



# การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด

(Preservation of Mushroom Culture)

เอกสารนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการองค์ความรู้  
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ



กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด  
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ  
กรมวิชาการเกษตร

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด  
(Preservation of Mushroom Culture)

เอกสารฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการความรู้  
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

## คำนำ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยกลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด มีหน้าที่หลักในการวิจัยและพัฒนาเห็ดในหลากหลายด้าน ทั้งการคัดเลือก ปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้เห็ดพันธุ์ดี การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มผลผลิต การค้นคว้าหาวิธีการเพาะเห็ดชนิดใหม่ รวมไปถึงวิธีการอนุรักษ์และเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด โดยการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดให้มีความถูกต้องและเหมาะสมเป็นอีกปัจจัยสำคัญหนึ่งในกระบวนการเพาะเห็ดที่มีคุณภาพ เพื่อให้ได้ผลตอบแทนที่มากขึ้นและลดต้นทุนการผลิต ปัจจุบันการเพาะเห็ดเพื่อการค้าได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เกษตรกรทั้งรายใหญ่และรายย่อยมีความสนใจทั้งทางด้านเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มผลผลิต การเลือกใช้วัสดุเพาะที่หลากหลาย ตลอดจนวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดที่เหมาะสม เพื่อความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ของเชื้อ และความเสถียรของสายพันธุ์ เอกสารการจัดการความรู้ฉบับนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อถ่ายทอดองค์ความรู้สำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ด้วยวิธีต่าง ๆ ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดแต่ละชนิด ตลอดจนวิธีการปรับใช้วัสดุ อุปกรณ์ที่หาได้ง่าย ราคาถูก สำหรับเผยแพร่ให้นักวิจัย นักศึกษา ตลอดจนเกษตรกรและผู้สนใจ เพื่อให้เข้าใจกระบวนการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดและนำไปปรับใช้ได้อย่างเหมาะสม กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด หวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจ และเป็นข้อมูลที่สามารถนำไปอ้างอิงและต่อยอดงานวิจัยได้ในอนาคต

คณะทำงานการจัดการความรู้  
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ  
มิถุนายน 2562

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. ความสำคัญของการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	1
2. วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	2
3. ความสำคัญของการเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ด	3
4. วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ด	3
5. การควบคุมคุณภาพของเชื้อพันธุ้เห็ดที่เก็บรักษา	5
6. การปรับใช้วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ดให้เหมาะสม	6
7. วิธีเก็บรักษาเชื้อพันธุ้เห็ดชนิดต่าง ๆ	8
7.1 เชื้อพันธุ้เห็ดสกุลนางรม	8
7.2 เชื้อพันธุ้เห็ดหูหนู	9
7.3 เชื้อพันธุ้เห็ดกระด้าง	10
7.4 เชื้อพันธุ้เห็ดฟาง	13
7.5 เชื้อเห็ดชนิดอื่น ๆ	16
สรุป	18
เอกสารอ้างอิง	19

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรม	12
2. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดหูหนู	12
3. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดกระด้าง	13
4. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง	15

## การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด (Preservation of Mushroom Culture)

### 1. ความสำคัญของการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ประเทศไทยจัดอยู่ในพื้นที่เขตร้อนชื้นจึงมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ทั้งพืช สัตว์รวมถึงสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหรือที่เรียกโดยทั่วไปว่าจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น เห็ด รา แบคทีเรีย ไวรัส ยีสต์ เป็นต้น ปัจจุบันจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสำคัญและถูกนำมาใช้ประโยชน์มากขึ้น ทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อม การเกษตร สาธารณสุข รวมถึงการผลิตอาหารและอุตสาหกรรมต่าง ๆ

เชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อราและแบคทีเรียที่สามารถแยกจนได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้ว หากต้องการนำไปศึกษาคุณลักษณะเฉพาะในด้านต่าง ๆ จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณ และต้องคำนึงถึงการเก็บรักษาที่ถูกต้อง เพื่อการนำจุลินทรีย์เหล่านั้นไปใช้ประโยชน์ในหลากหลายด้าน อาทิ (พัฒนา, 2547)

1. เป็นเครื่องมือในการศึกษาเทคโนโลยีทางชีวภาพ เพื่อสนับสนุนการเกษตร สิ่งแวดล้อม อุตสาหกรรมทางการแพทย์และเภสัชกรรม
2. เป็นเครื่องมือของงานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ในหลาย ๆ สาขา

เมื่อทำการรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ควรมีการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวโมเลกุล ลักษณะทางการเกษตรต่าง ๆ จัดเก็บอย่างเป็นระบบภายในศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์กรรมของจุลินทรีย์ เพื่อเป็นแหล่งอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ สำหรับการศึกษาและใช้ประโยชน์ทางด้านต่าง ๆ อย่างยั่งยืน และเป็นแหล่งวัตถุดิบของจุลินทรีย์ธรรมชาติที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ เพื่อนำมาศึกษา คัดเลือก ปรับปรุงพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์สำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ได้ตามความต้องการ

## 2. วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ จำเป็นต้องเลือกใช้วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกต้องและเหมาะสมกับเชื้อชนิดนั้นๆ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ สามารถเก็บได้นานโดยไม่สูญเสียพันธุ์ กลายพันธุ์ หรือสูญเสียคุณสมบัติเฉพาะของจุลินทรีย์ชนิดนั้นไป โดยทั่วไปวิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ มี 6 วิธี ดังนี้ (Smith and Onions, 1994)

1. การเก็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture media) เป็นการเก็บเชื้อระยะสั้น มีการถ่ายเชื้อทุก 6 เดือน เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด แต่ต้องระมัดระวังเรื่องการกลายพันธุ์ของเชื้อ และการปนเปื้อนจากการย้ายเชื้อในแต่ละครั้ง
2. การเก็บภายใต้ไขมันแร่ (Mineral oil) การเก็บด้วยวิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes, Zygomycetes และ Basidiomycetes ได้นานถึง 10 ปี ส่วนเชื้อราในกลุ่ม Oomycetes เก็บได้เพียง 2 ปี
3. การทำให้แห้ง (Drying) การทำให้เชื้อจุลินทรีย์แห้งในวัสดุต่าง ๆ เช่น กระดาษกรองที่ปลอดเชื้อ ดิน ทราชู ซิลิกาเจล และบนแผ่นเจลาติน เป็นการหยุดการเจริญของเชื้อส่วนใหญ่ใช้เก็บเชื้อราซึ่งทนต่อความแห้งได้ดี รวมถึงยีสต์และแบคทีเรียบางชนิด
4. การเก็บในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (Sterilized distilled water) วิธีนี้สามารถเก็บสปอร์ในรูปสปอร์แขวนลอย (spore suspension) หรือชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ เชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ เก็บรักษาได้ดีด้วยวิธีนี้
5. การเก็บในสภาพเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation) เป็นวิธีการเก็บไว้ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ  $-196^{\circ}\text{C}$  วิธีนี้เหมาะกับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด และสามารถเก็บเชื้อได้นานกว่า 10 ปี
6. การทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying หรือ lyophilization) เป็นหลักการนำน้ำออก ลดความชื้นจากเซลล์จุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาพแห้งทำให้อัตราเมตาบอลิซึมต่ำลง แต่ยังมีชีวิตอยู่และสามารถเก็บเชื้อไว้ได้นานมากกว่า 10 ปี ข้อดีของวิธีนี้ คือ เหมาะสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจำนวนมากและเก็บรักษาได้นาน ส่วนข้อด้อยคือ มีค่าใช้จ่ายสูงในการซื้ออุปกรณ์และเครื่องมือ

อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาจุลินทรีย์ไม่มีวิธีใดวิธีเดียวที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ทุกชนิด การเก็บรักษาจุลินทรีย์ ควรคำนึงถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ต้องการเก็บ วัตถุประสงค์ในการเก็บ ความพร้อมของเครื่องมือ อุปกรณ์ ความชำนาญของบุคลากร งบประมาณที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ ควรเก็บเชื้อทุกชนิดสำรองไว้อย่างน้อย 1 - 2 ชุด เพื่อป้องกันการสูญเสียเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทั้งจากเหตุการณ์ไม่คาดคิด และภัยธรรมชาติต่าง ๆ

### 3. ความสำคัญของการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด

เห็ด เป็นเชื้อรากลุ่มหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย และสามารถนำผลลัพธ์จากการย่อยสลายไปใช้ในการเจริญ เห็ดรับประทานได้หลายชนิดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากมีโปรตีน กากใยสูง ปราศจากไขมัน อีกทั้งประกอบด้วยวิตามินอีกและกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งเป็นประโยชน์ทางด้านสุขภาพของมนุษย์ มีบันทึกการนำเห็ดมาประกอบอาหาร เป็นยารักษาโรค หรือนำไปแปรรูปเพื่อการค้ามาอย่างยาวนาน ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาวิจัยถึงคุณสมบัติประโยชน์ด้านอื่น ๆ ของเห็ด เช่น ประโยชน์ของเห็ดทางการแพทย์ การนำไปใช้เป็นส่วนประกอบทางด้านเครื่องสำอาง ตลอดจนการสกัดสารสำคัญในเห็ดบางชนิด เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร เช่น สารควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่าง ๆ เป็นต้น

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

ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน โดยจำเป็นต้องคำนึงถึงคุณภาพ ความมีชีวิต การเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ไม่พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ มีความเสถียรของเชื้อพันธุ์ ไม่สูญเสียลักษณะทางพันธุกรรม ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยา (Chang and Miles, 2004) โดยวิธีการเก็บรักษาแบบต่าง ๆ เพื่อนำมาเลี้ยงหรือเพิ่มจำนวนภายหลัง โดยการจำกัดอากาศ อุณหภูมิ สารอาหารและน้ำ ช่วยให้เก็บรักษาให้นานและคงคุณภาพไว้ให้มากที่สุด

### 4. วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด

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

3.1 การเก็บรักษาเชื้อเห็ดระยะสั้น วิธีการที่นิยมใช้กันคือ การย้ายเชื้อลงอาหารวุ้น Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มเลี้ยงเส้นใยระยะแรกในอุณหภูมิที่เหมาะสมของเห็ดแต่ละชนิด จากนั้นเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 20 - 25 °C และมีการถ่ายเชื้อเป็นระยะ โดยปกติสามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 6 เดือน เป็นวิธีการปฏิบัติทั่วไปในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ สามารถใช้เก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดได้ในระยะสั้น และอาจนำเชื้อบนอาหารวุ้นไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 - 15 °C หรือลดปริมาณน้ำตาลในอาหารวุ้นลงครึ่งหนึ่ง เพื่อช่วยยืดอายุในการเก็บรักษา แต่ไม่เหมาะกับการเก็บรักษาเชื้อเห็ดในกลุ่มที่ต้องการอุณหภูมิสูงในการดำรงชีวิต การเก็บรักษาเชื้อบนอาหารวุ้นมีข้อดีคือเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย วัสดุ อุปกรณ์ที่นำมาใช้หาได้ง่าย ราคาถูก แต่มี



ข้อด้อยที่ต้องใช้เวลา แรงงานมากในการเตรียมอาหาร และต้องใช้พื้นที่มากในการเก็บหลอดหรือขวดเชื้อ นอกจากนี้ ยังอาจเกิดการสับเปลี่ยนในการเขียนรหัสหรือชนิดของเชื้อ และการต่อเชื้อลงอาหารใหม่บ่อยครั้ง สามารถเพิ่มโอกาสในการกลายพันธุ์ของเชื้อเห็ดและเกิดการปนเปื้อนจากการย้ายเลี้ยงบ่อย ๆ ได้

3.2 การเก็บรักษาเชื้อเห็ดระยะกลาง วิธีที่นิยมกันคือเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดบนวัสดุเพาะเชื้อเลี้ยงและน้ำกลั่น การเก็บรักษาเชื้อเห็ดบนวัสดุเพาะเชื้อเลี้ยง โดย Joseph (1998) รายงานการเตรียมวัสดุเพาะเชื้อเลี้ยงที่ใช้ในการเก็บรักษาซึ่งประกอบด้วย เชื้อเลี้ยงไม้เนื้อแข็ง 80% รำข้าวสาลี 15% และ ยิปซัม 5% ให้ความชื้น บรรจุลงขวดนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 121 °C ใส่เชื้อเห็ดจนเส้นใยเจริญคลุมเต็มอาหารเชื้อเลี้ยง วิธีการนี้สามารถเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นได้นานกว่า 1 ปี และการเก็บรักษาเชื้อเห็ดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นวิธีที่แนะนำว่ามีประสิทธิภาพดี วิธีการนี้ Joseph (1998) อ้างถึงรายงานการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเก็บรักษาเชื้อราสาเหตุโรค เป็นครั้งแรกโดย Castellani ในปี 1939 ต่อมา มีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านใช้วิธีการนี้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ อาทิ McGinnis *et al.* (1974) รายงานการเก็บรักษาเชื้อรา ยีสต์ แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีส ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิห้องได้ตั้งแต่ 12 - 60 เดือน และ Odds ในปี 1991 เก็บรักษาเชื้อยีสต์สาเหตุโรค ทั้งหมดนี้สามารถเก็บไว้ได้นานมากกว่า 3 ปี โดยไม่มีการเสื่อมของเชื้อ การเก็บรักษาเชื้อเห็ดระยะกลาง นอกจากเก็บบนวัสดุเพาะเชื้อเลี้ยงและการเจาะขึ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ใส่ลงไปขวดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว การเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้นและปิดทับด้วยน้ำมันหรือเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อเห็ดได้ด้วย เช่น เห็ดฟางที่เจริญอยู่บนอาหารวุ้น เมื่อปิดทับด้วยพาราฟินเหลวที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์สามารถเก็บไว้ได้นาน 6 เดือน (ยงยุทธ์และคณะ, 2525)

3.3 การเก็บรักษาเชื้อเห็ดระยะยาว โดยเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดในสภาพเยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -196 °C หรือ -384 °F ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นการเก็บรักษาที่หยุดกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อ ทุกขั้นตอนต้องมีการลดอุณหภูมิเพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์ อัตราการทำใหเย็นควรเป็นไปอย่างช้า ๆ (Cooling) และควบคุมให้ได้ประมาณ 1 °C ต่อนาที จนลงมาถึง -40 หรือ -50 °C แล้วจึงทำให้เยือกแข็งอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิต้องการ วิธีการนี้โดยทั่วไปมีการใช้กลีเซอรอล (Glycerol) ความเข้มข้น 5 - 10% เป็นสารป้องกันความเย็น (Cryoprotective agents) เพื่อลดความเสียหายต่อเซลล์ในขณะที่เก็บรักษาเชื้อ อย่างไรก็ตาม เมื่อต้องการนำเชื้อขึ้นจากถังไนโตรเจนเหลว ต้องมีการหลอมละลายตัวอย่าง (Thawing) เพื่อลดความเสียหายของเซลล์ในระยะของการทำให้ละลายอาจเกิดขึ้นได้และช่วยให้เชื้อมีอัตราการฟื้นตัวที่ดี วิธีการเก็บรักษาเชื้อในถังไนโตรเจนเหลวได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นวิธีที่ดีวิธีการหนึ่ง เนื่องจากสามารถลดอัตราการสูญเสียเซลล์ระหว่างการเก็บ ช่วยในการรักษาความคงที่ทางพันธุกรรมของเชื้อได้ดี และสามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 30 ปี แต่มีข้อควรระวังคือ ต้องรักษาปริมาณไนโตรเจนเหลวที่เหมาะสมภายในถังอยู่เสมอ เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้มีความสม่ำเสมอ โดยวิธีการนี้มีข้อด้อยคือ ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ต้องใช้คนที่มีทักษะและความชำนาญในการเก็บรักษาเชื้อ

## 5. การควบคุมคุณภาพของเชื้อพันธุ์เห็ดที่เก็บรักษา

การควบคุมคุณภาพของเชื้อพันธุ์เห็ดในแหล่งจัดเก็บเป็นสิ่งที่สำคัญมาก การควบคุมคุณภาพที่ดีนำไปสู่การมีชีวิตของเชื้อ ความแข็งแรง ความบริสุทธิ์หรือปลอดจากการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น และไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม วิธีการในการควบคุมคุณภาพจำเป็นต้องคำนึงถึงคุณสมบัติ ดังนี้

5.1 ความมีชีวิต (Viability) หลังจากการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดด้วยวิธีต่าง ๆ ตามที่กล่าวมาข้างต้น จำเป็นต้องมีการตรวจสอบความมีชีวิตหรือสภาพมีชีวิตของเห็ดชนิดนั้น ๆ วิธีเบื้องต้นในการตรวจสอบเชื้อเก็บรักษาทั้ง 3 ระยะ คือ เมื่อย้ายเชื้อเห็ดมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ โคลน (Colony) ที่เจริญขึ้นต้องมีลักษณะดีเหมือนเชื้อพันธุ์เดิม มีการเจริญของเชื้อที่สม่ำเสมอ รวมถึงสีของเส้นใยและอัตราการเจริญต้องไม่แตกต่างกับข้อมูลการเจริญของเชื้อพันธุ์เดิมก่อนการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาเพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อพันธุ์เห็ดที่เก็บรักษาในเห็ดหลายชนิด เช่น Singh *et al.* (2004) ตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อเห็ดที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวสาลี และเก็บภายในถังไนโตรเจนเหลวจำนวน 11 ชนิด คือ เห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus* และ *A. bitorquis*) เห็ดสกุลนางรม (*Pleurotus flabellatus*, *P. sajor-caju*, *P. ostreatus* และ *P. sapidus*) เห็ดหูหนู (*Auricularia polytricha*) เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) เห็ด *Morchella esculenta* และเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) โดยเมื่อนำเชื้อขึ้นมาเลี้ยงบนอาหาร Wheat Extract Agar (WEA) พบว่า เห็ดหูหนูและเห็ดฟางสภาพความมีชีวิตลดลง 10% หลังการเก็บรักษาภายในถังไนโตรเจนเหลวตั้งแต่ 6 - 42 เดือน ในขณะที่ เชื้อเห็ดอีก 9 ชนิด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพความมีชีวิต นอกจากนี้ Zaghi *et al.* (2017) ทดสอบความมีชีวิตในการเก็บรักษาเชื้อเห็ดกระดุม (*A. subrufescens*) ด้วยวิธี Cryopreservation โดยเลี้ยงเชื้อด้วย 2 กรรมวิธี คือ เลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA ผสมซูโครสความเข้มข้น 0 10 และ 20% แล้วเจาะชิ้นวุ้นใส่ลงใน cryotubes และเลี้ยงบนเมล็ดข้าวสาลีผสมซูโครสความเข้มข้น 0 10 และ 20% และเก็บลงใน cryotubes นำ cryotubes ทั้ง 2 กรรมวิธีเติมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 15 30 45% แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C และ -75 °C เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ปี พบว่า การเก็บเชื้อเห็ดกระดุมที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นระยะเวลา 1 ปี ไม่มีประสิทธิภาพในการเก็บเชื้อทั้งที่เจริญบนอาหาร PDA และเมล็ดข้าวสาลี ในขณะที่การเก็บเชื้อเห็ดกระดุมที่อุณหภูมิ -75 °C เป็นระยะเวลา 1 และ 2 ปี สารละลายซูโครสในทุกความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการคงความมีชีวิตของเห็ดกระดุม โดยกรรมวิธีที่เลี้ยงเชื้อในข้าวสาลี แม้ไม่เติมสารละลายซูโครส แต่เชื้อเห็ดยังสามารถเจริญคงความมีชีวิตอยู่ได้

5.1 ความบริสุทธิ์ (Purity) การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดด้วยวิธีที่เหมาะสมกับเห็ดแต่ละชนิดมีส่วนช่วยในการคงความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์อีกทางหนึ่ง เนื่องจาก การเก็บรักษาด้วยวิธีที่เหมาะสมสามารถคงสภาพความมีชีวิต เชื้อสามารถฟื้นตัว เจริญได้ดีเมื่อนำมาขยายเลี้ยง และในสภาพการเก็บรักษาเชื้อในบางวิธีสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม เมื่อนำเชื้อเห็ดที่เก็บรักษามาขยายเลี้ยงเพื่อทดสอบสภาพความมีชีวิต สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อเห็ดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในเบื้องต้น เช่น สีของเส้นใย ลักษณะการเจริญของเส้นใยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือลักษณะต่าง ๆ ของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การปนเปื้อนไม่เพียงแต่เชื้อราหรือแบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถ

ปนเปื้อนในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดเท่านั้น เชื้อเห็ดชนิดอื่นที่ไม่ตรงกับชนิดของเห็ดที่ต้องการเก็บรักษาถือเป็นการปนเปื้อนได้เช่นเดียวกัน

5.2 ความคงตัวหรือความเสถียรของสายพันธุ์ (Stability) และความสามารถในการออกดอก (Productivity) วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดที่เหมาะสม ต้องช่วยลดโอกาสในการเกิดความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมขึ้น ในเห็ดบางชนิดการตรวจสอบความตรงตามสายพันธุ์อาจสามารถตรวจสอบได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ความหนาแน่นของเส้นใย ลักษณะการเดินของเส้นใย รูปร่างของโคโลนี สีของเส้นใย แต่ในเห็ดบางชนิดที่เก็บรักษาอาจมีความจำเป็นต้องเพาะเห็ดชนิดนั้น ๆ ภายหลังจากการเก็บรักษามาเป็นระยะเวลาหนึ่ง เพื่อยืนยันว่าเชื้อพันธุ์เห็ดชนิดนั้นที่เก็บรักษา ยังมีความสามารถในการออกดอกและมีลักษณะตรงตามสายพันธุ์ดั้งเดิมก่อนการเก็บรักษาทั้งด้านคุณภาพ เช่น รสชาติ สี กลิ่น และด้านปริมาณ เช่น รูปร่าง ขนาดและน้ำหนัก ตลอดจนความสามารถในการใช้วัสดุเพาะจนกระทั่งเปิดดอกเก็บผลผลิต ในปัจจุบันการตรวจสอบความตรงตามสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลถูกนำมาใช้เพื่อลดระยะเวลาในการตรวจสอบและมีความแม่นยำสูง โดย Singh *et al.* (2004) ตรวจสอบการเก็บรักษาเชื้อเห็ดตระกูลเห็ด เห็ดสกุลนางรม เห็ดหูหนู เห็ดหอม เห็ด *Morchella* และเห็ดฟาง ที่เก็บภายในถังไนโตรเจนเหลวตั้งแต่ 6 - 42 เดือน ด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และ Internal Transcribed Spacers (ITS) พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมระหว่างการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดแบบการเก็บระยะสั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อและแบบการเก็บระยะยาวในถังไนโตรเจนเหลว เมื่อทดสอบความสามารถในการออกดอก พบว่าหลังการเก็บเชื้อไว้ 30 เดือน ไม่ส่งผลกระทบต่อการให้ผลผลิต (น้ำหนัก) ของเห็ดที่เก็บรักษา และ Zoghi *et al.* (2018) ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเห็ดตระกูลเห็ด (*A. subrufescens*) ที่เลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA และที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวสาลี แล้วเก็บรักษาด้วยเทคนิค cryopreservation ที่อุณหภูมิ  $-75^{\circ}\text{C}$  เป็นระยะเวลา 2 ปี โดยใช้เทคนิค PCR-RAPD พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเห็ดตระกูลเห็ดชนิดนี้

## 6. การปรับใช้วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดให้เหมาะสม

การเลือกวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดด้วยวิธีใดก็ตาม ต้องคำนึงถึงเป้าประสงค์หลักของการเก็บรักษา อาทิ สามารถรักษาคุณลักษณะของเห็ดที่ต้องการโดยคงสภาพเดิมไว้ให้มากที่สุด ตอบสนองต่อความต้องการในการใช้งานของผู้ใช้ เช่น ต้องการเก็บในระยะสั้น/ระยะยาว เก็บรักษาเชื้อเพื่อเป็นเชื้อต้นแบบ (Type cultures) เป็นเชื้ออ้างอิง (Reference cultures) เป็นเชื้อใช้งาน (Working culture) สำหรับงานวิจัยหรือให้บริการ โดยควรเป็นเชื้อที่ใหม่และพร้อมใช้งาน (Active) รวมถึงความพร้อมด้านแรงงาน อุปกรณ์เครื่องมือ และสถานที่ การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ควรใช้วิธีการเก็บให้เหมาะสมต่อความต้องการของเห็ดแต่ละชนิดและการใช้งานคุ้มค่าต่อการลงทุน ในแง่ของเกษตรกรควรเลือกใช้วิธีการที่ไม่ยุ่งยาก ลงทุนน้อยที่สุดและในส่วนของภาครัฐที่จำเป็นต้องมีการเก็บรักษาไว้เป็นแหล่งเชื้อพันธุ์หรือเพื่อการอนุรักษ์ต้องมีการเก็บเป็นระยะเวลาที่ยาวนาน จำเป็นต้องใช้วิธีการเก็บหรือใช้เทคโนโลยีขั้นสูง โดยเห็ดแต่ละชนิดอาจมีการปรับใช้วิธีการเก็บรักษาให้เหมาะสมที่แตกต่างกันไป เช่น

5.1 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดบนอาหารวุ้น เป็นวิธีที่ง่าย มีค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาน้อย เป็นวิธีที่สะดวกและนิยมใช้กันโดยทั่วไปทั้งการเก็บภายในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นเชื้อใช้งานสำหรับงานวิจัยและสามารถดัดแปลงไว้ใช้ถ่ายทอดสู่เกษตรกร แต่วิธีการนี้สามารถเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดได้เพียงระยะเวลาสั้น ๆ ไม่เกิน 4 – 6 เดือน แล้วย้ายเก็บลงในอาหารวุ้นใหม่ แต่การย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่บ่อย ๆ นั้น อาจส่งผลให้เชื้อพันธุ์เห็ดกลายเป็นพันธุ์ได้ง่าย และต้องอาศัยความชำนาญของผู้เก็บรักษาในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ ดังนั้น การเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดในอาหารวุ้นจึงควรตรวจสอบอยู่เสมอ เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารวุ้นแห้งจนเกินไป ซึ่งสามารถส่งผลให้เชื้อเห็ดที่เก็บรักษาตายได้

5.2 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดในน้ำกลั่น ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเห็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจนเชื้อเจริญได้ดีแล้ว การเจาะขึ้นวุ้น ใส่ขวดน้ำกลั่นหนึ่งขวด แล้วเก็บไว้ในตู้หมักหมมห้อง เป็นวิธีที่ง่ายและได้รับความนิยมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ใช้อุปกรณ์ที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพง เชื้อเห็ดหลายชนิดนิยมเก็บโดยใช้วิธีนี้ นอกจากนี้ การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดในน้ำกลั่นเมื่อนำเชื้อที่เก็บรักษามาย้ายเลี้ยงบนอาหาร เชื้อยังสามารถกลับมาเจริญได้ดี แม้มีการเก็บเชื้อมาเป็นระยะเวลานาน 2 - 5 ปี และเป็นวิธีที่สามารถใช้เก็บรักษาเพื่อการเป็นเชื้ออ้างอิง อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้มีข้อควรระวังคือไม่ควรใส่น้ำกลั่นในขวดจนสูงเกินไป ควรใส่น้ำประมาณครึ่งขวด เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อเจริญขึ้นมาถึงด้านบนฝาขวด ทำให้เชื้อเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย และต้องหมั่นตรวจเช็คการระเหยของน้ำ

5.3 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดในซีลี้อย เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ดัดแปลงจากการใช้วัสดุเพาะเพื่อเพาะและเก็บดอกเห็ดมาเป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด การเก็บเชื้อในซีลี้อยใส่เพียงน้ำลงในซีลี้อยแล้วบรรจุใส่ขวดหนึ่งขวดเชื้อ มีลักษณะคล้ายการจำลองสภาพในธรรมชาติของเชื้อเห็ดที่มักเจริญกินเนื้อไม้ และสามารถพักตัวอยู่ได้นาน วิธีการนี้ไม่นิยมใส่ส่วนประกอบอื่น เช่น รำข้าว หรือดีเกลือ เพราะต้องการให้เชื้อค่อย ๆ เจริญกินสารอาหารของเนื้อไม้อย่างช้า ๆ เพื่อการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน โดยวิธีนี้สามารถเก็บเชื้อได้นาน 2 - 5 ปี และควรใส่ซีลี้อยประมาณครึ่งขวดที่ต้องการเก็บ เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อเจริญขึ้นมาถึงด้านบนฝาขวด ซึ่งทำให้เชื้อเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย

## 7. วิธีเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดชนิดต่าง ๆ

### 7.1 เชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรม

สุวลักษณ์ และประไพศรี (2545) ได้ทดสอบการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมเป็นระยะเวลา 24 เดือน ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ในน้ำมันแร่ฆ่าเชื้อ (พาราฟินเหลว) และเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -75 °C และการเก็บบนอาหารวุ้นมีการถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน ตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ เลี้ยงเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมบนอาหาร PDA ในจานแก้ว เลี้ยงเชื้อ บ่มเส้นใยที่อุณหภูมิ 25 °C อายุ 7 วัน
2. การเตรียมภาชนะเก็บเชื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยงและเก็บเชื้อเห็ด ขวดเก็บเชื้อใช้ขวดไวแอล ขนาด 8 แตรม บรรจุอาหาร PDA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดและอาหารที่ใช้เก็บรักษา
3. การเก็บรักษาเชื้อเห็ด การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ในน้ำมันแร่ฆ่าเชื้อ (พาราฟินเหลว) และเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -75 °C ทำโดยเจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ย้ายชิ้นวุ้นจำนวน 10 ชิ้น ใส่ลงในขวดเก็บเชื้อบรรจุน้ำกลั่นหรือน้ำมันแร่ เก็บในห้องอุณหภูมิ 20 °C ยกเว้น ขวดเก็บเชื้อบรรจุกลีเซอรอล 10% เก็บในตู้แช่แข็ง ส่วนการเก็บเชื้อบนอาหารวุ้นทำการย้ายชิ้นวุ้น 1 ชิ้น เลี้ยงในหลอดแก้วทดสอบบนอาหาร PDA บ่มเส้นใยให้เจริญที่อุณหภูมิ 25 °C ก่อนเก็บในห้องอุณหภูมิ 20 °C และถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน
4. การควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษา เชื้อเห็ดที่เก็บรักษาต้องนำไปทดสอบความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ที่ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน และความสามารถในการออกดอก โดยย้ายชิ้นวุ้นจากการเก็บแต่ละวิธีจากทั้ง 4 วิธี วางบนอาหาร PDA ปริมาณ 20 ml ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ 10 จาน สำหรับขวดเก็บเชื้อบรรจุกลีเซอรอล 10% ที่เก็บในตู้แช่แข็ง ต้องนำมาแช่ใน water bath อุณหภูมิ 37 °C ก่อน แล้วย้ายเลี้ยงบ่มเส้นใยและสังเกตการเจริญที่อุณหภูมิ 25 °C ภายในเวลา 7 วัน เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเส้นใยเห็ดหลังเก็บรักษา และจากเส้นใยเห็ดที่ฟื้นตัว ย้ายเลี้ยงเส้นใยบนอาหาร PDA สำเร็จรูปที่อุณหภูมิ 25 °C วัดการเจริญของเส้นใยเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และความแข็งแรงของเส้นใย จากนั้นทดสอบความสามารถในการออกดอกของเส้นใย เตรียมเชื้อเพาะบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในขวดแก้วแบน บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C อายุ 10 วัน นำไปเพาะในวัสดุประกอบด้วย ขี้เลื่อย ผสมรำละเอียด น้ำตาลทราย ยิบซัมและดีเกลือ ความชื้น 60 - 70% บรรจุในถุงพลาสติกทนร้อนนึ่งฆ่าเชื้อเพาะทดสอบในโรงเรือนสภาพธรรมชาติ บันทึกน้ำหนักรวมเห็ดและหาค่าเฉลี่ยต่อก้อนวัสดุ
5. ผลการเก็บรักษา พบว่าการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในน้ำมันแร่ฆ่าเชื้อ และเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -75 °C มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาแตกต่างกัน โดยเส้นใยที่เก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง พบการระเหยของน้ำและพบการ

ปนเปื้อนจากเชื้ออื่นแต่ยังสามารถแยกเชื้อต่อให้บริสุทธิ์ได้ การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้ปฏิบัติงานได้ง่ายกว่าการเก็บในน้ำมันแร่เนื่องจากเชื้อซึ่งพบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นมากกว่าและความเหนอะหนะของน้ำมัน แต่มีข้อควรคำนึงเกี่ยวกับปริมาณน้ำที่ใช้เก็บต้องให้สัมพันธ์กับระยะเวลาการเก็บ สำหรับการเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-75^{\circ}\text{C}$  หากผู้เก็บเชื้อมีความพร้อมเรื่องวัสดุอุปกรณ์ถือเป็นวิธีการที่ปฏิบัติได้สะดวก ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น การเก็บรักษาเชื้อทั้ง 3 วิธี ช่วยยืดระยะเวลาในการถ่ายเชื้อ อายุในการเก็บ ลดปัญหาการเสียเวลาแรงงาน และการกลายพันธุ์ของเชื้ออันเนื่องมาจากการถ่ายเชื้อบ่อยครั้งจากวิธีการเก็บบนอาหารวุ้นและถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไป

## 7.2 เชื้อพันธุ์เห็ดหูหนู

เชื้อเห็ดหูหนูใช้วิธีการเก็บรักษาแบบเดียวกับเห็ดสกุลนางรม (สกุลลักษณะ และประไพศรี, 2545) ในระยะเวลาการเก็บ 24 เดือนในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ในน้ำมันแร่ที่นึ่งฆ่าเชื้อ เก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-75^{\circ}\text{C}$  และเก็บบนอาหารวุ้นโดยถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน ตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ เลี้ยงเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมบนอาหาร PDA ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ บ่มเส้นใยที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  อายุ 10 วัน
2. การเตรียมภาชนะเก็บเชื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยงและเก็บเชื้อเห็ด ขวดเก็บเชื้อใช้ไวแอลขนาด 8 แตรม ใช้อาหารพีดีเอเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดและอาหารที่ใช้เก็บรักษา
3. การเก็บรักษาเชื้อเห็ด การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ในน้ำมันแร่ที่นึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-75^{\circ}\text{C}$  ทำโดยเจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ย้ายชิ้นวุ้นจำนวน 10 ชิ้น ใส่ลงในขวดเก็บเชื้อที่บรรจุน้ำกลั่นน้ำมันแร่ หรือกลีเซอรอล 10% ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เก็บในห้องอุณหภูมิ  $20^{\circ}\text{C}$  ยกเว้นขวดเก็บเชื้อบรรจุกลีเซอรอล 10% เก็บในตู้แช่แข็ง ส่วนการเก็บบนอาหารวุ้นย้ายชิ้นวุ้น 1 ชิ้นเลี้ยงในหลอดแก้วทดสอบบนอาหาร PDA บ่มเส้นใยให้เจริญที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  ก่อนเก็บในห้องอุณหภูมิ  $20^{\circ}\text{C}$  และถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน
4. การควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษา เชื้อเห็ดที่เก็บรักษาต้องนำไปทดสอบความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ที่ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน และความสามารถในการออกดอก โดยย้ายชิ้นวุ้นจากการเก็บแต่ละวิธีจากทั้ง 4 วิธี วางบนอาหาร PDA ปริมาณ 20 ml ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ 10 จาน สำหรับขวดเก็บเชื้อบรรจุกลีเซอรอล 10% ที่เก็บในตู้แช่แข็ง ต้องนำมาแช่ใน water bath อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  ก่อน แล้วย้ายเลี้ยงบ่มเส้นใยและสังเกตการเจริญที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  ภายในเวลา 10 วัน เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเส้นใยเห็ดหลังเก็บรักษา และจากเส้นใยเห็ดที่ฟื้นตัว ย้ายเลี้ยงบนอาหาร PDA สำเร็จรูปที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  วัดการเจริญของเส้นใยเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และความแข็งแรงของเส้นใย จากนั้นทดสอบความสามารถในการออกดอกของเส้นใย เตรียมเชื้อเพาะบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในขวดแก้วแบน บ่ม

ที่อุณหภูมิ 30 °C อายุ 14 วัน นำไปเพาะในวัสดุประกอบด้วย ชีลื้อ ผสมรำละเอียด น้ำตาลทราย ยิบซัมและดีเกลือ ความชื้น 60 - 70% บรรจุในถุงพลาสติกทึบร้อนหนึ่งฆ่าเชื้อ เพาะทดสอบในโรงเรือนสภาพธรรมชาติ บันทึกน้ำหนักดอกเห็ดและหาค่าเฉลี่ยต่อก้อนวัสดุ

5. **ผลการเก็บรักษา** พบว่า การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดหูหนูในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในน้ำมันแร่หนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -75 °C เป็นเวลา 24 เดือน แต่ละวิธีมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาแตกต่างกัน โดยเส้นใยที่เก็บในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง พบการระเหยของน้ำและพบการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นแต่ยังสามารถแยกเชื้อต่อให้บริสุทธิ์ได้ ส่วนการเก็บในน้ำมันแร่หนึ่งฆ่าเชื้อพบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นมากกว่าการเก็บวิธีนี้ในเชื้อพันธุ์เห็ดชนิดอื่น สำหรับการเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -75 °C ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น การเก็บรักษาเชื้อทั้ง 3 วิธี ช่วยยืดระยะเวลาในการถ่ายเชื้อ อายุในการเก็บ ลดปัญหาการเสียหาย แรงแรงงาน และการกลายพันธุ์ของเชื้ออันเนื่องมาจากการถ่ายเชื้อบ่อยครั้งจากวิธีการเก็บบนอาหารวุ้นและถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไป

### 7.3 เชื้อพันธุ์เห็ดกระด้าง

สุวลักษณ์ และคณะ, 2546 ; สุวลักษณ์. 2548 ทดสอบวิธีการเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดกระด้างโดยเก็บในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บบนอาหารชีลื้อหนึ่งฆ่าเชื้อและเก็บบนอาหารวุ้นมีการถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือนตามขั้นตอนดังนี้

1. **การเตรียมเชื้อเห็ดบริสุทธิ์** เลี้ยงเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดกระด้างบนอาหาร PDA ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ บ่มเส้นใยที่อุณหภูมิ 30 °C อายุ 7 วัน
2. **การเตรียมภาชนะเก็บเชื้อ** อาหารที่ใช้เลี้ยงและเก็บเชื้อเห็ด ขวดเก็บเชื้อใช้โวลูเมน 8 แตรม ใช้อาหาร PDA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดและอาหารที่ใช้เก็บรักษา คือ อาหาร PDA และอาหารชีลื้อ
3. **การเก็บรักษาเชื้อเห็ด** การเก็บรักษาในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ทำโดยเจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเห็ดกระด้างเจริญอยู่ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มม. และย้ายชิ้นวุ้นหนึ่งชิ้นเลี้ยงบนอาหาร PDA ปริมาณ 5 ml ในขวดเก็บเชื้อ บ่มเส้นใยให้เจริญที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน ปิดทับผิวหน้าด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เก็บในห้องอุณหภูมิ 25 °C ส่วนการเก็บในชีลื้อหนึ่งฆ่าเชื้อ ทำโดยย้ายชิ้นวุ้นหนึ่งชิ้น เลี้ยงบนชีลื้อหนึ่งฆ่าเชื้อที่บรรจุในขวดเก็บเชื้อ (เตรียมจากชีลื้อหนัก 3 กรัม ปรับความชื้นด้วยน้ำและหนึ่งฆ่าเชื้อ) บ่มเส้นใยให้เจริญที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เก็บในห้องอุณหภูมิ 25 °C และวิธีการเก็บเชื้อบนอาหารวุ้น ทำการย้ายชิ้นวุ้นหนึ่งชิ้นเลี้ยงบนอาหาร PDA ปริมาณ 5 ml ในขวดเก็บเชื้อ บ่มเส้นใยให้เจริญที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน เก็บในห้องอุณหภูมิ 25 °C ซึ่งต้องมีการถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน

4. **การควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษา** เชื้อเห็ดที่เก็บรักษาถูกนำไปทดสอบความมีชีวิต ความบริสุทธิ์ที่ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน และการทดสอบความสามารถในการออกดอก โดยย้ายชิ้นวุ้นจากแต่ละวิธีการเก็บทั้ง 3 วิธี วางบนอาหารปริมาณ 20 ml ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ 10 จาน บ่มเส้นใยและสังเกตการเจริญที่อุณหภูมิ 30 °C ภายในเวลา 10 วัน เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเส้นใยเห็ดหลังเก็บรักษา และจากเส้นใยเห็ดที่พื้นตัว ย้ายเลี้ยงบนอาหาร PDA สำเร็จรูปที่อุณหภูมิ 30 °C วัดการเจริญของเส้นใยเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และความแข็งแรงของเส้นใย จากนั้นทดสอบความสามารถในการออกดอกของเส้นใย เตรียมเชื้อเพาะบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในขวดแก้วแบน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C อายุ 7-8 วัน นำไปเพาะในวัสดุประกอบด้วย ขี้เลื่อย ผสมรำละเอียด น้ำตาลทราย ยิบซัมและดีเกลือ ความชื้น 60 - 70% บรรจุในถุงพลาสติกทึบร้อนนึ่งฆ่าเชื้อ เพาะทดสอบในโรงเรือนสภาพธรรมชาติ บันทึกน้ำหนักดอกเห็ดและหาค่าเฉลี่ยต่อก้อนวัสดุ
5. **ผลการเก็บรักษา** พบว่า เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดกระด้างจากวิธีเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บบนอาหารขี้เลื่อยนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 24 เดือน ยังคงความมีชีวิตและมีการเจริญของเส้นใยบนอาหารที่ทดสอบ และเมื่อนำเส้นใยมาเพาะทดสอบ เส้นใยเห็ดที่เก็บรักษายังคงออกดอกให้ผลผลิตได้เช่นเดียวกับเส้นใยที่เก็บบนอาหารวุ้นซึ่งมีถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 6 เดือน ดังนั้น ทั้ง 2 วิธีการ จึงใช้เก็บรักษาเส้นใยเห็ดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดระยะเวลา แรงงานในการย้ายเชื้อต่อทุก 6 เดือน ลดการเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น และลดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในวัสดุเพาะขี้เลื่อยที่บรรจุในขวดแก้วกลมและขวดแก้วแบน และในอาหารวุ้นที่บรรจุในขวดแก้วแบนของเห็ดสกุลนางรม (ภาพที่ 1) เห็ดหูหนู (ภาพที่ 2) และเห็ดกระด้าง (ภาพที่ 3) เป็นการปรับใช้วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับการเก็บรักษาที่หาได้ง่าย ราคาถูก โดยเฉพาะเชื้อพันธุ์เห็ดที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและวัสดุเพาะขี้เลื่อย เป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดที่ได้ระยะเวลา นานกว่าการเก็บรักษาเชื้อบนอาหารวุ้น สามารถนำไปถ่ายทอดให้กับเกษตรกรได้ง่าย โดยการเก็บเชื้อทั้ง 2 วิธี สามารถยืดระยะเวลาในการถ่ายเชื้อ อายุในการเก็บ ลดปัญหาการเสียเวลา แรงงาน และการกลายพันธุ์ของเชื้ออันเนื่องมาจากการถ่ายเชื้อบ่อยครั้ง ได้มากกว่าการเก็บเชื้อบนอาหารวุ้น ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไป สำหรับวิธีการเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดในขี้เลื่อย เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้จากการเพาะเห็ดในขี้เลื่อย โดยการใส่เพียงน้ำลงในขี้เลื่อยเพื่อให้ความชื้นแต่ไม่เติมสารอาหารอื่น ๆ เพื่อชะลอการเจริญของเชื้อ สามารถเก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้น และเป็นวิธีการดัดแปลงวิธีการเก็บรักษาให้มีความใกล้เคียงกับธรรมชาติที่เชื้อเห็ดมักเจริญ ย่อยสลายสารอาหารต่าง ๆ จากเนื้อไม้ นอกจากนี้ การเก็บรักษาด้วย 2 วิธีนี้ สามารถปฏิบัติงานได้ง่ายกว่าการเก็บในน้ำมันแร่นึ่งฆ่าเชื้อ ที่มีความเหนอะหนะของน้ำมันและมักพบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น แต่มีข้อควรคำนึงถึงปริมาณน้ำที่ใช้เก็บต้องสัมพันธ์กับระยะเวลาการเก็บ และขี้เลื่อยที่บรรจุลงในขวด ไม่ควรสูงจนเกินไป เพื่อไม่ให้เชื้อพันธุ์เห็ดเจริญขึ้นมาด้านบนปากขวดและทำให้เกิดการปนเปื้อน อย่างไรก็ตาม



การเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ  $-75^{\circ}\text{C}$  ในถังไนโตรเจน หากผู้เก็บเชื่อมีความพร้อมเรื่องวัสดุอุปกรณ์ ถือเป็นวิธีการที่ปฏิบัติได้สะดวก ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ง่าย



ภาพที่ 1 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมโดย (ก) เก็บบนอาหารวุ้น (ข) เก็บในน้ำกลั่นนิ่งซ้ำเชื้อ 2 ครั้ง และ (ค) เก็บในซีลี้อยู่ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วแบนและขวดแก้วกลม



ภาพที่ 2 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดหูหนูโดย (ก) เก็บบนอาหารวุ้น (ข) เก็บในน้ำกลั่นนิ่งซ้ำเชื้อ 2 ครั้ง และ (ค) เก็บในซีลี้อยู่ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วแบนและขวดแก้วกลม



ภาพที่ 3 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดกระด้างโดย (ก) เก็บบนอาหารวุ้น (ข) เก็บในน้ำกลั่นหนึ่งขวด เชื้อ 2 ครั้ง และ (ค) เก็บในซีลื้อย ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วแบนและขวดแก้วกลม

#### 7.4 เชื้อพันธุ์เห็ดฟาง

เห็ดฟางเป็นเห็ดที่เจริญได้รวดเร็ว แต่มักพบปัญหาความอ่อนแอลงของเชื้อและการกลายพันธุ์ได้ง่าย เมื่อเก็บรักษาเชื้อเป็นเวลานาน จากการศึกษาและทดสอบวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางเพื่อให้ได้เชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่มีความบริสุทธิ์ มีความเสถียร มีอายุยืนยาว และคงสภาพความมีชีวิตเช่นเดียวกับพันธุ์เดิม มีวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ได้หลากหลายวิธี แต่วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่นิยมใช้และสามารถถ่ายทอดไปสู่เกษตรกรได้ง่าย มีดังนี้ (Mc Gennis *et al.*, 1974; Joseph , 1997)

- วิธีการเก็บรักษาบนอาหารวุ้น (Agar slant)
- วิธีการเก็บรักษาในวัสดุหมัก (Compost)
- วิธีการเก็บรักษาในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Sterilized distilled water)

##### วิธีการเก็บรักษาบนอาหารวุ้น (Agar slant)

จากการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบนอาหารแข็ง โดยย้ายเส้นใยที่เลี้ยงอยู่บนอาหาร PDA แล้วตัดชิ้น PDA ที่มีเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง ย้ายลงอาหาร PDA ใหม่ ทุก 1 2 4 8 และ 12 สัปดาห์อย่างต่อเนื่อง พบว่าการย้ายเชื้อพันธุ์เห็ดฟางลงอาหาร PDA ใหม่ทุก 1 สัปดาห์ต่อเนื่องกันจำนวน 7 ครั้ง เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง ยังคงเจริญและมีรูปแบบโคโลนีเหมือนเชื้อพันธุ์เดิม แต่หากเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบนอาหาร PDA นานกว่า 3 สัปดาห์ เมื่อย้ายลงอาหาร PDA ใหม่ มักพบโคโลนีที่มีเพียงเส้นใยอาหาร ซึ่งเป็นเส้นใยเจริญนอนราบบนผิวหน้าอาหาร PDA ไม่มีเส้นใยอากาศ (อัจฉราและศุภนิത്യ, 2546) นอกจากนี้ การเก็บเชื้อนาน 8 และ 12 สัปดาห์ แล้วย้ายเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางลงอาหาร PDA ใหม่ พบทั้งโคโลนีที่มีเพียงเส้นใยอาหาร ไม่มีเส้นใยอากาศ และพบโคโลนีที่มีเส้นใยครบทั้ง 2 ชนิด เมื่อทดสอบเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่มีเส้นใยทั้ง

2 ชนิด พบว่า สามารถเกิดดอกได้โดยการเพาะเลี้ยงบนวัสดุหมักในโรงเรือนและให้ผลผลิตไม่ต่างจากผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงก่อนการเก็บรักษา

ในหลายเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่มีการย้ายและต่อเส้นใยลง PDA ใหม่หลาย ๆ ครั้ง สามารถพบโคโคไคโนที่มีลักษณะดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน โดยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่มีเพียงโคโคไคโนเส้นใยอาหาร ซึ่งเส้นใยเจริญได้ซ้ามาก ไม่เหมาะสำหรับการนำไปเพาะเลี้ยงเป็นการค้า การเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบนอาหาร PDA ไว้เป็นเวลานาน อาหาร PDA มักแห้ง ส่งผลให้เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางแห้ง และทำให้เส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางตายหรือสูญเสียประสิทธิภาพบางอย่างไปด้วย ดังนั้นเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบนอาหาร PDA ควรบ่มเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25 - 35 °C ซึ่งอาหารที่เก็บเชื้อพันธุ์เห็ดฟางมักแห้งเร็วกว่าอาหารที่เก็บเชื้อพันธุ์เห็ดชนิดอื่นที่พักไว้ในห้องบ่มอุณหภูมิต่ำ อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบนอาหาร PDA มักใช้เก็บเชื้อพันธุ์เห็ดฟางเป็นระยะเวลาสั้น ๆ ไม่เกิน 3 สัปดาห์ เพื่อนำไปใช้งานขยายเส้นใยเชื้อพันธุ์

### วิธีการเก็บรักษาในวัสดุหมัก (Compost)

วิธีการเก็บรักษาเชื้อเห็ดฟางในวัสดุหมัก สามารถเก็บรักษาเชื้อได้ไม่ต่ำกว่า 3 เดือน ในอุณหภูมิห้อง วิธีการนี้เหมาะกับเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่เส้นใยสร้างแคลมิโดสปอร์ (chlamydo-spore) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดฟางได้นานยิ่งขึ้น โดยแคลมิโดสปอร์ของเห็ดฟางจะเพิ่มขึ้น เมื่อสภาพแวดล้อมการเจริญไม่เหมาะสม เช่น อาหารใช้เลี้ยงเส้นใยสมบูรณ์เกินไปหรือมีสารอาหารน้อยเกินไป

### วิธีการเก็บรักษาในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (Sterilized distilled water)

อัจฉราและประไพศรี (2543) ทดสอบวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่เก็บในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 โดยทดสอบเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง No.2 5 และ 6 (เป็นเชื้อพันธุ์บริการของศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย) ด้วยการนำชิ้น PDA ขนาด 5 มม. ที่มีเส้นใยเชื้อพันธุ์เห็ดฟางบริสุทธิ์เจริญอยู่จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อในขวดไวแอลขนาด 12 แตรม ที่ได้ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำเข้าบ่มในตู้อุณหภูมิ 35°C เก็บรักษาเป็นเวลา 1 3 6 12 และ 18 เดือน แล้วทดสอบสภาพความมีชีวิต พบว่าเชื้อพันธุ์เห็ดฟางทั้ง 3 เชื้อพันธุ์ยังมีชีวิต เมื่อทดสอบการเกิดดอกของเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง No.6 จากที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 1 3 6 และ 12 เดือน โดยการเพาะเลี้ยงกับวัสดุหมัก 3 สูตร คือ สูตรที่ 1 ขี้เถ้าหมัก สูตรที่ 2 ฟางข้าวและขี้เถ้าหมัก และสูตรที่ 3 ขี้เถ้าและขี้เถ้าหมัก ในระบบโรงเรือนที่ จ.พระนครศรีอยุธยา ผลการทดลองพบว่าเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง No.6 ที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นปลอดเชื้อนาน 12 เดือน ให้ผลผลิตได้ดีไม่ต่างกับที่เก็บไว้ 3 และ 6 เดือน ในทำนองเดียวกัน การทดสอบเพาะเลี้ยงกับขี้เถ้าและขี้เถ้าหมัก ที่ จ.นราธิวาส ได้ผลผลิตไม่ต่างกัน ส่วนการทดสอบกับฟางข้าวและขี้เถ้าหมัก ที่ จ.สุพรรณบุรี ได้ผลผลิตไม่ต่างกับการใช้เชื้อพันธุ์เห็ดเก็บรักษาในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 3 และ 6 เดือน จากนั้น เมื่อทดสอบการเกิดดอกของเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง No.5 ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 18 เดือน โดยการเพาะเลี้ยงกับวัสดุหมักในโรงเรือน พบว่า เชื้อเห็ดฟางสามารถให้ผลผลิตได้ดีเช่นเดิม โดยผลการทดสอบเก็บเชื้อพันธุ์เห็ดฟาง No.5 และ No.6 ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางเพื่อการค้าเพื่อลดต้นทุนจากการใช้อาหาร PDA ที่มีค่าใช้จ่ายในการเตรียมและต้องมีการถ่ายเชื้อพันธุ์เห็ดอย่างต่อเนื่อง

อัจฉรา (2553) ตรวจสอบเชื้อพันธุเห็ดฟางที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นปลอดเชื้อตั้งแต่ปี พ.ศ.2540 - 2553 จำนวนกว่า 80 เชื้อพันธุ (เชื้อพันธุที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ต้องนำขึ้นมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ใหม่ เมื่อน้ำในขวดไวแอลระเหยไปเหลือเพียง 20%) โดยพบว่า เชื้อพันธุเห็ดฟางยังมีชีวิตและโคโลนีของเชื้อยังมีทั้งเส้นใยอาหารและอากาศสมบูรณ์ เมื่อทดสอบการเกิดดอกของเชื้อพันธุเห็ดฟางทั้งที่กรมวิชาการเกษตร และที่ฟาร์มจากการทดสอบของเกษตรกร พบว่าหลายเชื้อพันธุมีประสิทธิภาพดีในการให้ผลผลิตและสามารถนำเชื้อพันธุเห็ดฟางนั้นมาทดแทนเชื้อพันธุเห็ดฟางพันธุเดิมที่ประสิทธิภาพการเกิดดอกเสื่อมลง นอกจากนี้ เชื้อพันธุเห็ดฟางที่เก็บรักษาในน้ำกลั่นปลอดเชื้อยาวนานกว่า 10 ปี ซึ่งเส้นใຍยังเจริญสมบูรณ์ดี เมื่อทดสอบการเกิดดอก พบว่า เชื้อพันธุธรรมชาติเกิดดอกได้ดี แต่เชื้อพันธุการค้าไม่เกิดดอก จึงสามารถแนะนำเกษตรกรให้เลี้ยงเส้นใຍในวัสดุหมักสักระยะหนึ่ง เพื่อให้เส้นใຍได้ปรับตัวให้คุ้นกับวัสดุหมัก หลังจากเก็บใຍในน้ำยาวนานกว่า 10 ปี แล้วจึงนำไปทำเชื้อเพาะ และเพาะทดสอบ

วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุเห็ดฟางในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ นอกจากการใช้ขวดไวแอลที่มีขนาดเล็กและอาจหาซื้อได้ยากในบางพื้นที่ สามารถดัดแปลงขวดเก็บเชื้อมาเป็นขวดแก้วกลมหรือขวดแก้วแบน (ภาพที่ 4) ได้ โดยขวดที่บรรจุน้ำต้องผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ใส่น้ำประมาณครึ่งขวดแล้วตัดชิ้นวุ้นใส่ลงไป ในขวดได้ประมาณ 15 – 20 ชิ้น วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน ต้นทุนไม่สูง ถ่ายทอดสู่เกษตรกรได้ และสามารถเก็บเชื้อได้เป็นระยะเวลาานาน แต่ควรตรวจสอบการระเหยของน้ำภายในขวดเป็นระยะ เพื่อลดการผิดพลาดและอาจส่งผลให้เชื้อตายได้หากน้ำภายในขวดระเหยจนหมด



ภาพที่ 4 การเก็บรักษาเชื้อพันธุเห็ดฟางด้วยวิธีต่าง ๆ (ก) เก็บบนอาหารวุ้น (ข) ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วแบนและขวดแก้วกลม

## การตรวจสอบเชื้อพันธุ์เห็ดฟางที่เก็บรักษา

เชื้อเห็ดฟางที่เก็บรักษาไว้ระยะยาวหรือสั้น โดยวิธีการเก็บรักษาในความเย็นยิ่งยวด (deep freeze) วิธีการเก็บไว้บนอาหารวุ้น ในวัสดุหมักหรือในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เมื่อย้ายเชื้อเห็ดมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ใหม่ โคลนที่เจริญขึ้นต้องมีลักษณะดีเหมือนเชื้อพันธุ์เดิม และเมื่อนำมาผลิตจำหน่ายต้องตรวจสอบความเสถียร โดยตรวจสอบการเกิดดอกในวัสดุหมักในถุงและลงแปลงเพาะ ซึ่งเป็นวิธีที่ตรวจสอบได้แม่นยำว่าเชื้อพันธุ์ยังคงให้ผลผลิตดอกได้เช่นเดิม นอกจากนี้ การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางการคำนวณแปลงเพาะ เป็นอีกวิธีที่ควรทำการทดสอบ โดยนำดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนแปลงเพาะในโรงเรือน เพาะเนื้อเยื่อลงอาหารวัสดุหมักที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (อัจฉรา, 2539) โดยไม่ต้องเตรียมเป็นแม่เชื้อบริสุทธิ์ เมื่อเส้นใยเจริญเต็มวัสดุหมัก เก็บรักษาไว้ใช้เป็นแม่เชื้อขยาย และขยายเป็นเชื้อเพาะ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนแปลงเพาะในโรงเรือนเพื่อตรวจสอบความเสถียรของเชื้อพันธุ์ได้

## 7.5 เชื้อเห็ดชนิดอื่น ๆ

นอกจากเห็ดสกุลนางรม เห็ดหูหนู เห็ดกระด้าง และเห็ดฟางแล้วยังมีเห็ดชนิดอื่น ๆ ที่ได้รับการวิจัยเพื่อการเก็บรักษาเชื้อเห็ดอย่างมีประสิทธิภาพด้วย อาทิ

### เชื้อเห็ดขอนขาว

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดขอนขาวในระยะสั้น ๆ ใช้วิธีเก็บเส้นใยภายใต้ น้ำกลั่น บนเมล็ดข้าวฟ่างและบนอาหารขี้เลื่อย ถ่ายเชื้อทุก 6 เดือน ให้ผลดีตามลำดับ (ประไพศรี และอัญชลี, 2543) การควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษา ทำการวัดอัตราการเจริญของเส้นใยและเพาะทดสอบผลผลิตจากเส้นใยที่เก็บรักษาในแต่ละวิธี สำหรับการเก็บบนอาหาร PDA และภายใต้ น้ำมันแร่ พบอาการเสื่อมของเชื้อเห็ดทำให้ลักษณะหมวกดอกผิดปกติไม่สมบูรณ์

### เชื้อเห็ดหลินจือ

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

### เชื้อเห็ดแครง

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดแครงในระยะสั้น ๆ (1 - 6 เดือน) โดยการเก็บในน้ำกลั่นให้ผลผลิตที่สูงสุด (รัฐพล และคณะ, 2551) ซึ่งการควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษาทำการวัดความมีชีวิตรอด และวัดอัตราการเจริญของเส้นใยที่เก็บรักษา และการเก็บในน้ำมันแร่ บนอาหาร PDA และ ที่ -20 °C เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ให้ผลดีตามลำดับ

### เชื้อเห็ดถั่ว หรือเห็ดโคนน้อย

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

## สรุป

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสามารถทำได้หลายวิธีทั้งการเก็บในระยะสั้นและระยะยาว วิธีที่เหมาะสมต่อเชื้อพันธุ์เห็ดแต่ละชนิด ตลอดจนความสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการใช้งานและความพร้อมของแหล่งที่เก็บรักษาย่อมแตกต่างกันไป การเลือกใช้วิธีการเก็บรักษาอย่างถูกต้องและเหมาะสม ทำให้การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ หลังการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้ว ควรมีการควบคุมคุณภาพในการเก็บรักษา โดยทดสอบความมีชีวิต (Viability) ความบริสุทธิ์ของเชื้อ (Purity) ความเสถียรของสายพันธุ์ (Stability) และความสามารถในการออกดอก (Productivity) เพื่อให้แน่ใจว่า เชื้อที่เก็บรักษาเป็นเชื้อที่ยังมีชีวิต มีคุณสมบัติเดิมอยู่ การตรวจสอบความมีชีวิตด้วยการนับจำนวนเชื้อพันธุ์เห็ดเก็บรักษาที่ฟื้นตัว (Recovery) การแยกชนิดและการทำให้บริสุทธิ์โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจวัดการเจริญของเส้นใยและการปนเปื้อน และการทดสอบความเสถียรและความสามารถในการออกดอกโดยนำไปเพาะเลี้ยง เป็นวิธีการยืนยันได้เป็นอย่างดีว่าเชื้อพันธุ์เห็ดที่เก็บรักษา ยังคงสภาพความแข็งแรง สามารถให้ผลผลิตได้ตรงตามลักษณะที่ดีของพันธุ์เห็ดชนิดนั้น ๆ และในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยตรวจสอบ ทั้งความบริสุทธิ์และการตรงตามชนิดของเชื้อพันธุ์เห็ดที่เก็บรักษา ซึ่งสามารถช่วยย่นระยะเวลาในการตรวจสอบและสามารถตรวจสอบหลายตัวอย่างในคราวเดียวกันได้

## เอกสารอ้างอิง

- นิรนาม. 2546. พัฒนาการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์เห็ด. หน้า 163. ใน : สรุปผลงานวิจัย ปี 2545. ตามยุทธศาสตร์ แผนงานวิจัย ปี 2546 ของกรมวิชาการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ และอัญชลี เชียงกุล. 2543. วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดขอนขาว. หน้า 38. ใน : บทความย่อยและสรุปผลการดำเนินงาน ประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร ปี 2543. วันที่ 8-10 มีนาคม 2543. ณ โรงแรมลองบีช จ. เพชรบุรี.
- พัฒนา สนธิรัตน์. 2547. จุลินทรีย์และการเก็บรักษา. ว. *วิชาการเกษตร*. 20: 80-89.
- ยงยุทธ์ สายฟ้า สัญชัย ตันตยาภรณ์ สุธีรา โสภิตกุล และโอภาส มิตรมานะ. 2525. การทดลองเก็บเชื้อเห็ดฟาง ระยะยาวภายใต้ไขมันแร่ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2525. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. หน้า 1-7.
- รัฐพล ศรประเสริฐ สุพิชชา ชัยวงศ์ฝัน วชิราภรณ์ พิกุลทอง และอนงค์ หัมพานนท์. 2551. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) และเห็ดโคนน้อย (*Coprinus* sp.)
- สุเมธชา พรหมบุญ. 2542. หลักการและเทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. ใน : การอนุรักษ์ความหลากหลายทาง พันธุกรรมของจุลินทรีย์, โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหนังสือและโฮมเพจ. แหล่งที่มา : <http://swu.ac.th/royal/book2/b2c11t3.html>
- สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ และประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ. 2545. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมและเห็ดหูหนู. หน้า 61-75. ใน : เห็ดไทย 2545. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย.
- สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ พิมพ์กานต์ อารามพงษ์พันธ์ สุทธิณี เจริญคิด และ สมพงษ์ อังโขรัมย์. 2546. ผลของวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ต่อการเจริญและผลผลิตเห็ดกระด้าง. 2546. หน้า 44. ใน : เอกสารรายงานผลการปฏิบัติงานวิจัยรายกิจกรรมประจำปี 2546. การประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ปี 2546. วันที่ 7-9 มีนาคม 2546. ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จ. ชลบุรี.
- สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ. 2548. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดบด หรือเห็ดลม หรือเห็ดกระด้างในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อและบนอาหารซีเลี่ยนนิ่งฆ่าเชื้อ. ข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด ปีที่ 10 ฉบับที่ 1 (มกราคม-เมษายน 2548) : 3-6.
- อัจฉรา พยัพพานนท์. 2539. การใช้วัสดุหมักเป็นอาหารแยกเนื้อเยื่อดอกเห็ดฟาง. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 22. กรุงเทพฯ. หน้า 680-681.
- อัจฉรา พยัพพานนท์ และ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ. 2543. การมีชีวิตรอดของเชื้อเห็ดฟางในน้ำกลั่น. เอกสารประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. วันที่ 8-10 มีนาคม 2543. โรงแรมลองบีช อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี. หน้า 37.
- อัจฉรา พยัพพานนท์. 2553. *เห็ดฟางและเทคโนโลยีการผลิตในโรงเรือน*. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ. 122 หน้า.



- Chang, S. T. and P. G. Miles. 2004. *Culture preservation*. Pages 189-201. In: *Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and 194 environmental impact* (eds ST Chang ST PG Miles). CRC press. Boca Raton. Florida
- Joseph, C.K. 1977. A better method for long-term storage of mushroom cultures. *Mushr. J. of Wild Mushr.* 16: 30-31.
- McGinnis, M.R.; A.A. Padhye and L. Ajello. 1974. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. *Applied Microbiology* 28: 218-222.
- Odds, F. C. 1991. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in Water. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 29: 413-415.
- Singh, S. K.; R.C. Upadhyay; S. Kamal and M. Tiwari. 2004. Mushroom cryopreservation and its effect on survival, yield and genetic stability. *CryoLetters* 25: 23-32.
- Smith, D. and A.H.S. Onions. 1994. *The Preservation and Maintenance of Living Fungi*. 2<sup>nd</sup> Edition. IMI Technical Institute, CAB International. 122 p.
- Zaghi, L. L. Jr.; A.D. Lopes; F.A. Cordeiro; I.M. Colla; M.B.D. Beteli; J.S. do Valle; G.A. Linde; N.B. Colauto. 2017. Cryopreservation at -75 °C of *Agaricus subrufescens* on wheat grains with sucrose. *Brazilian Journal of Microbiology* 49: 370-377.

ผู้ทรงคุณวุฒิ

ดร. สัญชัย ตันตยาภรณ์

คณะกรรมการจัดการความรู้ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นายคณัย	นาคประเสริฐ	ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ที่ปรึกษาคณะกรรมการ
นางสุวลักษณ์	ชัยชูโชติ	นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ	ประธานคณะกรรมการ
นางสาวรัชฎาภรณ์	ทองเหม	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	คณะกรรมการ
นายอนุสรณ์	วัฒนกุล	นักวิชาการโรคพืชปฏิบัติการ	คณะกรรมการ
นางสาวจิตรา	กิตติโมรากุล	นักวิชาการโรคพืชปฏิบัติการ	คณะกรรมการและเลขานุการ