บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดหอม

1.1 การจำแนกเห็ดหอม (Taxonomy) (ปัญญา และ กิตติพงษ์, 2532)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Lentinus edodes* (Berk.) Singer

Class : Basidiomycetes

Subclass : Holobasidiomycetidae

Order : Agaricales

Family : Tricholomataceae

โดยเห็ดหอมมีชื่อสามัญที่ใช้เรียกหลายชื่อ ในญี่ปุ่นเรียก Shiitake ในอังกฤษเรียก Black mushroom ในจีนเรียกว่า Haeng-ko เป็นต้น (อานนท์, 2532)

1.2 ลักษณะของเห็ดหอม (อานนท์, 2532)

เห็ดหอมที่เพาะสามารถแบ่งลักษณะออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. เห็ดหอมลาย คือ ดอกเห็ดหอมที่เกิดในฤดูหนาว อากาศแห้งและมีอุณหภูมิระหว่างกลางวันและกลางคืนต่างกันมาก หมวกดอกเห็ดจะแตกเป็นลาย สีซีด เป็นลักษณะที่มีคุณภาพสูงที่สุด
2. เห็ดหอมหนา คือ เห็ดหอมที่เกิดในฤดูหนาว แต่ความชื้นในอากาศสูง ดอกหนา
3. เห็ดหอมบาง คือ เห็ดหอมที่เกิดนอกฤดูหนาว เช่น ก่อนฤดูหนาวหรือปลายฤดูหนาวหรือในฤดูร้อน มีลักษณะดอกบาง

1.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Smith, 1978)

ส่วนประกอบของดอกเห็ด

1. หมวกดอกเห็ด (cap หรือ pileus) ส่วนของหมวกดอกเห็ดมีความกว้างประมาณ 5-12 เซนติเมตร มีลักษณะคล้ายร่ม ผิวหมวกดอกด้านบนมีสีน้ำตาล น้ำตาลปนแดง น้ำตาลเข้ม เห็ดหอมที่มีสีขาวจะพบน้อยมาก ขนาดของหมวกดอกจะต่างกันไปขึ้นอยู่กับพันธุ์ของเห็ดหอม เห็ดหอมบางพันธุ์อาจมีขนหรือเกล็ดหยาบๆติดอยู่บนหมวกดอกก็ได้
2. ครีบ (gill หรือ lamellae) มีลักษณะเป็นแผ่นบางสีขาว เรียงตัวกันเป็นรัศมีรอบก้านดอกเห็ด เมื่อดอกเห็ดแก่ครีบของดอกจะมีสีเข้ม

3. ก้านดอก (stipe) ก้านดอกเห็ดมีความยาวประมาณ 3-5 เซนติเมตร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8-13 มิลลิเมตร มีสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อน แต่ถ้าถูกกับอากาศนานๆจะมีสีเข้มขึ้น

4. สปอร์ (spore) มีขนาด 5.5-6.5 x 3-3.5 ไมโครเมตร มีผนังบางไม่มีสี สปอร์มีลักษณะค่อนข้างกลม สปอร์สร้างจาก basidium โดยที่ 1 basidium มีอยู่ 4 basidiospores

2. สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของเห็ดหอม

1. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหอมจะอยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส การเจริญของเส้นใยจะหยุดชะงัก และถ้าได้รับอุณหภูมิสูงเกิน 45 องศาเซลเซียสในอาหารเหลวเป็นระยะเวลาไม่นานก็จะทำให้เส้นใยตายภายใน 40 นาที ดอกเห็ดจะพัฒนาได้ดีเมื่อถูกชักนำโดยอุณหภูมิที่ค่อนข้างต่ำ อุณหภูมิมีผลต่อรูปร่างและผลผลิตของเห็ดในขณะที่มีการพัฒนาเป็นดอกเห็ด (Tokimoto and Komatsu, 1978)

2. ความชื้น

- ระยะสปอร์ ต้องการความชื้นสูงมากเพื่อทำให้ผนังหุ้มสปอร์อ่อนตัวง่ายต่อการงอก
- ระยะเส้นใย ในก้อนเชื้อเส้นใยจะเจริญได้ดีที่ระดับความชื้นประมาณ 60-75%
- ระยะออกดอก ภายในโรงเรือนต้องมีความชื้นในบรรยากาศประมาณ 80-90% และความชื้นในวัสดุเพาะประมาณ 75-80% (บรรณ, 2533) ความชื้นในบรรยากาศมีผลต่อคุณภาพของดอกเห็ด ถ้าความชื้นต่ำไม่เพียงพอก็จะทำให้ดอกเห็ดชะงักการเจริญเติบโต ถ้าความชื้นพอเหมาะจะทำให้ได้ดอกเห็ดหอมที่มีเนื้อหมวกดอกหนา ดอกสมบูรณ์ และเมื่อดอกเห็ดโตประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วเกิดความชื้นต่ำ หมวกดอกเห็ดจะแตกเป็นลายได้เห็ดหอมที่มีคุณภาพดีที่สุด (อานนท์, 2532)

3. อากาศ

สถานที่เพาะเห็ดควรมีการถ่ายเทอากาศที่สะดวก มีการระบายอากาศอยู่เสมอ (บรรณ, 2533)

4. แสง

แสงมีความจำเป็นมากในการเกิดดอกของเห็ด แต่ยับยั้งการเจริญของเส้นใย ความเข้มแสงต่ำสุดที่สามารถกระตุ้นให้เกิดดอกเห็ดอยู่ในช่วง 3.846×10^{-4}- 3.846×10^{-6} watt/m^2 และความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้เกิดดอกอยู่ที่ 3.846×10^{-1} watt/m^2 ความยาวคลื่นแสงที่มีผลต่อการพัฒนาของดอกเห็ดจะอยู่ระหว่าง 370-420 นาโนเมตร แสงสว่างมีผลต่อการพัฒนา

ของดอกเห็ด โดยเฉพาะเกี่ยวกับการสร้างครีบดอกเห็ดและสปอร์ ส่วนความมืดจะช่วยในการสร้างหมวกดอกของเห็ด

5. ธาตุอาหาร

- คาร์บอนและไนโตรเจน

แหล่งอาหารประเภทคาร์บอนที่เห็ดสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ได้แก่ monosaccharides, oligosaccharides และ polysaccharides ซึ่งควรใช้ในความเข้มข้น 3-5% ในอาหารเหลว ส่วนแหล่งอาหารประเภทไนโตรเจนที่เห็ดสามารถนำไปใช้ได้ ได้แก่ peptone, L-amino acid, urea และเกลือของแอมโมเนียม ปริมาณของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดหอมไม่ควรเกิน 0.02%

- แร่ธาตุและไธอะมีน

ธาตุอาหารจำพวก แมงกานีส, เหล็ก และสังกะสี ในอัตราส่วน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นการเจริญของเส้นใยเห็ดหอม ส่วนความเข้มข้นของไธอะมีนต่อการเจริญของเส้นใยอยู่ที่ 100 ไมโครกรัม/ลิตร ซึ่งมีบทบาทมากเมื่อเห็ดหอมออกดอก

6. ความเป็นกรด-ด่าง

- สภาพความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอยู่ที่ประมาณ 5-6

- ส่วนสภาพความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะต่อการเกิดดอกเห็ดควรอยู่ระหว่าง 3.5-4.5 (Tokimoto and Komatsu, 1978)

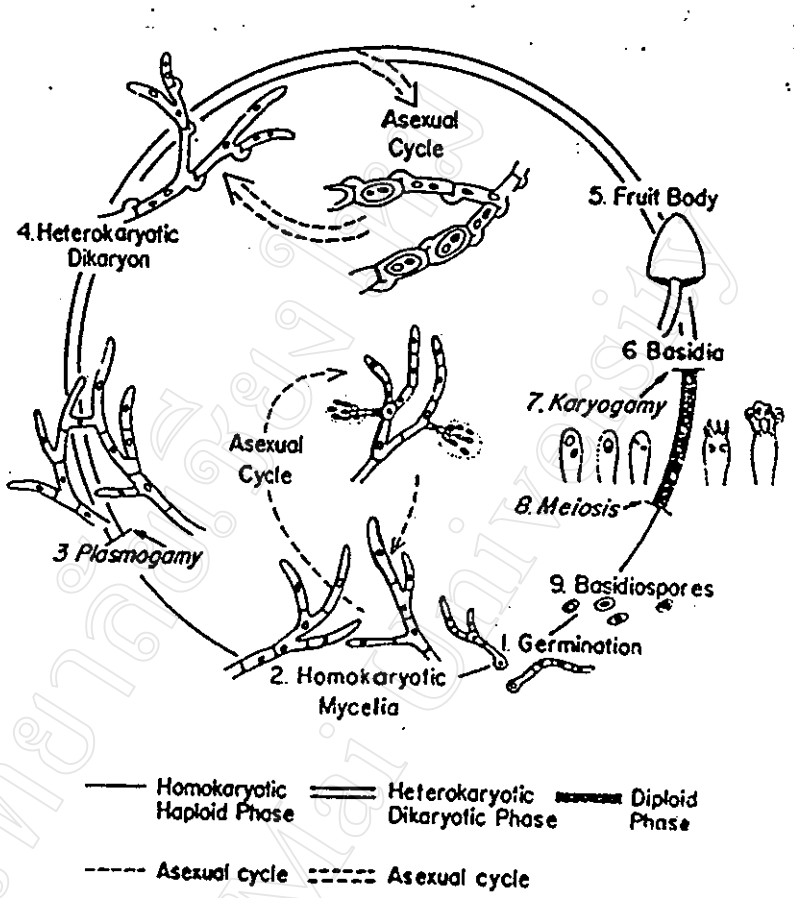
3. วงจรชีวิตของเห็ดหอม (Life cycle) (ดัดแปลงมาจากRaper,1978)

วงจรชีวิตของเชื้อราใน class Basidiomycetes ประกอบด้วย 9 ขั้นตอน (ภาพที่ 1)

ขั้นที่ 1 สปอร์เริ่มงอกเป็นเส้นใย

ขั้นที่ 2 เส้นใยมีนิวเคลียสเดี่ยวซึ่งมีโครโมโซม n เดียว (haploid homokaryotic mycelium) สามารถเจริญแพร่ขยายออกไปอย่างอิสระ เส้นใยนี้อาจผ่านหรือไม่ผ่านวงจรการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual cycle) โดยการสร้าง oidia (สปอร์ที่เกิดจากกิ่งก้านสั้นๆ ของเส้นใย) หรือ chlamydospores (สปอร์ที่เกิดจากการรวมตัวของเส้นใย) ก็ได้ แต่สำหรับเห็ดหอมไม่มพบวงจรการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

ขั้นที่ 3 เกิดการผสมระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ผสมและเข้าคู่กันได้ โดยเส้นใยรวมตัวกันแบบพลาสโมแกรมมี่ (plasmogamy)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของเชื้อราใน Class Basidiomycetes (Raper, 1978)

ขั้นที่ 4 ได้เส้นใยที่สมบรูณ์เพศ (fertile) ซึ่งเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสไม่เหมือนกัน (heterokaryon) เรียกว่า เส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryon) นิวเคลียสทั้งสองมีเพศที่สามารถเข้ากันได้ และมีลักษณะทางพันธุกรรมไม่เหมือนกันมีโครโมโซม n เดียว (haploid) เมื่อผสมกันแล้วแต่ละเซลล์จะมีนิวเคลียสอยู่หนึ่งคู่ตลอดเส้นใย ตรงผนังกั้นแบ่งเขตเซลล์ออกจากกันเกิดส่วนที่มีลักษณะโค้งงอขึ้นมา เรียกว่า ข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) เส้นใยนิวเคลียสคู่นี้สามารถขยายพันธุ์ได้เอง และอาจผ่านหรือไม่ผ่านวงจรการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสร้าง oidia หรือ chlamydospores ก็ได้ แต่เห็ดหอมไม่พบการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

ขั้นที่ 5 ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเส้นใยนิวเคลียสคู่ จะเริ่มพัฒนาเนื้อเยื่อพิเศษกลายเป็นดอกเห็ด

ขั้นที่ 6 เนื้อเยื่อที่สร้างสปอร์ที่อยู่ตรงครีบเห็ดจะสร้างเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายกระบองที่เรียกว่า แบซิเดีย (basidia) ในแต่ละแบซิเดียมีนิวเคลียสอยู่สองอัน (n+n)

ขั้นที่ 7 นิวเคลียสทั้งสอง (n+n) ในแบซิเดียจะรวมตัวกัน (karyogamy) เป็น diploid nucleus (2n) ช่วงนี้เป็นช่วงที่เซลล์มีนิวเคลียสเพียงนิวเคลียสเดียว

ขั้นที่ 8 เมื่อนิวเคลียสทั้งสองรวมตัวกันแล้วมีก็จะมีการแบ่งตัวแบบลดจำนวน (meiosis) ทันที ระหว่างนี้พันธุกรรมของพ่อและแม่ในนิวเคลียสรวมตัวกันและกระจายแยกออกจากกัน ซึ่งจะได้นิวเคลียสที่ลดจำนวนโครโมโซมลงเป็น haploid (n) จำนวน 4 อัน และแต่ละอันจะเคลื่อนไปสู่ปลายก้านชูสปอร์ (sterigma) ซึ่งเกิดตรงส่วนบนของแบซิเดียม นิวเคลียสทั้ง 4 อันจะพัฒนาไปเป็นแบซิดิโอสปอร์ (basidiospore)

ขั้นที่ 9 สปอร์จะถูกปล่อยออกมา และเริ่มต้นวงจรชีวิตของเห็ดอีกครั้ง

4. **รูปแบบการแสดงเพศ** (Pattern of sexuality) (Raper , 1978)

รูปแบบการแสดงเพศในเห็ดจะมีทั้งพวกที่ผสมตัวเองได้ (self-fertile) และพวกที่ผสมตัวเองไม่ได้ (self-sterile) พวกที่ผสมตัวเองได้มีเพียง 10% ของเห็ดทั้งหมด การผสมตัวเองไม่ได้ถูกควบคุมโดยปัจจัยที่เกี่ยวกับการเข้าคู่กันไม่ได้ (incompatibility factors) ซึ่งเป็นตัวจำกัดรูปแบบในการจับคู่ของคู่ผสม ระบบที่ควบคุมการเข้ากันไม่ได้มี 2 ระบบ คือ ระบบปัจจัยเดี่ยว (bipolar หรือ unifactorial incompatibility) และระบบปัจจัยคู่ (tetrapolar หรือ bifactorial incompatibility)

ในระบบปัจจัยเดี่ยวและปัจจัยคู่ การผสมเข้ากันไม่ได้จะแสดงผลเฉพาะระหว่างโครโมโซมที่เป็น haploid (n) เท่านั้น การผสมข้ามในระบบปัจจัยเดี่ยวมีโอกาสเกิดขึ้นได้ 50% ปัจจัยคู่มีโอกาสเกิดได้ 25% (Raper,1966)

4.1 ระบบที่ผสมตัวเองไม่ได้ (Heterothallism) เส้นใยที่สามารถผสมกันแล้วเจริญเติบโตเป็นดอกเห็ดได้นั้น ต้องเจริญมาจากสปอร์ที่มีคู่ยีนที่เกี่ยวกับลักษณะการแสดงออกทางเพศที่ต่างกัน ซึ่งถ้าผสมตัวเองจะไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ มีปัจจัยควบคุม 2 ปัจจัยคือ

4.1.1 ระบบปัจจัยเดี่ยว (unifactorial system) ลักษณะการแสดงออกของเพศถูกควบคุมด้วยปัจจัยทางพันธุกรรมเพียงปัจจัยเดียว คือ ปัจจัย A ซึ่งมีคู่ยีน (allele) อีกจำนวนมาก เรียกอีกอย่างว่า bipolar ปัจจัย A ควบคุมความสามารถในการผสมเข้ากันได้ของคู่ยีน ซึ่งการเข้าคู่กันของยีนต้องมีปัจจัย A ที่ต่างกัน (A≠) เมื่อผสมกันแล้วจะมีการแลกเปลี่ยนนิวเคลียส โดยนิวเคลียสจากเส้นใยหนึ่งเข้าไปในเส้นใยอีกเส้นใยหนึ่ง ทำให้เส้นใยที่ผสมกันแล้วเจริญเติบโตขึ้นกลายเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่แล้วกระจายไปทั่วตลอดเส้นใย เส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่นี้

จะมีข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) และจะพัฒนาเป็นดอกเห็ด ปัจจัย A ที่มาจับคู่กันนี้มียีนที่ต่างกัน คือ A1 และ A2 มีการกระจายตัวในอัตรา 1:1 ในแบซิเดียมมีการสร้างสปอร์ 4 สปอร์ มี 2 สปอร์ที่เป็น A1 และอีก 2 สปอร์เป็น A2 ทำให้เส้นใยที่เจริญจากสปอร์ทั้ง 4 มี 2 กลุ่ม คือ เส้นใยที่มีคู่ยีน A1 และ เส้นใยที่มีคู่ยีน A2 เมื่อนำมาจับคู่ผสมแบบพบกันหมดได้ผลดังตารางที่ 1 เห็ดที่มีรูปแบบการแสดงทางเพศแบบนี้คือ *Agaricus bitorquis* , *Auricularia auricula*

ตารางที่ 1 แสดงรูปแบบการจับคู่ผสมของเห็ดที่ผสมตัวเองไม่ได้ มีปัจจัยเดียว (Unifactorial Heterothallic)

รูปแบบการผสม	A1	A1	A2	A2
A1	-	-	+	+
A1	-	-	+	+
A2	+	+	-	-
A2	+	+	-	-

- = ผสมเข้ากันไม่ได้

+ = ผสมเข้ากันได้

จากตารางจะเห็นได้ว่า คู่ยีนที่เหมือนกันไม่สามารถผสมกันได้ แต่คู่ยีนที่ต่างกันสามารถผสมกันได้อย่างสมบูรณ์

4.1.2 ระบบปัจจัยคู่ (bifactorial system) มีปัจจัยที่ควบคุมการแสดงออกทางเพศ 2 ปัจจัย คือ ปัจจัย A และ ปัจจัย B ในการผสม ปัจจัย A ควบคุมการจับคู่กันของนิวเคลียส และการเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) ปัจจัย B ควบคุมการเคลื่อนย้ายนิวเคลียส และการเชื่อมของข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp fusion) กับเซลล์ที่อยู่ถัดมา

ถ้ามีปัจจัย A แตกต่างกัน แต่มีปัจจัย B เหมือนกัน (A≠ B=) จะทำให้การผสมเข้ากันได้เพียงครึ่งเดียว (hemicompatible) คือ ปัจจัย A ผสมเข้ากันได้ ส่วนปัจจัย B ผสมเข้ากันไม่ได้ เนื่องจากไม่มีการเคลื่อนย้ายนิวเคลียส เมื่อมีการผสมจะได้เส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่อยู่เฉพาะเซลล์ที่อยู่ปลายเส้นใย ส่วนเซลล์อื่นๆของเส้นใยยังคงมีนิวเคลียสเดี่ยว และเส้นใยยังเกิดข้อยึด

ระหว่างเซลล์แบบหลอกๆ (false clamps คือ ข้อยึดระหว่างเซลล์จะไม่เชื่อมกันกับเซลล์ที่อยู่ถัดมา ทำให้มีนิวเคลียส 1 นิวเคลียสถูกขังอยู่ในข้อยึดนี้)

ถ้ามีปัจจัย A เหมือนกัน แต่ปัจจัย B ต่างกัน (A= B≠) ก็จะทำให้การผสมเข้ากันได้เพียงครึ่งเดียว คือ ปัจจัย A ผสมเข้ากันไม่ได้ ส่วนปัจจัย B ผสมเข้ากันได้

ถ้ามีปัจจัย A และ B ต่างกัน (A≠ B≠) ทำให้การผสมสามารถเข้ากันได้สมบูรณ์มีข้อยึดที่แท้จริง

ปัจจัย A และ B กระจายตัวจากกันอย่างอิสระ ในอัตราส่วน 1:1:1:1 เช่น ในการผสมข้ามระหว่าง A1B1 x A2B2 สปอร์ที่ได้อาจเป็น A1B1 , A1B2 , A2B1 , A2B2 เมื่อนำไปผสมแบบพบกันหมดได้ผลดังตารางที่ 2 เห็ดที่มีรูปแบบการแสดงแบบนี้ เช่น *Auricularia polytricha* , *Lentinus edodes* , *Flammulina velutipes* , *Pleurotus ostreatus* และ *Corprinus fimetarius*

ตารางที่ 2 แสดงรูปแบบการจับคู่ผสมของเห็ดที่ผสมตัวเองไม่ได้ มีปัจจัยคู่ (Bifactorial Heterothallic)

รูปแบบการผสม	A1B1	A1B2	A2B1	A2B2
A1B1	-	F	(+)	+
A1B2	F	-	+	(+)
A2B1	(+)	+	-	F
A2B2	+	(+)	F	-

- = ผสมเข้ากันไม่ได้
+ = ผสมเข้ากันได้สมบูรณ์ ได้เส้นใยนิวเคลียสคู่ตลอดสาย มีข้อยึดระหว่างเซลล์
(+)= ผสมเข้ากันได้ไม่สมบูรณ์ มีการสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์แต่ไม่สมบูรณ์ เกิดดอกเห็ดไม่ได้
F = ผสมเข้ากันได้ไม่สมบูรณ์ เกิดเส้นใยที่มี multikaryotic heterokaryon ไม่สร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ เกิดดอกเห็ดไม่ได้

4.2 ระบบผสมตัวเองได้ (Homothallism) เส้นใยสามารถรวมตัวกับเส้นใยที่งอกมาจากสปอร์เดียวกันได้ และสามารถเกิดดอกเห็ดได้ โดยที่เส้นใยนี้ไม่ต้องไปรวมกับเส้นใยที่มาจากสปอร์อื่น สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

4.2.1 Primary homothallism สามารถผสมตัวเองได้โดยไม่มีปัจจัยที่เกี่ยวกับการเข้าคู่กันไม่ได้มาเกี่ยวข้อง เส้นใยแบบนี้เกิดจากสปอร์เดี่ยวที่มีนิวเคลียสเดียว ซึ่งมีนิวเคลียสที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน (homokaryotic) อาจเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์หรือไม่มีก็ได้ แต่ที่พบได้บ่อยที่สุดเป็นเส้นใยที่มีหลายนิวเคลียส (multikaryotic) ซึ่งไม่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ การรวมตัวกันของนิวเคลียส (karyogamy) และการแบ่งตัวแบบ meiosis เกิดขึ้นในแบซิเดียมของดอกเห็ด (fruit body) เส้นใยมีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryotic phase) ไม่พบในวงจรชีวิตของเห็ดที่มีรูปแบบการผสมแบบนี้ จึงไม่เกิดการกระจายตัวและการรวมกันของ genomes ที่ต่างกัน แต่ในบางครั้งอาจเกิดการรวมตัวและการกระจายตัวของ genomes ที่ต่างกันได้ ถ้าเกิดการกลายพันธุ์ของนิวเคลียส เห็ดที่มีรูปแบบการผสมแบบนี้ คือ *Volvariella volvacea*

4.2.2 Secondary homothallism เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่ผสมกันไม่ได้ซึ่งขึ้นอยู่กับการกระจายตัวของนิวเคลียส แบซิเดียของเห็ดที่มีรูปแบบการผสมแบบนี้มีสปอร์ 2 สปอร์ โดยเมื่อนิวเคลียสแบ่งตัวแล้วนิวเคลียสที่เข้ากันได้ 2 นิวเคลียสมีการเคลื่อนย้ายไปแต่ละแบซิดิโอสปอร์ เส้นใยที่ผสมตัวเองได้เกิดจาก สปอร์เดี่ยวซึ่งมีความสมบูรณ์เพศและมียีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่ผสมกันไม่ได้ที่ต่างกัน เส้นใยที่ผสมกันได้คือเส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryotic) ซึ่งอาจเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ เส้นใยนิวเคลียสคู่ที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซล หรือเส้นใยที่มีหลายนิวเคลียส (multikaryon) ที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ก็ได้ ระยะที่เส้นใยมีนิวเคลียสเหมือนกัน (homokaryotic phase) ไม่พบในวงจรชีวิตของเส้นใยที่มีรูปแบบนี้ รูปแบบนี้อาจควบคุมด้วยยีนเดี่ยวหรือยีนคู่ก็ได้ และการทำงานของรูปแบบนี้ก็จะแตกต่างจากรูปแบบที่มีการผสมข้าม เนื่องจากเมื่อนิวเคลียสแบ่งตัวแล้วกระจายอยู่ในแบซิดิโอสปอร์ เห็ดที่มีรูปแบบนี้ เช่น *Agaricus bisporous*

5. การปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอม

การปรับปรุงพันธุ์ หมายถึง การนำเอาลักษณะที่ต้องการจาก 2 สายพันธุ์ ที่มีลักษณะเฉพาะตัวที่ต่างกัน เอามารวมอยู่ด้วยกัน ซึ่งรวมไปถึงการสร้างและคัดเลือกลักษณะที่ต้องการด้วย ให้เกิดลูกผสมที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ให้คุณภาพและผลผลิตของเห็ดสูง นั่นคือ เป้าหมายของ

การปรับปรุงพันธุ์เห็ด การปรับปรุงพันธุ์ได้สำเร็จต้องมีความรู้ด้านชีววิทยาพื้นฐาน และระบบของการปรับปรุงพันธุ์ของเห็ดแต่ละชนิดที่ต้องการพัฒนาให้ดีขึ้น (Miles, 1993)

ในอดีตการปรับปรุงพันธุ์เห็ดส่วนใหญ่จะคัดเลือกจากสายพันธุ์ที่มาจากธรรมชาติ หรือชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการรวมกันของลักษณะทางพันธุกรรม ในปัจจุบันการผสมพันธุ์เห็ดได้มีการทำกันอย่างแพร่หลาย โดยใช้เทคนิคการรวมกันของลักษณะทางพันธุกรรม โดยมีจุดประสงค์เพื่อสร้างลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่งในสายพันธุ์ให้หลากหลายแล้วนำเข้ามาอยู่ด้วยกัน (one organism) (Chang, 1982)

การผลิตเห็ดหอมไม่ใช่เรื่องง่าย หลายบริษัทพยายามผลิตเพื่อทำเป็นการค้า แต่ก็ประสบความล้มเหลว ปัญหาหลักที่เห็นได้ชัดคือ ไม่สามารถผลิตเห็ดหอมให้เป็นที่น่าพอใจของตลาดได้ ในระยะเวลา 1 ปี สายพันธุ์หนึ่งอาจให้ผลผลิตที่สูงใน 1 เดือนหรือ 1 ปี แต่ต่อมาผลผลิตก็ลดลงอย่างไม่มีสาเหตุ สาเหตุของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้ไม่มีใครสามารถอธิบายได้ เพราะฉะนั้นจึงต้องการที่จะป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น หรือ ผลิตสายพันธุ์ที่มีความคงตัวมากกว่านี้ (Ellingboe, 1993)

วิธีที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ด

1.1 การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการคัดเลือกพันธุ์ (Selection)

ในทางการค้าส่วนใหญ่จะคัดเลือกพันธุ์จาก การเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยว หรือจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดที่คัดเลือกไว้ ซึ่งใช้ระยะเวลาไม่นานในการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ด แต่การปรับปรุงทางพันธุกรรมจากวิธีนี้ทำได้ยากมาก จึงควรมีการผสมพันธุ์ก่อน แล้วจึงใช้วิธีการคัดเลือกพันธุ์ (Chang, 1982)

1.2 การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ (Hybridization) ที่ใช้กันอยู่ส่วนมากมี 2 วิธี คือ

1. การผสมแบบเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวกับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Mon-mon mating)

โดยทั่วไปเห็ดจะสร้างสปอร์ โดยสร้างจากเซลล์ที่เรียกว่า แบซิเดียม (basidium) ซึ่ง 1 แบซิเดียมมี 4 สปอร์ และ 1 สปอร์มี 1 นิวเคลียส การที่จะสามารถเกิดดอกเห็ดได้ต้องเกิดจากเส้นใยที่มีนิวเคลียสเหมือนกัน (homokaryons) สามารถผสมเข้ากันได้กับเส้นใยที่เป็นhomokaryon อีกตัวแล้วได้เส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกันขึ้นมา (heterokaryon) เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวนี้เจริญช้า ความสามารถในการเข้ากันได้ของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว 2 สายพันธุ์สามารถทดสอบได้บนอาหารวุ้น ถ้าเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว 2 สายพันธุ์ สามารถผสมเข้ากันได้และเกิดเส้นใยนิวเคลียสคู่ การเจริญเติบโตของเส้นใยจะเปลี่ยนจากการเจริญช้าไปเป็นการเจริญที่ปกติ การผสมแบบนี้ทำให้เกิดการรวบรวมลักษณะที่ดีของทั้งสองสายพันธุ์เข้าด้วยกันให้อยู่ใน

สายพันธุ์เดียวกัน และกำจัดลักษณะที่ไม่ต้องการออกไป การทดลองนี้ใช้สำหรับทดสอบผลผลิตและรูปร่างลักษณะของเห็ด (Fritsche, 1978) การผสมกันระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว 2 สายพันธุ์ โดยประมาณจะได้คู่ผสมที่สามารถผสมกันได้ ¼ ของคู่ผสมทั้งหมด ขึ้นอยู่กับการเข้ากันได้และการได้เส้นใยนิวเคลียสคู่ คาดว่าน่าจะเป็นไปตามสมมุติฐานของระบบที่มีปัจจัยที่เข้ากันไม่ได้ 2 ปัจจัย (bifactorial sexual incompatibility) แต่ในการทดลอง พบว่าไม่ได้คู่ผสมของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่สามารถผสมเข้ากันได้ใกล้เคียงกับ 25 % เพราะได้เส้นใยนิวเคลียสคู่เพียง 10 % เท่านั้น แสดงว่าอาจมียีนอื่นที่มีผลต่อความสามารถในการเข้าคู่กัน นอกเหนือจากยีน A และยีน B (Ellingboe, 1993)

2. เส้นใยนิวเคลียสคู่ผสมกับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Di-mon mating)

เป็นการจับคู่ผสมระหว่างเส้นใยนิวเคลียสคู่กับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว การเคลื่อนย้ายนิวเคลียสจากเส้นใยนิวเคลียสคู่ไปยังเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวเกิดขึ้น ถ้านิวเคลียสหนึ่งหรือทั้งสองนิวเคลียสของเส้นใยนิวเคลียสคู่สามารถผสมเข้ากันได้กับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว โดยทั่วไปการผสมแบบไดมอน (di-mon mating) จะเกิดเส้นใยนิวเคลียสคู่ใหม่ที่ปลายของกลุ่มเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว โดยที่นิวเคลียสจากเส้นใยนิวเคลียสคู่ เคลื่อนย้ายเข้าไปยังเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว บางครั้งนิวเคลียสทั้งสองของเส้นใยนิวเคลียสคู่อาจสามารถเคลื่อนย้ายไปด้วยกัน และสร้างเส้นใยนิวเคลียสคู่แบบเดิมที่ปลายของกลุ่มเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ปกติการผสมแบบไดมอนจะทดสอบลักษณะของเส้นใยนิวเคลียสคู่กับสายพันธุ์สำหรับทดสอบที่เหมาะสม หรือ โดยการวิเคราะห์สปอร์ที่ได้จากเส้นใยนิวเคลียสคู่นี้ (Eger, 1978)

1.3 โดยใช้ protoplast fusion

สิ่งที่เป็นอุปสรรคอย่างหนึ่งต่อการผลิตเห็ด คือ การที่เส้นใยจาก 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ไม่สามารถผสมเข้ากันได้ ปัจจุบันมีรายงานว่า สามารถแยก protoplast จากพืชและเซลจุลินทรีย์ โดยใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ แล้วทำให้โปรโตพลาสรวมกันในช่วงเวลาสั้นๆ protoplast จะสร้างผนังเซลล์ใหม่ และเริ่มสร้างเซลล์ปกติ หรือสร้างเส้นใยขึ้น เซลล์เหล่านี้เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสต่างกัน ถ้าการรวมกันเกิดขึ้นระหว่างเซลล์ ที่มาจากสายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมต่างกัน ทำให้เพิ่มความถี่ของการผสมเข้าคู่กันได้ให้มากขึ้น ซึ่งการจับคู่ในลักษณะนี้ในธรรมชาติเกิดขึ้นได้ยากมาก เทคนิคนี้สามารถใช้ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในการผสมข้ามระหว่างชนิด (species) และระหว่างสกุล (genus) ซึ่งปกติไม่สามารถทำได้ (Chang, 1982)

6. ไอโซไซม์

Isozyme คือ เอนไซม์ชนิดเดียวกันที่มียีนต้นแบบมากกว่าหนึ่งยีน ทำให้มีโมเลกุลที่ต่างกัน หรือเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่ต่างรูปกัน ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีองค์ประกอบต่างกัน สรุปคือมีคุณสมบัติทางไฟฟ้าและโครงสร้างต่างกัน แต่มีปฏิกริยาทางเคมีแบบเดียวกัน เอนไซม์ต่างๆสามารถสกัดได้จากส่วนต่างๆของพืช โดยอาศัยเทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ซึ่งสามารถศึกษาตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างต้นสาย (clone) เดียวกัน หรือต่างชนิดกัน หรืออาจจำแนกพันธุ์พืชได้จากแบบของไอโซไซม์ (isozyme pattern) (ชวนพิศ, 2538)

7. อิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis)

อิเล็กโตรโฟรีซีส หมายถึง การเคลื่อนย้ายอนุภาคที่อยู่ในสารละลายด้วยกระแสไฟฟ้า โดยอาศัยคุณสมบัติของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าบวกหรือลบซึ่งเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบหรือบวกในสนามไฟฟ้าด้วยอัตราการเคลื่อนที่และทิศทางต่างกันไปตามแต่ชนิดของประจุบนอนุภาคนั้นๆ

ชนิดของอิเล็กโตรโฟรีซีส มี 3 ชนิด คือ

1. Moving boundaries หรือ Free electrophoresis สารตัวอย่างจะถูกบรรจุไว้ในระหว่างกลางของสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งอยู่ในหลอด เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าให้องค์ประกอบในสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วและทิศทางขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนประจุ ไม่เป็นที่นิยมเพราะสารแยกออกจากกันเห็นไม่ชัดเจน

2. Zone electrophoresis สารตัวอย่างจะใส่ลงในตัวกลางที่เป็นสารกึ่งแข็ง เช่น แป้งหรือเจล ผ่านกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลางที่แช่ในสารละลาย โมเลกุลในสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ตามแต่ชนิดขนาดและรูปร่างของโมเลกุลนั้นๆ ทำให้เกิดเป็นแถบ (discrete zone) Zone electrophoresis มีหลายแบบ เช่น

2.1 Paper electrophoresis ใช้กระดาษเป็นสารตัวกลาง ใช้แรงดันไฟฟ้าค่อนข้างต่ำ (low voltage paper electrophoresis) เหมาะสำหรับวิเคราะแยกสารผสมของโปรตีนที่แยกจากกันได้ยากด้วยวิธีโครมาโตรกราฟี แต่ไม่เหมาะที่จะแยกโมเลกุลขนาดเล็ก

2.2 Gel electrophoresis ใช้เจลเป็นสารตัวกลาง การแยกของโมเลกุลอาศัยสภาพของเนื้อเจลและขนาดช่อง (pore size) ที่เกิดจากการเตรียมเจลในระดับความเข้มข้นต่างๆกัน ในปัจจุบันนิยมใช้ polyacrylamide gels เนื่องจากสามารถปรับขนาดช่องของเนื้อเจลได้ ซึ่งมี 2 แบบ คือ แบบแท่ง (column gels) หรือ แบบแผ่น (slab gels) เจลแบบแผ่นนิยมใช้กันมาก เพราะสามารถใช้เปรียบเทียบกันได้คราวละหลายตัวอย่างในเจลแผ่นเดียวกัน

2.3 Isoelectric focusing หรือ Electrofocusing ใช้แยกสารหรือโมเลกุลที่เป็น ampholyte (amphoteric electrolyte) เช่น กรดอะมิโน อาศัยหลักให้สารตัวกลางมี pH ต่างระดับกัน (pH gradients) แล้วนำตัวอย่างลงไปในตัวกลาง เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าตัวอย่างจะเคลื่อนที่เมื่อถึงบริเวณที่ pH ของตัวกลางมีค่าเท่ากับ isoelectric pH ของตัวอย่างโปรตีนนั้นซึ่งเป็นจุดที่ประจุรวมของโปรตีนเท่ากับ 0 ตัวอย่างก็จะหยุด

3. Continuous electrophoresis หรือ Curtain electrophoresis ให้สารตัวอย่างที่ต้องการแยกเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางในสนามไฟฟ้าไปอย่างต่อเนื่อง การเคลื่อนที่จะขึ้นกับอัตราการไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ อัตราการใส่ตัวอย่าง ความเข้มของสนามไฟฟ้า ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ใช้กระดาษกรองเป็นสารตัวกลาง (พิสสวรรณ, 2531)

ความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์เห็ดมีความจำเป็นมากในการปรับปรุงพันธุ์ การวินิจฉัยความบริสุทธิ์โดยการใช้ลักษณะการแสดงออกภายนอก (phenotype) ของเห็ดไม่สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันได้ การศึกษาไอโซไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสน่าจะเป็นวิธีการตรวจสอบความผันแปรของพันธุ์พืชได้ดี มีความใกล้เคียงกับการตรวจสอบระดับ DNA (Simpson and Withers,1986)

8. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการวิเคราะห์หารูปแบบไอโซไซม์ esterase, peroxidase, acid phosphatase ของเห็ดนางรมลูมผสมโดยใช้ polyacrylamide gel 8.5 % ปรากฏว่า ไซโมแกรมของเส้นใยเห็ดลูกผสมมีความสัมพันธุ์กับไซโมแกรมของเส้นใยพ่อแม่ (เจนฟาง, 2540)

จากการทดลองของ Chang (1972) พบว่า ไซโมแกรมของเส้นใยเห็ดฟางที่ได้จากการหารูปแบบไอโซไซม์ peroxidase จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีระยะการเจริญเติบโตและผลผลิตที่แตกต่างกัน

ในเห็ดหอมการคัดเลือกสายพันธุ์มีการใช้ esterase เป็น isoenzyme ในการทำอิเล็กโตโฟรีซีส ซึ่งใช้เป็นตัวอธิบายความแตกต่างทาง genetic ของแต่ละสายพันธุ์ ร่วมด้วยอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย ให้เกิดความสอดคล้องกัน เป็นมาตราฐานในการคัดเลือกสายพันธุ์ (Levanon *et al.*, 1993)

เห็ดหอมเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การเจริญจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ระดับของความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ที่ 5 แป้งเป็นแหล่งของคาร์บอนที่ดีที่สุด ในขณะที่ยูเรียและแอสพาราจีนเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ดีที่สุด (Khan *et al.*, 1995)

ในประเทศเกาหลีได้มีการทดสอบผลผลิตของเห็ดหอม 60 สายพันธุ์ พบว่า มี 4 สายพันธุ์ที่น่าจะให้ผลผลิตและคุณภาพดี คือ FRI188 ให้ผลผลิต 132 กรัมต่อวัสดุเพาะ 1 กิโลกรัม FRI169, FRI259 และ FRI262 ให้ผลผลิต 130, 121 และ 119 กรัมตามลำดับ และได้นำสายพันธุ์ FRI188 มาทำการทดสอบกรรมวิธีในการกระตุ้นให้เกิดดอกเห็ด 3 กรรมวิธี กรรมวิธีที่ 1 กระตุ้นโดยแช่ในน้ำเย็น 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปตลอดไม่มีระยะพักตัว ให้ผลผลิตสูงที่สุด คือ 283 กรัม (ทำการเก็บ 3 ชุด) กรรมวิธีที่ 2 คล้ายกรรมวิธีแรกแต่มีระยะพักตัว 3 สัปดาห์ หลังจากที่เก็บชุดที่ 1 และ 2 ให้ผลผลิต 264 กรัม และกรรมวิธีที่ 3 ใช้วิธีฉีดพ่นด้วยน้ำเย็น ให้ผลผลิต 245 กรัม (Bak *et al.*, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University