บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ดรา พบรายงานการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลเกิดขึ้นทั้งในส่วนของหมวกดอกเห็ด ก้านดอก ครีบ สปอร์ และเส้นใย (Kanda *et al.*, 1996) รงควัตถุที่เห็ดราสร้างขึ้นนี้ส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสตามธรรมชาติ เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุโดยมีจุดประสงค์เพื่อป้องกันอันตรายหรือสภาวะความกดดันจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น รังสีอุลตราไวโอเลต อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาการเจริญเติบโต การเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และเอนไซม์ต่างๆ ที่ไม่เป็นที่ต้องการ (Bell and Wheeler, 1996) รงควัตถุที่เห็ดราสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่เป็นสารประกอบพวกฟีนอล ซึ่งต่อมาจะถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ไปเป็นสารควิโนนซึ่งเป็นเมลานินที่มีลักษณะเป็นสีน้ำตาล สารควิโนนตามธรรมชาติที่เห็ดราสังเคราะห์ขึ้นนั้นสามารถจำแนกออกได้เป็น 4 ชนิด ดังนี้ (1) ß-(3,4 dihydroxyphenyl) alanin (DOPA) (2) γ-glutaminyl -3,4- dihydroxybenzene (3) Catechol และสุดท้าย (4) dihydroxynaptalene (DHN) (Jolivet *et al.*, 1996; Nagai *et al.*, 2003)

ไทโรซิเนส คือ เอนไซม์ที่มีออกซิเจนอะตอมเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างโมเลกุล เอนไซม์นี้กระจายอยู่ตามธรรมชาติในระดับสูง ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุเมลานิน (Lerch, 1989) ในการสังเคราะห์รงควัตถุนั้นเอนไซม์จะมีบทบาทโดยการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงในปฏิกิริยา hydroxylation ของ monophenol ไปเป็น diphenol และเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ diphenol ไปเป็น quinone (Espin *et al.*, 1999) และจะทำปฏิกิริยากันเองจนกลายเป็นรงควัตถุสีน้ำตาลที่เรียกว่า เมลานิน (Soler – Rivas *et al.*, 1999) โดยทั่วไปเอนไซม์นี้ทั้งในสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งภายในมีโครงสร้างของการทำงานในส่วนที่ทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะประกอบไปด้วยบริเวณของคอปเปอร์ไอออน ซึ่งบริเวณนี้จะมีลักษณะคล้ายกับ hemocyanin ซึ่งเป็นโมเลกุลที่นำพาเอาออกซิเจนในเม็ดเลือดของสัตว์จำพวกหอยและแมลง (Leng and van Holde, 1991) โมเลกุลดังกล่าวมีการจับตัวกับคอปเปอร์ไอออนเช่นเดียวกันกับเอนไซม์ไทโรซิเนส (Lerch and Germann, 1988; Huber and Lerch, 1988)

ในระยะเวลา 2-3 ปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาโครงสร้างของยีนไทโรซิเนสจากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ *Neurospora crassa* (Lerch,1978,1982) *Streptomyces glaucescens* (Huber *et al.*, 1985) *Mus musculus* (Shibahara *et al.*, 1986; Kwon *et al.*, 1988; Muller *et al.*, 1988) และ *Homo sapiens* (Kwon *et al.*, 1987) โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และความแตกต่างของฮีโม

ไซยานิน พบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์เกาะกันเป็นกลุ่ม (Kanda *et al.*, 1996; Wichers *et al.*, 1996) ในสิ่งมีชีวิตดังกล่าวมีบริเวณ copper binding domain 2 บริเวณ เรียกว่า Cu A และ Cu B ซึ่งเป็นบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ (Wichers *et al.*, 2003) บริเวณดังกล่าวนี้สามารถนำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ในการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณชิ้นยีนไทโรซิเนสที่เกิดขึ้นในเห็ดกระดุม (Wichers *et al.*, 2003) และศึกษาลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างยีนไทโรซิเนสที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ นอกจากนั้น พบว่า บริเวณนำลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ดังกล่าวสามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์และลักษณะรูปแบบของยีนไทโรซิเนสที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตเดียวกันได้ (Nagai *et al.*, 2003) ความละม้ายคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วยให้การศึกษาทางอนูชีววิทยาของเห็ดขณะเก็บรักษาทำได้โดยง่าย

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปในเชิงคุณภาพในเห็ดหอม *Lentinus edodes* พบว่าเห็ดมีการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลในหมวกดอกหลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิตในระหว่างการเก็บรักษาและระหว่างการบรรจุหีบห่อด้วยวิธีการที่ไม่เหมาะสมในระหว่างนั้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลต่อการสังเคราะห์รงควัตถุเพิ่มมากขึ้นในหมวกดอก ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นนั้นจะไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรสชาดและกลิ่น (Nagai *et al.*, 2003) นอกจากนี้ในระหว่างการเก็บรักษาเพื่อรอการจำหน่ายยังพบว่าดอกเห็ดจะมีการสร้างสีน้ำตาลมากขึ้นเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Kanda, 1996)

การศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงของสีดอกเห็ด (Burton, 1996; Espin *et al.*, 1999) ของเห็ดกระดุม *Agaricus bisporus* พบว่า ยีนไทโรซิเนสมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลของดอกเห็ด (Turner, 1974) โดยเป็นตัวกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลในรูปของ DOPA และ GDHB (Jolivet *et al.*, 1996) โดยในระหว่างการเจริญเติบโตของดอกเห็ดเริ่มพบการทำงานของยีนไทโรซิเนสเพียงเล็กน้อย โดยการทำงานของยีนไทโรซิเนสจะเพิ่มขึ้นเมื่อดอกเห็ดมีการเจริญเติบโต ซึ่งกิจกรรมของยีนไทโรซิเนสของเห็ดกระดุมนี้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อระดับการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลในดอกเห็ด (Leeuwen and Wichers, 1997)

เห็ดยานางิ *Agrocybe cylindracea* เป็นเห็ดในวงศ์ Bolbitiaceae ลำดับ Agaricales เช่นเดียวกับเห็ดหอมและเห็ดกระดุมและ มีวงชีวิตเป็นแบบเฮเทอโรทัลลิคหรือมีการผสมพันธุ์ต่างเส้นใยกัน (heterothallic) เช่นเดียวกัน (Norton, 1981) ดอกเห็ดมีลักษณะกลม คล้ายรูปร่ม ผิวเรียบ สีน้ำตาลเข้มถึงดำ ครีบมีสีขาว เรียงติดกัน ก้าน มีสีขาว รูปร่างเป็นทรงกระบอกแบบ central stalk คือ อยู่กึ่งกลางของหมวกดอก เส้นใยแน่น สปอร์ มีสีขาวและมีรูปร่างรี ดอกเห็ดมีรสชาดดี เนื้อกรอบแน่น และสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายชนิด เป็นที่นิยมของผู้ประกอบการและ

ผู้บริโภค (ธีระ เอี่ยมไพศาล, 2549) ทำให้ดอกเห็ดมีมูลค่าสูงทางเศรษฐกิจและเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมาก (อัจฉรา พยัพพานนท์, 2535) ในผิวของหมวกดอกมีการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลพบปัญหาการเปลี่ยนแปลงสีรงควัตถุเช่นเดียวกัน (Borton, 1988) โดยการสังเคราะห์จะสอดคล้องกับระยะการพัฒนาการของดอกเห็ด โดยจะพบการเปลี่ยนสีมากในระยะดอกแก่เช่นเดียวกันกับเห็ดหอมและเห็ดกระดุม (Kanda *et al.*, 1996)

การศึกษาในเห็ดยานางิที่ผ่านมาพบว่า มุ่งเน้นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานและการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาเป็นส่วนใหญ่เพื่อการพัฒนาการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่อยู่ระหว่างอุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส โดยพบว่าแม้อุณหภูมิเย็นการเติบโตจะอยู่นานกว่า 24-30 องศาเซลเซียสก็ตามแต่ถ้าการเก็บเกี่ยวผลผลิตถ้ามีวิธีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม มีผลทำให้ดอกเห็ดเสื่อมสลายไปอย่างรวดเร็วเช่นกัน (อัจฉราวรรณ น้อยกล่ำ และประสิทธิ์ วัฒนวงศ์วิจิตร, 2542) สำหรับการศึกษาสารประกอบที่อยู่ในดอกเห็ดจะมุ่งเน้นไปด้านสารประกอบที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางยา เช่น พบว่ามีรายงานการศึกษาผลของ D-glucan ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเนื้องอกในหนู (Kiho *et al.*, 1996) Murcia และคณะ (2002) รายงานว่าการทดสอบคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในเห็ดหลายชนิด พบว่า เห็ดยานางิมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิไดซ์สารพิษที่เกิดขึ้นสูง ส่วนทางด้านชีวโมเลกุลเน้นทางด้านการวิเคราะห์สารที่มีคุณสมบัติในการต้านทานต่อสารพิษที่เกิดขึ้นพบรายงาน สารประกอบพวก polysaccarides ชนิด เบต้า และ อัลฟากลูแคน ซึ่งมีคุณสมบัติต้านทานต่อเซลล์มะเร็งในสิ่งมีชีวิต (Taira *et al.*, 2005) สำหรับการศึกษาทางด้านการโคลนยีนไทโรซิเนส การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนในเห็ดชนิดนี้ยังไม่มีรายงานที่สังเคราะห์ได้เป็นลายลักษณ์อักษร ดังนั้นการศึกษาโดยนำข้อมูลทางอณูวิทยามาประยุกต์ใช้ จึงเป็นพื้นฐานและกุญแจที่สำคัญและจะนำไปสู่ความเข้าใจกลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลและการเปลี่ยนไปของสีในดอกเห็ดต่อไป

ที่ผ่านมามีรายงานการศึกษาการโคลนยีนไทโรซิเนสในเห็ดราจำพวก *Aspergillus oryzae* โดยการสกัดจีโนมของราในบริเวณที่มีการสร้างสีน้ำตาลในปริมาณมาก การโคลนยีนไทโรซิเนส (Kitamoto *et al.*, 1995) ในการศึกษาเน้นการใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากยีนไทโรซิเนสจาก *A. oryzae* และเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานก่อนนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Obata *et al.*, 2004)

สำหรับการโคลนยีนไทโรซิเนสในเห็ดกระดุม เริ่มจากการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากส่วนต่างๆ ของดอกเห็ดจากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องด้วยเทคนิค reverse-transcription

polymerese chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณที่เป็นส่วนอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ copper-binding ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้รายงานไว้จาก *Neurospora crassa* (Kupper *et al.*, 1986) *Lycopersicon esculentum* (Shahar *et al.*, 1992) และ *Solanum tuberosum* (Hunt *et al.*, 1993) และใช้ cDNA ที่ได้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนตามวิธีที่กล่าวมา โดยในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย ขั้นตอน denature ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1นาที ต่อด้วย annealing ใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extention ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที สุดท้าย ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.30 นาที จำนวน 35 รอบ ชิ้นส่วนของยีนที่ได้แยกด้วยเทคนิคอิเล็คโทรฟอเรซิส จากนั้นได้นำชิ้นส่วนของยีนที่โคลนเข้าสู่แบคทีเรีย (Wichers *et al.*, 2003) พร้อมทั้งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยสำหรับยีนไทโรซิเนสใช้วิธี chain-terminator method ของ Sanger และคณะ (1997)

การศึกษาการแสดงออกของยีนสามารถดำเนินการโดยตรงโดยการตรวจวัดระดับการทำงานของยีนในเห็ดราชนิดนั้นๆ โดยเฉพาะการศึกษาการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดกระดุม พบการตรวจวัดระดับการสังเคราะห์จากปริมาณของคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค Southern blot (Ausubel *et al.*, 1995) โดยใช้โพรบจากโคลนดีเอ็นเอ ส่วนการศึกษาการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสใน *Aspergillus oryzae* สามารถตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในส่วนของจีโนมมิคดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค Southern blot เช่นกัน โดยหลักการใช้ดีเอ็นเอตรวจตาม (nucleic acid probe) ที่ติดฉลากด้วยสารรังสีหรือปลอดรังสี เข้า hybridize กับ amplified product ที่ตรึงติดบนกระดาษกรองไนลอน ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวใช้เวลา 2-3 วันและยังก่อให้เกิดการฟุ้งกระจายและเกิดการปนเปื้อนของ amplified product (อนุสรณ์ เชิดทอง, 2549) ในการตรวจวัดปริมาณของอาร์เอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นจะใช้เทคนิค Northern blot (Obata *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นเทคนิคที่นำอาร์เอ็นเอที่แยกได้ย้ายไปวางบนแผ่นไนลอนเช่นเดียวกับดีเอ็นเอแต่เทคนิค Northern blot ต้องอาศัยความละเอียดมากกว่าทั้งนี้เนื่องจากอาร์เอ็นเอย่อยสลายได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีวิธีการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนไทโรซิเนส โดยการวัดปริมาณการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอรวมของยีนด้วยวิธี competitive-quantitative RT-PCR (Marone *et al.*, 2001) โดยการนำอาร์เอ็นเอมาสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ cDNAหรือ real-time PCR (Rajagopal *et al.*, 2005) ซึ่งวิธีการหลังเป็นการเปรียบเทียบจำนวนของผลิตภัณฑ์ที่ได้กับโมเลกุลดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบ copy number (Hayward *et al.*, 1988) จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าทั้งสองวิธีเป็นที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความละเอียด สามารถวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้จริงแต่ก็มีข้อจำกัดที่ต้องคำนึงในการวิเคราะห์คือต้องอาศัยความละเอียดในการวิเคราะห์ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ขั้นตอนและวิธีการยุ่งยาก ซับซ้อน ทำให้มีต้นทุนในการ

วิเคราะห์สูงและต้องมีความพร้อมทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์รวมทั้งบุคคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ (Shindo *et al.*, 2002)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ในการตรวจวัดการแสดงออกของยีน ซึ่งเทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณของคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้ สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีขั้นตอนไม่ซับซ้อน เทคนิคดังกล่าว คือ เทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ที่อาศัยหลักการพื้นฐานทางไฟฟ้าเคมี ตัวเทคนิคอาศัยเครื่องมือและอุปกรณ์ในการตรวจวัดโดยที่มีคุณสมบัติเป็นตัวรับสัญญาณและแปลงสัญญาณของโมเลกุลคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่ตรวจวัดร่วมกับโมเลกุลของสี โดยเฉพาะอย่างยิ่งโมเลกุลสีที่ใช้ในการตรวจวัดต้องมีคุณสมบัติจับตัวกับดีเอ็นเอในลักษณะจำเป็นและกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของศักย์ทางไฟฟ้า โมเลกุลสีที่นำมาใช้ได้แก่ Hoechst 33258 จากรายงานพบว่าโมเลกุล Hoechst 33258 จะมีช่วงการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้ากว้างที่สุด จึงเหมาะสมและได้นำมาใช้ในการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าแล้ว (ปิยะศักดิ์ ขอุ่มพฤกษ์, 2549; Chumpluk, 2006; Chumpluk, 2007)

ที่ผ่านมาพบรายงานการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อวัวบ้าที่ปนในอาหารสัตว์ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ วิธีการที่ใช้ตรวจสอบเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ตามเงื่อนไข การบ่มที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีก่อน ตามด้วย 94 อาศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 68 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ สุดท้าย บ่มที่ 68 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ผสมรวมกับโมเลกุลสี Hoechst 33258 นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง linear sweep voltammetry (LSV) สำหรับการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดยการเปรียบเทียบกับโมเลกุลอ้างอิงที่ทราบจำนวน copy (12S rRNA) ที่เจือจางความเข้มข้นในระดับต่างๆ พร้อมทั้งคำนวณสัดส่วนของดีเอ็นเอเทียบกับปริมาณของโมเลกุลอ้างอิง (Chaumpluk *et al.*, 2006) ส่วนการศึกษาการแสดงออกของคลอโรฟิลเลสในบลอคโคลี่เริ่มจากการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากตัวอย่าง เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน ตรวจสอบการแสดงออกโดยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์เช่นเดียวกัน ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอของยีนคลอโรฟิลเลสที่ได้เปรียบเทียบกับโมเลกุลอ้างอิง 12S rRNA พร้อมกับคำนวณอัตราส่วนของดีเอ็นเอกับโมเลกุลอ้างอิง (Chumpluk *et al.*, 2007)

โดยหลักการศึกษาการวิเคราะห์โครงสร้างและระดับการแสดงออกยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิ สามารถวิเคราะห์โดยการสกัดอาร์เอ็นเอรวม โคลนยีนไทโรซิเนส หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากโคลนพร้อมทั้งศึกษาระดับการแสดงออกของเห็ดโดยการนำดอกเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและได้จากตลาดเป็นวัสดุวิจัยและศึกษาระยะของการเปลี่ยนแปลงไปของสีของดอกก่อนเริ่มศึกษาการแสดงออกที่ระยะต่างๆ โดยสกัดอาร์เอ็นเอรวม สังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ พร้อมกับวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์อีกครั้งพร้อมเปรียบเทียบปริมาณของ

ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยผลิตภัณฑ์ของโมเลกุล 12S rRNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส การดำเนินการดังกล่าวจัดว่าเป็นการประยุกต์ใช้ในเห็ดราเป็นครั้งแรก เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานการปรับปรุงคุณภาพของดอกเห็ดต่อไป