# บทที่ 2

# การตรวจเอกสาร

เห็ดฟางหรือเห็ดบัว (padi-straw mushroom, straw mushroom, chinese straw mushroom) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Volvariella volvacea* (Bull.ex Fr.) Sing เป็นเห็ดที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยทั่วทุกภาค (ราชบัณฑิตยสถาน, 2539) จัดเป็นเห็ดกินได้ที่สำคัญในเขตร้อนและกึ่งร้อน (subtropic) ที่นิยมมากเป็นอันดับ 5 ของโลก (Chang, 1993 cited after Chiu et al., 1995) รองจากเห็ดแชมปิญอง เห็ดสกุลนางรม เห็ดหอม และเห็ดหูหนู (ชาญยุทธ์และคณะ, 2543) มักพบเจริญในบริเวณที่มีซากพืชเน่าเปื่อยผุพัง เช่น ตามกองฟางข้าวเก่าๆ กองเปลือกถั่ว หรือกองปุ๋ยหมักซึ่งเห็ดฟางใช้เป็นอาหาร โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนที่มีอากาศร้อนอบอ้าวและความชื้นสูง เห็ดฟางมีเนื้อหนานุ่ม รสชาติอร่อย มีกลิ่นหอมคล้ายกล้วยไม้จึงเป็นที่นิยมบริโภคของคนไทย และยังอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหาร จากการวิเคราะห์พบว่าในเห็ดฟางสด 100 กรัม มีน้ำ 92.39 % โปรตีน 2.68 % ไขมัน 2.24 % น้ำตาล 2.6 % และวิตามิน บี 206.27 มิลลิกรัม (อดุลย์, 2542) เห็ดฟางเพาะครั้งแรกในประเทศจีนเมื่อ 300 ปีที่แล้ว ในระหว่างปี ค.ศ. 1932-1935 ชาวจีนโพ้นทะเลได้นำเข้ามาเพาะในประเทศฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และอีกหลายประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Chang, 1982, cited after Quimio et al., 1990) และได้แผ่ขยายไปยังประเทศใกล้เคียงในภูมิภาคเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย ซึ่งมีสภาพอากาศที่เหมาะกับการเจริญของเห็ดฟางที่ต้องการอุณหภูมิของการเจริญเติบโตในช่วง 28-36°ซ ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 75-85 % (Quimio et al., 1990) ส่วนประเทศไทยในปี พ.ศ. 2480 อาจารย์ก่าน ชลวิจารณ์ได้ทำการค้นคว้าทดลองทำเชื้อและเพาะเห็ดบัว (ชื่อเรียกเห็ดฟางในอดีต) โดยใช้เทคนิคแผนใหม่ได้เป็นผลสำเร็จโดยใช้ฟางเพาะ ต่อมาจึงนิยมเรียกชื่อเห็ดฟางและได้เผยแพร่ในปี พ.ศ. 2481 เป็นต้นมา (อานนท์, 2530) ซึ่งได้ใช้วิธีการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อและทำเชื้อเห็ดฟางจากขี้ม้าและเปลือกบัว เชื้อที่ได้นำมาเพาะบนกองฟางโดยเพาะแบบกองสูง (วสันณ์, 2536) การผลิตเห็ดฟางของประเทศไทยสามารถผลิตเห็ดฟางได้ประมาณ 84,000ตันต่อปี หรือร้อยละ 70 ของเห็ดทั้งประเทศ (ชาญยุทธ์และคณะ, 2543) ซึ่งเป็นเห็ดที่ผลิตได้มากเป็นอันดับ 1 ของประเทศ แหล่งเพาะเห็ดที่สำคัญได้แก่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา นครนายก อ่างทอง ปทุมธานี สระบุรี ชัยนาท สุโขทัย เชียงราย ลำพูน และพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ จังหวัดขอนแก่น หนองคาย กาฬสินธุ์ และนครราชสีมา (ชาญยุทธ์, 2540)

**1. การจำแนกเห็ดฟาง**

จากการศึกษาของ Singer (1975, อ้างโดย ชริดา, 2529) และ Li and Chang (1978) ได้จัดจำแนกเห็ดฟางไว้ดังนี้

Kingdom Fungi

Division Basidiomycota

Class Basidiomycetes

Subclass Holobasidiomycetes

Series Hymenomycetes

Order Agaricales

Family Pluteaceae

Genus *Volvariella*

Species *volvacea*

**2. ลักษณะทางสัณฐานและการเจริญเติบโตของเห็ดฟาง**

ดอกเห็ดฟางเป็นเห็ดทรงร่ม เมื่ออ่อนมีลักษณะกลม มีปลอกหุ้มทั้งดอก เมื่อแก่เห็ดจะดันให้ปลอกหุ้มแตกออกและดอกเห็ดมีลักษณะเป็นร่ม หมวกดอกเห็ดกลม (ชาญยุทธ์, 2540) ตรงกลางดอกสีเทาดำ ก้านดอกมีสีขาวครีม ไม่มีวงแหวน บริเวณฐานก้านดอกมีส่วนของปลอกหุ้มติดอยู่เรียก volva ครีบดอกไม่ยึดติดกับก้านดอก สปอร์มีลักษณะเป็นรูปทรงไข่ (oval shape) สีน้ำตาลแดง ขนาด 5-6 x 7-9 ไมครอน (Chang, 1972)

**2.1 ลักษณะทางสัณฐานของเห็ดฟาง (Morphology)**

เห็ดฟางประกอบด้วยส่วนที่เป็นดอกเห็ด (basidiocarp/fruiting body) ซึ่งเป็นส่วนที่สร้าง basidiospores สำหรับใช้สืบพันธุ์ และส่วนที่เป็นเส้นใย (vegetative hyphae) ในดอกเห็ดฟางที่เจริญเต็มที่มีส่วนประกอบที่สำคัญต่างๆ ดังนี้ (สุภชัย, 2521)

**2.1.1 ดอกเห็ดฟาง** (basidiocarp/fruiting body) เกิดจากการรวมตัวกันของเส้นใยแล้วเจริญขยายขนาดใหญ่ขึ้นเป็นดอกเห็ด ดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่ จะมีส่วนต่างๆ แบ่งได้เป็น 3 ส่วน ดังต่อไปนี้

**2.1.1.1 หมวกดอก (Pileus หรือ cap)** หมวกดอกเมื่อโตเต็มที่จะมีรูปร่างกลม สีเทา ผิวเรียบ ตรงกลางของหมวกมีสีเทาเข้ม ขอบหมวกสีเทาอ่อน ทั้งนี้สีของดอกจะเข้มหรือจางขึ้นกับสภาพการได้รับแสง สีของหมวกเปลี่ยนแปลงตามความเข้มของแสงหากต่ำกว่า 50 ฟุต แรงเทียน จะสร้างดอกเห็ดที่มีสีขาวทั้งก้าน หมวกและวอลว่า เมื่อแสง 200 ฟุตแรงเทียนหรือมากกว่า ดอกเห็ด

จะมีสีเข้ม (Tu and Cheng, 1978) เส้นผ่าศูนย์กลางมีขนาดประมาณ 6-10 ซม.เมื่อบาน ขนาดของดอกเห็ดจะขึ้นกับอาหารและสภาพแวดสิ่งแวดล้อม ส่วนริมหรือขอบดอกจะโตเร็วที่สุด ส่วนกลางหมวกจะเจริญช้ากว่า ด้านใต้หมวกจะมีครีบ (gills) หรือ lamellae หลายอันมีจำนวนตั้งแต่ 280-380 อัน ครีบแต่ละอันจะมีลักษณะตรง ผิวเรียบ ถ้าตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ครีบแต่ละอันจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ชั้นในสุดเป็นชั้นของเส้นใยที่รวมตัวกันอย่างหลวมๆ ชั้นนี้เรียกว่า trama ชั้นถัดออกมาหรือชั้นกลางเป็นชั้นของเส้นใยที่มารวมกันแน่น เรียกว่า subhymenium ชั้นนอกสุด (คือผิวทั้งสองข้างของครีบ) เรียกว่า hymenium เป็นชั้นที่มีการสร้าง basidia (basidium) (ศุภชัย, 2521) ซึ่งชั้น hymenium ของดอกเห็ดฟางที่เจริญเต็มที่ เมื่อตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) มี basidia เป็น tetrasporic ที่มีก้านชูสปอร์ (sterigma) 4 ก้าน (Li Sx et al., 1991) basidia ซึ่งมีรูปคล้ายกระบอง (club-shaped) และสร้าง cystidia ซึ่ง basidia จะให้กำเนิด basidiospores ปกติ basidium แต่ละอันของเห็ดฟางจะให้กำเนิด basidiospores 4 อัน basidiospore แต่ละอันจะมีก้านชูซึ่งเรียกว่า sterigmata ส่วน cystidia ที่สร้างขึ้นนั้นก็มีรูปคล้ายกับ basidium แต่ไม่สร้าง basidiospore รูปร่างของ basidiospore พบว่ามีลักษณะเป็นรูปคล้ายไข่ (egg-shaped) มีขนาดของหัวและท้ายไม่เท่ากัน (asymmetric) พวกที่มีรูปกลมและยาวรีนั้น พบมีจำนวนน้อย basidiospore รูปไข่ มีขนาดยาว 7-9 ไมครอน กว้างจาก 5-6 ไมครอน (จากส่วนที่กว้างที่สุด)ถึง 3-4 ไมครอน (จากส่วนที่แคบที่สุด) ผนังของ spore จะเรียบ และหนา spore cell content เมื่ออ่อนจะใสหรือมีสีอ่อน แต่เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (brownish) (Chang, 1972)

**2.1.1.2 ก้าน (Stipe หรือ stalk)** เป็นก้านชูหมวกเห็ดอยู่ระหว่าง pileus กับ volva ความยาวของก้านดอกซึ่งจะขึ้นอยู่กับขนาดของหมวก ปกติจะยาว 3.0-8.3 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.5 ซม. ก้านจะเรียบไม่มีวงแหวน (ring หรือ annulus) เมื่อสดจะมีสีขาว

**2.1.1.3 ถ้วย (Volva)** เป็นเนื้อเยื่อรูปถ้วยห่อหุ้มอยู่ที่ฐานของดอกเห็ด เป็นส่วนที่เจริญมาจาก universal veil ขณะที่ดอกเห็ดยังอ่อน volva มีสีน้ำตาลห่อหุ้มดอกเห็ดเอาไว้ เมื่อดอกเห็ดเจริญเต็มที่ ดอกเห็ดจะดัน volva ให้แตกออก ด้านล่างของ volva จะมีเส้นใยคล้ายรากพืช เรียกว่า rhizomorph หรือ mycelial connection ซึ่งเป็นเส้นใยที่มาประสานกันแน่น ทำหน้าที่ดูดอาหารมาเลี้ยงดอกเห็ด (ศุภชัย, 2521)

**2.1.2 เส้นใย (Vegetative hyphae)** เจริญมาจากสปอร์ เส้นใยของเห็ดฟางแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่

**2.1.2.1 เส้นใยขั้นที่หนึ่งหรือเส้นใยขั้นต้น (primary mycelium)** เป็นเส้นใยที่เจริญมาจาก basidiospore ที่มีนิวเคลียสหนึ่งอัน (haploid nucleus) เส้นใยมีผนังกั้น (septum) เมื่อแก่จะเป็นสีน้ำตาล ปกติจะแตกกิ่งก้านเป็นมุมฉาก บางครั้งพบแตกกิ่งก้านเป็นมุมระหว่าง 70-90 องศา เส้นใย

ที่แตกแขนงเหล่านี้แต่ละเส้นจะกว้าง 7.7-11.0 ไมครอน แต่ละเซลล์ของเส้นใยจะยาว 67-268 ไมครอน ภายในแต่ละเซลล์จะมีนิวเคลียสจำนวน 2-30 อัน นิวเคลียสแต่ละอันจะมีขนาดจาก 1.5-2.5 ไมครอน เส้นใยที่แตกแขนงออกมามักจะบวมพองที่ปลาย เส้นใยขั้นต้นของสายพันธุ์ (strain) หนึ่งสามารถ anastomosis กับเส้นใยอีก strain หนึ่งได้ซึ่งสามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การ anastomosis หมายถึงเส้นใยมาสัมผัสกันแล้วผนังตรงที่สัมผัสกันนั้นเกิดละลายออกทำให้นิวเคลียสของจากทั้ง 2 ใยเคลื่อนเข้าหากันเป็นสองนิวเคลียสในหนึ่งเซลล์ (n+n) ซึ่ง cell ที่มีนิวเคลียส 2 อันอยู่ด้วยกันนี้เรียกว่า heterokaryotic cell และ cell นี้จะมีการปรับเส้นใยใหม่เป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสเป็น n+n ซึ่งเรียกเส้นใยนี้ว่าเส้นใยขั้นที่สอง (secondary mycelium) การ anastomosis พบว่าอาจมีการเกิดได้ 3 แบบ คือ (a) peg-to-peg ส่วนปลายสุดของเส้นใยมาแตะกัน (b) tip-to-hyphae ส่วนปลายของเส้นใยสัมผัสกับเซลล์ใดเซลล์หนึ่งที่ไม่ใช่เซลล์ปลายสุด (c) tip-parallel-to-hyphae เป็นการสัมผัสระหว่างปลายของเส้นใยซึ่งเจริญขนานคู่กัน (ศุภชัย, 2521)

**2.1.2.2 เส้นใยขั้นที่สอง (secondary mecelium)** เป็นเส้นใยที่กำเนิดมาจากเนื้อเยื่อของดอกเห็ด หรือเป็นเส้นใยที่เกิดจาก anastomosis ของเส้นใยขั้นที่หนึ่งเรียกว่า heterokaryotic cell เส้นใยขั้นที่สองนี้จะมีการเจริญเติบโตเร็วและหนาแน่นมากกว่าเส้นใยขั้นที่หนึ่ง และถ้านำเส้นใยขั้นที่สองไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นจะสร้าง chlamydospore (asexual spore) ซึ่งมีผนังหนามากมาย และมักอยู่ติดกันเป็นลูกโซ่ chlamydospore มีการเกิดได้หลายแบบ คือ (a) อาจเกิดเดี่ยวๆ บนด้านข้างของเส้นใย (b) อาจเกิดบนเส้นใยที่ยังอ่อนอยู่ (c) อาจเกิดบนปลายของ cell ที่บวมพอง (d) อาจเกิดติดกันเป็นลูกโซ่ ซึ่งทั้ง 4 แบบนี้แบบที่เกิดติดกันเป็นลูกโซ่จะพบมากที่สุดเส้นใยเมื่อแก่ chlamydospore จะรวมตัวกันเป็นกลุ่มแน่นทำให้เห็นเป็นสีน้ำตาลเข้ม และจะสร้างขึ้นภายใน 3-14 วันหลังจากที่โรยเชื้อ ขึ้นกับชนิดของเส้นใยและอุณหภูมิ chlamydospores ที่เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่นั้นอันที่อยู่ปลายจะแก่แล้วจะหลุดออกมาและงอกภายใน 1-2 วัน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกคือ 35 °ซ การงอกของ chlamydospore อาจงอก germ tube 1 อันหรือหลายอันออกมา เส้นใยที่งอกจะเป็นชนิด secondary mycelium ซึ่งจะเจริญพัฒนาเป็นดอกเห็ดต่อไป

**2.1.2.3 เส้นใยขั้นที่สาม (Tertiary mycelium)** เป็นเส้นใยที่อัดตัวกันแน่นและมีการสะสมอาหาร จากนั้นจะพัฒนาไปเป็น fruiting body หรือดอกเห็ดต่อไป ซึ่งเส้นใยบนก้านและดอกเห็ดมีนิวเคลียสเป็น n+n ต่อหนึ่งเซลล์ (heterokaryotic cell) จะพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดต่อไป (ศุภชัย, 2521 และ ปัญญาและกิตติพงษ์, 2538)

เส้นใยของเห็ดฟางไม่มี clamp-connection เช่นเดียวกับ *Volvariella bombycina* (Pers. Ex Fr.) Sing หรือ Silver-silk straw mushroom นอกจากนี้ลักษณะการเจริญของเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยวของ *Volvariella bombycina* แบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ Type A เส้นใยเจริญเติบโตอย่าง

รวดเร็ว (fertile) มีการสร้าง chlamydospores และ Type B เส้นใยเจริญเติบโตช้า (infertile) และไม่สร้าง chlamydospore (Elliott and Challen, 1985)

**2.2 การเจริญเติบโตของเห็ดฟาง**

เห็ดฟางสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80-90 % และมีอุณหภูมิสูง 32-34 °ซ (Salunkhe and Kadam, 1988) หรือต้องการอุณหภูมิในช่วง 28-36 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 75-85 % (Quimio et al., 1990) โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญทางเส้นใยของเห็ดฟางคือ 35 ± 2 °ซ และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของดอกคือ 32 ± 2 °ซ แต่จะตายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 °ซ ส่วน *Volvariella bombycina* อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตคือ 28 ± 2 °ซ และสามารถเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิต่ำที่ 4 °ซ (Chiu et al., 1995) เห็ดฟางมีวงจรชีวิตส่วนใหญ่เป็นแบบ primary homothallism (ปัญญาและกิตติพงศ์, 2538) กล่าวคือ แต่ละสปอร์ของเห็ดสามารถเจริญเป็นดอกเห็ดจนครบวงจรชีวิตได้เองโดยไม่ต้องรอการผสมจากสปอร์อื่นซึ่งสปอร์ของเห็ดโดยทั่วไปอาจเป็นสปอร์ที่สามารถงอกผสมตัวเอง และสร้าง fruiting bodies ได้ (self fertile) หรือสปอร์ที่ไม่สามารถผสมกันได้ต้องผสมกับสปอร์อื่นที่เข้ากันได้ (self sterile) ซึ่ง self fertility หรือ homothallism ในเชื้อรา Basidiomycetes มีจำนวนประมาณ 10 % ขณะที่ self sterile หรือ heterothallic มีจำนวนประมาณ 90 % (Quimio et al., 1990)

เห็ดฟางมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (sexual reproduction) ที่จัดเป็น homothallic ชนิด primary homothallic สปอร์เดี่ยวของเห็ดฟางมี 1 นิวเคลียส (single uninucleate spore) ที่สามารถเจริญเป็นเส้นใยมีการผสมตัวเองและพัฒนาต่อไปเป็นดอกเห็ดได้ (Quimio et al., 1990, Oei, 1996, Chang et al., 1978 และ Raper, 1978 อ้างโดย ปัญญา, 2537) โดย uninucleate spore จะงอกให้เส้นใยที่มีหลายนิวเคลียส (multinucleate)(Chiu, 1993) เห็ดฟางที่แยกได้จากสปอร์เดี่ยวส่วนใหญ่สามารถสร้างดอกได้ (Chang and Yau, 1971) เห็ดฟางจัดเป็นเห็ดที่เป็น homothallic กล่าวคือ จาก basidiospore เดี่ยวๆเราเลี้ยงให้ออกดอกได้โดยที่ไม่ต้องมี anastomosis กับเส้นใย strain อื่นๆ หรือ spore ที่เป็น heterothallic ซึ่ง spore เหล่านี้ถ้านำไปเลี้ยงเป็น pure culture แล้วนำมาเพาะให้ออกดอกจะไม่ออกดอก จะต้องอาศัยการ anastomosis จาก pure culture อื่นที่เป็น heterothallic เหมือนกัน โดย heterothallic จัดได้เป็นชนิด bifactorial control ประมาณ 65 % และ heterothallic ชนิด unifactorial control ประมาณ 25 % (Raper, 1978)

**2.2.1 การงอกของ Basidiospore** ดอกเห็ดฟางที่เจริญเติบโตเต็มที่จะสร้าง basidiospores เจริญอยู่บนครีบ (gill) ของดอกเห็ดรูปร่างของ basidiospore ส่วนมากพบว่ามีลักษณะเป็นรูปไข่ (egg-shaped) มีขนาดของหัวและท้ายไม่เท่ากัน (asymmetric) พวกที่มีรูปกลมและยาวรีนั้นจะพบมีจำนวนน้อย basidiospore มีขนาดยาว 7-9 ไมครอน กว้างจาก 5-6 ไมครอน (จากส่วนที่กว้างที่สุด)

ถึง 3-4 ไมครอน (จากส่วนที่แคบที่สุด) ผนังของ spore จะเรียบและหนา cell content เมื่ออ่อนจะใส หรือมีสีอ่อน แต่เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (brownish) (Chang, 1972) ตรงส่วนที่กว้างของ basidiospore ซึ่งเป็นส่วนฐานจะมี hilum ซึ่งเป็นส่วนเชื่อมระหว่าง basidiospores และก้านชูสปอร์ (sterigma) spore มีผนัง 2 ชั้น คือ ผนังชั้นใน (perispore) และผนังชั้นนอก (epispore) ปกติแล้ว basidiospore จะมีนิวเคลียส 1 อันแต่บาง spore อาจพบนิวเคลียส 2 อันก็ได้ เมื่อ basidiospore จะงอกตรงส่วนของ hilum จะโป่งออก และเจริญต่อไปเป็น germ tube ทั้งนี้เนื่องจาก hilum เป็นส่วนที่มีผนังของ cytoplasm ปิดอยู่ ซึ่งเป็นทางให้น้ำและอาหารไหลผ่านเข้าไปก่อนที่จะงอก hilum นี้เป็นส่วนที่อ่อนที่สุดของผนัง spore ดังนั้นเมื่อ spore จะงอกส่วนของ hilum จึงโป่งออกและงอกเป็น germ tube ได้ง่าย หลังจาก spore งอกเป็น germ tube แล้วนิวเคลียสและไซโตลาสซึมที่อยู่ใน basidiospore ก็จะค่อยๆ ไหลเข้าไปอยู่ใน germ tube เหลือไว้แต่ผนังของ spore และเริ่มแบ่งนิวเคลียสแบบ mitosis ได้หลายนิวเคลียสซึ่งจะกระจายอยู่ทั่วไปใน germ tube เมื่อ germ tube ยาวพอสมควรก็จะแตกกิ่งก้านให้เป็น primary mycelium ก่อนแตกกิ่งก้าน germ tube อาจมีความยาว 28-267 ไมครอน (ศุภชัย, 2521)

การงอกของสปอร์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ การแช่ในน้ำกลั่น (presoaking) ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และความหนาแน่นของสปอร์ โดยสปอร์ของเห็ดฟางมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดที่อุณหภูมิ 40°ซ การแช่ในน้ำกลั่นหรือ phosphate buffer pH 8.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะทำให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าสปอร์ที่ไม่ได้ผ่านการแช่ (Chang, 1972) สปอร์ของเห็ดฟางควรเก็บที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากอุณหภูมิต่ำจะทำให้การงอกของสปอร์ลดลง (Quimio et al., 1990)

**2.2.2 การเจริญของเส้นใย** เมื่อเลี้ยงเส้นใยของเห็ดบนอาหารวุ้นจะพบว่า เส้นใยที่มาจากต่าง basidiospore กัน อาจจะมีการเจริญเติบโตต่างกัน เส้นใยจะมีการเจริญเติบโตที่ส่วนปลาย ขณะที่เส้นใยเติบโตนั้น ราจะสร้างผนังกั้นระหว่างเซลล์ (septum) ขึ้น เส้นใยจะเจริญไปบนอาหารวุ้น ตามปกติแล้วเมื่อเส้นใยที่เจริญมาจากต่าง spores เจริญอยู่ด้วยกัน เส้นใยแต่ละชนิดจะมาสัมผัสกัน และแลกเปลี่ยนสารภายในเซลล์รวมทั้งนิวเคลียส ทำให้บางเซลล์มีนิวเคลียส 2 ชนิด เซลล์ที่มีนิวเคลียสต่างชนิดอยู่ด้วยกันจะเจริญและให้กำเนิด secondary mycelium ซึ่งมีลักษณะบวมพอง (swallen) เมื่อแก่เซลล์ที่บวมพองเหล่านี้เชื่อกันว่าจำเป็นสำหรับสะสมอาหารเพื่อใช้ในการสร้างเป็นดอกเห็ด (fruiting body หรือ basidiocarp) ลักษณะนี้จะพบมากในกองเพาะเห็ดฟาง

เส้นใยขั้นที่สองที่อ่อนมักจะบางและยาว มีการแตกกิ่งก้านเล็กน้อยยังไม่พบเซลล์ที่บวมพอง เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยจะหนาและสั้นมีการแตกกิ่งก้านมาก และมีเซลล์ที่บวมพองมาก ปกติเส้นใยจะบวมพองได้หลายแห่งภายในเซลล์ เส้นใยที่บวมพองนั้นบางครั้งส่วนปลายของเส้นใย

สามารถยุบตัวแล้วเจริญเป็นเส้นใยธรรมดาต่อไปได้ หรือบางครั้งมีผนังกั้น (septum) แบ่งเป็นเซลล์ๆ

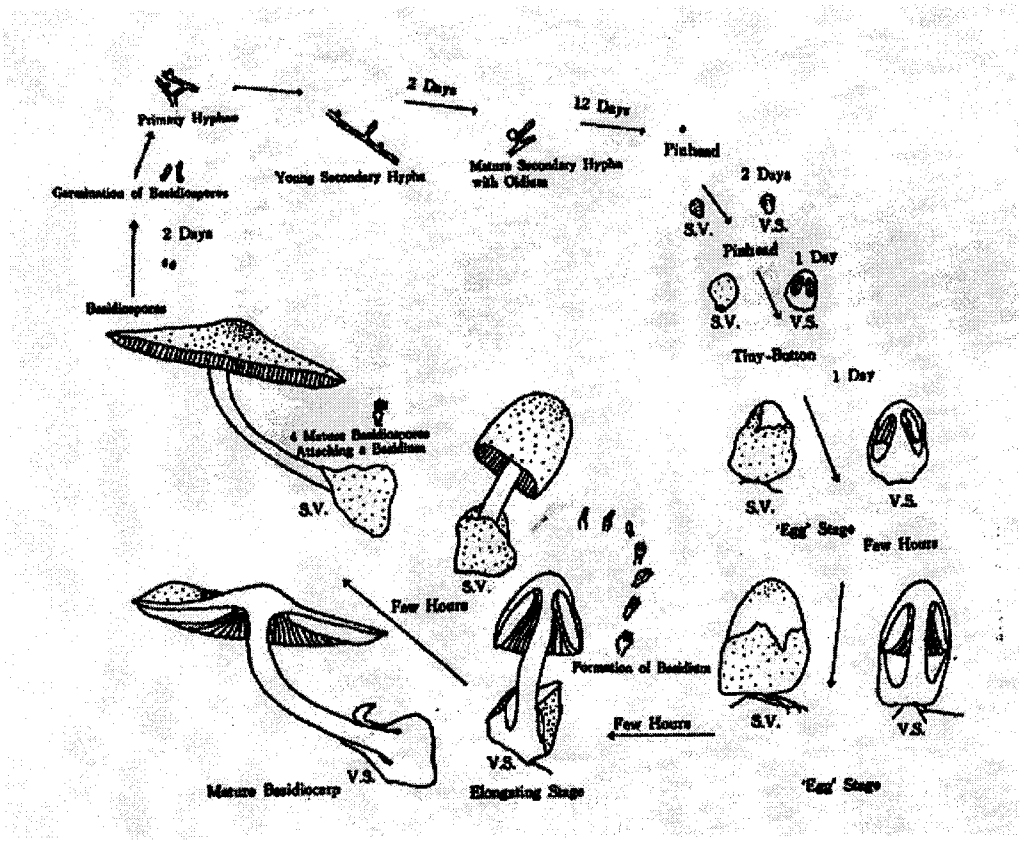
การงอกของ chlamydospore จะงอกเป็น germ tube 1 อัน หรือหลายอันออกมา จากนั้น germ tube ก็จะงอกเป็นเส้นใย ให้กำเนิดเส้นใยขั้นที่สอง (secondary vegetative hyphae) ซึ่งในที่สุดจะสร้างเป็นดอกเห็ดในกองเพาะต่อไป (ศุภชัย, 2521)

**2.2.3 การสร้างดอกเห็ด** ดอกเห็ดฟางเป็นส่วนที่เรียกว่า fruiting body หรือ basidiocarp ดอกเห็ด (pileus, cap) เป็นเห็ดทรงร่ม เกิดจากการรวมตัวของเส้นใย เจริญขยายใหญ่ขึ้น ลักษณะแรกเกิดเป็นก้อนกลมมีปลอกคลุม (volva) สีขาว จะค่อยๆเจริญเติบโตขึ้นแล้วแตกออกเป็นดอกเห็ด และก้านค่อยๆเจริญขึ้นมาในอากาศ คงเหลือเปลือกห่อหุ้มโคนอยู่มีลักษณะคล้ายถ้วยรองรับฐานดอกเห็ด หมวกดอกเมื่อโตเต็มที่จะกางออกมีลักษณะคล้ายร่ม เนื้อหมวกหนาพอสมควร ขนาดโตเต็มที่วัดได้ประมาณ 10-15 เซนติเมตร (ซม.) ผิวหมวกด้านบนเรียบอาจมีขนปกคลุมบางๆคล้ายเส้นไหม ดอกอาจมีสีเทาอ่อน หรือเทาแก่ ขอบหมวกเรียบตอนล่างหมวกเห็ดมีครีบ แผ่เป็นรัศมีรอบต้นเรียงแขวนตั้งฉากติดกับเนื้อหมวกเห็ดไม่ยึดติดกับก้านดอก ดอกเห็ดแรกบานครีบจะมีสีขาว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอมม่วงอ่อน และสีน้ำตาลเข้มตามลำดับ ก้านหมวกมีสีขาวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 ซม. เนื้อภายในละเอียด แน่นและค่อนข้างเปราะเล็กน้อย ก้านดอกสูงประมาณ 8-10 ซม. ผิวเรียบ ไม่มีวงแหวน ดอกเห็ดจะเจริญบนฟางหรือบนดิน ช่วงอายุการเป็นดอกเห็ดจะสั้น การเติบโตจากเส้นใยมาเป็นดอกเห็ดมีอยู่ 6 ระยะด้วยกัน คือ

1. ระยะหัวเข็มหมุด (pin head stage) ระยะนี้เส้นใยรวมตัวกันเห็นเป็นจุดสีขาวบนวัสดุที่เห็ดฟางใช้ในการเจริญเติบโต
2. ระยะกระดุมเล็ก ( tiny button stage) เป็นระยะที่ดอกเห็ดโตขึ้นมีขนาดเท่ากับเม็ดกระดุมขนาดเล็ก
3. ระยะกระดุม (button stage) เป็นระยะที่เส้นใยของเห็ดมีการเปลี่ยนแปลงและขยายตัวในความกว้างของดอกอย่างเต็มที่ ส่วนของหมวกและก้านดอกยังเล็กอยู่
4. ระยะไข่ (egg stage) ในระยะนี้ดอกเห็ด จะมีการเจริญด้านความยาวของก้านดอกและความกว้างของหมวกดอก เหมาะที่จะเก็บไปประกอบอาหาร เปลือกนอกเริ่มปริแตก
5. ระยะยืดตัว (elongation stage) หลังจากที่เปลือกที่หุ้มปริออก ก้านดอกเห็ดเริ่มจะชูดอกโต ในระยะแรกหมวกดอกจะยังไม่บาน ในระยะนี้สามารถมองเห็นมองเห็นหมวกดอก ครีบดอก ก้านดอก เนื้อเยื่อหุ้มโคนดอกได้ชัดเจน

6. ระยะดอกบานเต็มที่ (mature stage) ดอกเห็ดที่บานเต็มที่ ครีบดอกจะมีสปอร์อยู่ภายในครีบ

ดังแสดงในวงจรชีวิตของเห็ดฟาง ในภาพที่ 1 (ชาญยุทธ์และคณะ, 2543 และ Chang, n.d.)




**ภาพที่ 1** วงจรชีวิตของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* (Bull.ex Fr.) Sing. (Chang , n.d.)

**เส้นใยเป็นหมัน (sterile hyphae)**

เชื้อเห็ดที่ผลิตออกจำหน่ายบางครั้งพบว่ามีเส้นใยที่เจริญเติบโตดี แต่เส้นใยเหล่านี้ไม่รวมตัวกันและเจริญไปเป็นดอกเห็ด เส้นใยแบบนี้ค่อนข้างขาวฟู เติบโตเร็ว และไม่สร้าง chlamydospore ซึ่งสาเหตุเกิดจากเส้นใยเป็นหมัน หรือหัวเชื้อที่ใช้เพาะเห็ดได้มาจากเส้นใยที่เป็นหมัน หรือเส้นใยที่ใช้ทำหัวเชื้อผ่านการต่อเชื้อมาหลายครั้ง ทำให้เส้นใยเห็ดอ่อนแอไม่สามารถเจริญไปเป็นดอกได้ (ปัญญาและกิตติพงษ์, 2538) ซึ่งถ้าเส้นใยที่เป็นหมันไป anastomosis เข้ากับเส้นใยที่สมบูรณ์แล้วจะทำให้เส้นใยใหม่มีลักษณะที่ไม่ค่อยเป็นดอก ผลผลิตต่ำ ลักษณะของเส้นใยเป็นหมันมักจะเจริญดีแต่เส้นใยสีขาวฟู เกิดขึ้นเนื่องจากการต่อเชื้อบ่อยครั้ง และเกิด anastomosis กับเส้นใยเห็ดฟางที่มีในธรรมชาติซึ่งมีลักษณะการเจริญเป็นดอกเห็ดต่ำในขณะมีการเพาะเห็ดฟางในแปลง

**3. การผลิตเชื้อเห็ดฟาง**

การผลิตเชื้อเห็ดฟางนับเป็นอีกขั้นตอนที่มีความสำคัญเนื่องจากเชื้อเห็ดฟางมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมและมีความเสื่อมค่อนข้างสูง (วิฑูรย์, 2537) ในการผลิตเชื้อเห็ดจำเป็นต้องมีการคัดเลือกดอกเห็ด และเส้นใยที่จะนำไปทำหัวเชื้อ เส้นใยเห็ดฟางที่ดีไม่ควรต่อเชื้อบ่อยเกินไป จากรายงานของ Quimio และคณะ (1990) การต่อเชื้อเห็ดฟางมากกว่า 7 ครั้ง ทำให้เชื้อเห็ดอ่อนแอลง (degeneration) เปลี่ยนแปลงไปจากลักษณะเดิมและเมื่อนำไปเพาะทำให้ผลผลิตลดลง

**3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ (Isolation for pure culture)** ปัญญาและกิตติพงษ์ (2538)

**3.1.1 การแยกเชื้อจากสปอร์เดี่ยว (single spore isolation)** วิธีนี้ใช้สปอร์จากดอกเห็ดฟางที่เจริญเต็มที่แล้ว ไม่เป็นที่นิยมเพราะมีความยุ่งยาก และเมื่อนำไปทำหัวเชื้อจะให้ผลผลิตของดอกเห็ดที่ไม่แน่นอน เชื้อเห็ดกลายพันธุ์ง่าย แต่เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์

**3.1.2 การแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อดอกเห็ด (tissue culture isolation)** วิธีนี้ใช้เนื้อเยื่อจากดอกเห็ดขณะที่ยังตูมอยู่ จัดเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อเห็ดฟางเพื่อทำหัวเชื้อ เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย และเชื้อเห็ดฟางที่ได้จะให้ผลผลิตเหมือนพันธุ์เดิม

**3.2 เชื้อเห็ดฟาง**

เชื้อเห็ดฟางมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมและมีความเสื่อมสูงมาก นอกจากนี้การต่อเชื้อเห็ดที่มากกว่า 7 ครั้งจะทำให้เชื้ออ่อนแอลง และให้ผลผลิตลดลง (Quimio t al., 1990)

**3.3 สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและการเกิดดอกของเห็ดฟาง** (อานนท์, 2530) มีดังนี้คือ

**3.3.1 อุณหภูมิ** การเจริญเติบโตของเห็ดฟาง เส้นใยต้องการอุณหภูมิประมาณ 35-38 °ซ ในการเจริญเติบโต และจะออกดอกที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 20 °ซ จะไม่มีดอกเกิดขึ้น

**3.3.2 ความชื้น** เห็ดฟางเจริญเติบโตได้ดีที่ความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศประมาณ 80-90 % ในขณะที่ดอกเห็ดกำลังเจริญเจริญเติบโตอยู่นั้น หากความชื้นสัมพัทธ์ต่ำเกินไปดอกเห็ดอาจแคระแกรน ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ได้

**3.3.3 อากาศ** ทุกระยะการเจริญเติบโตของเห็ดล้วนแต่ต้องการอากาศในการหายใจทั้งสิ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งระยะของการสร้างและการเจริญเติบโตของดอกเห็ด จากการทดลองพบว่าระยะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดฟาง หากมีจำนวนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบริเวณกองสูงกว่าบรรยากาศเล็กน้อย คือประมาณ 0.1-0.2 % (โดยปกติในบรรยากาศจะมีก๊าซชนิดนี้อยู่ประมาณ

0.03 %) จะทำให้เส้นใยของเห็ดเจริญทางด้านความยาวและแบ่งเซลล์ได้เร็วยิ่งขึ้น แต่ช่วงระยะที่เส้นใยต้องการรวมตัวเพื่อเกิดดอก หากมีจำนวนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงแล้วจะทำให้เกิดดอกเห็ดน้อยลงหรือไม่เกิดเลย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของก๊าซนี้นอกจากนี้ยังมีผลต่อดอกเห็ดด้วย โดยเฉพาะส่วนก้านและหมวกดอกจะเล็กหรือไม่มีหมวกดอกเลย ส่วนผิวของดอกจะหยาบคล้ายหนังคางคก อันเนื่องมาจากเนื้อเยื่อของเห็ดส่วนปลอกหุ้มจะกลับเจริญเป็นเส้นใยเห็ดอีกครั้งหนึ่ง จากเหตุผลดังกล่าวจะเห็นว่าการถ่ายเทอากาศมีความจำเป็นต่อระยะที่กำลังจะเกิดดอกและช่วงที่เกิดดอกแล้ว โดยอาจทำการเปิดเอาวัสดุคลุมออก

**3.3.4 แสง** เห็ดฟางมีความต้องการแสงในการรวมตัวของเส้นใยขั้นที่ 2 เพื่อเป็นดอกเห็ด แสงจะช่วยกระตุ้นให้เส้นใยรวมตัวกัน โดยพบว่าแสงขนาด 80-150 ลักซ์ หรือ 25-50 แรงเทียนจะให้ผลดีที่สุด

**3.3.5 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)** เห็ดฟางมีความสามารถค่อนข้างพิเศษในการเจริญเติบโตในอาหารที่มีระดับความเป็นกรดเป็นด่างที่กว้างมาก คือระดับตั้งแต่ 4.5-8.5 แต่ไม่ได้หมายความว่าจะให้ผลผลิตสูงในระดับนี้ ซึ่งระดับความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของเส้นใย คือ 7.0

**4. คุณค่าทางอาหารของเห็ดฟาง**

คุณค่าทางอาหารของเห็ดฟางสด 100 กรัม ประกอบด้วย น้ำ 88.9 % โปรตีน 3.4 % ไขมัน 1.8 % คาร์โบไฮเดรต 3.9 % เยื่อใยหรือกาก 1.4 % พลังงาน 44 แคลลอรี่ เห็ดฟางมีคุณค่าทางอาหารสูงเมื่อเทียบกับพืชอื่นโดยเฉพาะโปรตีน (มีโปรตีนอยู่ระหว่าง 3-3.5 % ) เกลือแร่ วิตามิน ให้พลังงานและไขมันต่ำ ทำให้ลดไขมันในเส้นเลือด เหมาะสำหรับผู้ที่มีปัญหาเกี่ยวกับไขมันในเส้นโลหิตสูงและโรคหัวใจให้ทุเลาหายได้ นอกจากนี้เห็ดฟางยังมีโปรตีนจำพวกคาร์ดิโอท็อกซิค (cardiotoxic protein) เรียกว่า Volvatoxins ซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันการเติบโตและการหายใจของเซลล์มะเร็งที่เรียกว่า Ehrlich ascites tumor cells และสารนี้ยังมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus) ทั้งในห้องทดลองและภายในเซลล์ของหนู นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการลดกรดไขมันในเส้นเลือดได้ด้วย โดยการทำงานร่วมกันระหว่าง Volvatoxin A1 และ Volvatoxin A2 ซึ่งหากบริโภคเห็ดฟางเป็นประจำปัญหาเกี่ยวกับไขมันในเส้นโลหิตสูง หรือโรคหัวใจจะทุเลาและหายไปในที่สุด (ชาญยุทธ์, 2540 และชาญยุทธ์และคณะ, 2543)

**5. การเพาะเห็ดฟาง**

วิธีการเพาะเห็ดฟางอาจเพาะโดยการเพาะกองเตี้ย โดยใช้วัสดุต่างๆ เช่น ฟางข้าว ตอซังข้าวเปลือกของฝักถั่วเขียว เปลือกฝักถั่วเหลือง กากอ้อย ทะลายปาล์ม (ดีพร้อม, 2540) ซึ่งสามารถหาได้ในท้องถิ่น อย่างไรก็ตามการเพาะเห็ดฟางกองเตี้ยยังมีปัญหาอุปสรรคในระหว่างการเพาะในเรื่องฝน หรือสภาพอากาศไม่อำนวย ทำให้เกษตรกรไม่สามารถเพาะได้ตลอดปีตามความต้องการ เนื่องจากเห็ดฟางส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 32-38°ซ อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือประมาณ 35°ซ เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 15°ซ เส้นใยของเชื้อเห็ดฟางจะเจริญช้ามาก และจะหยุดการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10°ซ ทำให้เป็นปัจจัยที่จำกัดสำหรับการเพาะเห็ดฟาง ไม่สามารถเพาะได้ดีในทุกฤดูกาลและในทุกแหล่งของประเทศไทย (อดุลย์, 2542) จึงได้มีการพัฒนารูปแบบและวิธีการเพาะมาเป็นการเพาะเห็ดฟางในโรงเรือนขึ้น ทำให้สามารถดำเนินการผลิตโดยใช้พื้นที่น้อย แต่สามารถผลิตเห็ดฟางได้ปริมาณตามที่ต้องการในทุกฤดูกาล (บรรณ, 2532) ลักษณะของเชื้อเห็ดฟางที่ดีและเหมาะที่จะนำไปเพาะควรมีลักษณะดังนี้

1) เส้นใยเห็ดฟางเจริญเติบโตเต็มถุง เส้นใยมีสีขาวสามารถสังเกตได้
2) ก้อนเชื้อเห็ดมีกลิ่นหอมของเห็ดฟาง ไม่มีกลิ่นแอมโมเนียหรือกลิ่นเหม็น
3) ก้อนเชื้อเห็ดต้องไม่มีจุลินทรีย์ ปลอมปน เช่นเส้นใยมีลักษณะเว้าแหว่ง หรือเส้นใยมีสีอื่นปนสีขาว
4) ก้อนเชื้อเห็ดต้องไม่มีไข่ไร หรือไรตัวเล็กๆปน
5) ก้อนเชื้อเห็ดควรมีความชื้นเหมาะสมไม่เปียกแฉะหรือแห้งเกินไป ก้อนเชื้อควรมีอายุไม่เกิน 10 วัน หลังจากเส้นใยเดินเต็มก้อนปุ๋ยหมัก (ชาญยุทธ์, 2540)

**6. การปรับปรุงพันธุ์เห็ด**

วิธีการที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

**6.1 การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการคัดเลือกพันธุ์ (Selection)**

ในทางการค้าจะทำการคัดเลือกพันธุ์ใหม่จากการเพาะเลี้ยง multispores หรือจากการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยว หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดที่คัดเลือกไว้โดยตรง ซึ่งวิธีเหล่านี้จะใช้เวลาสั้นในการปรับปรุงพันธุ์ แต่การปรับปรุงทางพันธุกรรมจากวิธีการคัดเลือกทำได้ยากมากดังนั้นจึงควรผสมพันธุ์ก่อนจึงใช้วิธีคัดเลือกพันธุ์ต่อไป การคัดเลือกพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยวจะทำในเห็ดที่เป็นชนิด homothallic เช่น *Vovariella valvacea* และ *Agaricus bisporus* ส่วนการเพาะเลี้ยงจาก multispore หรือ tissue culture จะทำในเห็ดที่เป็น heterothallic (Quimio et al., 1990)

การคัดเลือกดอกเห็ดฟางไว้ใช้ทำพันธุ์ เพื่อจะนำไปใช้ในการขยายพันธุ์ต่อไป ควรเลือกดอกเห็ดที่มีลักษณะดังนี้ (ชาญยุทธ์, 2540)

1) เลือกดอกเห็ดจากแปลงที่ให้ผลผลิตสูงที่สุด

2) ควรเป็นดอกตูม ซึ่งอาจเป็นรูปทรงกลมหรือทรงรีก็ได้

3) เลือกดอกเห็ดที่มีปลอกหุ้มดอกเห็ดหนา เพราะจะได้น้ำหนักดีบานช้า และแข็งแรง

4) ขนาดของดอกเห็ดไม่ควรให้ใหญ่หรือเล็กเกินไป ควรเลือกที่มีขนาดเหมาะสมตามความต้องการของตลาด น้ำหนักดี

5) สีของดอกเห็ดอาจจะเลือกสีเทาหรือสีขาวก็ได้แล้วแต่ความต้องการของตลาด

การคัดเลือกสปอร์เดี่ยวของเห็ดฟางเป็นวิธีที่สามารถแยกสปอร์ที่เป็นหมันออกไปได้ จึงทำให้เชื้อเห็ดฟางมีความคงที่ (stability) และทำให้แข็งแรงได้อีก (rejuvenate) Graham (1978, อ้างโดยชริดา, 2529) ทั้งยังเป็นวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดที่ให้ผลผลิตสูงกว่าเดิมได้ Chang (1972) นอกจากนี้ยังมีการคัดเลือกสายพันธุ์โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการใช้รังสีเอ็กซ์ (X-rays) (Bos, 1996 และ Burkholder et al., 1947) รังสียูวี หรือการใช้สารเคมี เช่น N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine (NTG) (bapiraju et al., 2004) หรือสารโคคิซีน (cochicine) (สุมาลี, 2541)

### 6.2 การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ (hybridization) หรือการผสมข้าม (cross breeding)

การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีนี้ เป็นวิธีให้มีการผสมข้ามระหว่างเห็ดสองสายพันธุ์ที่สามารถเข้าคู่กันได้ ให้เส้นใยที่มีสองนิวเคลียสและเกิดเป็นดอกเห็ดได้ในที่สุด ซึ่งประสบความสำเร็จมากในงานปรับปรุงพันธุ์เห็ดกินได้หลายชนิด เช่นในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดย ขนิษฐา (2543) ได้ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยการผสมพันธุ์ ด้วยการแยกสปอร์เดี่ยวของเห็ดฟาง แล้วศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวโดยแบ่งเป็น การเจริญเร็ว เจริญปานกลาง และเจริญช้า จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวที่เจริญเร็วและช้า อย่างละ 4 สายพันธุ์ของแต่ละพันธุ์นำมาผสมกัน ได้ลูกผสม 64 สายพันธุ์ มี 18 สายพันธุ์ที่เกิด primordia และมีเพียง 14 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ และจากการทดลองพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างน้ำหนักแห้งของเส้นใยและผลผลิต คือสายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักมากที่สุดไม่ได้เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุด

ในการผสมข้าม (cross breeding) Fritsche et al. (1988) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์เห็ดระหว่าง *Agaricus bisporus* กับ *Agaricus bitorquis* โดยวิธี anastomosis ลูกผสมที่ได้มีลักษณะเด่นที่ได้รับจากพ่อและแม่ เช่นเดียวกับ ภัทราภรณ์ และวิเชียร (2540) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมสีเทาโดยการผสมพันธุ์แบบ Mono-mono crossing ระหว่างเห็ดนางรมสีเทากับเห็ดนางรมพันธุ์ลูกผสมได้ลูกผสมที่มีรูปร่างและคุณภาพดีซึ่งเห็ดทั้งสองมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศระบบ Heterothallism

(Raper, 1978) และการปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมโดยการผสมพันธุ์แบบสปอร์เดี่ยว โดยคัดเลือกลูกผสมที่มีข้อยืดระหว่างเซลล์ไปปลูกทดสอบผลผลิต ได้ลูกผสมบางสายเชื้อที่มีลักษณะคุณภาพค่อนข้างดีแต่ผลผลิตยังต่ำกว่าสายพันธุ์ พ่อ-แม่ (หทัยกาญจน์และวิเชียร, 2544) นอกจากนี้ยังมีการสร้างสายพันธุ์เห็ดใหม่โดยวิธีหลอมรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fussion) ซึ่งเป็นการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดฟางและเห็ดโคน ได้ลูกผสมซึ่งมีลักษณะร่วมระหว่างพ่อ-แม่ เรียกเห็ดชนิดนี้ว่า "เห็ดโฟน" (สุมาลี, 2541)

**7. การศึกษาด้านชีวโมเลกุลของเห็ดฟาง**

**7.1 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker)** นำมาใช้บอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี เนื่องจากเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของสารพันธุกรรม ที่สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลาน ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายประจำตัวของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ ที่เรียกว่า "ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ" (DNA fingerprint) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเทคนิคที่ใช้กันมากในงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดจำแนก (identification) และอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ พันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์ (breeding) ระบาดวิทยา (epidemiology) ของพืชและเชื้อรา (Weising et al., 1995)

ดีเอ็นเอเครื่องหมายสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้วิธีการ DNA-DNA hybridization เช่น restriction fragment length polymorpism (RFLP) และดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้วิธีการ polymerase chain reaction (PCR) เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment lenght polymorpism (AFLP) และ simple sequence repeat (SSR) เป็นต้น (Weising et al., 1995) ซึ่งดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดต่างๆ มีหลักการดังต่อไปนี้

**7.2 เทคนิคด้าน Polymerase chain reaction (PCR)**

Polymerase chain reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมาจากบางส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) โดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ซึ่งกระบวนการต่างๆ เลียนแบบจากการจำลองตัวเองของสายดีเอ็นเอในสภาพธรรมชาติ (*in vivo* DNA replication)

**7.2.1 องค์ประกอบพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการทำ PCR มีดังนี้**

(1) ดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA template)

(2) ไพรเมอร์ (primers) คือลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ(โอลิโกนิวคลีโอไทด์) ที่เป็นคู่สมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ด้านปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบ

(3) ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotied triphosphates, dNTPs)

(4) เอนไซม์ DNA polymerase

**7.2.2 หลักการของเทคนิค PCR**

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ DNA สายใหม่จากสาย DNA ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย ด้วยการอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ เป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน (พิสสวรรณ, 2540)

**ขั้นตอนที่ 1** เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสาย DNA ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95°ซ

**ขั้นตอนที่ 2** เรียกว่า anealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์สายสั้นๆ (oligonucleotide primers) ประมาณ 14-30 mer ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ที่เป็นต้นแบบจับคู่กันซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60°ซ

**ขั้นตอนที่ 3** เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูล DNA ที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 72-75°ซ โดยเอนไซม์ที่ใช้ต้องมีคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้ง 3 ขั้นตอน

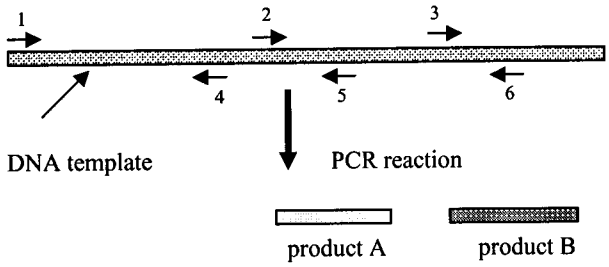
จากขั้นตอนที่ 1-3 รวมเรียกเป็นหนึ่งรอบ (one cycle) ซึ่งจะทำให้ได้ DNA สายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ต้นแบบเพิ่มขึ้นจำนวน 1 คู่ เมื่อปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นตอนที่ 1-3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณ (amplify) DNA ได้มากมาย โดยประมาณปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า นั่นคือ หากใช้ปริมาณ DNA ต้นแบบระดับพิโคกรัมจะผลิต DNA เพิ่มขึ้นได้ถึงระดับไมโครกรัม

**7.3 วิธีการที่ใช้ในการทำรูปแบบของลายพิมพ์ DNA**

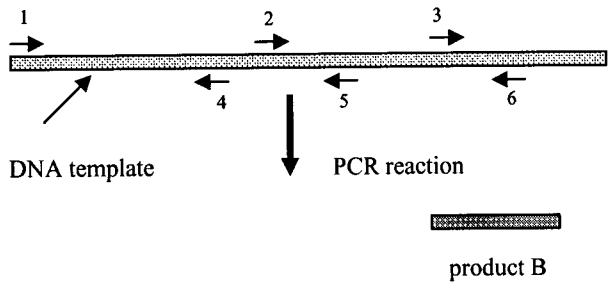
**7.3.1 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)** คือ เทคนิคหรือกระบวนการที่ได้รูปแบบต่างๆ ของแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณบางส่วนของจีโนม เป็นการสร้าง DNA fingerprint ด้วย arbitrary primer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (oligonucleotides) ประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ โดยทั่วไปนิยมใช้ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer/arbitrary primer) ซึ่งเป็นไพรเมอร์สายสั้นๆ ทำปฏิกิริยาสังเคราะห์สาย DNA กับ DNA ต้นแบบ (DNA template) แบบสุ่ม ในสภาพที่มีเกลือสูง (high salt) อุณหภูมิต่ำ (โดยทั่วไป 35-40 °ซ) ซึ่งวิธีนี้จะได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดประมาณ 200-2,000 bp

เนื่องจากจีโนมที่พบในนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม eukaryote มีความซับซ้อนเป็นอย่างมาก และมีโอกาสที่มีส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ จำนวน 8-10 นิวคลีโอไทด์จัดเรียงไว้ในทิศทางที่ถูกต้องและอยู่ใกล้กันเพียงพอที่จะถูกเพิ่มปริมาณโดย PCR ดังนั้นเมื่อมีการเลือกใช้ส่วนของ primer แบบสุ่มโดยเป็น primer สายสั้นๆเพียง 10 นิวคลีโอไทด์ จากจำนวนชุดของ primer สายสั้นๆ จำนวนมาก ในบางครั้งบาง primer ไม่สามารถทำให้เกิดมีการเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ แต่มีบาง primer ที่เลือกมาสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้หลายขนาดโดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดอาจมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันหรือแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน (Weising et al., 1995) การใช้ primer สายสั้นๆ แบบสุ่มในการจับเกาะ (arbitraly-primed polymerase chain reaction (AP-PCR)) เป็นวิธีง่ายๆในการหาความสัมพันธ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ถึงความแตกต่างระดับ species และ strains ซึ่งเทคนิค AP-PCR และ Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) (Welsh and Mc Clelland cited after Chiu et al., 1995) เช่น การศึกษาในการแยกความแตกต่างของ homokaryotic strains และ heterokaryotic strain ของเห็ด *Agaricus bisporus* โดย Khush et al. (1992) โดยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งใช้ short oligonucleotide primers **Kit A** จาก Operon Technologies Inc. โดยในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (ปฏิกิริยา PCR ) ใช้โปรแกรมของอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอนต่างๆ และตรวจสอบ PCR products (ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ) โดย agarose gel electrophoresis ซึ่งลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ต่างกันมีความสัมพันธ์กับลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการใช้ RAPD marker ในการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรม (genetic characterisation) ของเห็ด *Agaricus bisporus* ในการจำแนกสายพันธุ์ของเห็ด (strain identification ) (Moore et al., 2001) การใช้เทคนิค RAPD ในการแยกความแตกต่างภายในสปีชีส์และระหว่างสปีชีส์ของเห็ด *Agaricus bisporus* และ *A. bitorquis* (Song et al., n.d.) สำหรับแผนภาพของการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค RAPD สรุปได้ในภาพที่ 2

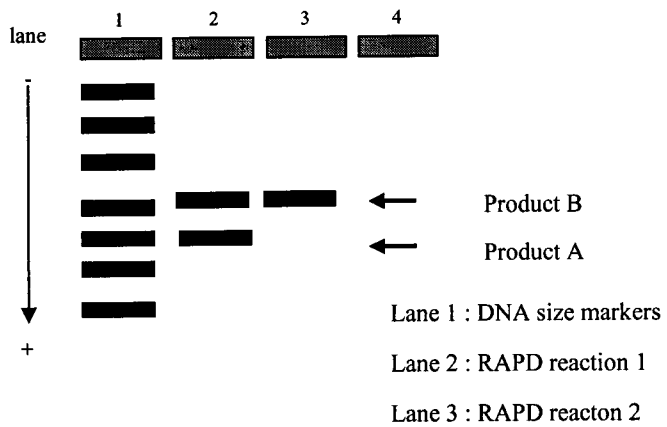
**a. RAPD reaction 1**




**b. RAPD reaction 2**




**c. agarose gel electrophoresis**




**ภาพที่ 2** การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดย RAPD ในปฏิกิริยาที่ 1 (a) และปฏิกิริยาที่ 2 (b) เมื่อนำมาตรวจสอบโดย agarose gel electrophoresis จะได้แถบดีเอ็นเอดังภาพ c ดังนั้นถ้าหากดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาที่ 1 และปฏิกิริยาที่ 2 มาจากแหล่งต่างกัน (แต่ยังมีความสัมพันธ์กันอยู่) แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่ตำแหน่ง 2 มีความแตกต่างกัน (ดัดแปลงจาก Anonymous, 2002)

**7.3.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)** เป็นการวิเคราะห์รูปแบบชิ้นส่วน DNA ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่แยกได้จากแบคทีเรีย ตำแหน่งการตัด DNA มีความจำเพาะเจาะจงเรียกว่า recognition sequence ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของเอนไซม์ โดยทั่วไปนิยมใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มี recognition sequence จำนวน 4-8 คู่เบส ทำให้สามารถเปรียบเทียบความเหมือนของรูปแบบลายพิมพ์ DNA ของชิ้น DNA ช่วงที่นำมาศึกษาได้ และทำให้สามารถจัดกลุ่มหรือจำแนกชนิดได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เช่นใช้เทคนิค RFLPs, AP-PCR และ RAPD ในการจำแนกสายพันธุ์ (strain) ของเห็ดหอม *(Lentinula edodes)* ในประเทศจีน พบว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง(homogeneous) (Chiu et al., 1996) และ ใช้เทคนิค RFLPs ในการตรวจสอบ heterokaryons ของ *Agaricus bisporus* ที่ได้จากการผสมระหว่าง homokaryon จากสายพันธุ์ธรรมชาติและพันธุ์การค้า (Jin et al., 1992)

**7.3.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)** โดยหลักการของ AFLP ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ 1) ตัดจีโนมของสิ่งมีชีวิตด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด (digestion), 2) เชื่อม Adapter จำนวน 2 ชนิดที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนปลายของชิ้น DNA ซึ่งได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (adapter ligation) เช่น ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I จะต้องเชื่อมด้วย Adapter ชนิด *EcoR* I Adapter และ 3) ให้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่จำเพาะต่อ adapter เข้าจับกับสาย DNA ต้นแบบ ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้มักติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี หรือสารเรืองแสง เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่มี adapter เข้าไปจับอย่างสมบูรณ์ตามขั้นตอนของการทำ PCR แล้วแยกขนาดของชิ้น DNA ที่ได้โดยเทคนิค gel electrophoresis แล้วตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA จากการเรืองแสงของไพรเมอร์ที่เกาะอยู่กับชิ้น DNA ในกรณีที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี ตรวจสอบรูปแบบลายพิมพ์ DNA โดยใช้แผ่นฟิล์ม X-ray ทาบลงบนแผ่น gel แล้วนำฟิล์มไปล้างบริเวณที่มีไพรเมอร์จับเกาะจะปรากฏแถบสีดำบนแผ่นฟิล์มเปรียบเทียบความเหมือนของ DNA fingerprint และในกรณีที่ไม่ได้ติดฉลากไพรเมอร์ สามารถตรวจสอบรูปแบบของ DNA fingerprint ได้โดยการย้อมด้วย ethidium bromide หรือ silver nitrate (Sambrook et al., 1989)

**7.3.4 Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)** เป็นการศึกษา DNA fingerprint ในส่วนของ ribosomal RNA genes (rDNA) ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ rRNAs โดยตรงเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สำคัญที่นิยมนำมาใช้แยกชนิด (species) และ สายพันธุ์ (strains) ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Chen et al., 1992) RNA genes (rDNA) ของ eukaryotes มีลักษณะที่เป็นหน่วยที่เรียงซ้ำๆ ต่อกัน (tandem repeats) ซึ่งแต่ละหน่วยที่เรียงซ้ำๆ กัน ประกอบด้วยรหัสพันธุกรรมในส่วนของ 18S, 5.8S และ 28S rRNAs ซึ่งแยกออกจากกันด้วย internal transcribed spacers (ITS1, ITS2) และในแต่ละชุดของ rDNA ที่ซ้ำๆ กัน ถูกแยกด้วย intergenic spacer (IGS), ส่วนของ rRNA gene มี

ความคงที่สูงมาก จะเกิดการเปลี่ยนแปลงช้าและสามารถนำมาใช้ศึกษา phylogeny ในระดับ Division และ Class ลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในส่วน ITS และ IGS เป็นส่วนที่เกิดวิวัฒนาการได้เร็วที่สุดในชุดของ rRNAs gene และอาจทำให้เกิดความแตกต่างระหว่าง species ภายใน genus เดียวกัน หรือระหว่างประชากร (White et al., 1990)

ในการศึกษา DNA fingerprint ของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคนิคดังกล่าวอาศัยการทำปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการศึกษาด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ด้วย specific primer ที่จำเพาะต่อนิวคลีโอไทด์ที่มีลักษณะ high conserve region ของ small subunit ribosomal DNA และตัดชิ้น DNA product จากปฏิกิริยา PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวประสบความสำเร็จในการใช้จำแนกเชื้อราในกลุ่มของรา ectomycorrhiza (Eliane et al., 2002)