รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเห็ด

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเห็ดเศรษฐกิจสายพันธุ์ใหม่

กิจกรรม : เห็ดที่มีศักยภาพ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : รวบรวม จำแนกลักษณะและศึกษาการเกิดดอกของเห็ดลิ้นกวาง (*Fistulina hepatica* (Schaeff.) With.)

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Collection, Characterize and Fruitification of *Fistulina hepatica* (Schaeff.) With.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายกรกช จันทร

ผู้ร่วมงาน : นายอนุสรณ์ วัฒนกุล นางสาววราพร ไชยมา

หน่วยงานต้นสังกัด : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดลิ้นกวางช่วงฤดูฝน ในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2556 ในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ พบเห็ดลิ้นกวาง จำนวน 5 ไอโซเลต คือ Fh001, Fh002, Fh005, Fh006 และ Fh007 และได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 2 ไอโซเลต จากสาขาวิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คือ NN1 (Fh003) และ PR (Fh004) การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง 7 ไอโซเลต บนอาหารวุ้น 6 ชนิด ที่บ่มเชื้อใน 2 สภาพคือ สภาพปรกติและสภาพมืด พบว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001, Fh002, Fh005 และ Fh007 มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดบนอาหาร PMP ซึ่งการเจริญของเชื้อเห็ดไม่แตกต่างกันทั้งที่เลี้ยงใน 2 สภาพ เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh003 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร PMP ในสภาพมืดได้ดีกว่าสภาพมีแสงปรกติ เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh004 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GPA ทั้งที่เลี้ยงใน 2 สภาพไม่แตกต่างกัน และเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh006 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA ในสภาพมืดดีกว่าสภาพมีแสงปรกติ การศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต ที่

คัดเลือกมา คือ Fh001 Fh002 Fh005 และ Fh006 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน 7 ชนิด และแหล่งไนโตรเจน 6 ชนิด ที่แตกต่างกัน พบว่า เชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลต เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแมนโนสเป็นองค์ประกอบ ในส่วนของแหล่งไนโตรเจน เชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต มีการเจริญได้ดีบนอาหารพื้นฐานที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกัน การเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต ที่ช่วงอุณหภูมิต่างๆ 5 ระดับ พบว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวางทุกไอโซเลตเจริญได้ดีที่สุดที่ช่วงอุณหภูมิ 25-27°c (อุณหภูมิห้อง) และรองลงมาที่ช่วงอุณหภูมิ 25°c ในการเตรียมเชื้อขยายเห็ดลิ้นกวางบนเมล็ดข้าวฟ่าง พบว่าการบ่มเส้นใยในสภาพปรกติและในสภาพมืด เห็ดลิ้นกวาง Fh002 มีอัตราการเจริญสูงกว่าเห็ดลิ้นกวาง Fh005, Fh006 และ Fh001 ตามลำดับ ซึ่งในการทดสอบวัสดุเพาะ 3 สูตรในเบื้องต้นกับเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 โดยบ่มก้อนเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) ในสภาพไม่มีแสง พบว่าที่ 15 วัน หลังจากใส่เชื้อขยาย เส้นใยของเชื้อเห็ดเริ่มเจริญลงไปบนวัสดุเพาะ และที่ 30 วัน เชื้อเห็ดบนวัสดุเพาะสูตร 3 (ขี้เลื่อยไม้ยางพารา : ข้าวฟ่างต้มสุก : ปูนขาว : ดีเกลือ อัตรา 100 : 50 : 1: 0.2 กิโลกรัม) เจริญเร็วกว่าวัสดุสูตร 2 (ขี้เลื่อยไม้ยางพารา : รำละเอียด : ปูนขาว : ดีเกลือ อัตรา 100 : 50 : 1: 0.2 กิโลกรัม) และสูตร 1 (ขี้เลื่อยไม้ยางพารา : รำละเอียด : ปูนขาว : ดีเกลือ อัตรา 100 : 5 : 1: 0.2 กิโลกรัม) ตามลำดับ นำสูตรวัสดุเพาะทั้ง 3 สูตร ไปใช้ในการศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง ทั้ง 4 ไอโซเลต พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 12 วัน เชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลต ไม่มีการเจริญของเส้นใยลงบนวัสดุเพาะสูตรใดเลย ซึ่งแตกต่างจากการทดสอบในเบื้องต้นกับเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 และเมื่อเวลาผ่านไปก้อนเชื้อเห็ดแสดงการปนเปื้อนของราดำและราเขียว จึงยังไม่ได้ข้อสรุปที่ชัดเจนถึงสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดลิ้นกวาง อย่างไรก็ตามในการทดสอบเบื้องต้นกับเห็ดลิ้นกวาง Fh001 นั้น ก้อนเชื้อเห็ดที่เส้นใยเจริญเต็มแล้ว ย้ายมาบ่มในสภาพมีแสงสว่างเพื่อให้เส้นใยแก่และกระตุ้นให้เกิดการสร้างตุ่มดอก พบว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 บนวัสดุเพาะสูตร 1 เท่านั้นที่มีการสร้างตุ่มดอกเกิดขึ้น เมื่อย้ายก้อนเชื้อไปบ่มเลี้ยงต่อที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 23-25°c ดอกเห็ดลิ้นกวางจะเจริญพัฒนาจนอยู่ในช่วงที่มีลักษณะเหมาะสมแก่การเก็บผลผลิตได้ เมื่อเวลาผ่านไป 5-7 วัน

6. คำนำ

ประเทศไทยมีพื้นที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นแถบเส้นศูนย์สูตร มีทรัพยากรป่าไม้และระบบนิเวศต่างๆ ที่ค่อนข้างสมบูรณ์ ส่งผลให้มีความหลากหลายทางชีวภาพของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ จากการที่ประเทศไทยมีสภาพอากาศร้อนชื้นจึงเหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฤดูฝน ซึ่งเห็ดราถือเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งในระบบนิเวศวิทยา มีส่วนสำคัญในฐานะเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารในธรรมชาติ เห็ดราที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชมีส่วนช่วยในการจัดหาธาตุอาหารที่จำเป็นต่อเจริญเติบโตของพืช เห็ดราหลายชนิดยังมี

ความสำคัญในด้านการนำมาใช้เป็นอาหารและยาสมุนไพร (Mello et al., 2006) เห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อราที่มีขนาดใหญ่ ลักษณะโดยทั่วไปประกอบด้วยส่วนหมวกดอก (cap) ส่วนครีบ (gills) หรือรูใต้ดอก (pores) และก้านดอก (stipe) แต่เห็ดก็ไม่ได้หมายถึงดอกเห็ดที่มีลักษณะเป็นหมวก มีส่วนของก้านดอกและมีครีบใต้ส่วนหมวกเท่านั้น ยังรวมถึงเห็ดราอื่นๆที่มีการรวมตัวกันของเส้นใยเกิดเป็นดอกเห็ด อาจมีเนื้อนุ่ม แข็ง หรือเหนียว โดยอาจมีส่วนหมวกดอกหรือไม่มีก็ได้ (ราชบัณฑิตยสถาน, 2539) การดำรงชีวิตของเห็ดแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ

1. Saprophytes เห็ดรากลุ่มนี้ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายเศษซากต่างๆในระบบนิเวศ ให้กลายเป็นธาตุอาหารลงสู่ดิน

2. Parasites เห็ดรากลุ่มนี้ได้รับสารอาหารจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เห็ดราที่ดำรงชีวิตแบบนี้อาจก่อให้เกิดโรคกับต้นพืชที่อาศัยร่วมอยู่ด้วย หรือทำให้ต้นพืชเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าที่ควร

3. Mycorrhiza เห็ดรากลุ่มนี้ดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (symbiosis) การเป็นมายคอไรซาของเห็ดนั้นมีส่วนช่วยให้พืชอาศัยดูดธาตุอาหารได้มากขึ้น อีกทั้งช่วยป้องกันการเข้าทำลายจากเชื้อสาเหตุของโรคพืชด้วย (Smith and Read, 1997)

เห็ดมีความสำคัญต่อมนุษย์อย่างมากทั้งในด้านการนำมาเป็นอาหาร ยาตลอดจนด้านสิ่งแวดล้อม โดยมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศวิทยาเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสมบูรณ์ของสภาพป่าไม้ ในอดีตมนุษย์รู้จักแต่การนำเห็ดมาปรุงหรือประกอบเป็นอาหารเท่านั้น แต่แท้จริงแล้วเห็ดยังสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรค โดยนำมาเป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงร่างกาย ตลอดจนใช้เป็นยาสมุนไพรในการบำบัดรักษาโรค ปัจจุบันมีการศึกษาและวิจัยทางด้านเห็ดมากขึ้น พบว่าเห็ดมีคุณประโยชน์ต่อสุขภาพสูง โดยสามารถสกัดสารที่มีประโยชน์จากเห็ดมาใช้ สามารถแบ่งกลุ่มของเห็ดตามการนำไปใช้ประโยชน์ได้ 2 กลุ่ม คือ

1. เห็ดใช้เป็นอาหาร (Dietary mushrooms) เป็นกลุ่มเห็ดที่นำมาใช้ในการประกอบอาหาร เนื่องจากหาได้ง่าย ราคาถูก มีรสชาติดี มีคุณค่าทางอาหารสูง ทางด้านโภชนาการพบว่าเห็ดมีสารอาหารค่อนข้างครบถ้วนสมบูรณ์ อุดมไปด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต เยื่อใย วิตามิน และมีปริมาณไขมันและแครอลี่ต่ำ (Sadler, 2003; Bernas *et al*., 2006) ตลอดจนเป็นแหล่งรวมสารอาหารชนิดอื่นๆด้วย เช่น โปแตสเซียม ฟอสฟอรัส เหล็กและแมกนีเซียม รวมถึงวิตามิน B ชนิดต่างๆ วิตามิน C และ D (Sadler, 2003; Sanmee *et al*., 2003; Bernas *et al*., 2006)

2. เห็ดที่ใช้เป็นยาสมุนไพร (Medicinal mushrooms) เป็นกลุ่มเห็ดที่มีคุณสมบัติทางยาหรือเป็นสมุนไพร ในอดีตในประเทศจีน ญี่ปุ่น นิยมนำเห็ดมาใช้เป็นสมุนไพร เห็ดที่นิยมนำมาเป็นสมุนไพรกันอย่าง

แพร่หลาย คือ เห็ดหลินจือ (ศิริวรรณ และไมตรี, 2543) โดยนำมาเป็นยาอายุวัฒนะมีส่วนช่วยให้ผู้บริโภคมีอายุยืน ต่อมาแพร่หลายไปทางยุโรปและอเมริกา ในประเทศไทยนำเห็ดที่เจริญบนไม้ผุมาผสมเป็นยาใช้ในทางการแพทย์สมุนไพร เช่น เห็ดโคนซึ่งมีรสหวาน ใช้เป็นยาบำรุงกำลัง ช่วยในการย่อยอาหาร ละลายเสมหะ และลดการคลื่นไส้อาเจียน เห็ดแครง ใช้แก้อาการอ่อนเพลีย รักษาโรคของสตรี เห็ดตับเต่า แก้ไข้หวัด ลดอาการปวดในข้อ รักษาการตกขาว เป็นต้นเห็ดนับว่าเป็นแหล่งผลิตผลิตภัณฑ์ทางยาตัวใหม่ ๆ สารที่สกัดจากเห็ดบางชนิดมีคุณสมบัติในการต่อต้านการเกิดเนื้องอก กระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดโคลเลสเตอรอลในเลือด ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เห็ดหลายชนิดมีสาร polysaccharide เป็นองค์ประกอบในดอกเห็ด เส้นใย สารนี้ส่วนใหญ่มีโครงสร้างหลักของ glucan มีส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการระงับการเจริญของมะเร็ง โดยกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิกันโดยเฉพาะ T- Cell เพื่อต่อต้านเซลล์มะเร็ง (Wasser, 2002) จากสรรพคุณทางยาต่างๆของเห็ด ทำให้วงการแพทย์และเภสัชกรรมค้นหาเห็ดที่มีศักยภาพในการผลิตสารที่มีประโยชน์ เพื่อนำมาผลิตยาสำหรับรักษาโรคมะเร็งและระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ซึ่งยังไม่มียาชนิดใดรักษาได้ในปัจจุบัน

เห็ดลิ้นกวาง (*Fistulina hepatica* Schaeff. ex.;Fr) ชื่อสามัญ Beef steak mushroom หรือ Ox tongue จัดอยู่ในวงศ์ Fistulinaceae ดอกเห็ดมีรูปร่างคล้ายลิ้น พัดหรือช้อน ผิวเรียบหรือปกคลุมด้วยขนเล็กน้อย ผิวเป็นเมือกเหนียว มีสีของดอกเห็ดแตกต่างกันไปตามช่วงการเจริญของเห็ด ตั้งแต่สีแดง แดงอมส้ม จนถึงแดงเข้มหรือน้ำตาลแดง ด้านใต้ดอกเห็ดเป็นรูสีขาวถึงชมพูอมเหลือง รูลักษณะเป็นหลอดแยกกัน ก้านดอกสั้นติดด้านข้างหรืออาจไม่พบส่วนก้าน เนื้อในดอกคล้ายสเต็ก (นิวัฒ, 2553) พบได้ในสภาพป่าธรรมชาติ ดำรงชีวิตแบบปรสิต เป็นสาเหตุของโรค brown rot พบว่ามักเจริญอยู่กับไม้ยืนต้นโดยเฉพาะจำพวกต้นโอ๊ค หรือ chestnut (Ribeiro *et al*., 2007) เป็นที่ทราบกันดีในหมู่นักเดินป่าว่าเห็ดลิ้นกวางสามารถรับประทานได้ เมื่อนำมาปรุงเป็นอาหารแล้วมีรสชาติดีมาก (Hattori and Tanaka, 1997) โดยนิยมนำเห็ดมาทอดกับเนย ย่าง ต้ม นำมารับประทานกับสลัด (Wu *et al*., 2007) หรือนำเห็ดมาทำเป็นสเต็กแทนเนื้อสัตว์ เนื่องจากเนื้อในของดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายเนื้อวัวดิบ ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนสำหรับผู้ที่รับประทานมังสวิรัติ

เห็ดลิ้นกวางนอกจากเป็นเห็ดที่นำมารับประทานได้ ยังมีการศึกษาวิจัยในการนำสารสำคัญต่างๆที่มีในเห็ดมาใช้ประโยชน์ การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่พบในเห็ดลิ้นกวาง การสกัดสาร secondary metabolites โดยมุ่งเน้นไปที่สารประกอบ acetylenic เป็นหลัก เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ การศึกษาของ Huffman (2002) พบสารประกอบในกลุ่ม polyacetylenic alcohol สามารถยับยั้งกิจกรรม ของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (Oxford

strain) และ *Salmonella typhi* (strain Miss S) และสามารถยับยั้งกิจกรรม ของเชื้อแบคทีเรีย อื่นๆ ได้ เช่น *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Klebsiella pneumoniae* (Coletto, 1981; Coletto, 1992) การศึกษาของ อรอนงค์ (2551) ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อเห็ดลิ้นกวางต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในคน พบว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวางสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* และ *Shigella* sp. ได้ดี เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี Dual culture ทั้งนี้เห็ดลิ้นกวางยังมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว จึงมีการนำมาสกัดสารระเหย (volatile compounds) จากส่วนดอกหรือเส้นใยของเห็ด (Wu *et al*., 2005; Wu *et al*., 2007) ในด้านคุณสมบัติทางการแพทย์ของเห็ดลิ้นกวาง สารสำคัญในเห็ดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Ribeiro *et al.*, 2007) ต้านมะเร็ง (Othsuka *et al.*, 1973) ต่อต้านเนื้องอก (Hattori and Tanaka, 1997) เป็นแหล่งของสารต้านมะเร็งหรือสารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Wasser, 2002)

ปัจจุบันจำนวนประชากรโลกมีแนวโน้มสูงขึ้น ความต้องการปัจจัยต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นอาหาร ยารักษาโรค หรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ ของประชากรก็เพิ่มตามไปด้วย การนำเห็ดป่าที่รับประทานได้มาศึกษา วิจัยและพัฒนาจนถึงขั้นที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ รวมถึงความต้องการพันธุกรรมจากความหลากหลายนั้น เพื่อนำมาปรับปรุงพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณที่มากพอกับความต้องการของประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นนั้น เป็นอีกหนึ่งแนวทางที่จะช่วยให้ความเป็นอยู่ของมนุษยชาติดีขึ้น เห็ดเป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีคุณประโยชน์ยิ่งในหลาย ๆ ด้าน การศึกษาและรวบรวมเห็ดป่ารับประทานได้ จึงเป็นงานด้านการเกษตรที่สำคัญเพื่อตอบสนองความต้องการของมนุษย์ เห็ดลิ้นกวางเป็นเห็ดป่าอีกชนิดหนึ่งที่สามารถรับประทานได้ ในต่างประเทศนำมาประกอบอาหาร มีรสชาติดี อีกทั้งสารต่างๆในเห็ดชนิดนี้ยังมีประโยชน์ในหลายๆด้าน เช่น สรรพคุณทางยา หรือยับยั้งเชื้อจุลินทีรย์ เป็นต้น พบว่าเห็ดลิ้นกวางสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเห็ดได้ในสภาพควบคุม (Hattori and Tanaka, 1997) และในประเทศไทยมีรายงานการพบเห็ดชนิดนี้ (อรอนงค์, 2551; นิวัฒ, 2553) ถึงอย่างไรก็ตามก็ยังไม่มีการนำเห็ดชนิดนี้มาใช้ประโยชน์อย่างแท้จริง ตลอดจนยังไม่มีการวิจัยถึงการหาวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดลิ้นกวางในเบื้องต้น ดังนั้นการศึกษา รวบรวมสายพันธุ์เห็ดลิ้นกวางจากธรรมชาติ รวมถึงการหาวิธีการกระตุ้นให้เกิดดอกของเห็ดลิ้นกวางในเบื้องต้น จึงเป็นงานหนึ่งที่มีความสำคัญและควรดำเนินการ การวิจัยนี้จึงเป็นการเก็บรวบรวมเห็ดลิ้นกวางจากสภาพธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อการรวบรวมสายพันธุ์ของเห็ดชนิดนี้ไว้ใช้ในการศึกษา หรือนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต ได้นำข้อมูลที่ได้นั้นมาปรับปรุงลักษณะพื้นฐานทางนิเวศวิทยาของการเจริญของดอกเห็ดนั้น ๆ และเป็นตัวอย่างการศึกษาเพื่อการอนุรักษ์เห็ดลิ้นกวางต่อไปในอนาคต

7. วิธีดำเนินการ

7.1 รวบรวมและเก็บตัวอย่างสายพันธุ์เห็ดลิ้นกวางจากธรรมชาติในประเทศไทย

7.1.1 การเก็บตัวอย่างและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บรวบรวมตัวอย่างและบันทึกภาพตัวอย่างของเห็ดลิ้นกวาง จดบันทึกข้อมูลสถานที่เก็บชนิดของพืชอาศัยที่เห็ดเจริญอยู่ด้วย จากนั้นนำตัวอย่างเห็ดที่เก็บรวบรวมได้มาบันทึกข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาต่อไป

7.1.2 การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา

จดบันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของเห็ดลิ้นกวางระดับที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic) ได้แก่ ลักษณะหมวกและก้านดอก ขนาด สี รูปร่าง ลักษณะของรูใต้หมวกดอก สี ขนาด และลักษณะสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic) นำเนื้อเยื่อในส่วน hymenophore มาตัดเป็นแผ่นบางๆ มาทำสไลด์ในน้ำเปล่า และสารตัวกลางโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 3% และน้ำยาเมลเซอร์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ บันทึกภาพและข้อมูลรูปร่างและขนาดของสปอร์ และแบสิเดียม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

7.2 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดลิ้นกวาง

7.2.1 อาหารวุ้น

ศึกษาการเจริญของเส้นใยของเห็ดลิ้นกวาง 7 ไอโซเลต บนอาหารวุ้น 6 ชนิด ในสภาพบ่มเลี้ยงที่ต่างกัน โดยทดสอบบนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเชื้อเห็ดในแนวระดับ (linear growth rate) วางแผนการทดลองแบบ 6 x 2 Factorial in CRD (complete randomized design) โดยปัจจัยแรก คือ สูตรอาหาร 6 ชนิด ได้แก่ PDA (Poteto dextose agar) เป็น control, CMA (Corn meal agar), GPA (Glucose peptone agar), MEA (Malt extract agar), PDPYA (Potato dextrose peptone yeast agar) และ PMP (Potato malt peptone agar) และปัจจัยที่สอง คือ สภาพที่ใช้บ่มเลี้ยงเชื้อเห็ด ได้แก่ สภาพปกติ และ สภาพมืด กำหนดกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ (แต่ละซ้ำประกอบด้วย 3 จานเลี้ยงเชื้อ) หลังจากปลูกเชื้อเห็ดลิ้นกวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) วัดการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อเห็ด โดยวัดจากขนาดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ที่อายุ 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 วัน ตามลำดับและประเมินความหนาแน่นของเส้นใยโดยสายตา

7.2.2 แหล่งคาร์บอน

ศึกษาการเจริญของเส้นใยของเห็ดลิ้นกวาง 7 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (basal medium) ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ (แต่ละซ้ำประกอบด้วย 3 จานเลี้ยงเชื้อ) แหล่งคาร์บอน 7 ชนิด ที่ใช้คือ กลูโคส (glucose), เซลลูโลส (cellulose), ซูโครส (sucrose), แป้ง (soluble starch), ฟรุคโตส (fructose), แมนโนส (mannose) และเดกซ์โตส (dextrose) อาหารทุกสูตรที่ทำการทดลองใช้จำนวน 25 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) วัดการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อที่อายุ 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 วัน ตามลำดับและประเมินความหนาแน่นของเส้นใยโดยสายตา

7.2.3 แหล่งไนโตรเจน

ศึกษาการเจริญของเส้นใยของเห็ดเห็ดลิ้นกวาง 7 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (basal medium) ที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 6 ชนิด วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ (แต่ละซ้ำประกอบด้วย 3 จานเลี้ยงเชื้อ) แหล่งไนโตรเจน 6 ชนิด ที่ใช้ คือ เปปโตน (peptone), โปรแตสเซียมไนเตรต (KNO_3), ยูเรีย (urea), แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) อาหารทุกสูตรที่ทำการทดลองใช้จำนวน 25 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) วัดการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อที่อายุ 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 วัน ตามลำดับและประเมินความหนาแน่นของเส้นใยโดยสายตา

7.2.4 อุณหภูมิ

ศึกษาช่วงอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเลี้ยงเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง 7 ไอโซเลต วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย อุณหภูมิ 5 ระดับ กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ (แต่ละซ้ำประกอบด้วย 3 จานเลี้ยงเชื้อ) ช่วงอุณหภูมิที่ทดสอบ คือ อุณหภูมิห้อง เป็น control, 15°c, 20°c, 25°c และ 30°c ปลูกเชื้อเห็ดบนอาหาร PDA ใช้อาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อเห็ด โดยวัดจากขนาดความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ที่อายุ 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 และ 30 วัน ตามลำดับและประเมินความหนาแน่นของเส้นใยโดยสายตา

7.3 ศึกษาการเตรียมเชื้อเห็ดบนเมล็ดข้าวฟ่าง

ศึกษาการทำหัวเชื้อขยายเห็ดลิ้นกวางบนเมล็ดข้าวฟ่าง ในสภาพการบ่มที่ต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเส้นใย และความหนาแน่นของเส้นใย วางแผนการทดลอง

แบบ 4 x 2 Factorial in CRD โดยปัจจัยแรก คือ เชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต คือ Fh001, Fh002, Fh005 และ Fh006 และปัจจัยที่สองคือ สภาพที่ใช้บ่มเลี้ยงเชื้อเห็ด ได้แก่ สภาพปกติ และ สภาพมืด กำหนดกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ (แต่ละซ้ำประกอบด้วย 3 ขวด)

เลี้ยงเชื้อเห็ดลิ้นกวางบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อเห็ดลิ้นกวางอายุ 25 วัน ตัดปลายเส้นใยเชื้อเห็ดลิ้นกวางจากอาหาร PDA ลงในเมล็ดข้าวฟ่างต้มสุกที่บรรจุในขวดแก้วทนร้อน ขวดละ 150 กรัม ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที โดยวางชิ้นวุ้นเชื้อเห็ดที่ผิวด้านบนเมล็ดข้าวฟ่าง บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) หลังจากปลูกเชื้อ 12 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยบนข้าวฟ่าง และประเมินความหนาแน่นของเส้นใยบนเมล็ดข้าวฟ่าง เก็บข้อมูลการเจริญของเชื้อเห็ดทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 45 วัน

7.4 ศึกษาการเจริญของเส้นใยบนก้อนวัสดุเพาะสูตรต่างๆ

ศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต คือ Fh001, Fh002, Fh005 และ Fh006 บนวัสดุเพาะในถุงพลาสติก วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วยวัสดุที่เพาะ 3 สูตร กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ (แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนวัสดุเพาะ 6 ก้อน)

สูตรที่ 1 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา + รำละเอียด อัตราส่วน 100:5 กิโลกรัม (โดยน้ำหนักแห้ง)

สูตรที่ 2 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา + รำละเอียด อัตราส่วน 100:50 กิโลกรัม (โดยน้ำหนักแห้ง)

สูตรที่ 3 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา + ข้าวฟ่างต้มสุก อัตราส่วน 100:50 กิโลกรัม (โดยน้ำหนักแห้ง)

แต่ละสูตรนำมาผสม ปูนขาว + ดีเกลือ อัตราส่วน 1:0.2 กิโลกรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) นำวัสดุแต่ละสูตรผสมให้เข้ากัน ใส่น้ำทำให้มีความชื้นประมาณ 65 % บรรจุถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 2.5 x 11.5 นิ้ว ถุงละ 300 กรัม อัดวัสดุให้แน่นพอสมควร ใส่คอพลาสติกและอุดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากก้อนวัสดุเพาะเย็นลง จึงเขี่ยเชื้อเห็ดลิ้นกวางแต่ละตัวอย่างที่เลี้ยงไว้ในเมล็ดข้าวฟ่างลงไป 1 ช้อนต่อถุง นำก้อนบ่มเลี้ยงไว้ในอุณหภูมิห้อง (25-27°c) ในสภาพไม่มีแสง เริ่มวัดการเจริญเส้นใยบนก้อนวัสดุเพาะหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 15 วัน เก็บข้อมูลการเจริญของเชื้อเห็ดทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 45 วัน ตั้งแต่ปากถุงจนถึงจุดสิ้นสุดการเจริญของเส้นใย และประเมินความหนาแน่นของเส้นใยบนวัสดุเพาะ

7.5 ศึกษาการเกิดดอกบนวัสดุเพาะในถุงพลาสติก

ก้อนเชื้อเห็ดลิ้นกวางที่เตรียมในข้อ 7.4 หลังจากบ่มก้อนเชื้อในสภาพไม่มีแสง เป็นเวลา 50 วัน จึงย้ายก้อนเชื้อมาบ่มต่อในสภาพมีแสงสว่าง ทิ้งไว้ให้เส้นใยแก่ 15-20 วัน และเพื่อกระตุ้นการสร้างตุ่มดอก

เห็ด จากนั้นกรีดถุงพลาสติกบริเวณที่มีการสร้างตุ่มดอก แล้วนำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ 23-25°c ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 70% จนกระทั่งเห็ดออกดอกสามารถเก็บผลผลิตได้ เก็บข้อมูลปริมาณผลผลิตที่ได้ในแต่ละการทดลอง และเปรียบเทียบผลผลิตของเห็ดลิ้นกวางแต่ละสายพันธุ์โดยคำนวณจากสูตร

$$B.E. (\%) = \frac{\text{น้ำหนักเห็ดสดที่ได้รับ} \times 100}{\text{น้ำหนักวัสดุแห้งที่ใช้เพาะ}}$$

จดบันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ เช่น ขนาดดอกเห็ด ทำการวัดขนาด ดูรูปร่างของดอกเห็ด สี ลักษณะรูปร่าง และบันทึกภาพเห็ดลิ้นกวางแต่ละสายพันธุ์ไว้

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. สวนป่า แหล่งธรรมชาติ และอุทยานแห่งชาติ ในประเทศไทย
2. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 รวบรวมและเก็บตัวอย่างสายพันธุ์เห็ดลิ้นกวางในประเทศไทย และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดลิ้นกวางระหว่างปี พ.ศ. 2554-2556 ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม ในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ พบเห็ดลิ้นกวาง จำนวน 5 ไอโซเลต โดยในปี พ.ศ. 2554 พบ 1 ไอโซเลต ในปี พ.ศ. 2555 พบ 1 ไอโซเลต และในปี พ.ศ. 2556 พบ 3 ไอโซเลต สามารถพบเห็ดลิ้นกวางเจริญอยู่บนไม้ยืนต้นหรือตอไม้ จำพวกไม้ตระกูลก่อ (Fagaceae) บริเวณลำต้น โพรงไม้หรือโคนต้นพืชอาศัย และตัวอย่างเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 2 ไอโซเลต ได้รับความอนุเคราะห์จาก สาขาวิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตารางที่ 1

สัณฐานวิทยาของเห็ดลิ้นกวาง ดอกเห็ดขนาด 6-15 x 5-8 เซนติเมตร หนา 1.7-4.5 เซนติเมตร รูปร่างคล้ายลิ้น ช้อนหรือพัด ผิวดอกด้านบนเหนียวหนืด มีปุ่มเล็กๆ สีส้มอมแดงอ่อน แดงจนถึงแดงเข้ม ด้านใต้ดอกเห็ด (pore surface) มีลักษณะเป็นรูขนาดเล็กจำนวนมาก สีขาวอมเหลือง เหลืองอ่อน เหลืองจนถึงแดงอมส้ม ตามช่วงการเจริญ ขนาดรูยาว 8-15 มิลลิเมตร แยกออกจากกัน จำนวนรู 3-6 รูต่อมิลลิเมตร เนื้อในดอกเห็ดสีชมพูถึงแดง มีลายเส้นสีขาว สปอร์ขนาด 3-4 x 4-5.5 ไมโครเมตร รูปไข่ ผิวเรียบ ผนังบาง พิมพ์สปอร์สีครีม ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 1

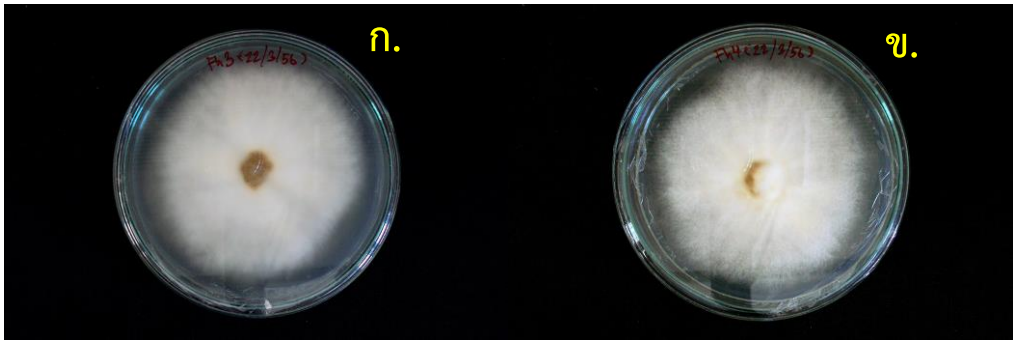
ตารางที่ 1 เห็ดลิ้นกวางไอโซเลตต่างๆ ที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ไอโซเลต	พรรณไม้	สถานที่ที่พบ/แหล่งที่มา	บริเวณที่พบบนพืชอาศัย	ปีที่เก็บตัวอย่าง
Fh001	Fagaceae	หน่วยพิทักษ์ป่าซำบอน อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	โพรงไม้บนลำต้นพืช	2554
Fh002	Fagaceae	หน่วยพิทักษ์ป่าซำบอน อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	โพรงไม้บนลำต้นพืช	2555
Fh003 (NN1)	-	ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจาก สาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	-	-
Fh004 (PR)	-	ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจาก สาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	-	-
Fh005	Fagaceae	หน่วยพิทักษ์ป่าซำบอน อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	บนลำต้นพืช	2556
Fh006	Fagaceae	หน่วยพิทักษ์ป่าซำบอน อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	บนลำต้นพืช	2556
Fh007	Fagaceae	หน่วยพิทักษ์ป่าซำบอน อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	โคนต้นพืช	2556

ตารางที่ 2 สัณฐานวิทยาของเห็ดลิ้นกวางที่เก็บรวบรวมจากธรรมชาติในประเทศไทย

ไอโซเลต	หมวกเห็ด			ใต้หมวกดอก		สปอร์		
	รูปร่าง	สี	ขนาด[กxยxน] (ซม.)	สี	จำนวนรู/มม.	รูปร่าง	สี	ขนาด (μm)
Fh001	คล้ายพัด	ส้มอมแดง	10.2 x 8.5 x 2.4	เหลืองอ่อน	3-5	ellipsoid	ครีม	3-4 x 5-5.5
Fh002	คล้ายลิ้น	ส้มอมแดงอ่อน	5.7 x 6.3 x 5.2	แดงอมส้ม	5-6	ellipsoid	ครีม	3-4 x 4-5
Fh005	คล้ายพัด/ลิ้น	ส้มอมแดง	7.8 x 6.7 x 1.5	เหลืองอ่อน	4-5	ellipsoid	ครีม	3-4 x 4-5
Fh006	คล้ายพัด	ส้มอ่อน	8.9 x 9.7 x 1.7	แดงอมส้ม	4-5	ellipsoid	ครีม	3-4 x 4-5.5
Fh007	คล้ายพัด/ลิ้น	แดงอมส้ม	9.2 x 10.8 x 2.2	เหลือง	3-5	ellipsoid	ครีม	3-4 x 4-5.5

ภาพที่ 1 เห็ดลิ้นกวางที่เก็บรวบรวมได้จากธรรมชาติ ไอโซเลต Fh001 (ก.), ไอโซเลต Fh002 (ข.), ไอโซเลต Fh005 (ค.), ไอโซเลต Fh006 (ง.) และไอโซเลต Fh007 (จ.) และรูปร่างสปอร์เห็ดลิ้นกวางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า (ฉ.)



ภาพที่ 2 เส้นใยเห็ดลิ้นกวางไอโซเลต Fh003 (ก) และไอโซเลต Fh004 (ข) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

8.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดลิ้นกวาง

8.2.1 อาหารวุ้น

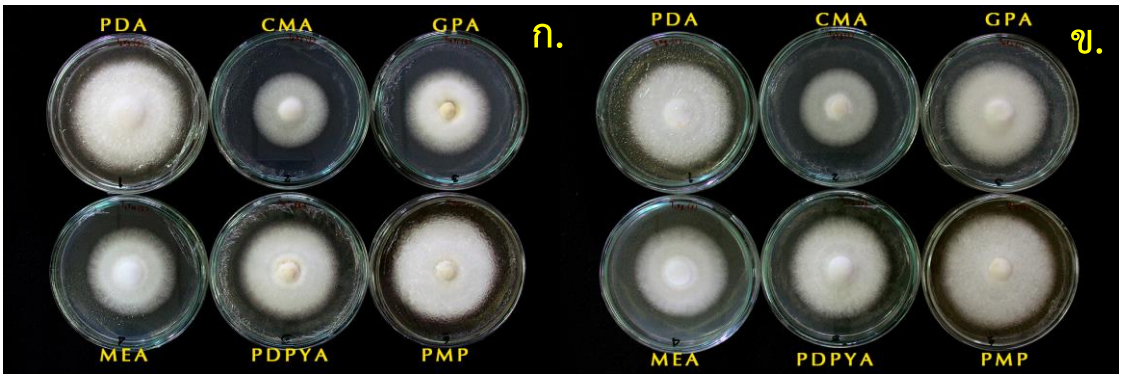
ผลการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง 7 ไอโซเลต บนอาหารวุ้น 6 ชนิด คือ PDA, CMA, GPA, MEA, PDPYA และ PMP โดยบ่มเชื้อใน 2 สภาพ เปรียบเทียบกันคือ สภาพปรกติ และสภาพมืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) เห็ดลิ้นกวาง Fh001 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PMP และ PDA ทั้งที่บ่มในสภาพปรกติ (7.18 และ 7.05 เซนติเมตร ตามลำดับ) และในสภาพมืด (7.20 และ 6.69 เซนติเมตร ตามลำดับ) ซึ่งการบ่มเชื้อเห็ดทั้งใน 2 สภาพ มีผลต่ออัตราการเจริญของเส้นใยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่เชื้อเห็ดเจริญได้น้อยที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA ทั้งที่บ่มในสภาพมืดและสภาพปรกติ (4.63 และ 4.23 เซนติเมตร ตามลำดับ) โดยลักษณะของเส้นใยของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 เจริญค่อนข้างหนาแน่นถึงหนาแน่นมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิด แสดงใน ตารางที่ 3 (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 อายุ 30 วัน บนอาหารวุ้น 6 ชนิด บ่มเชื้อในสภาพปรกติและสภาพมืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c)

อาหารวุ้น	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) [1/]		ความหนาแน่นของเส้นใย[2/]	
	สภาพปรกติ	สภาพมืด	สภาพปรกติ	สภาพมืด
PDA	7.050a	6.695a	++++	++++
CMA	4.233c	4.635d	+++	+++
GPA	5.993b	6.290b	++++	+++
MEA	5.768b	5.823b	+++	+++
PDPYA	6.083b	6.358b	+++	+++
PMP	7.180a	7.200a	++++	++++

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test

[2/]++++ เส้นใยเจริญหนาแน่นมาก +++ เส้นใยเจริญค่อนข้างหนาแน่น ++ เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง + เส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย



ภาพที่ 3 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh001 บนอาหารวุ้น 6 ชนิด ในสภาพปรกติ (ก.) และสภาพไม่มีแสง (ข.)

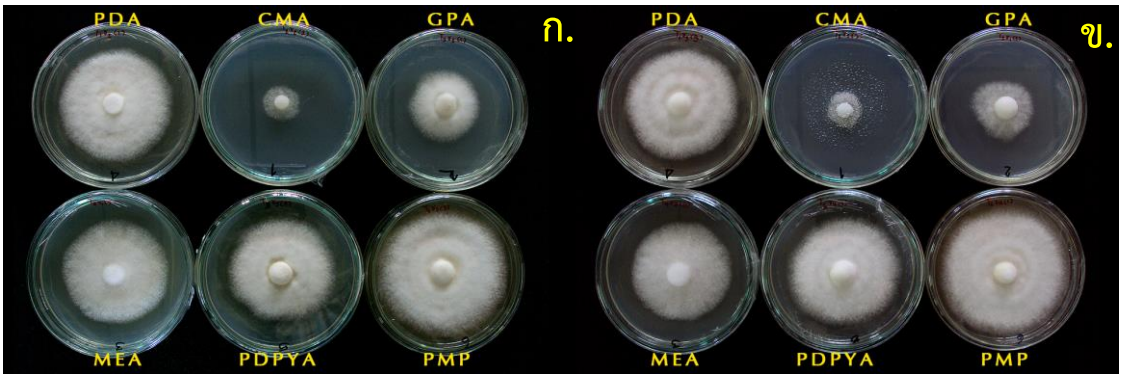
เห็ดลิ้นกวาง Fh002 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PMP ทั้งที่บ่มในสภาพมืด และในสภาพปรกติ (8.52 และ 8.23 เซนติเมตร ตามลำดับ) โดยมีลักษณะการเจริญของเส้นใยหนาแน่นมาก และเชื้อเห็ดมีการเจริญบนอาหาร PDA MEA และ PDPYA ได้ดีรองลงมาตามลำดับ โดยมีการเจริญของเส้นใยบนอาหารที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh002 เจริญได้น้อยที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA ทั้งที่บ่มในสภาพมืดและสภาพปรกติ (1.92 และ 2.05 เซนติเมตร ตามลำดับ) ซึ่งลักษณะการเจริญของเส้นใยหนาแน่นปานกลาง แสดงใน ตารางที่ 4 (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh002 อายุ 30 วัน บนอาหารวุ้น 6 ชนิด บ่มเชื้อในสภาพปรกติและสภาพมืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c)

อาหารวุ้น	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) [1/]		ความหนาแน่นของเส้นใย[2/]	
	สภาพปรกติ	สภาพมืด	สภาพปรกติ	สภาพมืด
PDA	6.393b	6.642b	++++	++++
CMA	1.928d	2.058d	++	++
GPA	3.968c	4.200c	+++	++
MEA	6.173b	6.268b	+++	+++
PDPYA	5.943b	6.208b	+++	+++
PMP	8.230a	8.520a	++++	++++

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test

[2/]++++ เส้นใยเจริญหนาแน่นมาก +++ เส้นใยเจริญค่อนข้างหนาแน่น ++ เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง + เส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย



ภาพที่ 4 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh002 บนอาหารวุ้น 6 ชนิด ในสภาพปรกติ (ก.) และสภาพไม่มีแสง (ข.)

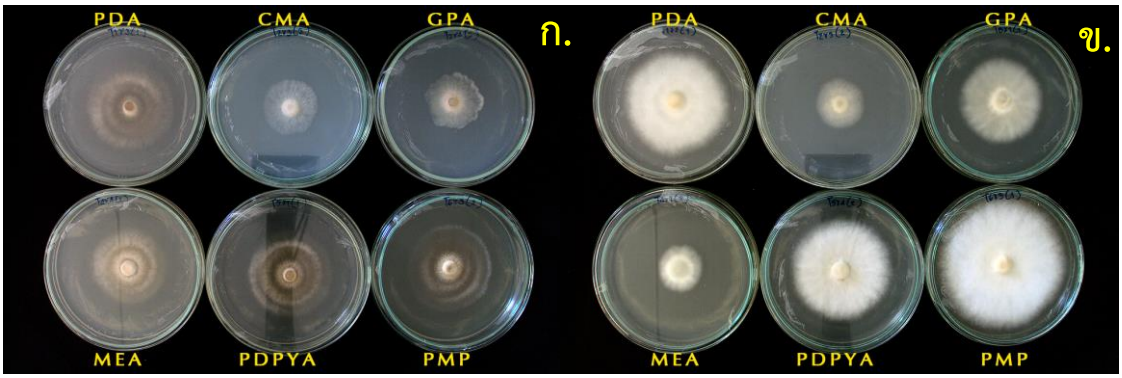
เห็ดลิ้นกวาง Fh003 มีการเจริญในการบ่มที่สภาพมืดได้ดีกว่าการบ่มในสภาพปรกติ บนทุกอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ โดยเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PMP (8.73 เซนติเมตร) ลักษณะการเจริญของเส้นใยหนาแน่นมาก และเชื้อเห็ดเจริญได้ดีบนอาหาร PDA และ PDPYA รองลงมาตามลำดับ (7.69 และ 7.20 เซนติเมตร) ในขณะที่เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh003 ที่บ่มในสภาพปรกติ มีลักษณะการเจริญของเส้นใยหนาแน่นน้อย บนทุกอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ โดยเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA PDPYA และ PMP ตามลำดับ (5.74, 4.79 และ 4.65 เซนติเมตร) แสดงใน ตารางที่ 5 (ภาพที่ 5)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh003 อายุ 30 วัน บนอาหารวุ้น 6 ชนิด บ่มเชื้อในสภาพปรกติและสภาพมืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c)

อาหารวุ้น	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) [1/]		ความหนาแน่นของเส้นใย[2/]	
	สภาพปรกติ	สภาพมืด	สภาพปรกติ	สภาพมืด
PDA	5.748a	7.695b	+	+++
CMA	2.628d	3.443d	+	++
GPA	3.285c	6.268c	+	++
MEA	3.035cd	3.575d	+	++
PDPYA	4.793b	7.200b	+	+++
PMP	4.650b	8.737a	+	++++

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test

[2/]++++ เส้นใยเจริญหนาแน่นมาก +++ เส้นใยเจริญค่อนข้างหนาแน่น ++ เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง + เส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย



ภาพที่ 5 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh003 บนอาหารวุ้น 6 ชนิด ในสภาพปรกติ (ก.) และสภาพไม่มีแสง (ข.)

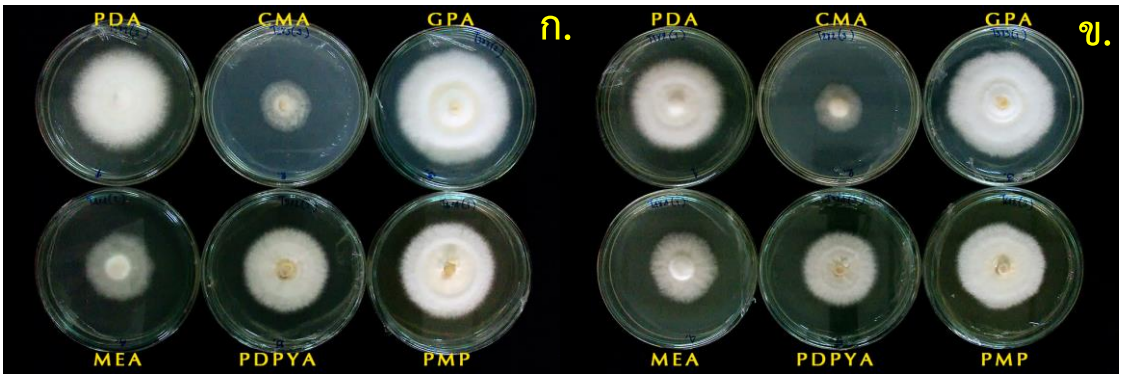
เห็ดลิ้นกวาง Fh004 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GPA และ PDA ทั้งที่บ่มในสภาพปรกติ (7.02 และ 6.53 เซนติเมตร ตามลำดับ) มีลักษณะการเจริญของเส้นใยหนาแน่นมาก และในสภาพมืด (6.95 และ 6.14 เซนติเมตร ตามลำดับ) มีลักษณะการเจริญของเส้นใยค่อนข้างหนาแน่น ซึ่งการบ่มเชื้อเห็ดทั้งใน 2 สภาพ มีผลต่ออัตราการเจริญของเส้นใยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh004 เจริญได้น้อยที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA ทั้งที่บ่มในสภาพมืดและสภาพปรกติ (2.96 และ 2.89 เซนติเมตร ตามลำดับ) มีลักษณะของเส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง แสดงใน ตารางที่ 6 (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh004 อายุ 30 วัน บนอาหารวุ้น 6 ชนิด บ่มเชื้อในสภาพปรกติและสภาพมืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c)

อาหารวุ้น	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) [1/]		ความหนาแน่นของเส้นใย[2/]	
	สภาพปรกติ	สภาพมืด	สภาพปรกติ	สภาพมืด
PDA	6.535ab	6.143b	++++	+++
CMA	2.960e	2.893d	++	++
GPA	7.025a	6.958a	++++	+++
MEA	4.458d	4.355c	++	++
PDPYA	5.015c	4.648c	+++	+++
PMP	6.208b	5.850b	++++	+++

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test

[2/]++++ เส้นใยเจริญหนาแน่นมาก +++ เส้นใยเจริญค่อนข้างหนาแน่น ++ เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง + เส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย



ภาพที่ 6 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh004 บนอาหารวุ้น 6 ชนิด ในสภาพปรกติ (ก.) และสภาพไม่มีแสง (ข.)

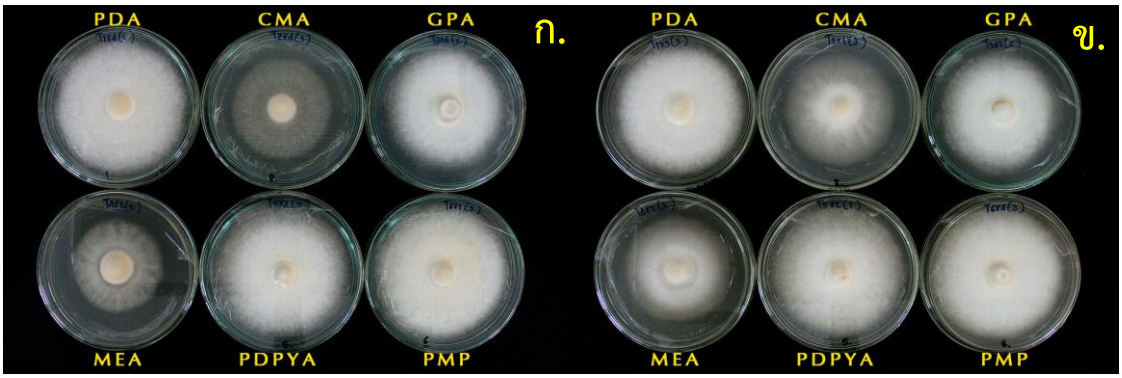
เห็ดลิ้นกวาง Fh005 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PMP และ PDA ทั้งที่บ่มในสภาพมืด (8.98 และ 8.88 เซนติเมตร ตามลำดับ) และในสภาพปรกติ (8.87 และ 8.86 เซนติเมตร ตามลำดับ) โดยมีลักษณะการเจริญของเส้นใยหนาแน่นมาก และเชื้อเห็ดเจริญได้ค่อนข้างน้อยบนอาหาร MEA (6.02 และ 5.86 เซนติเมตร) และ CMA (6.14 และ 5.36 เซนติเมตร) ทั้งในสภาพปรกติและสภาพมืดตามลำดับ โดยมีลักษณะการเจริญของเส้นใยหนาแน่นปานกลาง แสดงใน ตารางที่ 7 (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh005 อายุ 30 วัน บนอาหารวุ้น 6 ชนิด บ่มเชื้อในสภาพปรกติและสภาพมืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c)

อาหารวุ้น	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) [1/]		ความหนาแน่นของเส้นใย[2/]	
	สภาพปรกติ	สภาพมืด	สภาพปรกติ	สภาพมืด
PDA	8.868a	8.887ab	++++	++++
CMA	5.360c	6.148d	++	++
GPA	7.540b	7.705c	++++	+++
MEA	5.868c	6.023d	++	+++
PDPYA	8.458a	8.408b	+++	+++
PMP	8.875a	8.983a	++++	++++

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test

[2/]++++ เส้นใยเจริญหนาแน่นมาก +++ เส้นใยเจริญค่อนข้างหนาแน่น ++ เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง + เส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย



ภาพที่ 7 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh005 บนอาหารวุ้น 6 ชนิด ในสภาพปรกติ (ก.) และสภาพไม่มีแสง (ข.)

เห็ดลิ้นกวาง Fh006 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PMP ทั้งที่บ่มในสภาพมืดและปรกติ (7.90 และ 7.82 เซนติเมตร ตามลำดับ) และเจริญได้ดีรองลงมาบนอาหาร PDA ทั้งที่บ่มในสภาพปรกติและมืด (5.98 และ 5.43 เซนติเมตร ตามลำดับ) ในขณะที่การเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh006 อาหาร MEA GPA และ CMA เจริญได้ไม่ดีนัก แสดงใน ตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh006 อายุ 30 วัน บนอาหารวุ้น 6 ชนิด บ่มเชื้อในสภาพปรกติและสภาพมืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c)

อาหารวุ้น	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) [1/]		ความหนาแน่นของเส้นใย[2/]	
	สภาพปรกติ	สภาพมืด	สภาพปรกติ	สภาพมืด
PDA	5.980b	5.430b	-	-
CMA	2.488d	4.098c	-	-
GPA	2.650d	2.543d	-	-
MEA	2.958d	3.725c	-	-
PDPYA	3.513c	2.850d	-	-
PMP	7.823a	7.905a	-	-

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test

[2/]++++ เส้นใยเจริญหนาแน่นมาก +++ เส้นใยเจริญค่อนข้างหนาแน่น ++ เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง + เส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย

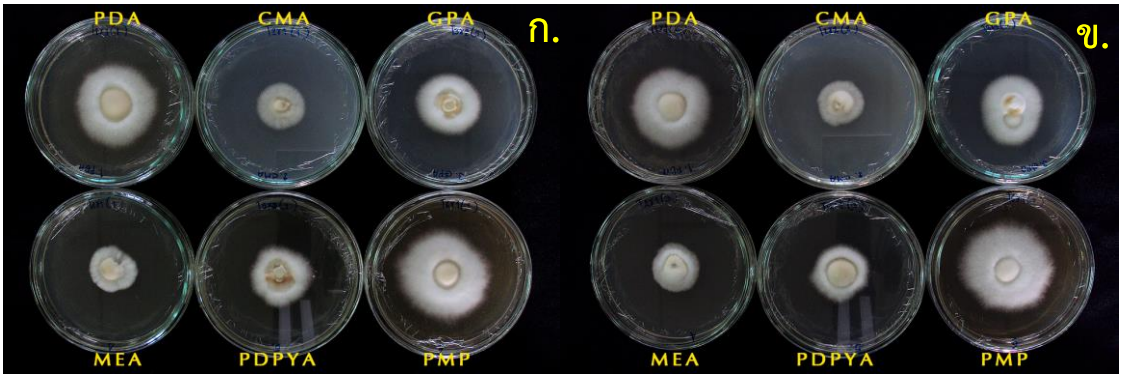
เห็ดลิ้นกวาง Fh007 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PMP ทั้งที่บ่มในสภาพปรกติและสภาพมืด (6.16 และ 6.00 เซนติเมตร ตามลำดับ) และเชื้อเห็ดเจริญได้ดีรองลงมาบนอาหาร PDA ทั้งที่บ่มในสภาพมืดและปรกติ (5.66 และ 5.59 เซนติเมตร ตามลำดับ) การเจริญของเส้นใยลักษณะค่อนข้างหนาแน่น ในขณะที่การเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh007 บนอาหาร CMA เจริญได้ไม่ดีนัก ทั้งที่บ่มในสภาพปรกติและสภาพมืด (2.92 และ 2.85 เซนติเมตร ตามลำดับ) โดยการเจริญของเส้นใยลักษณะหนาแน่นปานกลาง แสดงใน ตารางที่ 9 (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh007 อายุ 30 วัน บนอาหารวุ้น 6 ชนิด บ่มเชื้อในสภาพปรกติและสภาพมืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c)

อาหารวุ้น	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) [1/]		ความหนาแน่นของเส้นใย[2/]	
	สภาพปรกติ	สภาพมืด	สภาพปรกติ	สภาพมืด
PDA	5.593b	5.668b	+++	+++
CMA	2.928d	2.850d	++	++
GPA	4.050c	4.090c	++	++
MEA	2.875d	3.025d	++	++
PDPYA	4.150c	4.025c	++	++
PMP	6.160a	6.008a	+++	+++

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

[2/]++++ เส้นใยเจริญหนาแน่นมาก +++ เส้นใยเจริญค่อนข้างหนาแน่น ++ เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง + เส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย



ภาพที่ 8 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh007 บนอาหารวุ้น 6 ชนิด ในสภาพปรกติ (ก.) และสภาพไม่มีแสง (ข.)

8.2.2 แหล่งคาร์บอน

การเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต คือ Fh001 Fh002 Fh005 และ Fh006 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (basal medium) ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด พบว่า เชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลต เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแมนโนส (4.91, 5.97, 6.71 และ 5.32 เซนติเมตร ตามลำดับ) โดยลักษณะการเจริญของเส้นใยหนาแน่นปานกลาง ทั้งนี้เจริญได้ดีกว่าบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเดกซ์โตส (3.00, 4.21, 3.52, และ 3.15 เซนติเมตร ตามลำดับ) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้โดยทั่วไปในอาหารเลี้ยงเชื้อรา ในขณะที่เชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลต เจริญได้น้อยที่สุดบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนซูโครส (2.51, 3.38, 3.25 และ 2.23 เซนติเมตร ตามลำดับ) แสดงใน ตารางที่ 10 (ภาพที่ 9-12)

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต อายุ 30 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด

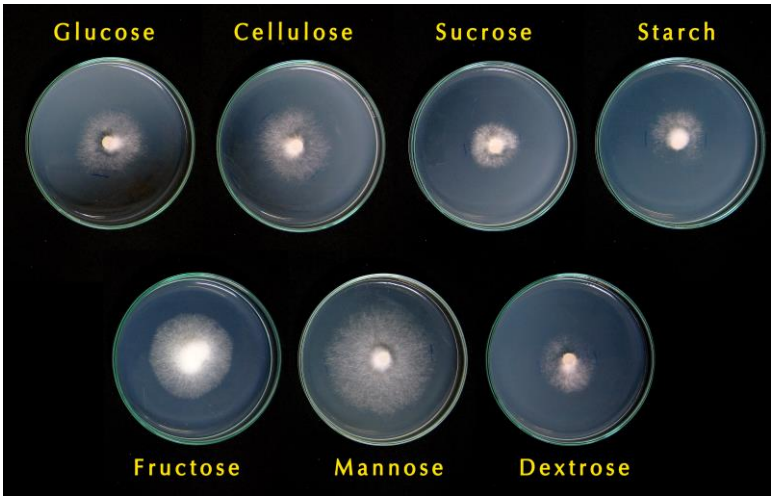
แหล่งคาร์บอน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเห็ดลิ้นกวาง (ซม.) [1/]				ความหนาแน่นของเส้นใย[2/]			
	Fh001	Fh002	Fh005	Fh006	Fh001	Fh002	Fh005	Fh006
กลูโคส	3.675b	4.388c	4.318c	3.188c	++	+	++	+
เซลลูโลส	3.963b	4.638b	4.488c	3.075c	++	+	++	+
ซูโครส	2.513d	3.388d	3.250d	2.238d	+	+	++	+
แป้ง	2.888c	4.225b	3.337d	3.125b	+	+	+	+
ฟรุคโตส	4.738a	4.775b	4.813b	4.125b	+++	+++	+++	+
แมนโนส	4.913a	5.975a	6.712a	5.325a	++	++	++	++
เดกซ์โตส	3.000c	4.212c	3.525d	3.150c	+	+	+	+

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test

[2/]++++ เส้นใยเจริญหนาแน่นมาก +++ เส้นใยเจริญค่อนข้างหนาแน่น ++ เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง + เส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย

ภาพที่ 9 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh001 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด

ภาพที่ 10 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh002 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด



ภาพที่ 11 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh005 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด

ภาพที่ 12 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh006 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด

8.2.3 แหล่งไนโตรเจน

การเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 6 ชนิด พบว่า เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเปปโตน (1.81 เซนติเมตร) เห็ดลิ้นกวาง Fh002 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียมซัลเฟต (2.88 และ 2.77 เซนติเมตร) เห็ดลิ้นกวาง Fh005 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแอมโมเนียมคลอไรด์ (3.82 เซนติเมตร) และเห็ดลิ้นกวาง Fh006 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมซัลเฟต (2.66 และ 2.37 เซนติเมตร) โดยเชื้อเห็ดทั้ง 4 ไอโซ

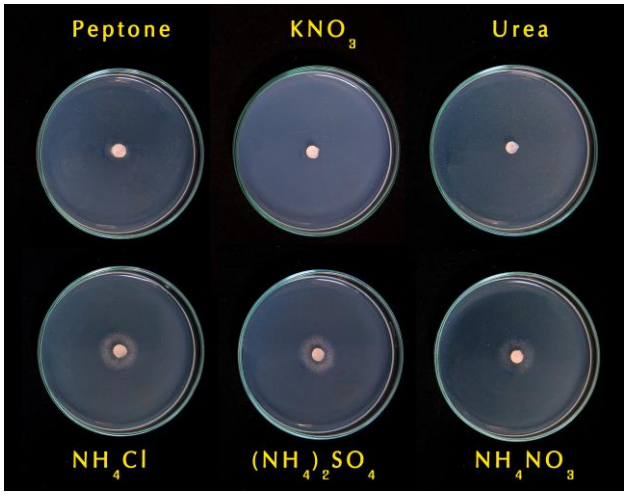
เลต มีลักษณะการเจริญของเส้นใยหนาแน่นน้อยถึงปานกลาง แต่ทั้งนี้พบว่าไม่มีเชื้อเห็ดลิ้นกวางไอโซเลตใดเลยที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนยูเรีย แสดงใน ตารางที่ 11 (ภาพที่ 13-16)

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต อายุ 30 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 6 ชนิด

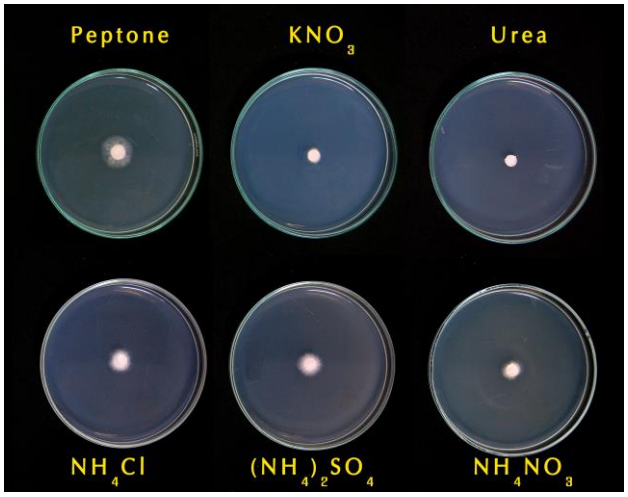
แหล่งไนโตรเจน	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเห็ดลิ้นกวาง (ซม.) [1/]				ความหนาแน่นของเส้นใย[2/]			
	Fh001	Fh002	Fh005	Fh006	Fh001	Fh002	Fh005	Fh006
เปปโตน	1.813a	1.488d	2.163d	1.588c	+	+	+	+
KNO_3	1.488b	2.550bc	2.250d	1.188d	+	+	+	+
ยูเรีย	-	-	-	-	-	-	-	-
NH_4Cl	1.275b	2.425c	3.825a	2.663a	+	+	++	++
$(NH_4)_2SO_4$	1.288b	2.775ab	3.338c	2.375ab	+	+	++	++
NH_4NO_3	1.263b	2.888a	3.563b	2.263b	+	+	++	++

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

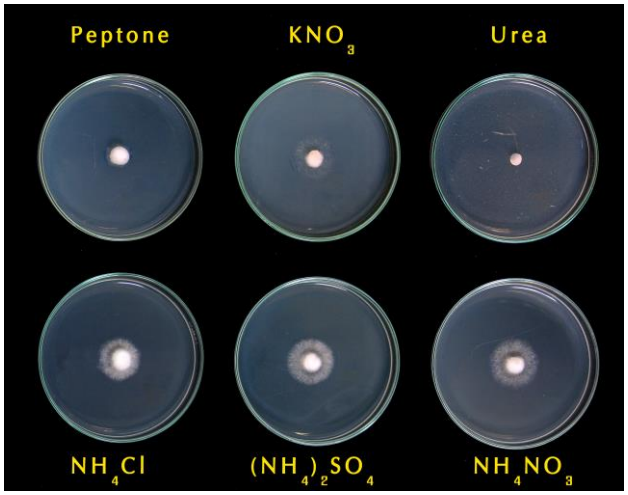
[2/]++++ เส้นใยเจริญหนาแน่นมาก +++ เส้นใยเจริญค่อนข้างหนาแน่น ++ เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง + เส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย



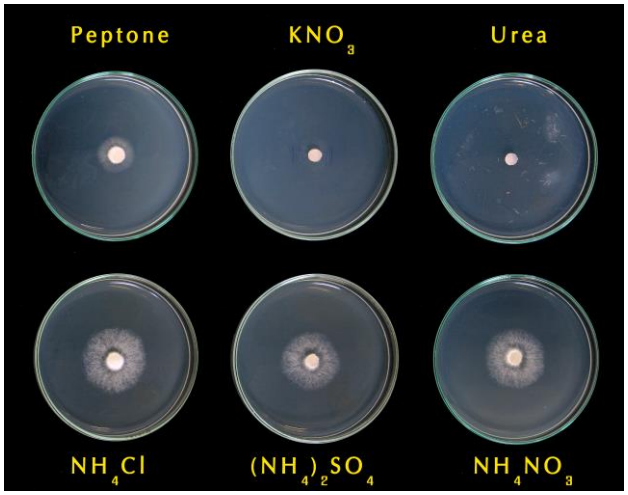
ภาพที่ 13 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh001 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 6 ชนิด



ภาพที่ 14 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh002 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 6 ชนิด



ภาพที่ 15 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh005 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 6 ชนิด



ภาพที่ 16 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง Fh006 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 6 ชนิด

8.2.4 อุณหภูมิ

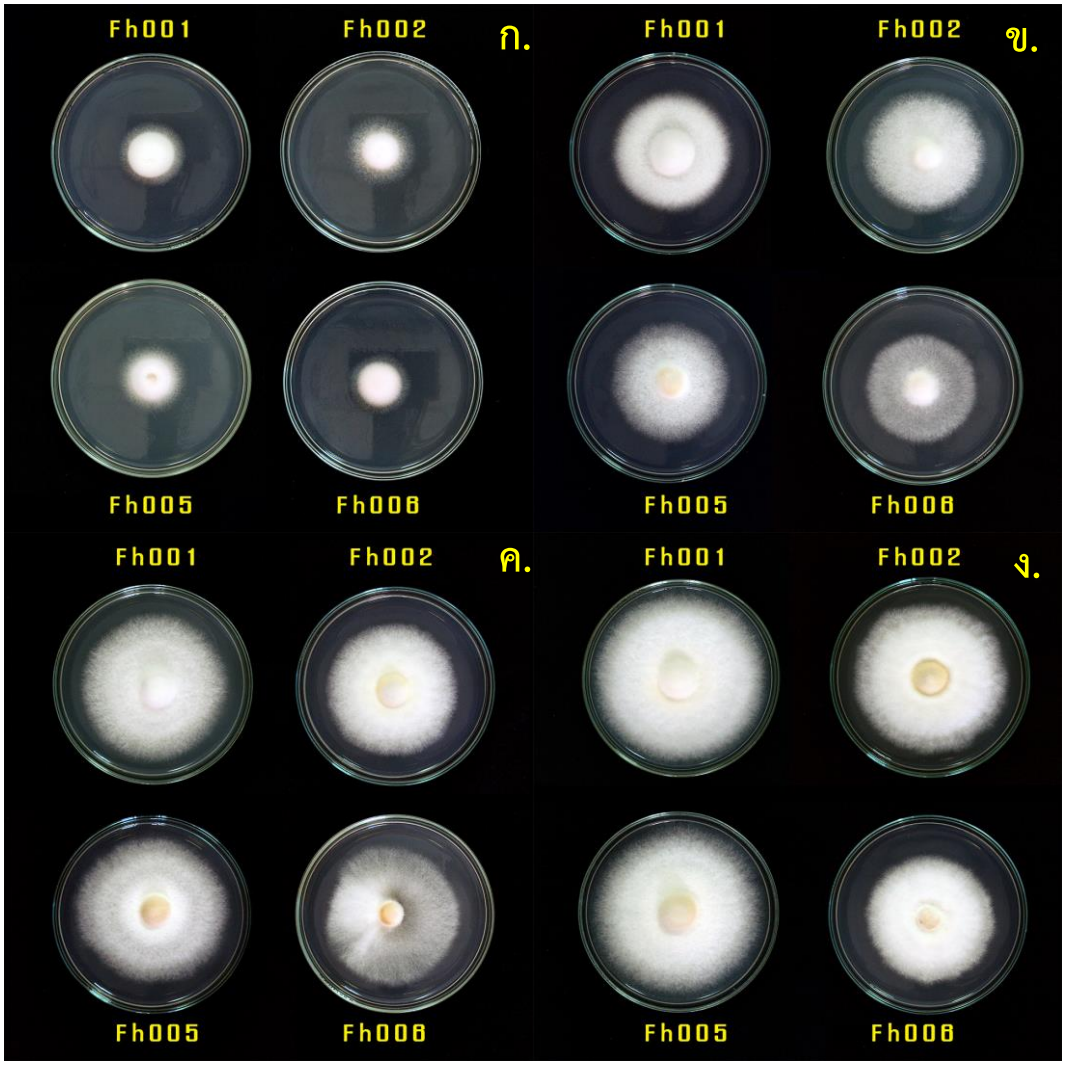
การเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ช่วงอุณหภูมิต่างกัน 5 ระดับ พบว่า เชื้อเห็ดลิ้นกวางทุกไอโซเลตเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) มีลักษณะของเส้นใยเจริญหนาแน่นมาก โดยที่ระยะเวลาบ่มเชื้อ 30 วัน เชื้อเห็ด Fh005 มีการเจริญได้ดีที่สุด (8.76 เซนติเมตร) รองลงมาคือ Fh001 Fh002 และ Fh006 ตามลำดับ (8.68, 7.62 และ 6.62 เซนติเมตร) และการบ่มเส้นใยเชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลตในช่วงอุณหภูมิ 25°c เจริญได้ดีรองลงมา ในขณะที่การบ่มเชื้อเห็ดในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำลง 20°c และ 15°c เชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลต มีแนวโน้มของอัตราการเจริญที่ลดลง ทั้งนี้เมื่อบ่มเชื้อเห็ดลิ้นกวางในช่วงอุณหภูมิที่สูง คือ 30°c พบว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลต มีการเจริญต่ำที่สุด แสดงใน ตารางที่ 12 (ภาพที่ 17)

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต อายุ 30 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ช่วงอุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°c)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเห็ดลิ้นกวาง (ซม.) [1/]				ความหนาแน่นของเส้นใย[2/]			
	Fh001	Fh002	Fh005	Fh006	Fh001	Fh002	Fh005	Fh006
15	3.060d	3.533c	3.335d	2.748c	+++	+++	+++	++
20	5.975c	6.358b	6.310c	5.628b	++++	+++	+++	++
25	6.943b	6.397b	7.410b	6.518a	++++	++++	+++	+++
RT	8.685a	7.625a	8.768a	6.628a	++++	++++	++++	++++
30	2.065e	2.090d	3.475d	1.368d	-	-	-	-

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test

[2/]++++ เส้นใยเจริญหนาแน่นมาก +++ เส้นใยเจริญค่อนข้างหนาแน่น ++ เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง + เส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย



ภาพที่ 17 การเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต บนอาหาร PDA ที่ช่วงอุณหภูมิ 15°c (ก.), 20 °c (ข.), 25°c (ค.) และ อุณหภูมิห้อง (ง.)

8.3 การเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวางบนข้าวฟ่าง

จากผลการทดสอบช่วงอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต คือ Fh001 Fh002 Fh005 และ Fh006 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) และ 25°c เชื้อเห็ดลิ้นกวางทุกตัวอย่าง มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุดตามลำดับ ในขณะที่ช่วงอุณหภูมิ 15°c 20°c และ 30°c เส้นใยเชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ตัวอย่างเจริญได้ค่อนข้างช้า ดังนั้นจึงเลือกช่วงอุณหภูมิห้อง (25-27°c) เป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวางบนเมล็ดข้าวฟ่าง

หลังจากย้ายเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต คือ Fh001 Fh002 Fh005 และ Fh006 ลงเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่าง เป็นเวลา 12 วัน เริ่มวัดการเจริญของเส้นใยเชื้อเห็ด พบว่าเชื้อเห็ดทุกตัวอย่างเริ่มมีการเจริญของเส้นใยจากชิ้นวุ้นลงบนเมล็ดข้าวฟ่าง วัดอัตราการเจริญของเส้นใยของเชื้อเห็ดลิ้นกวางทุกๆ 3 วัน เป็น

เวลา 45 วัน พบว่าการบ่มเส้นใยในสภาพปรกติ เห็ดลิ้นกวาง Fh002 มีอัตราการเจริญสูงกว่าเห็ดลิ้นกวาง Fh005 Fh006 และ Fh001 โดยมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.26, 9.65, 7.75 และ 5.08 เซนติเมตร ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการบ่มในสภาพมืด เห็ดลิ้นกวาง Fh002 มีอัตราการเจริญที่สูงกว่าเห็ดลิ้นกวาง Fh005 Fh006 และ Fh001 โดยมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.23, 9.49, 8.16 และ 5.52 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

การบ่มเส้นใยในสภาพปรกติและสภาพไม่มีแสง มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh002 และ Fh005 ไม่มากนัก โดยในเห็ดลิ้นกวาง Fh002 มีอัตราการเจริญของเส้นใยในการบ่มที่สภาพปรกติและสภาพไม่มีแสง 10.26 และ 10.23 เซนติเมตร เห็ดลิ้นกวาง Fh005 มีอัตราการเจริญของเส้นใย 9.65 และ 9.49 เซนติเมตร ในขณะที่การบ่มเส้นใยในสภาพปรกติและสภาพไม่มีแสง มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh006 และ Fh001 ค่อนข้างมาก โดยเห็ดลิ้นกวาง Fh006 มีอัตราการเจริญของเส้นใยในการบ่มที่สภาพปรกติและสภาพไม่มีแสง 7.75 และ 8.16 เซนติเมตร เห็ดลิ้นกวาง Fh001 มีอัตราการเจริญของเส้นใย 5.08 และ 5.52 เซนติเมตร

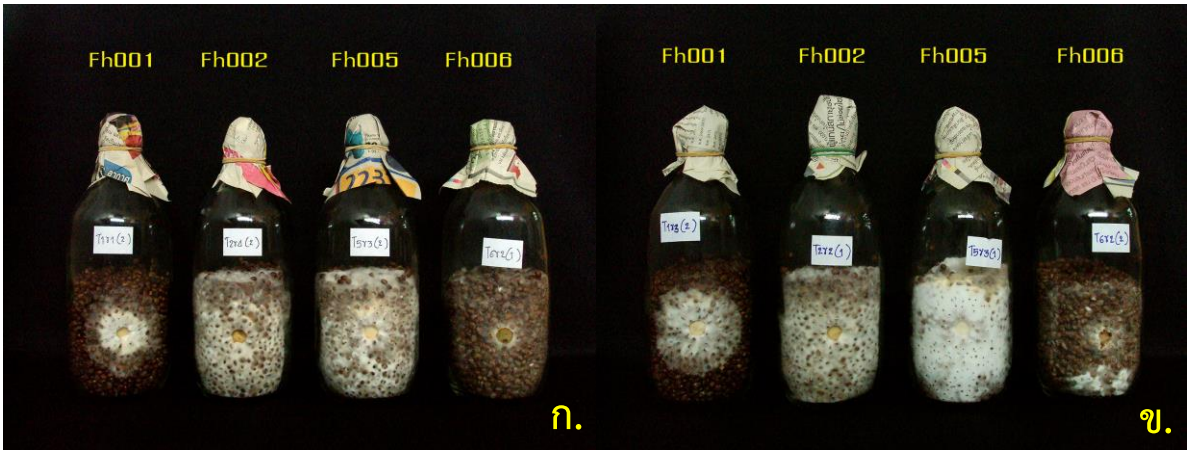
ลักษณะของเส้นใยของเห็ดลิ้นกวางทุกตัวอย่างบนข้าวฟ่างมีสีขาว โดยเห็ดลิ้นกวาง Fh005 มีการเจริญของเส้นใยค่อนข้างหนาแน่นกว่าเห็ดลิ้นกวาง Fh002 และ Fh001 ในขณะที่เห็ดลิ้นกวาง Fh006 มีการเจริญของเส้นใยค่อนข้างบางบนเมล็ดข้าวฟ่าง (ภาพที่ 18)

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต บนข้าวฟ่าง บ่มในสภาพปรกติและสภาพมืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) นาน 45 วัน

เห็ดลิ้นกวาง	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) [1/]		ความหนาแน่นของเส้นใย[2/]	
	สภาพปรกติ	สภาพมืด	สภาพปรกติ	สภาพมืด
Fh001	5.078c	5.515d	++	++
Fh002	10.263a	10.233a	+++	++
Fh005	9.648a	9.495b	+++	++++
Fh006	7.753b	8.165c	++	++

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test

[2/]++++ เส้นใยเจริญหนาแน่นมาก +++ เส้นใยเจริญค่อนข้างหนาแน่น ++ เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง + เส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย



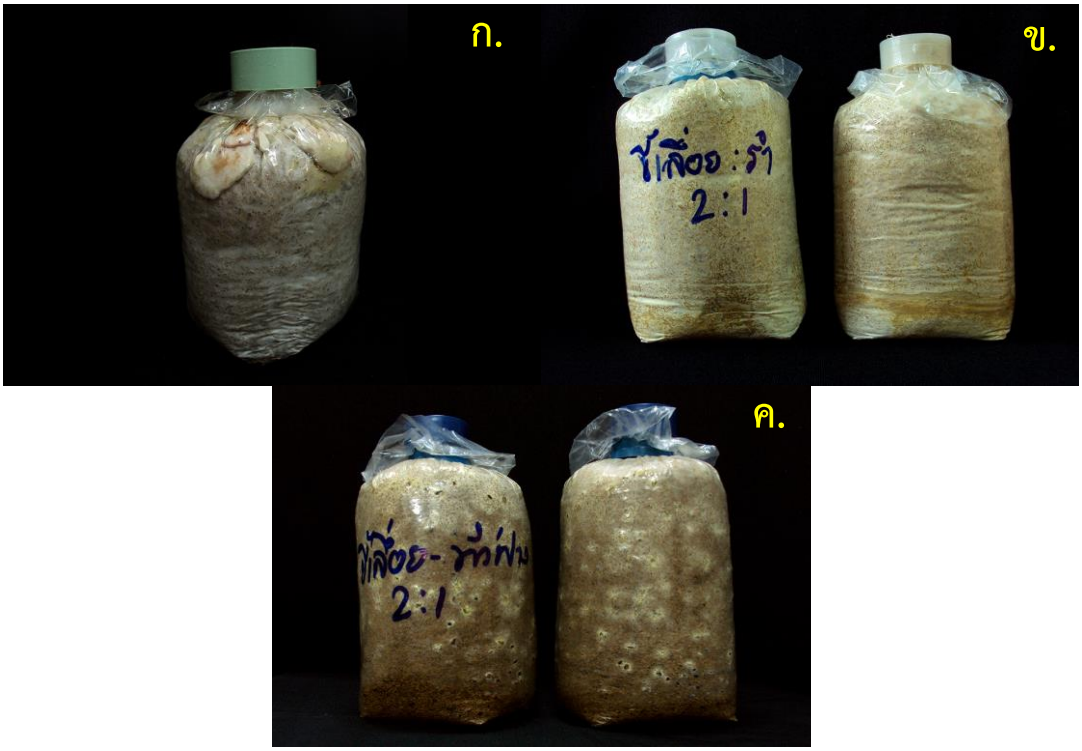
ภาพที่ 18 การเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ตัวอย่าง บนเมล็ดข้าวฟ่าง ในขวดแก้วใสทนร้อน บ่มในสภาพปรกติ (ก.) และในสภาพไม่มีแสง (ข.)

8.4 การเจริญของเส้นใยบนก้อนวัสดุเพาะสูตรต่างๆ

การทดสอบสูตรวัสดุเพาะ 3 สูตร ในเบื้องต้นกับเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 โดยใส่วัสดุเพาะถุงละ 450 กรัม บ่มก้อนเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) ในสภาพไม่มีแสง เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน เส้นใยของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 เริ่มเจริญลงไปบนวัสดุเพาะ และเมื่อเวลา 30 วัน เชื้อเห็ดลิ้นกวางบนวัสดุเพาะสูตร 3 (ขี้เลื่อยไม้ยางพารา : ข้าวฟ่างต้มสุก : ปูนขาว : ดีเกลือ อัตรา 100 : 50 : 1: 0.2 กิโลกรัม) มีการเจริญจากปากถุงลงมาเร็วกว่าวัสดุสูตร 2 (ขี้เลื่อยไม้ยางพารา : รำละเอียด : ปูนขาว : ดีเกลือ อัตรา 100 : 50 : 1: 0.2 กิโลกรัม) และสูตร 1 (ขี้เลื่อยไม้ยางพารา : รำละเอียด : ปูนขาว : ดีเกลือ อัตรา 100 : 5 : 1: 0.2 กิโลกรัม) ตามลำดับ ในขณะที่ความหนาแน่นของเส้นใยเชื้อเห็ดในวัสดุเพาะสูตร 1 และสูตร 2 ลักษณะเส้นใยจะหนาแน่นกว่าเส้นใยเชื้อเห็ดในวัสดุเพาะสูตร 3 ที่มีลักษณะเส้นใยค่อนข้างบาง ทำการบ่มก้อนเชื้อต่อเป็นเวลารวม 50 วัน จนเส้นใยเดินเต็มก้อนเชื้อ (ภาพที่ 19) จากการทดสอบในเบื้องต้นนี้ จึงนำสูตรวัสดุเพาะทั้ง 3 สูตร ไปใช้ในการศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง ทั้ง 4 ไอโซเลต ต่อไป

การศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 Fh002 Fh005 และ Fh006 บนวัสดุเพาะ 3 สูตร ในถุงพลาสติกขนาด 300 กรัม หลังจากใส่เชื้อขยายเห็ดลิ้นกวางบนเมล็ดข้าวฟ่างทั้ง 4 ไอโซเลต ลงบนก้อนวัสดุเพาะ ทั้ง 3 สูตร และนำไปบ่มก้อนเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) ในสภาพไม่มีแสง เมื่อเวลาผ่านไป 12 วัน เชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่มีการเจริญลงบนวัสดุเพาะสูตรใดเลย ซึ่งแตกต่างจากการทดสอบในเบื้องต้นกับเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 เพียงตัวอย่างเดียว ที่เมื่อหลังจากหยอดเชื้อขยายลงวัสดุเพาะ เป็นเวลา 15 วัน เส้นใยของเชื้อเริ่มเจริญลงไปบนวัสดุเพาะ และเมื่อบ่มก้อนเชื้อเห็ดต่อไปนานขึ้น ก้อนเชื้อแสดงการปนเปื้อนของราดำและราเขียว (ภาพที่ 20) ลงมาจากบริเวณเชื้อข้าวฟ่างที่ใส่ลงไป จึงยังไม่สามารถเก็บผลการ

ทดลองได้ ซึ่งจากผลที่เกิดขึ้น อาจเป็นผลมาจากการใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพาราจากแหล่งที่ได้มาต่างกันกับเมื่อทดสอบในเบื้องต้น หรืออาจเกิดจากเชื้อขยายมีอายุค่อนข้างมาก จากที่เห็นว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวางใช้เวลามากกว่า 60 วันกว่าจะเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง และเมื่อนำมาใช้เชื้อขยายอาจมีประสิทธิภาพในการเจริญบนวัสดุเพาะลดลง



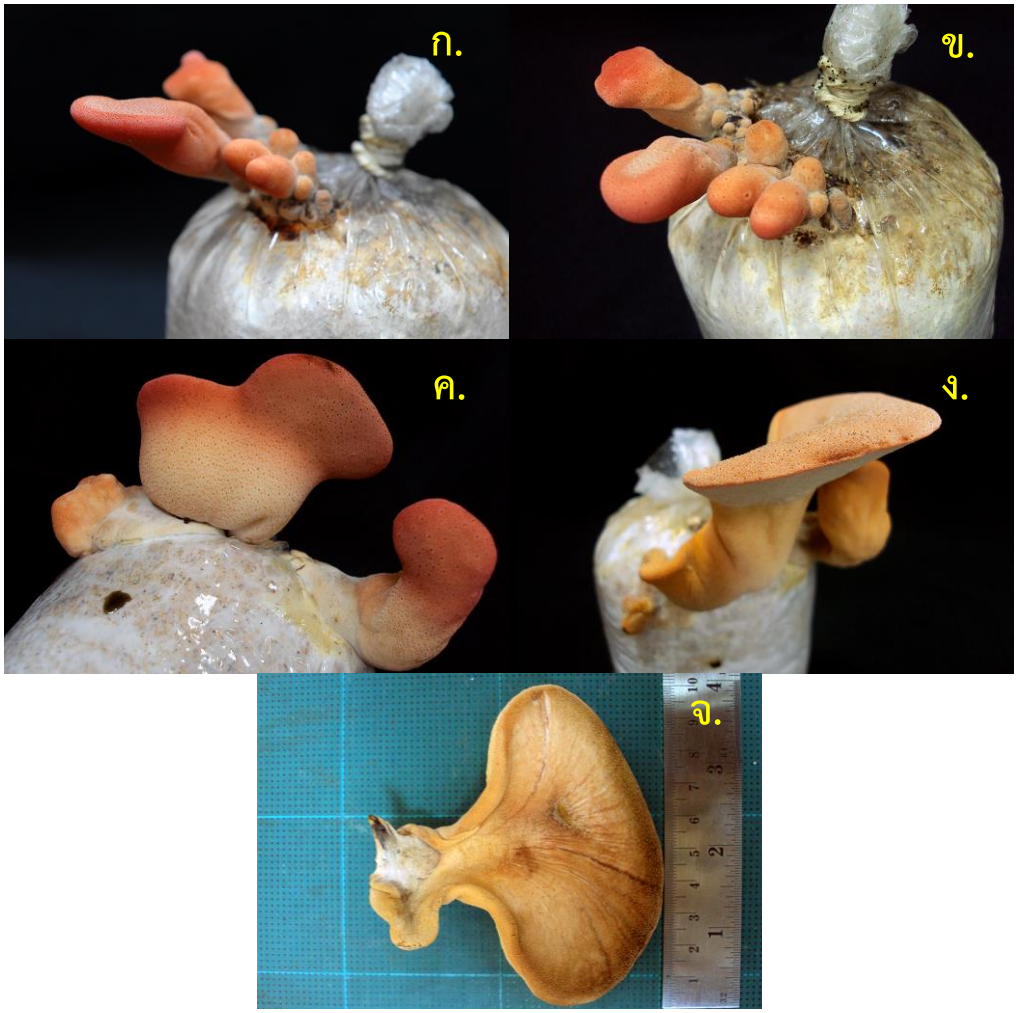
ภาพที่ 19 การเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวางตัวอย่าง Fh001 บนก้อนวัสดุเพาะ สูตร 1 (ก.) สูตร 2 (ข.) และสูตร 3 (ค.)

ภาพที่ 20 ก้อนเชื้อเห็ดลิ้นกวางแสดงการปนเปื้อนของราดำและราเขียว

8.5 ศึกษาการเกิดดอกบนวัสดุเพาะในถุงพลาสติก

จากการทดสอบสูตรวัสดุเบื้องต้นกับเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 โดยเพาะเลี้ยงในวัสดุเพาะ 3 สูตร เมื่อนำก้อนเชื้อเห็ดที่เส้นใยเจริญเต็มก้อนแล้ว จากนั้นย้ายก้อนเชื้อเห็ดมาบ่มในสภาพมีแสงสว่าง ให้เส้นใยแก่ต่ออีก 20-30 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) และเพื่อกระตุ้นให้สร้างตุ่มดอก พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะสูตร 1 เท่านั้น ที่มีการสร้างตุ่มดอกเกิดขึ้นบริเวณไหล่ถุงเพาะเห็ด (ภาพที่ 21) ในขณะที่เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะสูตร 2 และ 3 ไม่มีการพัฒนาสร้างตุ่มดอกเกิดขึ้น และเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น ก้อนเชื้อแสดงการปนเปื้อนของราดำและราเขียว ลงมาจากบริเวณเชื้อข้าวฟ่างที่ใส่ลงไป จากนั้นกรีดถุงก้อนเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 บริเวณที่มีการสร้างตุ่มดอกเห็ดเกิดขึ้น แล้วย้ายไปบ่มเลี้ยงต่อที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 23-25°c ให้ความชื้นโดยฉีดพ่นด้วยน้ำเป็นละอองฝอยบริเวณผิวก้อนถุงช่วงเช้า กลางวันและเย็น เพื่อให้ตุ่มดอกพัฒนาเป็นดอกเห็ด เมื่อเวลาผ่านไป 5-7 วัน ดอกเห็ดลิ้นกวางจะเจริญพัฒนาจนอยู่ในช่วงที่มีลักษณะเหมาะสมแก่การเก็บผลผลิต

จากที่เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 ที่ทดสอบในวัสดุเพาะสูตร 2 และ 3 เมื่อนำไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างตุ่มดอก แต่พบว่าเชื้อเห็ดไม่มีการพัฒนาสร้างตุ่มดอกเกิดขึ้น อีกทั้งยังแสดงการปนเปื้อนของราดำและราเขียว ทั้งนี้อาจเนื่องจากตัวเชื้อเห็ดเองสูญเสียประสิทธิภาพในการสร้างดอกเห็ดไป หรืออาจเกิดจากสภาพของการกระตุ้นให้เกิดการสร้างตุ่มดอกยังไม่เหมาะสม



ภาพที่ 21 ลักษณะการเกิดดอกเห็ดลิ้นกวาง Fh001 บนวัสดุเพาะสูตร 1 กลุ่มตุ่มดอกและดอกขนาดเล็กของเห็ดลิ้นกวาง (ก.) และ (ข.), ลักษณะรูพรุน ใต้หมวกดอกเห็ดลิ้นกวาง (ค.), ดอกเห็ดลิ้นกวางที่เจริญอยู่ในช่วงที่มีลักษณะเหมาะสมแก่การเก็บผลผลิต (ง.) และ (จ.)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดลิ้นกวางช่วงฤดูฝน ในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม ระหว่างปี พ.ศ. 2554-2556 ในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ พบเห็ดลิ้นกวาง จำนวน 5 ไอโซเลต คือ Fh001, Fh002, Fh005, Fh006 และ Fh007 โดยจะพบเห็ดลิ้นกวางเจริญอยู่บนไม้ยืนต้นหรือตอไม้ จำพวกไม้ตระกูลก่อ (Fagaceae) บริเวณลำต้น โพรงไม้หรือโคนต้นพืชอาศัย ทั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 2 ไอโซเลต จากสาขาวิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คือ ไอโซเลต NN1 (Fh003) ซึ่งเก็บรวบรวมได้จากเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว และ โซเลต PR (Fh004) ซึ่งเก็บรวบรวมได้จากเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติภูเรือ จังหวัดเลย เพื่อนำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ตัวอย่างเห็ดลิ้นกวางที่พบมีขนาดดอกและรูปร่างที่หลากหลาย ดอกเห็ดขนาด 6-15 x 5-8 เซนติเมตร หนา 1.7-4.5 เซนติเมตร รูปร่างคล้ายลิ้น ช้อนหรือพัด ผิวดอกด้านบนเหนียวหนืด มีปุ่มเล็กๆ สีส้มอมแดงอ่อน แดงจนถึงแดงเข้ม ด้านใต้ดอกเห็ด มีลักษณะเป็นรูขนาดเล็กจำนวนมาก สีขาวอมเหลือง เหลืองอ่อน เหลืองจนถึงแดงอมส้ม ตามช่วงการเจริญของเห็ด ขนาดรูยาว 8-15 มิลลิเมตร แยกออกจากกัน จำนวนรู 3-6 รูต่อมิลลิเมตร เนื้อในดอกเห็ดสีชมพูถึงแดง มีลายเส้นสีขาว สปอร์รูปไข่ ผิวเรียบ ผนังสปอร์บาง ขนาด 3-4 x 4-5.5 ไมโครเมตร พิมพ์สปอร์สีครีม

การศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดลิ้นกวาง 7 ไอโซเลต บนอาหารวุ้น 6 ชนิด คือ PDA, CMA, GPA, MEA, PDPYA และ PMP โดยบ่มเชื้อใน 2 สภาพ เปรียบเทียบกันคือ สภาพปรกติและสภาพมืด ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) พบว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001, Fh002, Fh005 และ Fh007 มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดบนอาหาร PMP และเจริญได้ดีรองลงมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งการเจริญของเชื้อเห็ดไม่แตกต่างกันทั้งที่เลี้ยงในสภาพปรกติและสภาพมืด เส้นใยเชื้อเห็ดมีสีขาว เจริญหนาแน่นถึงหนาแน่นมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh003 มีการเจริญของเส้นใยในสภาพมืดได้ดีกว่าสภาพมีแสงปรกติ โดยในสภาพมืดเชื้อเห็ดเจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร PMP และรองลงมาคือ PDA ในขณะที่การเลี้ยงในสภาพปรกติ เชื้อเห็ดเจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA และรองลงมาคือ PDPYA เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh004 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GPA และรองลงมาบนอาหาร PDA ทั้งที่เลี้ยงในสภาพปรกติและสภาพมืดไม่แตกต่างกัน และเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh006 เจริญได้ในสภาพมืดดีกว่าสภาพมีแสงปรกติ โดยในสภาพมืดเชื้อเห็ดเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และรองลงมาคือ PMP ในขณะที่การเลี้ยงในสภาพปรกติ เชื้อเห็ดเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PMP และรองลงมาคือ PDA ซึ่งจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการเลือกใช้ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับเห็ดลิ้นกวางแต่ละไอโซเลต มีส่วนช่วยในการให้เชื้อเห็ดลิ้นกวางไอโซเลตนั้นๆเจริญได้ในอัตราที่ดี แต่อย่างไรก็ตามอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ใช้เป็น control ในการศึกษานี้ ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเชื้อเห็ดโดยทั่วไป เมื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 7 ไอโซเลต เชื้อเห็ดยังมีการเจริญของเส้นใยในอัตราที่ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ดังนั้นในกรณีที่ไม่สามารถเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดต่อชนิดของเห็ดลิ้นกวางไอโซเลตนั้นๆได้ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ยังสามารถนำมาใช้ทดแทนได้สำหรับใช้ในการเลี้ยงเชื้อเห็ดลิ้นกวาง

การเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต ที่คัดเลือกมา คือ Fh001, Fh002, Fh005 และ Fh006 บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน 7 ชนิด และแหล่งไนโตรเจน 6 ชนิด ที่แตกต่างกัน พบว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลต เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแมนโนสเป็นองค์ประกอบ ลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อเห็ดหนาแน่นปานกลาง ทั้งนี้เจริญได้ดีกว่าบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเดกซ์โตส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นองค์ประกอบโดยทั่วไปในอาหารเลี้ยงเชื้อรา ในขณะที่เชื้อเห็ดทั้ง 4 ไอโซเลต เจริญได้น้อยที่สุดบนอาหารพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอนซูโครสเป็นองค์ประกอบ จากที่เห็ดลิ้นกวางเป็นเห็ดที่มีการเจริญของเส้นใยค่อนข้างช้า บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด ดังนั้นการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเดกซ์โตสที่ใช้เป็นส่วนประกอบปรกติไปเป็นแหล่งคาร์บอนแมนโนส อาจจะมีผลช่วยทำให้เชื้อเห็ดลิ้นกวางเจริญได้เร็วและดีขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารพื้นฐานที่มีเปปโตนเป็นองค์ประกอบ เห็ดลิ้นกวาง Fh002 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารพื้นฐานที่มีแอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นองค์ประกอบ เห็ดลิ้นกวาง Fh005 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารพื้นฐานที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นองค์ประกอบและเห็ดลิ้นกวาง Fh006 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารพื้นฐานที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นองค์ประกอบโดย เชื้อเห็ดทั้ง 4 ไอโซเลต มีลักษณะการเจริญของเส้นใยหนาแน่นน้อยถึงปานกลาง เห็นได้ว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลตมีการเจริญที่ดีบนอาหารพื้นฐานที่มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อของเห็ดลิ้นกวางแต่ละไอโซเลต จะช่วยให้เชื้อเห็ดมีการเจริญที่ดีขึ้น แต่ทั้งนี้พบว่าไม่มีเชื้อเห็ดลิ้นกวางไอโซเลตใดเลยที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนยูเรีย

การเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ช่วงอุณหภูมิต่างๆ 5 ระดับ บ่มเลี้ยงเชื้อเห็ดเป็นเวลา 30 วัน พบว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวางทุกไอโซเลตเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) ลักษณะของเส้นใยเจริญหนาแน่นมาก โดยเชื้อเห็ด Fh005 มีการเจริญได้ดีที่สุด รองลงมาคือ Fh001, Fh002 และ Fh006 ตามลำดับ ลักษณะการเจริญของเส้นใยของเชื้อเห็ดลิ้นกวางทุกไอโซเลตหนาแน่นมาก และการบ่มเส้นใยเชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลตในช่วงอุณหภูมิ 25°c เจริญได้ดีรองลงมา ดังนั้นอุณหภูมิในช่วง 25-27°c จึงเหมาะสมต่อการนำมาใช้บ่มเลี้ยงเส้นใยหรือการเก็บรักษาเชื้อเห็ดลิ้นกวางในระยะสั้น (short term) ได้ ในขณะที่การบ่มเชื้อเห็ดในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำลง 20°c และ 15°c เชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลต มีแนวโน้มของอัตราการเจริญที่ลดลง ทั้งนี้เมื่อบ่มเชื้อเห็ดลิ้นกวางในช่วงอุณหภูมิที่สูง คือ 30°c พบว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลต มีการเจริญต่ำที่สุด

การศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวางบนเมล็ดข้าวฟ่าง เพื่อใช้เตรียมเชื้อขยายเห็ดลิ้นกวางบนเมล็ดข้าวฟ่าง หลังจากย้ายเชื้อเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต เลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่าง เป็นเวลา 12 วัน เชื้อเห็ดทุกไอโซเลตเริ่มมีการเจริญของเส้นใยจากชิ้นวุ้นลงบนเมล็ดข้าวฟ่าง เมื่อบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน พบว่าการบ่มเส้นใยในสภาพปรกติและในสภาพมืด เห็ดลิ้นกวาง Fh002 มีอัตราการเจริญสูงกว่าเห็ดลิ้นกวาง Fh005, Fh006 และ Fh001 ตามลำดับ ทั้งนี้ผลของสภาพการบ่มเส้นใยทั้งในสภาพปรกติและสภาพมืดไม่มีผลต่อความแตกต่างของอัตราการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh002 และ Fh005 ในขณะที่การบ่มเส้นใยในสภาพปรกติและสภาพไม่มีแสง มีผลต่อความแตกต่างของอัตราการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 และ Fh006 ดังนั้นการเลือกสภาพที่เหมาะสมต่อการบ่มเชื้อขยายเห็ดลิ้นกวางแต่ละชนิดบนเมล็ดข้าวฟ่าง จะช่วยให้เชื้อเห็ดเจริญเติบโตได้เร็วและดี ทั้งนี้ลักษณะของเส้นใยของเห็ดลิ้นกวางทุกไอโซเลตบนข้าวฟ่างมีสีขาว โดยเห็ดลิ้นกวาง Fh005 มีการเจริญของเส้นใยค่อนข้างหนาแน่นกว่าเห็ดลิ้นกวาง Fh002 และ Fh001 ในขณะที่เห็ดลิ้นกวาง Fh006 มีการเจริญของเส้นใยค่อนข้างบางบนเมล็ดข้าวฟ่าง

การทดสอบสูตรวัสดุเพาะเลี้ยงเห็ดลิ้นกวาง 3 สูตร ในเบื้องต้นกับเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 ในถุงพลาสติกขนาด 450 กรัม บ่มก้อนเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) ในสภาพมืด เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน เส้นใยของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 เริ่มเจริญลงไปบนวัสดุเพาะ ที่ระยะเวลา 30 วัน เชื้อเห็ดลิ้นกวางบนวัสดุเพาะสูตร 3 (ขี้เลื่อยไม้ยางพารา : ข้าวฟ่างต้มสุก : ปูนขาว : ดีเกลือ อัตรา 100 : 50 : 1: 0.2 กิโลกรัม) มีการเจริญจากปากถุงลงมาเร็วกว่าวัสดุสูตร 2 (ขี้เลื่อยไม้ยางพารา : รำละเอียด : ปูนขาว : ดีเกลือ อัตรา 100 : 50 : 1: 0.2 กิโลกรัม) และสูตร 1 (ขี้เลื่อยไม้ยางพารา : รำละเอียด : ปูนขาว : ดีเกลือ อัตรา 100 : 5 : 1: 0.2 กิโลกรัม) ตามลำดับ ทั้งนี้ลักษณะของเส้นใยที่เจริญบนวัสดุเพาะสูตร 1 และสูตร 2 มีความหนาแน่นกว่าเส้นใยเชื้อเห็ดที่เจริญบนวัสดุเพาะสูตร 3 ซึ่งมีลักษณะเส้นใยค่อนข้างบาง จากการทดสอบเบื้องต้นนี้ จึงนำสูตรวัสดุเพาะทั้ง 3 สูตร ไปใช้ในการศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ดลิ้นกวาง ทั้ง 4 ไอโซเลต โดยบรรจุวัสดุเพาะลงในถุงพลาสติกขนาด 300 กรัม เมื่อเวลาผ่านไป 12 วัน หลังจากใส่เชื้อขยายเห็ดลิ้นกวางบนเมล็ดข้าวฟ่าง ลงบนก้อนวัสดุเพาะ ทั้ง 3 สูตร เชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลต ไม่มีการเจริญของเส้นใยลงบนวัสดุเพาะสูตรใดเลย ซึ่งแตกต่างจากการทดสอบในเบื้องต้นกับเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 เพียงตัวอย่างเดียว ที่เมื่อหลังจากหยอดเชื้อขยายลงวัสดุเพาะ เป็นเวลา 15 วัน เส้นใยของเชื้อเริ่มเจริญลงไปบนวัสดุเพาะ และเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้นก้อนเชื้อเห็ดลิ้นกวางทั้ง 4 ไอโซเลต แสดงการปนเปื้อนของราดำและราเขียว ลงมาจากบริเวณเชื้อข้าวฟ่างที่ใส่ลงไป ซึ่งจากผลที่เกิดขึ้น อาจเป็นผลมาจากการใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพาราจากแหล่งที่ได้มาต่างกันกับเมื่อทดสอบในเบื้องต้น หรืออาจเกิดจากเชื้อขยายมีอายุค่อนข้างมาก จากที่เห็นว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวางใช้เวลามากกว่า 60 วันกว่าจะเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง และเมื่อนำมาใช้เชื้อขยายอาจมีประสิทธิภาพในการเจริญบนวัสดุเพาะลดลง ดังนั้นในการเตรียมเชื้อขยายเห็ดลิ้นกวาง ควรทำในปริมาณที่น้อยลงต่อขวดแก้วทนร้อน ซึ่งจากการทดลองใช้

ข้าวฟ่าง 150 กรัมต่อขวด อาจปรับลดลงเป็น 50-70 กรัมต่อขวด เพื่อให้เชื้อเห็ดเจริญได้เต็มในระยะเวลาที่เร็วขึ้นต่อการจะนำมาใช้และเชื้อขยายไม่แก่จนเกินไป

อย่างไรก็ตามจากการทดสอบวัสดุเพาะ 3 สูตรในเบื้องต้นกับเห็ดลิ้นกวาง Fh001 ได้นำก้อนเชื้อเห็ดที่เส้นใยเจริญเต็มก้อนแล้ว ย้ายมาบ่มในสภาพมีแสงสว่าง เพื่อให้เส้นใยแก่ต่ออีก 20-30 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-27°c) และกระตุ้นให้เกิดการสร้างตุ่มดอก พบว่าเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะสูตร 1 เท่านั้น ที่มีการสร้างตุ่มดอกเกิดขึ้นบริเวณไหล่ถุงเพาะเห็ด ในขณะที่บนวัสดุเพาะสูตร 2 และ 3 ไม่มีการพัฒนาดังกล่าวเกิดขึ้น อีกทั้งเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น ก้อนเชื้อสูตร 2 และ 3 แสดงการปนเปื้อนของราดำและราเขียว ลงมาจากบริเวณเชื้อขยายที่ใส่ลงไป ก้อนเชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 เมื่อใช้มีดลนไฟฆ่าเชื้อกรีดบริเวณที่มีการสร้างตุ่มดอกเห็ดเกิดขึ้น แล้วย้ายไปบ่มเลี้ยงต่อที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 23-25°c ให้ความชื้นโดยฉีดพ่นด้วยน้ำเป็นละอองฝอยบริเวณผิวก้อนถุงช่วงเช้า กลางวันและเย็น เมื่อเวลาผ่านไป 5-7 วัน ดอกเห็ดลิ้นกวางจะเจริญพัฒนาจนอยู่ในช่วงที่มีลักษณะเหมาะสมแก่การเก็บผลผลิตได้ ทั้งนี้จากการที่เชื้อเห็ดลิ้นกวาง Fh001 ที่ทดสอบในวัสดุเพาะสูตร 2 และ 3 เมื่อนำไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างตุ่มดอก แต่พบว่าเชื้อเห็ดไม่มีการพัฒนาสร้างตุ่มดอกเกิดขึ้น อีกทั้งยังแสดงการปนเปื้อนของราดำและราเขียว ทั้งนี้อาจเนื่องจากตัวเชื้อเห็ดเองสูญเสียประสิทธิภาพในการสร้างดอกเห็ดไป หรืออาจเกิดจากสภาพของการกระตุ้นให้เกิดการสร้างตุ่มดอกยังไม่เหมาะสม

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างเห็ดลิ้นกวางพบตัวอย่างเห็ดลิ้นกวาง 5 ไอโซเลต ทำให้หน่วยเก็บรักษาพันธุกรรมเห็ด กรมวิชาการเกษตร มีเชื้อพันธุ์เห็ดลิ้นกวางซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยเก็บรักษาและรวบรวมไว้ ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในด้านงานวิจัย ตลอดจนการพัฒนาไปสู่การเพาะเลี้ยงต่อไป

2. การศึกษาการกระตุ้นให้เกิดดอกของเห็ดลิ้นกวาง 4 ไอโซเลต แม้ว่าจากผลการทดสอบจะยังไม่ได้ข้อสรุปที่ชัดเจนถึงสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดลิ้นกวาง แต่ถึงอย่างไรก็ตามในการทดสอบในเบื้องต้นถึงการกระตุ้นให้เกิดดอก พบว่าเห็ดลิ้นกวางไอโซเลต Fh001 มีการสร้างตุ่มดอกเกิดขึ้นและพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1 ซึ่งจากผลการทดสอบทำให้ทราบถึงระยะเวลาและวิธีการในการบ่มก้อนเชื้อเห็ด รวมถึงปัจจัยและขั้นตอนในการกระตุ้นให้เกิดดอกได้ในเบื้องต้น ดังนั้นจากข้อมูลที่ได้เหล่านี้ จะนำไปใช้เพื่อศึกษาและพัฒนาต่อถึงวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดลิ้นกวางให้มีความคงที่และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น เพื่อที่จะนำวิธีการเพาะเลี้ยงที่ได้ถ่ายทอดสู่เกษตรกรที่สนใจการเพาะเลี้ยงเห็ดชนิดนี้ต่อไป

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสาขาวิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อพันธุ์เห็ดลิ้นกวาง ไอโซเลต NN1 และ PR เพื่อนำมาใช้ในการวิจัย

12. เอกสารอ้างอิง

นิวัฒ เสนาะเมือง. 2553. เห็ดป่าเมืองไทย: ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์. หจก. ยูนิเวอร์แซล กราฟฟิค แอนด์ เทรดดิ้ง: กรุงเทพมหานคร.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2539. เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย. ราชบัณฑิตยสถาน: กรุงเทพมหานคร.

ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และ ไมตรี สุทธจิตต์. 2543. เห็ดสมุนไพร: จากอดีต สู่ปัจจุบันและอนาคต. เห็ดไทย 2545. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย.

อรอนงค์ อรุณลักษณ์, 2551. ลักษณะโดยทั่วไป เครื่องหมายทางชีวโมเลกุลและความสามารถในการผลิตภายใต้สภาพควบคุม ของเห็ดลิ้นกวาง และเห็ดซิ่นโค่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Bernas, E., G. Jaworska, and Z. Lisiewska. 2006. Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 5 (1): 5-20.

Coletto, M. A. B. 1981. Basidiomycetes in relation to antibiosis. II. Antibiotic activity of mycelia and culture liquids. G Batteriol Virol Immunol. 74(7-12): 267-274.

Coletto, M. A. B. 1992. Antibiotic activity in basidiomycetes. VI. Antibiotic activity of mycelia and cultural filtrates of thirty three new strains. Allionia (Turin) 31:87-90.

Hattori, R., and H. Tanaka. 1997. Method for growing fruit body of *Fistulina hepatica*. United States Paten 5: 489-590.

Huffman, E. A. 2002. A new polyacetylenic alcohol in *Fistulina hepatica*: progress towards the identification of acetylenases in basidiomycetes. Miami University Oxford, Ohio.

Mello, A., S. Ghignone, A. Vizzini, C. Sechi, P. Ruiu, and P. Bonfante. 2006. ITS primers for the identification of marketable boletes. Journal of Biotechnology 121: 318-329.

Ohtsuka S, S. Ueno, C. Yoshikumi, F. Hirose, Y. Ohmura, T. Wada, T. Fujii, and E. Takahashi. 1973. Polysaccharides having an anticarcinogenic effect and a method of producing them from species of Basidiomycetes. United Kingdom Paten 1-82.

Ribeiro, B., P. Valentao, P. Baptista, R. M. Seabra, and P. B. Andrade. 2007. Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). Food and Chemical Toxicology 45: 1805-1813.

Sadler, M. 2003. Nutritional properties of edible fungi. Nutrition Bulletin 28: 305-308.

Sanmee, R., B. Dell, P. Lumyong, K. Izumori, and S. Lumyong. 2003. Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand. Food Chemistry 82: 527-532.

Smith, S. E., and D. J. Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd ed. Academic Press: London.

Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunodulating polysaccharide. Applied Microbiology Biotechnology 60: 258-274.

Wu, S., U. Krings, H. Zorn, and R. G. Berger. 2005. Volatile compounds from the fruiting bodies of beefsteak fungus *Fistulina hepatica* (Schaeffer Fr.) Fr. Food Chemistry 92(2): 221-226.

Wu, S., H. Zorn, U. Krings, and R. G. Berger. 2007. Volatiles from submerged and surface-cultured beefsteak fungus, *Fistulina hepatica*. Flavor and Fragrance Journal 22: 53-60.