รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเห็ด

2. โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเห็ดเศรษฐกิจสายพันธุ์ใหม่
กิจกรรมที่ 5 เห็ดที่มีศักยภาพ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) รวบรวม ศึกษา และประเมินการใช้ประโยชน์ของเห็ดหูหนูขาว (*Tremella fuciformis* Berkeley) เพื่อรวบรวมไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์ศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Collection, Study and Utilization of *Tremella fuciformis* Berkeley for Conserve in Genbank

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายอนุสรณ์ วัฒนกุล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	น.ส.วราพร ไชยมา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

สำรวจพบเห็ดหูหนูขาวจำนวน 12 ไอโซเลท ในช่วงฤดูฝน ทั้งในสภาพป่าธรรมชาติ ป่าปลูก และบริเวณรอบ ๆ ที่อยู่อาศัย สามารถแยกเชื้อเห็ดหูหนูขาวได้ 4 ไอโซเลท คือ TF001, TF002, TF003 และ TF004 และแยกเชื้อ *Hypoxylon* sp. จากท่อนไม้ที่เห็ดหูหนูขาวเจริญอยู่ได้จำนวน 4 ไอโซเลท คือ H-TF001, H-TF002, H-TF003 และ H-TF004 การแยกเชื้อบริสุทธิ์เห็ดหูหนูขาวทำได้ยากมาก อัตราการปนเปื้อนสูง เส้นใยเห็ดหูหนูขาวเจริญได้ดีบนอาหาร PYPDA ส่วนเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. เจริญได้ดีบนอาหาร PDA และ PYPDA แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวและเชื้อรา *Hypoxylon* sp. คือ Starch แหล่งไนโตรเจนเหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาว คือ NH_4NO_3 และ $(NH_4)_2SO_4$ ส่วนแหล่งไนโตรเจนเหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. คือ KNO_3 และเส้นใยเห็ดหูหนูขาวเจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 25 - 30 องศาเซลเซียส ในการผสมเชื้อเห็ดหูหนูขาวและเชื้อรา *Hypoxylon* sp. นั้น ต้องใช้เห็ดหูหนูขาวที่เจริญเป็นเส้นใยมาผสมจึงจะสามารถผสมเข้ากันได้ดี หากนำเห็ดหูหนูขาวที่เจริญอยู่ในระยะที่เป็นยีสต์ (yeast-like conidia) มาผสม โอกาสที่ยีสต์จะงอกเป็นเส้นใยและเข้าผสมกับเส้นใย *Hypoxylon* sp. นั้นเป็นไปได้น้อย เนื่องจากไม่ใช่ทุกเซลล์ของยีสต์ที่จะงอกเป็นเส้นใยเชื้อเห็ดหูหนูขาวได้

6. คำนำ

เนื่องจากปัจจุบันพื้นที่ป่าธรรมชาติลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีผลต่อความอุดมสมบูรณ์ของป่าและความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต สิ่งมีชีวิตหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป เห็ดจัดเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกรา ที่มีความสำคัญกับมนุษย์เป็นอย่างมาก เป็นอาหาร ยา และเป็นผู้ย่อยสลายช่วยรักษาสมดุลของสิ่งแวดล้อมโลก เห็ดหูหนูขาว (*Tremella fuciformis* Berkeley) เป็นเห็ดที่มีรสชาติดี หวาน กลิ่นหอม อร่อย เห็ดชนิดนี้เป็นที่รู้จักกันดีในวงการแพทย์แผนโบราณของจีน เป็นอาหารบำรุงน้ำอสุจิ ทำให้ไตแข็งแรง ดับอาการร้อนใน ทำให้ปอดทำงานได้ดีมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทำให้เกิดการหลั่งน้ำลาย ช่วยในการย่อยอาหารและบำรุงกระเพาะ ช่วยหยุดอาการไอ ลดไข้ ช่วยกระตุ้นการทำงานของลำไส้ ทำให้ระบบการทำงานของร่างกายร่วมกับไวตามินดีขึ้นเป็นการเพิ่มพลังของชีวิต กระตุ้นการทำงานของระบบเลือด การทำงานของหัวใจ และบำรุงสมอง แลยังมีคุณสมบัติเป็นยาอายุวัฒนะอีกด้วย เห็ดหูหนูขาวเมื่อนำมาตากแห้งจะสามารถเก็บไว้ได้นานโดยไม่เสื่อมคุณภาพ ในธรรมชาติเห็ดหูหนูขาวเจริญได้ดีในเขตร้อนโดยเฉพาะสภาพอากาศเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เห็ดหูหนูขาวจะเจริญเติบโตบนขอนไม้ที่เริ่มเปื่อยผุพังในบริเวณที่ชุ่มชื้นมาก ๆ ชาวจีนนับว่าเป็นชาติแรกที่รู้จักวิธีการเพาะเห็ดหูหนูขาวโดยการตัดไม้โอ๊กเป็นท่อน ๆ มาเพาะ แต่ประเทศไทยยังไม่สามารถเพาะได้

การวิจัยครั้งนี้จึงต้องการเก็บรวบรวมเห็ดหูหนูขาวจากธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อการรวบรวมสายพันธุ์ของเห็ดชนิดนี้ไว้ใช้ในการศึกษา หรือนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต ได้นำข้อมูลที่ได้นั้นมาปรับปรุงลักษณะพื้นฐานทางนิเวศวิทยาของการเจริญของดอกเห็ดนั้น ๆ และเป็นตัวอย่างการศึกษาเพื่อการอนุรักษ์เห็ดต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อรวบรวมและศึกษา ลักษณะของเห็ดหูหนูขาวใน ประเทศไทย
2. ให้ได้สายพันธุ์เห็ดหูหนูขาวจากธรรมชาติ นำมาอนุรักษ์ไว้ในศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ด ฯ
3. ให้ได้ข้อมูล ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีววิทยาของเห็ดหูหนูขาว เพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์
4. เพื่อได้สายพันธุ์ที่เหมาะสม นำไปศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดหูหนูขาว

การตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้องและผลงานวิจัยที่ผ่านมา

เห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำประเภทราที่มีวิวัฒนาการสูงกว่าราอื่น ๆ เห็ดมีความสำคัญต่อมนุษย์มากทั้งในด้านอาหาร ยา และสิ่งแวดล้อม เห็ดมีรูปร่าง สีสัน ลักษณะวิสัย ถิ่นกำเนิดแตกต่างกัน เช่นเห็ดเกิดตามธรรมชาติมีมากในฤดูฝน ตามป่า ทุ่งนา ทุ่งหญ้า พื้นดิน ต้นไม้ ขอนไม้ (ราชบัณฑิตยสถาน, 2539) เห็ดบางชนิดอยู่อาศัยร่วมกับรากพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ได้แก่ เห็ดไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) ซึ่งมีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของต้นไม้ เสริมความทนทานต่อความแห้งแล้ง (Brundrett et al., 1996) เห็ดกินได้เป็นอาหารที่มี

คุณค่ามากเทียบกับผักเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญยิ่ง เพราะเห็ดสามารถเปลี่ยน lingo cellulose ให้กลายเป็น fungal protein ได้โดยตรงนั่นเอง (นัยนา, 2545; Brundrett et al., 1996) เห็ดหลายชนิดได้รับการพัฒนาจากเห็ดป่าและส่งเสริมให้เพาะเลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน เช่น เห็ดขอนขาว และเห็ดหูหนู เป็นต้น มีการนำเห็ดไปทำสีย้อมผ้า ผลิตสารปฏิชีวนะ และเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม เห็ดบางชนิดทำให้เกิดสีในเนื้อไม้ และรักษาเนื้อไม้ เช่น เห็ดฆ้องเขาเขียว ดังนั้นเห็ดจึงมีบทบาทสำคัญกับชีวิตมนุษย์ทั้งระดับพื้นฐานความเป็นอยู่ และระดับเศรษฐกิจของชาติ

คุณค่าทางสมุนไพรของเห็ด

เห็ดนับว่าเป็นแหล่งผลิตผลิตภัณฑ์ทางยาตัวใหม่ ๆ สารที่แยกจากเห็ดบางชนิดมีคุณสมบัติในการต่อต้านการเกิดเนื้องอก กระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดโคเลสเตอรอลในเลือด มีคุณสมบัติต่อต้านไวรัส แบคทีเรีย เห็ดหลายชนิดมีสาร polysaccharide ในดอกเห็ด เส้นใย ซึ่งสารนี้ส่วนใหญ่มีโครงสร้างหลักของ glucan เป็นส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการระงับการเจริญของมะเร็ง โดยกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิกันโดยเฉพาะ T- Cell เพื่อต่อต้านเซลล์มะเร็ง (Wasser, 2002) มีรายงานทางเภสัชกรรมว่าเห็ดเป็นแหล่งยาสมุนไพรสำคัญในการใช้รักษาโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคเบาหวาน พบการสร้าง terpenoids, flavonoids, sterol, alkanoids และ polysaccharide ซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อร่างกายมนุษย์ (Li et al., 2004) จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้วงการแพทย์ และเภสัชกรรมค้นหาเห็ดที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสาร polysaccharide เพื่อนำมาผลิตยาสำหรับรักษาโรคมะเร็งและระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ซึ่งยังไม่มียาชนิดใดรักษาได้ในปัจจุบัน

เห็ดหูหนูขาว (*Tremella fuciformis* Berkeley)

มีชื่อสามัญคือ Snow mushroom หรือ White Brain Fungus จัดอยู่ในวงศ์ Tremellaceae เห็ดชนิดนี้เป็นที่รู้จักกันดีในวงการแพทย์แผนโบราณของจีน เห็ดชนิดนี้มีรูปร่างหน้าสวยงาม ดูสะอาด มีรสชาติหวาน นุ่ม และไม่มีพิษอะไรต่อร่างกายเลย มีสรรพคุณเป็นอาหารบำรุงน้ำอสุจิ ทำให้ไตแข็งแรง ดับอาการร้อนใน ทำให้ปอดทำงานดีมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทำให้เกิดการหลั่งน้ำลาย ช่วยในการย่อยอาหารและบำรุงกระเพาะ ช่วยระงับอาการไอ ลดไข้ ช่วยกระตุ้นการทำงานของลำไส้ กระตุ้นการทำงานของหัวใจ และบำรุงสมอง ในโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในฟูเจี้ยน ประเทศจีน ได้นำน้ำเชื่อมเห็ดหูหนูขาวในการรักษาโรคหลอดลมอักเสบเรื้อรังซึ่งมีประสิทธิภาพเกือบ 85% และมีตัวเลขนัยสำคัญที่ประสบความสำเร็จถึง 47% ยังมีรายงานการใช้น้ำเชื่อมเห็ดหูหนูขาวในการรักษาโรคหลอดเลือดในปอดที่ต่อเชื่อมกับหัวใจตีบเรื้อรัง พบว่ามีผลตอบสนอง 80-90% น้ำเชื่อมนี้ยังช่วยบรรเทาอาการไอ ขับเสมหะและโรคหืดหอบ ช่วยบรรเทาอาการระคายเคืองในลำคอ บรรเทาอาการบาดเจ็บที่ซี่โครง อาการบาดแผลเรื้อรังในหลอดลม ทำให้รอบเดือนของสตรีเป็นปกติ ช่วยในการระบาย รักษาโรคบิด โดยใช้เห็ดหูหนูขาว 3-4 กรัม แช่ในน้ำอุ่น 1-2 ชั่วโมง จากนั้นกรองแล้วเติมน้ำพอท่วมแล้วตุ๋นจนเป็นของเหลวข้น และเติมน้ำตาลทรายกรวด รับประทานวันละ 2 ครั้ง อีกทั้งยังมีรายงานว่าสารสกัด polysaccharide ที่ได้จากเห็ดหูหนูขาวช่วยยับยั้งการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง sarcoma 180 ในหนูขาว (สาทิต. 2546)

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตู้บ่มเชื้อ
2. ตู้เขี่ยเชื้อ
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ ต่าง ๆ
5. วัสดุเพาะ เช่น ขี้เลื่อย รำ ฯลฯ

วิธีการ

1. รวบรวมและเก็บตัวอย่างสายพันธุ์เห็ดหูหนูขาวที่สามารถบริโภคได้จากธรรมชาติในประเทศไทย

1.1 การเก็บตัวอย่าง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานและจุลสัณฐานวิทยา

เก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดหูหนูขาวในพื้นที่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทย โดยจดบันทึกลักษณะต่าง ๆ เช่น สถานที่เก็บ วันที่เก็บ วัสดุที่เห็ดนั้นขึ้นอยู่ ลักษณะการขึ้น การมีหนอนกัด หรือสัตว์แทะหรือไม่ จากนั้นนำตัวอย่างเห็ดที่เก็บรวบรวมได้มาศึกษารายละเอียดต่าง ๆ ทำการวัดขนาด ดูรูปร่างของดอกเห็ด สี ลักษณะผิวของดอกเห็ด ดูลักษณะสี ความกว้างหนา และทำการผ่าดูเนื้อเยื่อภายในดอก

1.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

เห็ดหูหนูขาว ใช้วิธีตัด หรือแยกเนื้อเยื่อ โดยใช้มีดผ่าตัด เข็มเขี่ย วางชิ้นเนื้อเยื่อบนอาหาร PDA ส่วน *Hypoxylon* sp. ทำการตัดเนื้อไม้บริเวณที่มีเห็ดหูหนูขาวเกิดดอก วางเลี้ยงบนอาหาร PDA หลังเส้นใยเจริญทำการตัดปลายเส้นใยไปย้ายเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ เก็บรักษาเชื้อ เพื่อใช้ดำเนินการทดลองต่อไป

2. ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดหูหนูขาว

2.1 อาหารวุ้น

ศึกษาการเจริญของเส้นใยของเห็ดหูหนูขาวและ *Hypoxylon* sp. บนอาหารบนอาหารวุ้น 5 ชนิด ในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเชื้อเห็ดในแนวระดับ (linear growth rate) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD, completely randomized design) ประกอบด้วย 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 จานเลี้ยงเชื้อ อาหารที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

1) PDA (มันฝรั่ง 200 กรัม, dextrose 20 กรัม)

2) PDPYA (มันฝรั่ง 100 กรัม, dextrose 20 กรัม, peptone 2 กรัม, yeast extract 0.5 กรัม)

3) CMA (corn meal 20 กรัม)

4) MEA (malt extract 3 กรัม, yeast extract 2 กรัม, KH_2PO_4 0.5 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม)

5) GPA (glucose 10 กรัม, peptone 2.0 กรัม, KH_2PO_4 0.5 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม)

อาหารทุกสูตรที่ทำการทดลองใช้จำนวน 20 มล. ต่อจานเลี้ยงเชื้อ ปลูกเชื้อบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากปลูกเชื้อแล้วประมาณ 30 วัน จึงทำการวัดความกว้างของโคโลนี และประเมินความหนาแน่นของเส้นใยโดยสายตา

2.2แหล่งคาร์บอน

ศึกษาการเจริญของเส้นใยของเห็ดหูหนูขาวและ *Hypoxylon* sp. บนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ จำนวน 7 ชนิด วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD, completely randomized design) ประกอบด้วย 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 จานเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบ คือ กลูโคส (glucose), เซลลูโลส (cellulose), ซูโครส (sucrose), แป้ง (soluble starch), ฟรุคโตส (fructose), แมนโนส (mannose) และมัลโตส (maltose) อาหารทุกสูตรที่ทำการทดลองใช้จำนวน 20 มล. ต่อจานเลี้ยงเชื้อ ปลูกเชื้อบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากปลูกเชื้อแล้วประมาณ 30 วัน จึงทำการวัดความกว้างของโคโลนี และประเมินความหนาแน่นของเส้นใยโดยสายตา

2.3 แหล่งไนโตรเจน

ศึกษาการเจริญของเส้นใยของเห็ดหูหนูขาวและ *Hypoxylon* sp. บนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ จำนวน 6 ชนิด วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD, completely randomized design) ประกอบด้วย 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 จานเลี้ยงเชื้อ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ทดสอบ คือ เปปโตน (peptone), โปรแตสเซียมไนเตรต (KNO3), ยูเรีย (urea), แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH4Cl), แอมโมเนียมซัลเฟต (NH4)2SO4 และแอมโมเนียมไนเตรต (NH4NO3) อาหารทุกสูตรที่ทำการทดลองใช้จำนวน 20 มล. ต่อจานเลี้ยงเชื้อ ปลูกเชื้อบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากปลูกเชื้อแล้วประมาณ 30 วัน จึงทำการวัดความกว้างของโคโลนี และประเมินความหนาแน่นของเส้นใยโดยสายตา

2.4 อุณหภูมิ

ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเลี้ยงเส้นใยเห็ดหูหนูขาว ในอาหาร PDA โดยนำไปบ่มเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 15, 20, 25, 30 และ 35 ^{0} ซ วางแผนแบบสุ่มตลอด (CRD, completely randomized design) ประกอบด้วย 4 ซ้ำ (ซ้ำละ 4 จานเลี้ยงเชื้อ) อาหารทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลองใช้จำนวน 20 มล. ต่อจานเลี้ยงเชื้อ หลังจากปลูกเชื้อแล้วประมาณ 30 วัน จึงทำการวัดความกว้างของโคโลนี และประเมินความหนาแน่นของเส้นใยโดยสายตา

3. ศึกษาการเจริญของเส้นใยและการเกิดดอกบนวัสดุเพาะในถุงพลาสติก

3.1 การผลิตเชื้อขยาย

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหูหนูขาว เมื่อมีอายุ 10 วัน หรือ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. นำเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. ที่อายุ 6 วัน ใส่เชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อหรือหลอดที่เลี้ยงเส้นใยเห็ดหูหนูขาว โดยวางตรงกลางโคโลนีของเส้นใยเห็ดหูหนูขาว อัตราส่วน *Hypoxylon* sp. : เส้นใยเห็ดหูหนูขาว ประมาณ 1 : 1000 บ่มเลี้ยงต่อจนเส้นใยผสมเข้ากัน จึงตัดชิ้นวุ้นบริเวณที่มีเส้นใยเห็ดหูหนูขาวเจริญไปเลี้ยงในขี้เลื่อยเพื่อทำเชื้อขยายต่อไป

3.2 เปรียบเทียบวัสดุเพาะหลักและวัสดุทำเชื้อขยาย

ศึกษาการเพาะเห็ดหูหนูขาวโดยทำการทดลองในถุงพลาสติก เชื้อที่ใช้เพาะ (spawn) เป็นเชื้อที่เตรียมเลี้ยงไว้ในเมล็ดข้าวฟ่างและในขี้เลื่อย มี 4 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ล่ะ 4 ซ้ำ ซ้ำล่ะ 5 ถุง วางแผนการทดลองแบบ RCBD (randomized complete block design) มีส่วนประกอบดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา + รำละเอียด + ปูนขาว + ดีเกลือ ใส่เชื้อขยายจากข้าวฟ่าง
ทรีตเมนต์ที่ 2 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา + รำละเอียด + ปูนขาว + ดีเกลือ ใส่เชื้อขยายจากขี้เลื่อย
ทรีตเมนต์ที่ 3 ขี้เลื่อยไม้ทุเรียน + รำละเอียด + ปูนขาว + ดีเกลือ ใส่เชื้อขยายจากข้าวฟ่าง
ทรีตเมนต์ที่ 4 ขี้เลื่อยไม้ทุเรียน + รำละเอียด + ปูนขาว + ดีเกลือ ใส่เชื้อขยายจากขี้เลื่อย

ขี้เลื่อยไม้ + รำละเอียด + ปูนขาว + ดีเกลือ อัตราส่วน 100: 20: 1: 0.5 นำวัสดุแต่ละสูตรผสมให้เข้ากัน ผสมน้ำให้มีความชื้นประมาณ 65 % บรรจุถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 7 x 12 นิ้ว ถุงละ 500 กรัม อัดวัสดุให้แน่นพอสมควร ใส่คอพลาสติกและอุดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}C เป็นเวลา 45 นาที. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจึงเขี่ยเชื้อที่เลี้ยงไว้ในขี้เลื่อยลงไป 1 ช้อนต่อถุง บันทึกผล เปรียบเทียบระยะเวลาที่เชื้อเห็ดเจริญเต็มถุง ทิ้งไว้ให้เส้นใยแก่ จึงนำไปเปิดถุงให้ออกดอก

3.3 เปรียบเทียบสูตรอาหาร

ศึกษาการเพาะเห็ดหูหนูขาวโดยทำการทดลองในถุงพลาสติก เชื้อที่ใช้เพาะ (spawn) เป็นเชื้อที่เตรียมเลี้ยงไว้ขี้เลื่อย มี 3 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ล่ะ 5 ซ้ำ ซ้ำล่ะ 5 ถุง วางแผนการทดลองแบบ RCBD (randomized complete block design) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา + รำละเอียด + ปูนขาว + ดีเกลือ อัตราส่วน 100: 5: 1: 0.2
ทรีตเมนต์ที่ 2 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา + รำละเอียด + ปูนขาว + ดีเกลือ อัตราส่วน 100: 20: 1: 0.2
ทรีตเมนต์ที่ 3 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา + ข้างฟ่างต้ม + น้ำตาล + ดีเกลือ อัตราส่วน 100: 50: 1: 0.2

นำวัสดุแต่ละสูตรผสมให้เข้ากัน ผสมน้ำให้มีความชื้นประมาณ 65 % บรรจุถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 7 x 12 นิ้ว ถุงละ 500 กรัม อัดวัสดุให้แน่นพอสมควร ใส่คอพลาสติกและอุดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อ ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}C เป็นเวลา 45 นาที. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจึงเขี่ยเชื้อที่เลี้ยงไว้ในขี้เลื่อยลงไป 1 ช้อนต่อถุง บันทึกผล เปรียบเทียบระยะเวลาที่เชื้อเห็ดเจริญเต็มถุง ทิ้งไว้ให้เส้นใยแก่ จึงนำไปเปิดถุงให้ออกดอก

การเปิดดอก ทำโดยดึงจุกสำลีออก พับปากถุงลงมาให้อยู่เหนือวัสดุเพาะประมาณ 2 - 3 ซม. แล้วนำเข้าโรงเรือน (อุณหภูมิห้อง 26 - 32 ^{0}C) และความชื้นสัมพัทธ์ 85% รอจนกระทั่งเห็ดออกดอก คำนวณหา B.E.โดยใช้สูตร

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

4. บันทึกข้อมูลเข้าฐานข้อมูลเห็ดในธนาคารเชื้อพันธุ์

เวลาและสถานที่ ปี 2554 – 2555

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. สำรวจเห็ดหูหนูขาวในพื้นที่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกกลาง และภาคใต้ของประเทศไทย
2. กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ตึกโภชากร จตุจักร กทม

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. รวบรวมและเก็บตัวอย่างสายพันธุ์เห็ดหูหนูขาวที่สามารถบริโภคได้จากธรรมชาติในประเทศไทย

1.1 การเก็บตัวอย่าง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจุลสัณฐานวิทยา

จากการสำรวจเห็ดหูหนูขาวในสภาพธรรมชาติ พบเห็ดหูหนูขาวจำนวน 12 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) พบในช่วงฤดูฝน ทั้งในสภาพป่าธรรมชาติ ป่าปลูก และบริเวณรอบ ๆ ที่อยู่อาศัย

ตารางที่ 1 แสดงผลการสำรวจพบเห็ดหูหนูขาวในธรรมชาติ

จำนวน /ไอโซเลต	**สถานที่สำรวจ / เก็บตัวอย่าง**	**ชนิดพืชอาศัย**	**ภาพประกอบ**
ไอโซเลตที่ 1	อ.น้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	ตระกูลไม้ก่อ	
ไอโซเลตที่ 2	อ.น้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	ไม้มะม่วง	
ไอโซเลตที่ 3	อ.คลองลาน จ. กำแพงเพชร	ไม้มะม่วง	
ไอโซเลตที่ 4	อ.คลองลาน จ. กำแพงเพชร	ไม้ขนุน	
ไอโซเลตที่ 5	อ่าวคุ้งกระเบน อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี	ไม้เงาะ	
ไอโซเลตที่ 6	น้ำตกคลองไพบูลย์ จ. จันทบุรี	ไม่ทราบชนิด	

ไอโซเลตที่ 7	อ.โป่งน้ำร้อน จ.จันทบุรี	ไม้มะม่วง	
ไอโซเลตที่ 8	ต.ทุ่งเพล อ.มะขาม จ. จันทบุรี	ไม้สะตอ	
ไอโซเลตที่ 9	จ.นครราชสีมา	ไม่ทราบชนิด	
ไอโซเลตที่ 10	อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงใหม่	ไม้มะม่วง	
ไอโซเลตที่ 11	อ.ภูพาน จ.สกลนคร	ไม้มะกอก	
ไอโซเลตที่ 12	อ.ภูพาน จ.สกลนคร	ไม้สะเดา	

ชั้น Tremellomycetes

อันดับ Tremellales

วงศ์ Tremellaceae

สกุล ***Tremella***

Tremella fuciformis

ลักษณะจำแนกชนิด

ดอกเห็ด คล้ายแผ่นวุ้น บาง สีขาวโปร่งแสง แผ่นเห็ดเป็นคลื่นเชื่อมติดกันปลายแยกเป็นแขนง คล้ายกลีบดอกไม้จำนวนมาก เมื่ออายุมากขึ้นจะเพิ่มจำนวนอัดแน่นเป็นก้อนกลม ดอกแห้งเปลี่ยนเป็นสีขาวอมเหลืองอ่อน

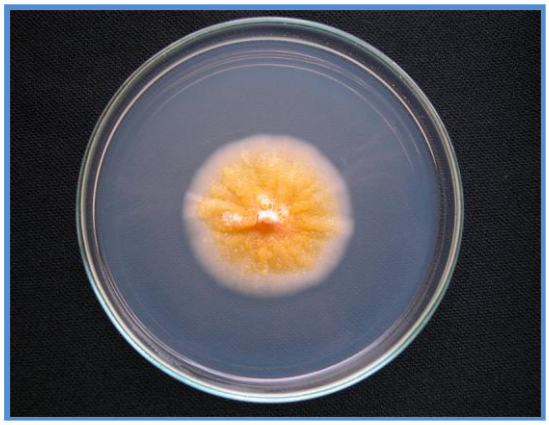
สปอร์ รูปไข่ แกนกลางคอดเล็กน้อย ขนาด 7-9 X 4-6.5 ไมโครเมตร เซลล์ที่ให้กำเนินสปอร์มีผนังกันตามยาว แบ่งเป็น 4 พูชัดเจน
(สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2550)

1.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

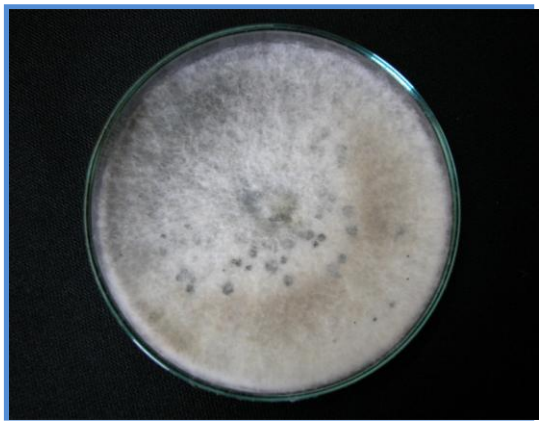
สามารถแยกเชื้อเห็ดหูหนูขาวได้ 4 ไอโซเลท คือ

TF001 =	ไอโซเลทที่ 1	อ.น้ำหนาว จ.เพชรบูรณ์	พืชอาศัย ตระกูลไม้ก่อ
TF002 =	ไอโซเลทที่ 7	อ.โป่งน้ำร้อน จ.จันทบุรี	พืชอาศัย ไม้มะม่วง
TF003 =	ไอโซเลทที่ 8	อ.มะขาม จ.จันทบุรี	พืชอาศัย ไม้สะตอ
TF004 =	ไอโซเลทที่ 11	อ.ภูพาน จ.สกลนคร	พืชอาศัย ไม้มะกอก

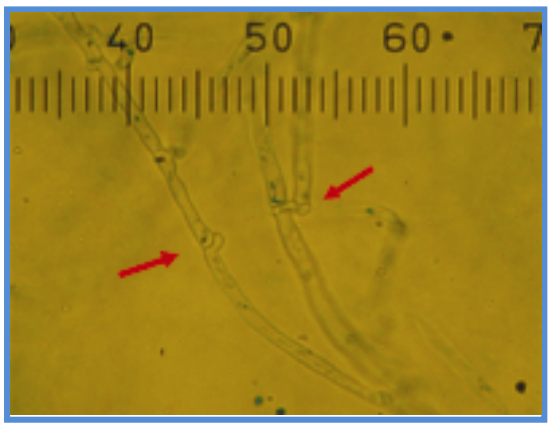
และแยกเชื้อ *Hypoxylon* sp. จากท่อนไม้ที่เห็ดหูหนูขาวเจริญอยู่ได้จำนวน 4 ไอโซเลท คือ H-TF001, H-TF002, H-TF003 และ H-TF004 ซึ่งมีรายงานว่าเห็ดหูหนูขาวและเชื้อรา *Hypoxylon* sp. มีความจำเพาะเจาะจงกัน โดยหูหนูขาวเป็นปรสิตของเชื้อรา *Hypoxylon* sp. หากแยกเชื้อเห็ดหูหนูขาวจากต้นไม้หรือท่อนไม้ใด ต้องแยกเชื้อรา *Hypoxylon* sp. ที่เจริญอยู่ในต้นไม้หรือท่อนไม้นั้นด้วย (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544) จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดหูหนูขาวในการทดลองครั้งนี้สามารถแยกเชื้อได้เพียง 4 ไอโซเลท จากที่สำรวจพบถึง 12 ไอโซเลท ด้วยการแยกเชื้อบริสุทธิ์เห็ดหูหนูขาวทำได้ยากมาก เนื่องจากดอกเห็ดมีขนาดเล็กและบาง การตัดชิ้นเนื้อเยื่อภายในดอกทำได้ค่อนข้างยาก อีกทั้งเห็ดที่พบในธรรมชาติมีหนอนแมลงเข้าทำลายอยู่ภายในดอกเห็ดทำให้เกิดอัตราการปนเปื้อนสูงทั้งจากแบคทีเรียและเชื้อรา



รูปที่ 1 เชื้อบริสุทธิ์เห็ดหูหนูขาว



รูปที่ 2 เชื้อบริสุทธิ์ *Hypoxylon* sp.



รูปที่ 3 เส้นใยเห็ดหูหนูขาวแสดง clamp connection

รูปที่ 4 ดอกเห็ดหูหนูขาวบนอาหารวุ้น PDA

2. ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดหูหนูขาว

2.1 อาหารวุ้น

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 2) พบว่าเส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF001 เจริญได้ดีบนอาหาร PYPDA และ GPA คือ 4.54 และ 4.44 ซม. ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีพบว่าบนอาหาร PYPDA เส้นใยมีความหนาแน่นมากกว่า (รูปที่ 5) เส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF002 เจริญได้ดีบนอาหาร CMA GPA และ PYPDA คือ 4.23 4.09 และ 3.80 ซม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีพบว่าบนอาหาร PYPDA เส้นใยมีความหนาแน่นมากกว่า (รูปที่ 6) เส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF003 เจริญได้ดีบนอาหาร GPA และ PYPDA คือ 3.89 และ 3.78 ซม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีพบว่าบนอาหาร

PYPDA เส้นใยมีความหนาแน่นมากกว่า (รูปที่ 7) เส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF004 เจริญได้ดีบนอาหาร PYPDA คือ 4.69 ซม. (รูปที่ 8) และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าบนอาหาร PYPDA และ PDA เส้นใยมีความหนาแน่นใกล้เคียงกัน

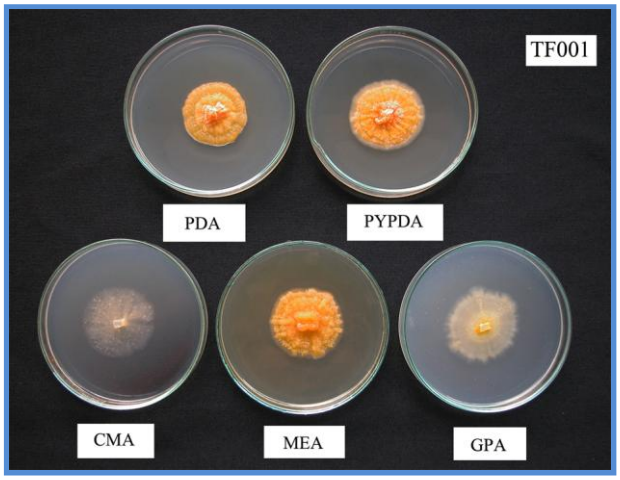
ตารางที่ 2 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวบนอาหารวุ้นชนิดต่าง ๆ

อาหาร	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี เห็ดหูหนูขาว (ซม.)			
	TF001	TF002	TF003	TF004
PDA	4.01 bc	3.59 bc	2.99 b	3.96 b
PYPDA	4.54 a	3.80 abc	3.78 a	4.69 a
CMA	3.90 c	4.23 a	3.19 b	4.21 b
MEA	3.98 bc	3.40 c	3.11 b	4.01 b
GPA	4.44 ab	4.09 ab	3.89 a	4.26 b

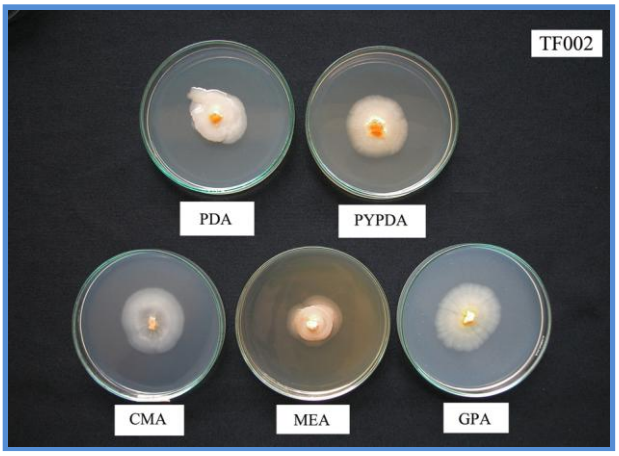
C.V. (TF001) = 7.27 % C.V. (TF002) = 8.32 %

C.V. (TF003) = 8.45 % C.V. (TF004) = 5.89 %

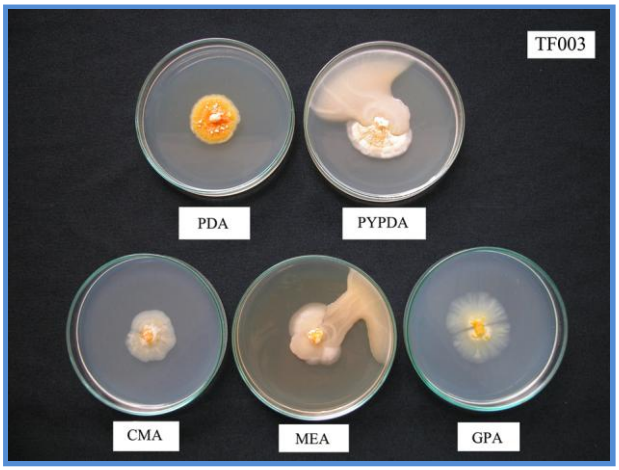
หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan’s new multiple rang test (DMRT)



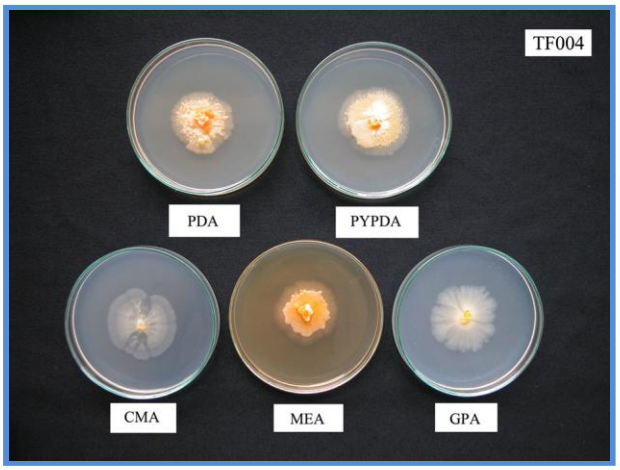
รูปที่ 5 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF001 บนอาหารชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 6 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF002 บนอาหารชนิด



รูปที่ 7 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF003 บนอาหารชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 8 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF004 บนอาหารชนิดต่าง ๆ

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 3) พบว่าเส้นใย *Hypoxylon* sp. ไอโซเลท H-TF001 เจริญได้ดีบนอาหาร PDA PYPDA CMA และ MEA คือ 9.00 8.95 8.73 และ 8.70 ซม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีพบว่าบนอาหาร PYPDA PDA และ MEA เส้นใยมีความหนาแน่นมากกว่าอาหารชนิดอื่นตามลำดับ (รูปที่ 9) เส้นใย *Hypoxylon* sp. H-TF002 เจริญได้ดีบนอาหาร PDA PYPDA และ MEA คือ 9.00 8.93 และ 8.73 ซม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีพบว่าบนอาหาร PYPDA PDA และ MEA เส้นใยมีความหนาแน่นมากกว่าอาหารชนิดอื่นตามลำดับ (รูปที่ 10) เส้นใย *Hypoxylon* sp. H-TF003 เจริญได้ดีบนอาหาร MEA PDA และ PYPDA คือ 8.88 8.85 และ 8.80 ซม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีพบว่าบนอาหาร PDA PYPDA และ MEA เส้นใยมีความหนาแน่นมากกว่าอาหารชนิดอื่นตามลำดับ (รูปที่ 11) เส้นใย *Hypoxylon* sp. H-TF004 เจริญได้ดีบนอาหาร PYPDA PDA และ MEA คือ 8.98 8.95 และ 8.95 ซม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีพบว่าบนอาหาร PDA PYPDA และ MEA เส้นใยมีความหนาแน่นมากกว่าอาหารชนิดอื่นตามลำดับ (รูปที่ 12)

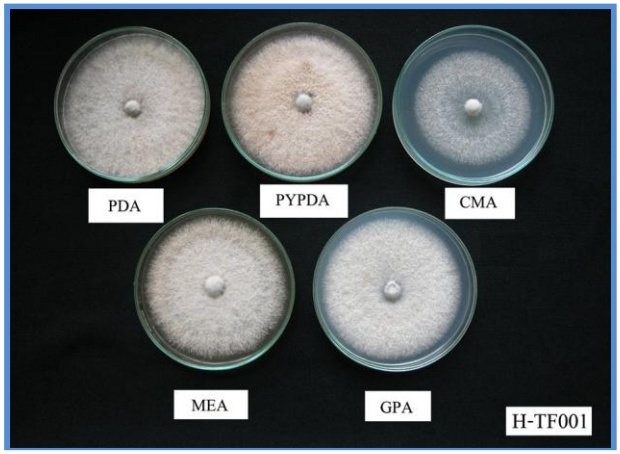
ตารางที่ 3 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใย *Hypoxylon* sp. บนอาหารวุ้นชนิดต่าง ๆ

อาหาร	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี *Hypoxylon* sp. (ซม.)			
	H-TF001	H-TF002	H-TF003	H-TF004
PDA	9.00 a	9.00 a	8.85 a	8.95 a
PYPDA	8.95 a	8.93 a	8.80 a	8.98 a
CMA	8.73 a	6.85 c	6.30 c	6.48 c
MEA	8.70 a	8.73 a	8.88 a	8.95 a
GPA	7.30 b	8.18 b	8.08 b	8.60 b

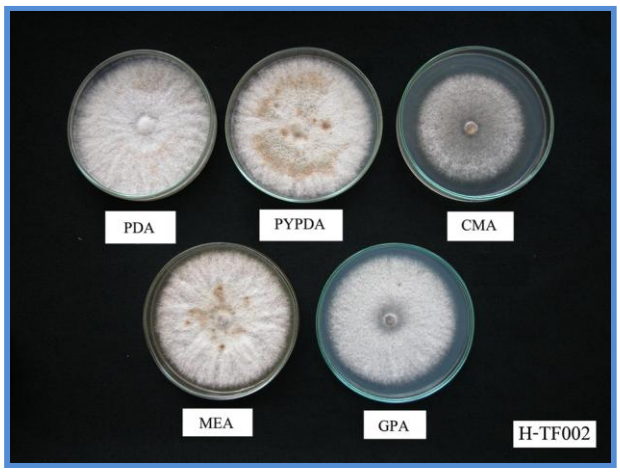
C.V. (TF001) = 2.77 % C.V. (TF002) = 2.40 %

C.V. (TF003) = 2.84 % C.V. (TF004) = 1.60 %

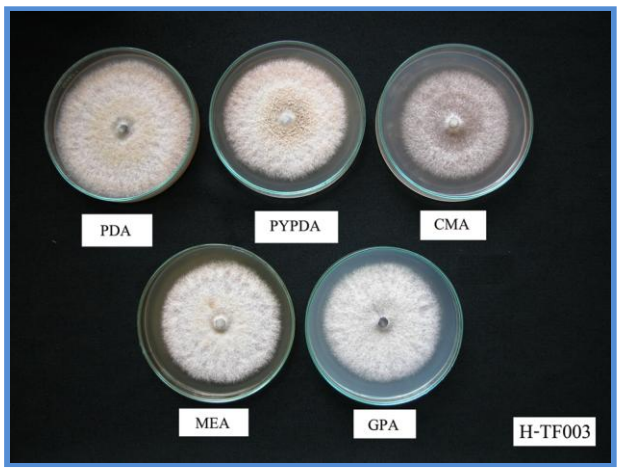
หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan’s new multiple rang test (DMRT)



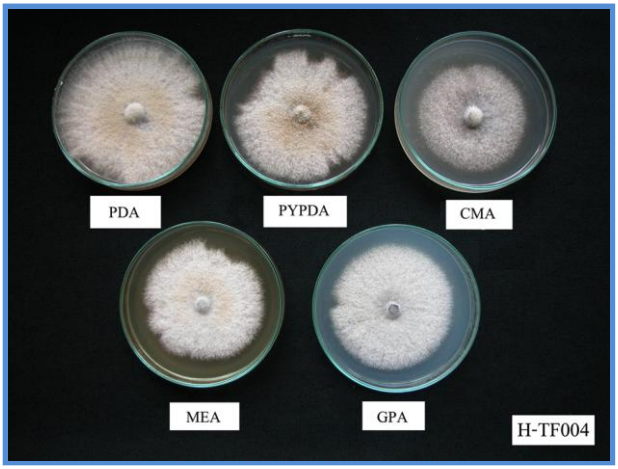
รูปที่ 9 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF001 บนอาหารชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 10 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF002 บนอาหารชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 11 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF003 บนอาหารชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 12 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF004 บนอาหารชนิดต่าง ๆ

2.2 แหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4) พบว่าเส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF001 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือ Starch Glucose และ Sucose มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.18 3.85 และ 3.83 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 13) เส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF002 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือ Starch Sucose และ Mannose มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.10 3.98 และ 3.84 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 14) เส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF003 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือ Starch มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.99 ซม. (รูปที่ 15) เส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF004 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือ Starch มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.96 ซม. (รูปที่ 16) และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าบนอาหารที่มี Starch เป็นแหล่งคาร์บอน เส้นใยมีความหนาแน่นมากที่สุด

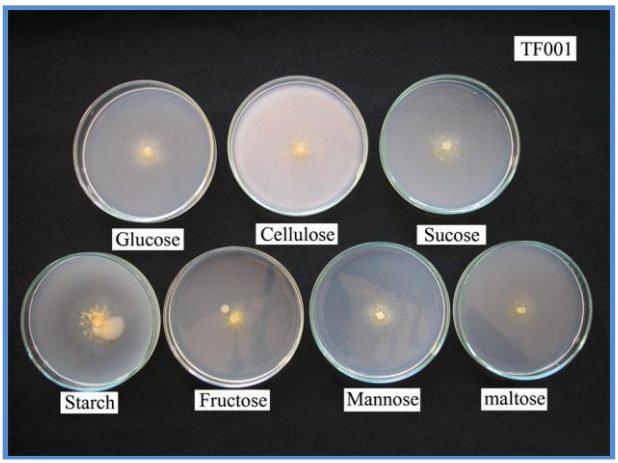
ตารางที่ 4 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวบนอาหารวุ้นที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี เห็ดหูหนูขาว (ซม.)			
	TF001	TF002	TF003	TF004
Glucose	3.85 ab	3.56 bc	2.78 b	3.53 b
Cellulose	3.21 cd	3.51 bc	2.34 c	2.90 e
Sucose	3.83 ab	3.98 ab	2.46 c	3.44 bc
Starch	4.18 a	4.10 a	2.99 a	3.96 a
Fructose	2.91 d	3.25 c	2.13 d	3.19 d
Mannose	3.48 bc	3.84 ab	2.75 b	3.28 cd
maltose	3.40 bc	3.59 bc	2.54 c	3.18 d

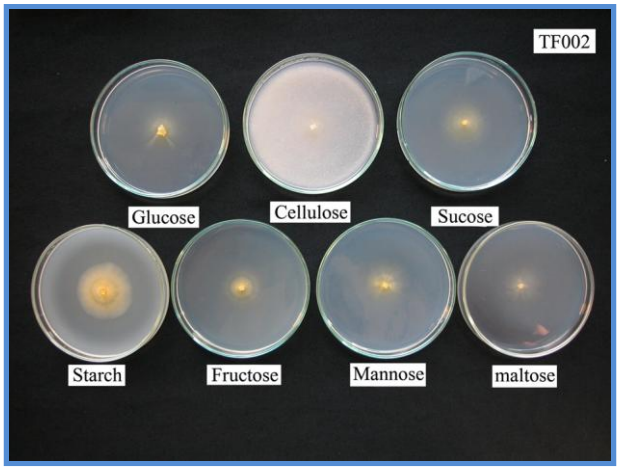
C.V. (TF001) = 8.26 % C.V. (TF002) = 8.31 %

C.V. (TF003) = 5.22 % C.V. (TF004) = 3.65 %

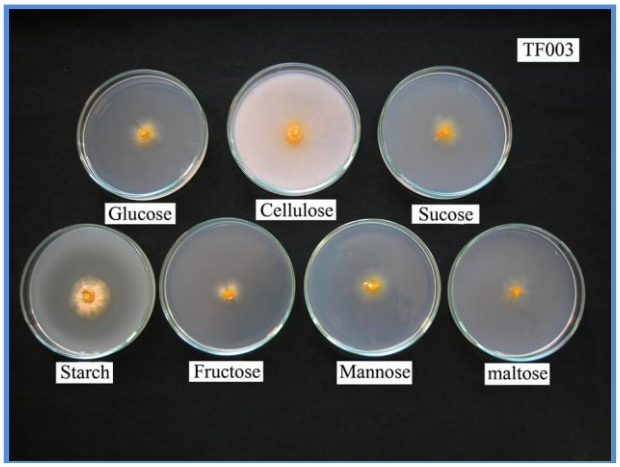
หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan’s new multiple rang test (DMRT)



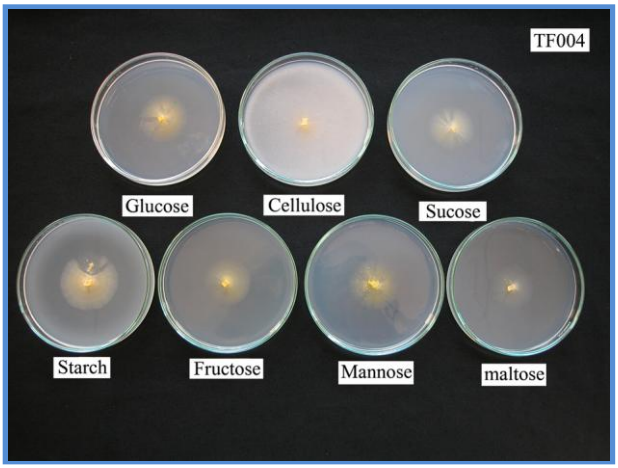
รูปที่ 13 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF001 บนแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ



รูปที่ 14 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF002 บนแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ



รูปที่ 15 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF003 บนแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ



รูปที่ 16 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF004 บนแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 5) พบว่าเส้นใย *Hypoxylon* sp. H-TF001 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือ Glucose maltose Starch Mannose และ Fructose มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.10 7.73 7.70 และ7.60 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 17) เส้นใย *Hypoxylon* sp. H-TF002 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือ Sucose Starch และ Mannose มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.33 6.75 และ 6.70 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 18) เส้นใย *Hypoxylon* sp. H-TF003 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือ Sucose Glucose Mannose และ Fructose มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.00 6.90 6.90 และ 6.58 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 19) เส้นใย *Hypoxylon* sp. H-TF004 เจริญได้ดีบนอาหารที่มี Mannose เป็นแหล่งคาร์บอน มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.58 ซม. (รูปที่ 20) และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเส้นใย *Hypoxylon* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าบนอาหารที่มี Starch เป็นแหล่งคาร์บอน เส้นใยมีความหนาแน่นมากที่สุด

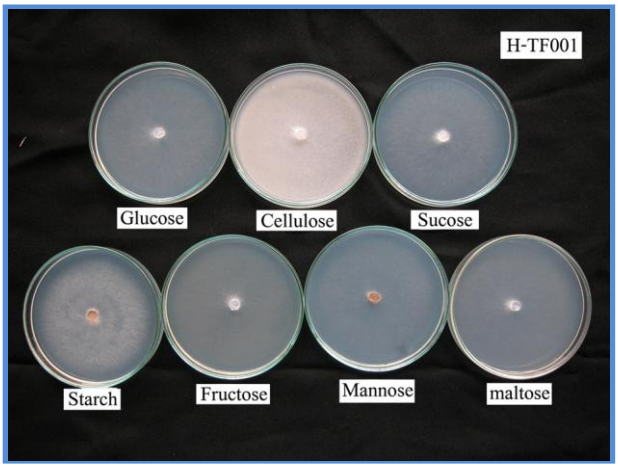
ตารางที่ 5 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใย *Hypoxylon* sp. บนอาหารวุ้นที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี *Hypoxylon* sp. (ซม.)			
	H-TF001	H-TF002	H-TF003	H-TF004
Glucose	8.10 a	5.90 c	6.90 a	6.43 cd
Cellulose	6.65 c	6.10 bc	9.30 b	5.95 d
Sucose	7.50 b	7.33 a	7.00 a	7.05 b
Starch	7.70 ab	6.75 ab	6.35 b	7.08 b
Fructose	7.60 ab	6.45 bc	6.58 ab	7.03 b
Mannose	7.68 ab	6.70 ab	6.90 a	7.58 a
maltose	7.73 ab	6.05 bc	6.88 a	6.53 c

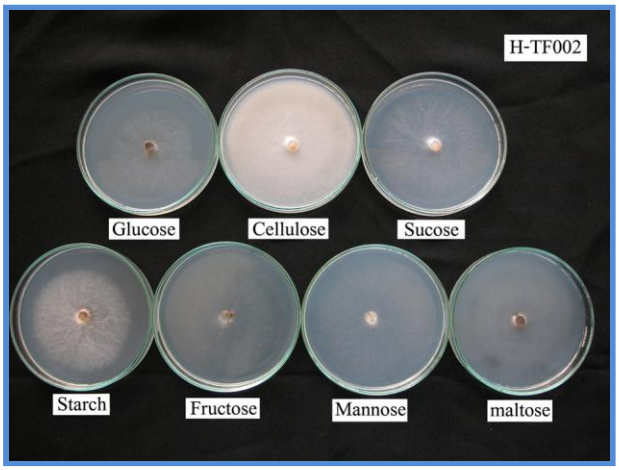
C.V. (TF001) = 4.42 % C.V. (TF002) = 6.93 %

C.V. (TF003) = 4.58 % C.V. (TF004) = 4.83 %

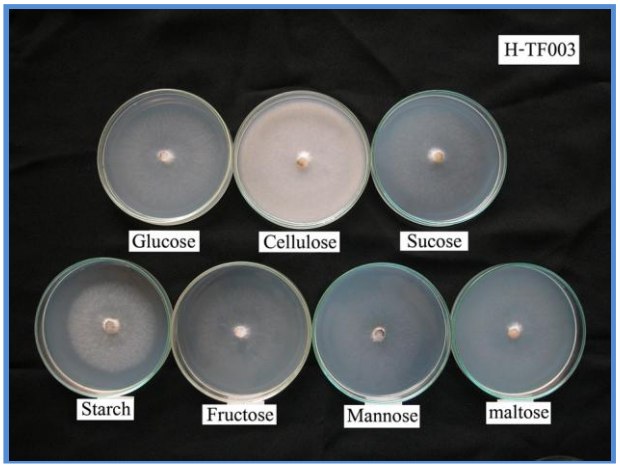
หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan’s new multiple rang test (DMRT)



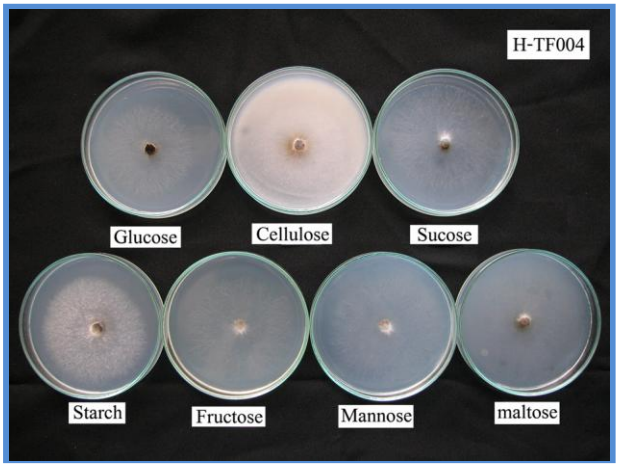
รูปที่ 17 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF001 บนแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ



รูปที่ 18 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF002 บนแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ



รูปที่ 19 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF003 บนแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ



รูปที่ 20 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF004 บนแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

2.3 แหล่งไนโตรเจน

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 6) พบว่าเส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF001 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ NH_4NO_3 $(NH_4)_2SO_4$ Peptone และ NH_4Cl มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.93 4.79 4.68 และ 4.56 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 21) เส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF002 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ $(NH_4)_2SO_4$ NH_4NO_3 และ NH_4Cl มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.65 4.64 และ 4.59 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 22) เส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF003 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ NH_4NO_3 Peptone และ $(NH_4)_2SO_4$ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.98 3.95 และ 3.94 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 23) เส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF004 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ NH_4NO_3 และ $(NH_4)_2SO_4$ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.96 และ 4.86 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 24) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าบนอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ NH_4NO_3 และ Peptone เส้นใยมีความหนาแน่นใกล้เคียงกัน

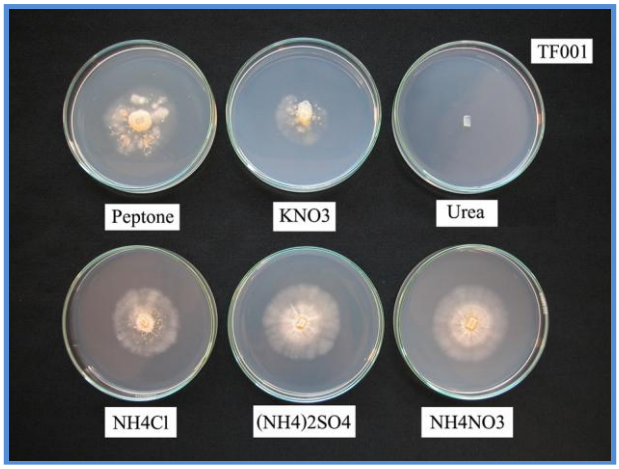
ตารางที่ 6 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวบนอาหารวุ้นที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

แหล่งไนโตรเจน	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี เห็ดหูหนูขาว (ซม.)			
	TF001	TF002	TF003	TF004
Peptone	4.68 a	4.33 b	3.95 a	4.80 b
KNO_3	3.79 b	4.14 b	3.14 c	4.03 c
Urea	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 d
NH_4Cl	4.56 a	4.59 a	3.55 b	4.81 b
$(NH_4)_2SO_4$	4.79 a	4.65 a	3.94 a	4.86 ab
NH_4NO_3	4.93 a	4.64 a	3.98 a	4.96 a

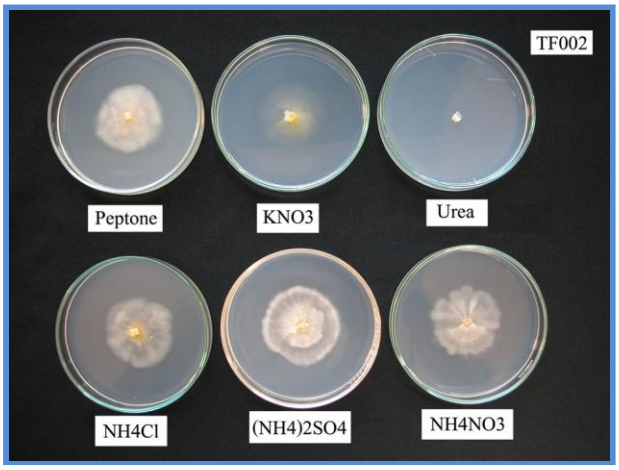
C.V. (TF001) = 7.32 % C.V. (TF002) = 4.57 %

C.V. (TF003) = 4.34 % C.V. (TF004) = 2.43 %

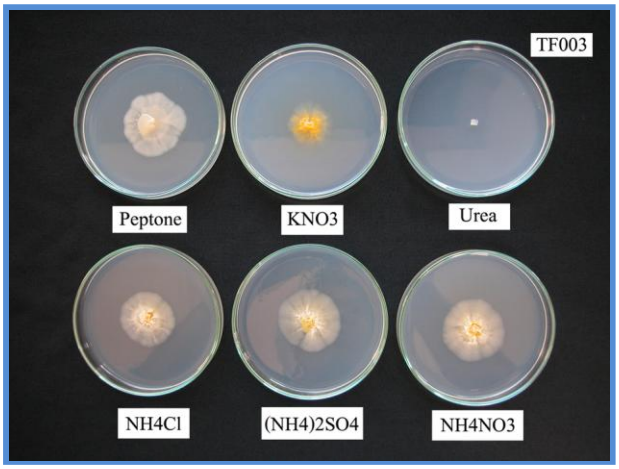
หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan's new multiple rang test (DMRT)



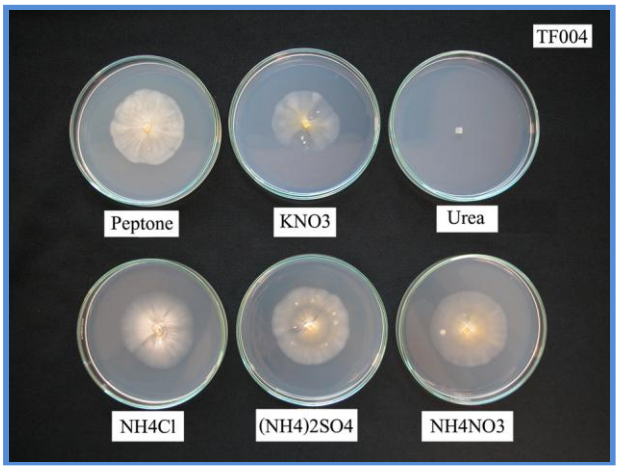
รูปที่ 21 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF001 บนแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ



รูปที่ 22 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF002 บนแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ



รูปที่ 23 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF003 บนแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ



รูปที่ 24 การเจริญของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวสายพันธุ์ TF004 บนแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 7) พบว่าเส้นใย *Hypoxylon* sp. H-TF001 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ KNO_3 มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.00 ซม. (รูปที่ 25) เส้นใย *Hypoxylon* sp. H-TF002 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ KNO_3 มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.45 ซม. (รูปที่ 26) เส้นใย *Hypoxylon* sp. H-TF003 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ KNO_3 มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.40 ซม. (รูปที่ 27) เส้นใย *Hypoxylon* sp. H-TF004 เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ KNO_3 และ Peptone มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.00 และ 7.60 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 28) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเส้นใย *Hypoxylon* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าบนอาหารที่มี Peptone และ KNO_3 เส้นใยมีความหนาแน่นมากใกล้เคียงกัน

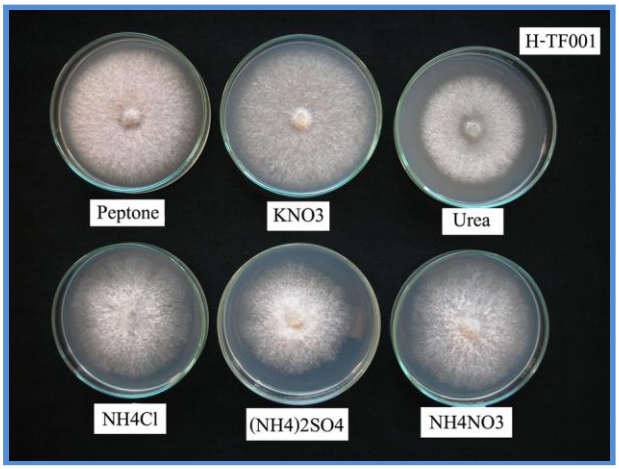
ตารางที่ 7 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใย *Hypoxylon* sp. บนอาหารวุ้นที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

แหล่งไนโตรเจน	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี *Hypoxylon* sp. (ซม.)			
	H-TF001	H--TF002	H-TF003	H-TF004
Peptone	8.40 b	7.50 b	6.88 bc	7.60 a
KNO_3	9.00 a	8.45 a	8.40 a	8.00 a
Urea	6.60 d	5.95 d	6.30 d	5.83 c
NH_4Cl	7.78 c	7.03 c	6.23 d	5.93 c
$(NH_4)_2SO_4$	6.98 d	6.30 d	6.40 cd	5.00 d
NH_4NO_3	7.78 c	7.88 b	7.10 b	6.95 b

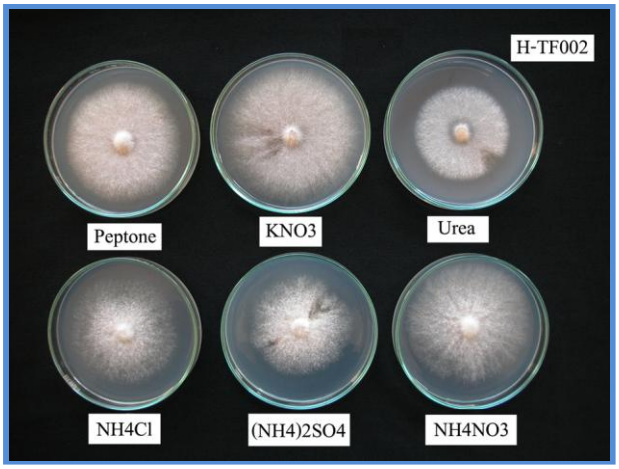
C.V. (TF001) = 3.62 % C.V. (TF002) = 4.22 %

C.V. (TF003) = 4.86 % C.V. (TF004) = 5.73 %

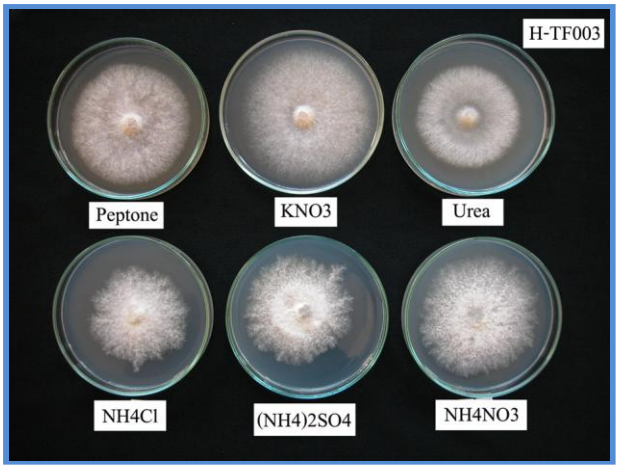
หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan’s new multiple rang test (DMRT)



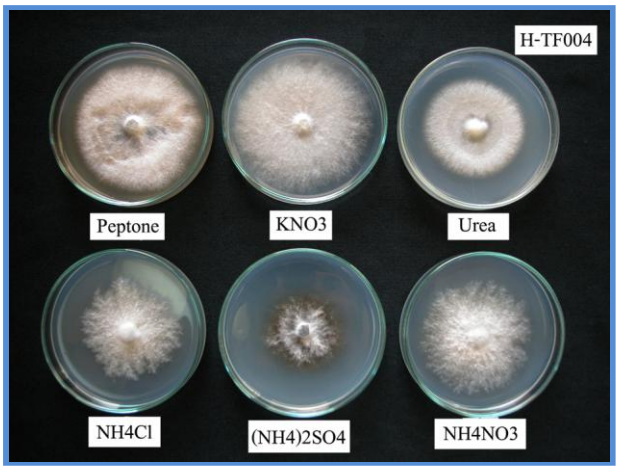
รูปที่ 25 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF001 บนแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ



รูปที่ 26 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF002 บนแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ



รูปที่ 27 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF003 บนแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ



รูปที่ 28 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. สายพันธุ์ H-TF004 บนแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

2.4 อุณหภูมิ

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 8) พบว่าเส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF001 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.49และ 4.48 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 29) ใยเห็ดหูหนูขาว TF002 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 และ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.88และ 3.56 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 30) เส้นใยเห็ดหูหนูขาว TF003 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 20 และ 30 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.83 2.70 และ 2.66 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 31) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เส้นใยมีความหนาแน่นใกล้เคียงกัน

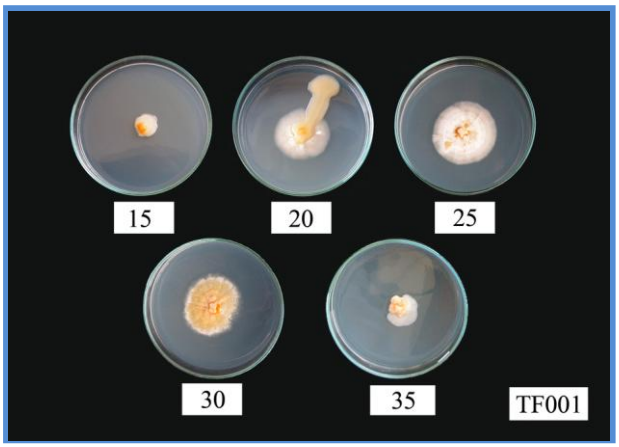
ตารางที่ 8 แสดงการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวบนอาหารวุ้นที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี เห็ดหูหนูขาว (ซม.)			
	TF001	TF002	TF003	TF004
15	1.48 c	1.66 c	1.71 b	1.68 c
20	3.80 b	2.78 b	2.70 a	2.73 b
25	4.49 a	3.56 a	2.83 a	4.08 a
30	4.48 a	3.88 a	2.66 a	3.85 a
35	1.58 c	1.48 c	1.94 b	2.50 b

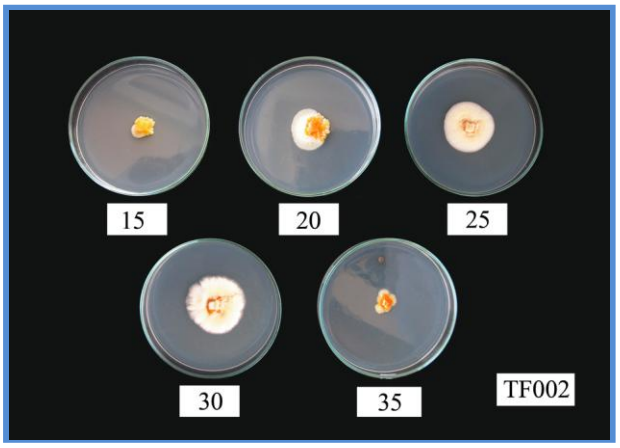
C.V. (TF001) = 8.54 % C.V. (TF002) = 9.77 %

C.V. (TF003) = 11.49 % C.V. (TF004) = 5.84 %

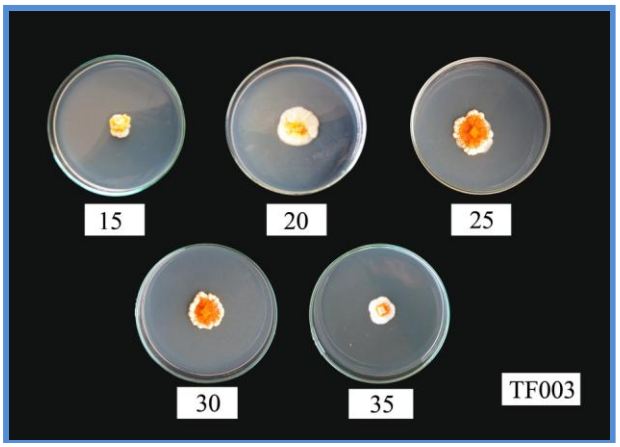
หมายเหตุ : ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan’s new multiple rang test (DMRT)



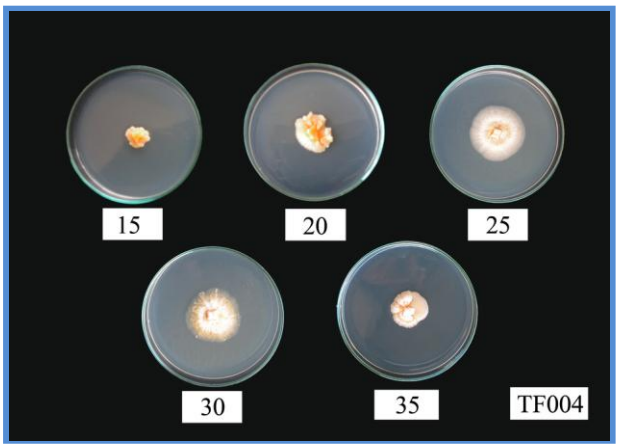
รูปที่ 29 การเจริญของเส้นใย**เห็ดหูหนูขาว**สายพันธุ์ TF001 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ



รูปที่ 30 การเจริญของเส้นใย**เห็ดหูหนูขาว**สายพันธุ์ TF002 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ



รูปที่ 31 การเจริญของเส้นใย**เห็ดหูหนูขาว**สายพันธุ์ TF003 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ



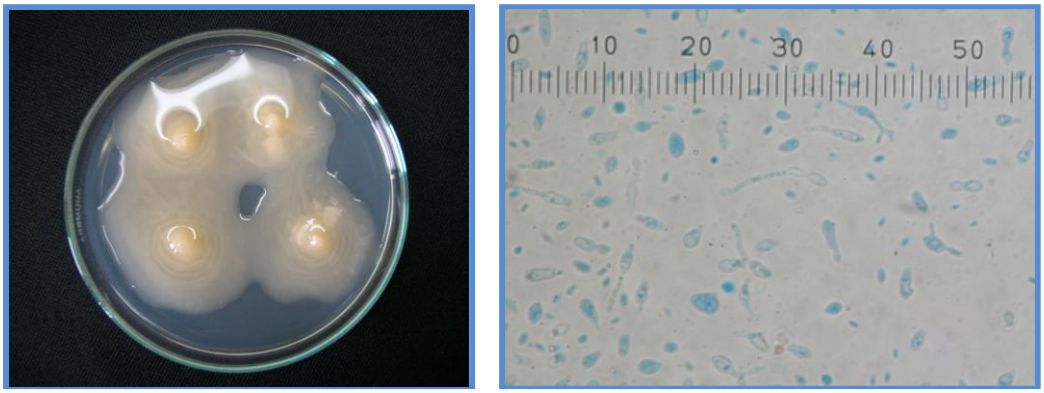
รูปที่ 32 การเจริญของเส้นใย**เห็ดหูหนูขาว**สายพันธุ์ TF004 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

3. ศึกษาการเจริญของเส้นใยและการเกิดดอกบนวัสดุเพาะในถุงพลาสติก

3.1 การผลิตเชื้อขยาย

หลังจากผสมเชื้อเห็ดหูหนูขาวและเชื้อรา *Hypoxylon* sp. เข้าด้วยกัน (รูปที่ 33) จึงตัดเส้นใยบริเวณดังกล่าวไปเลี้ยงต่อในข้าวฟ่างหรือในขี้เลื่อย ในการผสมเชื้อเห็ดหูหนูขาวและเชื้อรา *Hypoxylon* sp. นั้น ต้องใช้เห็ดหูหนูขาวที่เจริญเป็นเส้นใยมาผสมจึงจะสามารถผสมเข้ากันได้ดี หากนำเห็ดหูหนูขาวที่เจริญอยู่ในระยะที่เป็นยีสต์ (yeast-like conidia) (รูปที่ 34) มาผสม โอกาสที่ยีสต์จะงอกเป็นเส้นใยและเข้าผสมกับเส้นใย *Hypoxylon* sp. นั้นเป็นไปได้น้อย (Chen and Huang, nd.)

รูปที่ 33 แสดงเส้นใยที่ผสมระหว่างเห็ดหูหนูขาวและเชื้อรา *Hypoxylon* sp. (ลูกศรชี้)



รูปที่ 34 และ 35 แสดงเห็ดหูหนูขาวในระยะที่เป็นยีสต์

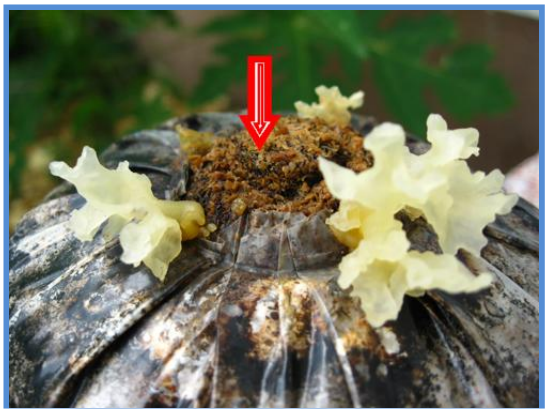
3.2 เปรียบเทียบวัสดุเพาะหลักและวัสดุทำเชื้อขยาย

จากการศึกษาเปรียบเทียบวัสดุเพาะหลัก คือ ขี้เลื่อยไม้ทุเรียนและขี้เลื่อยไม้ยางพารา และเปรียบเทียบร่วมกับวัสดุที่ใช้ผลิตเชื้อขยาย คือ ข้าวฟ่างและขี้เลื่อยไม้ยางพารา พบว่าก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้เชื้อขยายเห็ดหูหนูขาวในข้าวฟ่างไม่สามารถพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้ เนื่องจากมีแมลงเข้าทำลายเมล็ดข้าวฟ่างและเมล็ดข้าวฟ่างเน่าเสียขณะเปิดดอก อาจเนื่องจากต้องใช้ความชื้นค่อนข้างสูง ส่วนก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้เชื้อขยายเห็ดหูหนูขาวในขี้เลื่อยทั้งที่ใช้ขี้เลื่อยไม้ทุเรียนและขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นวัสดุเพาะหลัก สามารถพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้ (รูปที่ 36, 37 และ 38) แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ได้ เนื่องจากพบหนอนแมลงหวี่เข้าทำลายบริเวณผิวหน้าของก้อนเชื้อเห็ด (รูปที่ 39)

รูปที่ 36 ดอกเห็ดอายุ 3 วัน
ขนาดดอก : เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.5 เซนติเมตร

รูปที่ 37 ดอกเห็ดอายุ 8 วัน
ขนาดดอก : เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 เซนติเมตร

รูปที่ 38 ดอกเห็ดอายุ 20 วัน
ขนาดดอก : เส้นผ่าศูนย์กลาง 5-7เซนติเมตร



รูปที่ 39 ดอกเห็ดถูกหนอนแมลงหวี่เข้าทำลาย
สังเกตุ : ขี้เลื่อยสีน้ำตาลเป็นขุย (ลูกศรชี้)

3.3 เปรียบเทียบสูตรอาหาร

จากการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารพบก้อนปนเปื้อนแบคทีเรียช่วงที่บ่มเชื้อในฤดูร้อนและพบการเข้าทำลายของไรศัตรูเห็ด เส้นใยเห็ดถูกไรทำลายทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการเกิดดอกได้

4. บันทึกข้อมูลเข้าฐานข้อมูลเห็ดในธนาคารเชื้อพันธุ์

เชื้อพันธุ์เห็ดหูหนูขาวทั้ง 4 ไอโซเลท และเชื้อรา *Hypoxylon* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท เก็บรักษาไว้ในศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย เพื่อใช้ดำเนินการทดลองต่อไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1.รวบรวมและเก็บตัวอย่างสายพันธุ์เห็ดหูหนูขาวที่สามารถบริโภคได้จากธรรมชาติในประเทศไทย

สำรวจพบเห็ดหูหนูขาวจำนวน 12 ไอโซเลท พบในช่วงฤดูฝน ทั้งในสภาพป่าธรรมชาติ ป่าปลูก และบริเวณรอบ ๆ ที่อยู่อาศัย แต่สามารถแยกเชื้อเห็ดหูหนูขาวได้ 4 ไอโซเลท คือ TF001, TF002, TF003 และ TF004 สามารถแยกเชื้อ *Hypoxylon* sp. จากท่อนไม้ที่เห็ดหูหนูขาวเจริญอยู่ได้จำนวน 4 ไอโซเลท คือ H-TF001, H-TF002, H-TF003 และ H-TF004 ด้วยการแยกเชื้อบริสุทธิ์เห็ดหูหนูขาวทำได้ยากมาก เนื่องจากดอกเห็ดมีขนาดเล็กและบาง การตัดชิ้นเนื้อเยื่อภายในดอกทำได้ค่อนข้างยาก อีกทั้งเห็ดที่พบในธรรมชาติมีหนอนแมลงเข้าทำลายอยู่ภายในดอกเห็ดทำให้เกิดอัตราการปนเปื้อนสูงทั้งจากแบคทีเรียและเชื้อรา

2. ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดหูหนูขาว

2.1 อาหารวุ้น

พบว่าเส้นใยเห็ดหูหนูขาวเจริญได้ดีบนอาหาร PYPDA เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเห็ดหูหนูขาวทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าบนอาหาร PYPDA เส้นใยมีความหนาแน่นมากกว่าอาหารชนิดอื่น จึงควรใช้อาหาร PYPDA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดหูหนูขาว ส่วนเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp. เจริญได้ดีบนอาหาร PDA และ PYPDA เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีพบว่าบนอาหาร PYPDA PDA และ MEA เส้นใยมีความหนาแน่นมากกว่าอาหารชนิดอื่นตามลำดับ จึงควรใช้อาหาร PYPDA หรือ PDA ในการเลี้ยงเส้นใยเชื้อรา *Hypoxylon* sp.

2.2 แหล่งคาร์บอน

พบว่าเส้นใยเห็ดหูหนูขาว เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือ Starch และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าบนอาหารที่มี Starch เป็นแหล่งคาร์บอน เส้นใยมีความหนาแน่นมากที่สุด ส่วนเส้นใย *Hypoxylon* sp. เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน คือ Glucose Sucose Starch และ Mannose และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเส้นใย *Hypoxylon* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าบนอาหารที่มี Starch เป็นแหล่งคาร์บอน เส้นใยมีความหนาแน่นมากที่สุด สรุปได้ว่า Starch เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Hypoxylon* sp.

2.3 แหล่งไนโตรเจน

พบว่าเส้นใยเห็ดหูหนูขาว เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ NH_4NO_3 และ $(NH_4)_2SO_4$ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าบนอาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ NH_4NO_3 และ Peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน เส้นใยมีความหนาแน่นมากที่สุด **แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ** $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4NO_3 ส่วนเส้นใย *Hypoxylon* sp. เจริญได้ดีบนอาหารที่มีแหล่ง

ไนโตรเจน คือ KNO_3 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเส้นใย *Hypoxylon* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าบนอาหารที่มี KNO_3 และ Peptone เส้นใยมีความหนาแน่นมากที่สุด

2.4 อุณหภูมิ

พบว่าเส้นใยเห็ดหูหนูขาว เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีของเส้นใยเห็ดหูหนูขาวทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เส้นใยมีความหนาแน่นมากที่สุด

ดังนั้นหากใช้อาหาร PYPDA ที่เติม Starch เป็นแหล่งคาร์บอน **เติม** $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน**และบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-30** องศาเซลเซียส **น่าจะทำให้เส้นใย**เจริญได้ดีที่สุดทั้งนี้ต้องดำเนินการทดลองสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อไป

3. ศึกษาการเจริญของเส้นใยและการเกิดดอกบนวัสดุเพาะในถุงพลาสติก

3.1 การผลิตเชื้อขยาย

ในการผสมเชื้อเห็ดหูหนูขาวและเชื้อรา *Hypoxylon* sp. นั้น ต้องใช้เห็ดหูหนูขาวที่เจริญเป็นเส้นใยมาผสมจึงจะสามารถผสมเข้ากันได้ดี หากนำเห็ดหูหนูขาวที่เจริญอยู่ในระยะที่เป็นยีสต์ (yeast-like conidia) มาผสม โอกาสที่ยีสต์จะงอกเป็นเส้นใยและเข้าผสมกับเส้นใย *Hypoxylon* sp. นั้นเป็นไปได้น้อย เนื่องจากไม่ใช่ทุกเซลล์ของยีสต์ที่จะงอกเป็นเส้นใยเชื้อเห็ดหูหนูขาวได้

3.2 เปรียบเทียบวัสดุเพาะหลักและวัสดุทำเชื้อขยาย

พบว่าขี้เลื่อยน่าจะเป็นวัสดุสำหรับทำเชื้อขยายเห็ดหูหนูขาวมากกว่าเมล็ดข้าวฟ่าง เนื่องจากการเปิดดอกเห็ดหูหนูขาวต้องใช้ความชื้นสูง เมล็ดข้าวฟ่างมีโอกาสเน่าเสียได้ง่ายกว่า

3.3 เปรียบเทียบสูตรอาหาร

จากการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารพบก้อนปนเปื้อนแบคทีเรียช่วงที่บ่มเชื้อในฤดูร้อนและพบการเข้าทำลายของไรศัตรูเห็ด เส้นใยเห็ดถูกไรทำลายทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการเกิดดอกได้ จึงต้องมีการปรับสถานที่และสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมและปลอดภัยจากแมลงศัตรูเห็ดในการทดลองต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยสามารถนำไปใช้ในงานวิจัยเทคโนโลยีการผลิตเห็ดหูหนูขาว

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง

นัยนา ทองเจียม. 2545. การเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์เห็ดป่ากินได้ในสูตรอาหารต่าง ๆ. เอกสารงานวิจัย เลขที่ร. 578. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ. 12 หน้า

ราชบัณฑิตยสถาน. 2539. เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ. 170 หน้า.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2544. เห็ดและราในประเทศไทย. หน้า 86.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วว.). 2550. เห็ดในป่าสะแกราช. อรุณการพิมพ์, กรุงเทพฯ

สาทิต ไทยทัตกุล. 2546. เห็ดสมุนไพร. เห็ดไทย 2546. สมาคมนักวิจัยเห็ดไทย หน้า 18-33.

Chen, Alice W. and Huang, Nian Lai. nd. Mixed-culture Cultivation of *Tremella fuciformis* on Synthetic Logs. www.mushroomcompany.com

Arora, D. 1986. Mushroom Demystified. Berkeley: Ten Speed Press.

Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and N. malajczuk. 1996. Working with Mycorrhizasin Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32, Canberra, Australia. 374 p.

Li, W. L., Zheng, H. C., Bukura, J. and Kimpe, N. D. 2004. Nature medicines used in the tradition Chinese medical system for therapy of dibetes mellitus. Journal of Ethnopharmalogy (92) 1-21.

Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunodulating polysaccharide. Appl Microbiol Biotechnology (60) 258-274.

13. ภาคผนวก : -