉรา พยัพพานนท์. 2553. เห็ดฟางและเทคโนโลยีการผลิตในโรงเรือน. โรงพิมพ์ชุมนุม สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ. 122 หน้า.
- Chang, S. T. and P. G. Miles. 2004. *Culture preservation*. Pages 189-201. In: *Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and 194 environmental impact* (eds ST Chang ST PG Miles). CRC press. Boca Raton. Florida
- Joseph, C .K. 1977. A better method for long-term storage of mushroom cultures. *Mushr. J. of Wild Mushr.* 16: 30-31.
- Joseph, C.K. 1998. Resurrecting a better method for long-term storage of mushroom cultures.  
<http://www.mycoculture.org/extras/jjkish-culture-stroge-technique>.  
 Or <http://www.mycoculture.org/archivehome.html>.
- McGinnis, M. R. ; A.A. Padhye and L. Ajello. 1974. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Applied Microbiology* 28: 218-222.
- Odds, F. C. 1991. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in Water. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 29: 413-415.

- Singh, S. K.; R.C. Upadhyay; S. Kamal and M. Tiwari. 2004. Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yield and genetic stability. *CryoLetters* 25: 23-32.
- Smith, D. and A.H.S. Onions. 1994. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. 2<sup>nd</sup> Edition. IMI Technical Institute, CAB International. 122 p.
- Zaghi, L. L. Jr.; A.D. Lopes; F.A. Cordeiro; I.M. Colla; M.B.D. Beteli; J.S. do Valle; G.A. Linde; N.B. Colauto. 2017. Cryopreservation at -75 °C of *Agaricus subrufescens* on wheat grains with sucrose. *Brazilian Journal of Microbiology* 49: 370-377.

## ผู้ทรงคุณวุฒิ

ดร. สัตยชัย ตันตยาภรณ์

ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตรด้านความร่วมมือระหว่างประเทศ

### คณะกรรมการจัดการความรู้ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นายदनัย นาคประเสริฐ ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ปรึกษาคณะกรรมการ

นางสุวลักษณ์ ชัยชูโชติ นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ ประธานคณะกรรมการ

น.ส.รัชฎาภรณ์ ทองเหม นักวิชาการเกษตรชำนาญการ คณะทำงาน

นายอนุสรณ์ วัฒนกุล นักวิชาการโรคพืชปฏิบัติการ คณะทำงาน

น.ส.จิตรา กิตติโมรากุล นักวิชาการโรคพืชปฏิบัติการ คณะทำงานและเลขานุการ





## การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด (Preservation of Mushroom Cultures)

กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว  
เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900