บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดฟาง

1.1 การจำแนกเห็ดฟาง (Hawksworth และคณะ, 1995)

Super kingdom	:	*Eukaryota*
Kingdom	:	*Fungi*
Division	:	*Basidiomycota*
Class	:	*Basidiomycetes*
Subclass	:	*Homobasidiomycetes*
Series	:	*Hymenomycetes*
Order	:	*Agaricales*
Family	:	*Pluteaceae*
Genus	:	*Volvariella*
Species	:	*volvacea*

1.2 การเจริญเติบโตของเห็ดฟาง

เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดฟาง เส้นใยของเห็ดฟางจะงอกและรวมตัวกันเป็นตุ่มเพื่อเจริญเป็นดอกเห็ดเรียกว่า fruiting body หรือ basidiocarp ลักษณะของเส้นใยจะมีสีขาวกระจายอยู่ตามดินหรือกองปุ๋ยหมัก การเจริญเติบโตของเส้นใยเมื่อเจริญเติบโตต่อไปเป็นดอกเห็ดแบ่งออกเป็น 6 ระยะคือ

(1) ระยะหัวเข็มหมุด (pinhead) ระยะนี้เส้นใยจะรวมตัวกันเห็นเป็นจุดสีขาวเล็ก ๆ บนวัสดุที่ใช้เพาะเห็ดฟาง

(2) ระยะกระดุมเล็ก (tiny button) เป็นระยะที่ดอกเห็ดขยายโตขึ้นมีขนาดเท่ากับเม็ดกระดุมขนาดเล็ก

(3) ระยะกระดุม (button) เป็นระยะที่เส้นใยของเห็ดมีการเปลี่ยนแปลงและขยายขนาดใหญ่ขึ้น

(4) ระยะรูปไข่ (egg) ในระยะนี้ดอกเห็ดเริ่มขยายใหญ่ขึ้นจนกระทั่งเปลือกที่หุ้มเริ่มปริ ในระยะนี้เป็นระยะที่เหมาะต่อการเก็บผลผลิตออกจำหน่าย และเป็นระยะที่ประชาชนนิยมนำมาประกอบอาหาร

(5) ระยะยืดตัว (elongation) ในระยะนี้สามารถมองเห็นหมวกดอก ครีบดอก ก้านดอก เนื้อเยื่อที่หุ้มโคนก้านดอกได้ชัดเจน

(6) ระยะดอกบานเต็มที่ (mature) ดอกเห็ดที่บานเต็มที่ ครีบดอกจะมีสปอร์อยู่ภายในครีบเป็นจำนวนมาก

1.3 รูปร่างของดอกเห็ดฟาง

เห็ดฟางมีส่วนประกอบและรูปร่างคล้ายเห็ดทั่ว ๆ ไป ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

(1) ปลอกหุ้มดอกเห็ด (volva) มีลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ อยู่รอบฐานของก้านดอกเห็ด ในขณะที่ดอกเห็ดยังอ่อนจะมีสีน้ำตาล และมีลักษณะคล้ายรูปถ้วยรองรับโคนดอกเห็ดเอาไว้

(2) ก้านดอกเห็ด (stipe) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.5 เซนติเมตร ยาว 3-8 เซนติเมตร เชื่อมระหว่างส่วนกลางของใต้หมวกเห็ดและปลอกที่หุ้มโคน มีสีขาว ผิวเรียบ และไม่มีวงแหวน

(3) หมวกดอก (pileus) เมื่อเจริญเต็มที่จะมีลักษณะเป็นวงกลม ผิวเรียบ ตรงส่วนกลางจะเป็นสีเทาดำ ส่วนบริเวณขอบจะมีสีเทาอ่อนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6-10 เซนติเมตร ซึ่งขนาดจะเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมและธาตุอาหารที่ได้รับ

(4) ครีบดอก (gills) ใต้หมวกเห็ดจะมีครีบดอกเป็นจำนวนมากตั้งแต่ 280-380 อัน ครีบดอกเรียงตัวกันเป็นรัศมีรอบก้านดอก มีลักษณะตรงผิวเรียบ ซึ่งครีบดอกจะไม่สัมผัสกับก้านดอกเห็ด ที่บริเวณนี้จะเป็นแหล่งสร้างสปอร์

เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าในแต่ละครีบประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ชั้นในสุดเส้นใยจะเกาะกันอย่างหลวม ๆ เรียกชั้นนี้ว่า inverse trama ส่วนชั้นกลางเส้นใยจะเกาะกันแน่นเรียกว่า subhymenium และชั้นนอกเรียกว่า hymenium ซึ่งเป็นชั้นที่สร้าง basidia และ cystidia

(5) สปอร์ (basidiospores) สปอร์ที่เกิดบน basidia เรียกว่า basidiospores ซึ่งจะมี สปอร์ในแต่ละ basidium สปอร์ของเห็ดฟางจะมีลักษณะเป็นรูปไข่ ความยาวโดยเฉลี่ยของสปอร์คือ 7-9 ไมโครเมตร ส่วนที่กว้างที่สุดจะมีขนาด 5-6 ไมโครเมตร และส่วนที่แคบที่สุดจะมีขนาด 3-4 ไมโครเมตร(Chang, 1972)

1.4 วงจรชีวิตของเห็ดฟาง (Chang,1972)

เห็ดฟางจัดเป็นเห็ดที่มีวงจรชีวิตแบบ primary homothallism โดยเริ่มจากดอกเห็ดเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้าง basidiospore ซึ่งเกิดจากการพัฒนาเส้นใยขั้นที่สอง ซึ่งมีสองนิวเคลียส (n + n) มีการพัฒนาไปเป็น basidium ซึ่งมีลักษณะคล้ายกระบอง เมื่อนิวเคลียสสองอันเข้ามารวมกันจะมีการกระจายตัวของลักษณะทางพันธุกรรม จากนั้นนิวเคลียสจะมีการแบ่งตัวแบบ meiosis ได้ haploid nucleus (n) จำนวน 4 นิวเคลียส และมีการสร้างก้านชูสปอร์ (sterigma) 4 อัน และนิวเคลียส

จะเคลื่อนที่สู่ปลาย sterigma และพัฒนาไปเป็น basidiospore เมื่อสปอร์แก่ก็จะถูกปล่อยออกมา และถ้าไปตกในบริเวณที่เหมาะสมก็จะงอกเส้นใยออกมา ซึ่งเส้นใยของเห็ดฟางแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

(1) เส้นใยขั้นแรก (primary mycelium) หรือเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryon)

เป็นเส้นใยที่พัฒนามาจากสปอร์เดี่ยว มีการเจริญเป็นรัศมี บางครั้งเส้นใยจะฟูมีลักษณะเป็นก้อนหลวม ๆ ในแต่ละเซลล์จะมีจำนวนนิวเคลียสตั้งแต่ 2-30 นิวเคลียส แต่ละนิวเคลียสมีขนาดโดยเฉลี่ย 1.5 - 2.5 ไมโครเมตร ลักษณะที่สำคัญของระยะนี้คือเส้นใยจะมีลักษณะพอง ซึ่งจะพบเป็นจำนวนมาก

(2) เส้นใยขั้นที่สอง (secondary mycelium) หรือเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryon)

เส้นใยขั้นนี้ได้จากการตัดเนื้อเยื่อของดอกเห็ด หรือได้จากเส้นใยที่เกิดหลังจากการผสมพันธุ์(anastomosis) ระหว่างเส้นใยขั้นแรกของดอกเห็ดสองสายพันธุ์ ซึ่งการเจริญเติบโตของเส้นใยขั้นที่สองจะคล้ายกับเส้นใยขั้นแรก เพียงแต่จะมีการเจริญเร็วกว่าและแข็งแรงมากกว่า การเลี้ยงเส้นใยนี้ในอาหารที่สมบูรณ์จะพบว่ามีการเกิดคลามิโดสปอร์เป็นจำนวนมาก

1.5 การงอกของเบสิดิโอสปอร์

เบสิดิโอสปอร์(basidiospores) เกิดขึ้นภายในดอกเห็ด ส่วนมากมีลักษณะเป็นรูปไข่ ส่วนที่เชื่อมระหว่าง basidiospore กับ sterigma เรียกว่า hilum ผนังของสปอร์มี 2 ชั้น ชั้นนอกคือ epispore ชั้นในคือ perispore สปอร์ที่แก่จะมีสีน้ำตาลแดงซึ่งเป็นเม็ดสีที่พบบริเวณผนังสปอร์ไม่ใช่ใน cytoplasm ซึ่ง basidiospore ส่วนมากจะมีหนึ่งนิวเคลียส แต่บางครั้งอาจพบสองนิวเคลียสก็ได้

เมื่อสปอร์งอกจะมีตุ่มงอกออกมาจาก hilum หลังจากนั้นจะเจริญอย่างต่อเนื่องไปเป็น germ tube ที่ hilum นี้จะถูกล้อมรอบด้วย cytoplasmic membrane ซึ่งจะกลายเป็นทางเข้าของน้ำและอาหารก่อนที่สปอร์จะงอก ในระหว่างที่เกิดการงอกจะเป็นจุดที่มีความต้านทานน้อยที่สุดซึ่งจะทำให้ตุ่มนั้นงอกออกมา โดยปกติแล้ว germ tube จะแตกกิ่งก้านหลังจากที่มันยืดยาวออกไป แต่บางครั้งจะแตกแขนงตรงจุดที่งอกออกมาเลย สิ่งที่อยู่ภายในสปอร์จะค่อยๆ เคลื่อนไปสู่ germ tube ทีละน้อยจนหมด ซึ่งจะเริ่มมีการแบ่งนิวเคลียสในเวลาต่อมาหลังจากเข้าไปใน germ tube แล้ว และจะเพิ่มจำนวนนิวเคลียสเป็น 2-8 นิวเคลียส ใน germ tube ที่ยังไม่มีผนังกั้นนั้น germ tube อาจจะขยายจนมีความยาว 28-267 ไมโครเมตร ก่อนที่จะแตกแขนง หลังจากนั้นก็จะเจริญต่อไปจนกลายเป็นเส้นใยขั้นแรก(primary mycelium)

2. สภาพแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการเกิดดอกของเห็ดฟาง (อานนท์, 2530)

สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย และการออกดอกของเห็ดฟางมีดังนี้คือ

2.1 อุณหภูมิ การเจริญเติบโตทางด้านเส้นใยต้องการอุณหภูมิประมาณ 35-38 °C และจะออกดอกที่อุณหภูมิ 28-30°C แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 20°C จะไม่มีดอกเกิดขึ้น

2.2 ความชื้น สำหรับความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศนั้น ควรรักษาให้อยู่ในระดับ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ดอกเห็ดกำลังเจริญเติบโตอยู่นั้น หากความชื้นสัมพัทธ์ต่ำเกินไป ดอกเห็ดก็อาจจะแตระแกรน ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ได้

2.3 อากาศ ทุกระยะการเจริญเติบโตของเห็ดล้วนแล้วแต่ต้องการอากาศในการหายใจทั้งสิ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งระยะของการสร้างและการเจริญเติบโตของดอกเห็ด

จากการทดลอง พบว่า ระยะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดฟาง หากมีจำนวนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบริเวณกองเพาะสูงกว่าบรรยากาศเล็กน้อย คือประมาณ 0.1-0.2% (ปกติในบรรยากาศจะมีก๊าซชนิดนี้อยู่ประมาณ 0.03%) จะทำให้เส้นใยของเห็ดเจริญทางด้านความยาวและแบ่งเซลล์ได้เร็วยิ่งขึ้น ในทางตรงกันข้าม ช่วงระยะที่เส้นใยต้องการรวมตัวเพื่อเกิดดอก หากมีจำนวนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงแล้ว จะทำให้เกิดดอกเห็ดน้อยลงหรือไม่เกิดเลย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของก๊าซนี้ นอกจากนี้ยังมีผลต่อดอกเห็ดด้วย โดยเฉพาะส่วนก้านและหมวกดอกจะเล็กหรือไม่มีหมวกดอกเลย ส่วนผิวของดอกจะหยาบคล้ายหนังคางคก อันเนื่องมาจากเนื้อเยื่อของเห็ด ส่วนปลอกหุ้มจะกลับเจริญเป็นเส้นใยเห็ดอีกครั้งหนึ่ง

จากเหตุผลดังกล่าว จะเห็นว่า การถ่ายเทอากาศมีความจำเป็นต่อระยะที่กำลังจะเกิดดอกและตอนที่เกิดดอกแล้ว โดยอาจจะทำได้โดยการเปิดเอาวัสดุคลุมออก

2.4 แสง เห็ดฟางมีความต้องการแสงในการรวมตัวของเส้นใยขั้นที่ 2 เพื่อเป็นดอกเห็ด แสงจะช่วยกระตุ้นให้เส้นใยรวมตัวกัน ดังนั้น ในราววันที่ 4-6 หลังจากที่โรยเชื้อเห็ดลงในวัสดุเพาะแล้ว เส้นใยมีความต้องการแสง โดยแสงจะเป็นตัวช่วยกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวให้เกิดดอกเห็ด ซึ่งแสงสีฟ้า จะให้ผลดีที่สุด

สำหรับปริมาณของแสงนั้น จากการศึกษาด้วยเครื่องวัด Illumianation meter พบว่า แสงขนาด 80-150 ลักซ์ หรือประมาณ 25-50 แรงเทียน จะดีที่สุด

2.5 ความเป็นกรดด่าง (pH) จากการศึกษาระดับความเป็นกรด-ด่างที่เห็ดฟางสามารถเจริญเติบโตได้ พบว่า เห็ดฟางมีความสามารถค่อนข้างพิเศษในการที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีระดับความเป็นกรด-ด่างที่กว้างมาก กล่าวคือ ระดับตั้งแต่ 4.5-8.5 แต่ก็มิได้หมายความว่าจะให้ผลผลิตสูงในระดับนี้ ซึ่งระดับที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยคือ 7.0

3. การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ของเห็ดฟาง

ในการที่จะกำหนดว่าธรรมชาติของเห็ดฟางเป็นพวก homothallic หรือ heterothallic นั้น จากงานทดลองของ Kligman(1943)ได้แสดงให้เห็นถึงขั้นตอนที่จะกำหนดและอธิบายถึงธรรมชาติของเห็ดฟางที่เป็น homothallic ดังนี้

1. มีการค้นพบเส้นใยสปอร์เดี่ยว 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ กลุ่มหลักที่พบเป็นจำนวนมากเส้นใยมีการเจริญเร็ว เมื่อเส้นใยแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและมีคลามิโดสปอร์เกิดขึ้น ซึ่งถือว่าเป็นเส้นใยที่ปกติ ส่วนอีกกลุ่มได้แก่เส้นใยที่มีการเจริญช้า ไม่ค่อยพบคลามิโดสปอร์ ถือว่าเป็นเส้นใยที่ผิดปกติ (Chang และ Yau, 1971)

2. ส่วนมากเส้นใยสปอร์เดี่ยวที่ปกติจะสามารถเกิดดอกเห็ดได้แต่มีส่วนน้อยที่เป็นหมัน และเส้นใยสปอร์เดี่ยวที่ผิดปกติทั้งหมดเป็นเส้นใยที่เป็นหมันไม่สามารถที่จะเกิดดอกเห็ดได้

3. เมื่อผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยที่เป็นหมันด้วยกันพบว่าลูกผสมส่วนมากสามารถเกิดดอกเห็ดได้

4. ในบางกรณี ประมาณ 75% ของเส้นใยสปอร์เดี่ยวที่ไม่เป็นหมันจะมาจากสปอร์ของดอกเห็ดที่มาจากการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยวเช่นกัน

จากความจริงที่ว่าการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยวสามารถเกิดดอกเห็ดได้แสดงให้เห็นว่าเห็ดฟางจัดเป็นพวก homothallic

จากรายงานของ Chang และ Yau (1971) สันนิษฐานว่ามีปัจจัยร่วมที่เกี่ยวข้องกับการผสมพันธุ์ 2 ปัจจัยคือ A_1 และ A_2 ซึ่งเส้นใยที่สามารถสร้างดอกเห็ดได้จะมีปัจจัยทั้งสองอยู่ด้วยกัน โดยเกิดจากการผสมระหว่าง A_1 และ A_2 หรืออาจเกิดการผสมข้ามคู่ยีนที่ไม่เท่ากันโดยเกิดจากการผสมระหว่าง A_1 กับ $A_1A_2A_2$ หรือ A_2 กับ A_1A_1A2 โดยมีเหตุผลที่มาสนับสนุนสันนิษฐานนี้คือ

1. เส้นใยจะเป็นหมัน(25%) เมื่อ
   (1.1) A_1 หรือ A_2 แยกกันอยู่ ซึ่งจะให้เส้นใยที่มีการเจริญผิดปกติ
   (1.2) $A_1A_2A_2$ หรือ $A_2A_1A_1$ แยกกันอยู่ จะให้เส้นใยที่มีการเจริญปกติ
2. เส้นใยสปอร์เดี่ยวที่ไม่เป็นหมันจะมีจีโนไทป์เป็น A_1A_2 โดยมีการเจริญของเส้นใยเป็นปกติ(ประมาณ 75%) ในขณะที่เส้นใยสปอร์เดี่ยวที่มีการเจริญผิดปกติจะเป็นเส้นใยที่เป็นหมันทั้งหมด
3. ในการผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยที่เป็นหมัน อาจสันนิษฐานได้ว่าถ้าผสมแล้วทำให้ปัจจัยร่วมทั้งสองปัจจัยสมดุลกันลูกผสมที่ได้จะไม่เป็นหมัน เช่น $A_1A_2A_2 \times A_1A_1A_2$ หรือ $A_1 \times A_1A_2A_2$ หรือ $A_2 \times A_1A_1A_2$ หรือ $A_1 \times A_2$ ฯลฯ

4. เส้นใยสปอร์เดี่ยวที่แตกต่างกันจะขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของดอกเห็ดที่ใช้ โดยสันนิษฐานว่ามีการเกิด crossing over ที่ไม่เท่ากันในทุกรุ่น

(4.1) ถ้าสภาพภายใน basidium ของดอกเห็ดเป็น $A_1A_2 \times A_1A_2$ เส้นใยสปอร์เดี่ยวที่ได้ส่วนมากจะไม่เป็นหมัน (75%) และมีการเจริญเป็นปกติ

(4.2) ถ้าสภาพภายใน basidium เป็น $A_1 \times A_2$ เส้นใยสปอร์เดี่ยวที่ได้จะมีการเจริญที่ผิดปกติ (แต่อย่างไรก็ตามเชื่อว่าสปอร์เดี่ยวที่เป็น A_1 หรือ A_2 ไม่สามารถงอกได้)

(4.3) ถ้าสภาพภายใน basidium เป็น $A_1 \times A_1A_2A_2$ หรือ $A_2 \times A_1A_1A_2$ อย่างน้อยครึ่งหนึ่งของสปอร์เดี่ยวที่ได้จะมีการเจริญของเส้นใยเป็นปกติและเส้นใยเหล่านี้ส่วนมากจะเป็นหมัน

4. การปรับปรุงพันธุ์เห็ด

วัตถุประสงค์หลักของการปรับปรุงพันธุ์คือ การเพิ่มผลผลิตต่อเนื้อที่ปลูก ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ในระยะแรกๆมีความหมายแค่การคัดเลือกพันธุ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติเพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการ แต่หลังจากที่มีการค้นพบกฎของ Mendel การปรับปรุงพันธุ์จึงเริ่มเปลี่ยนแปลงจากการคัดเลือกพันธุ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ มาเป็นการผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์จากสิ่งที่มนุษย์ทำให้เกิดขึ้น

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนั้นจะถูกควบคุมโดยพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่แตกต่างกันหรือที่สามารถรวมกันได้ เห็ดที่จะนำมาใช้ควรมีการปรับตัวได้ดีในธรรมชาติ และมีฐานพันธุกรรมกว้างเพื่อที่จะได้มีลักษณะให้เลือกมากพอสำหรับใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ (Raper, 1978)

วิธีการที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดนั้น มีหลายวิธีคือ

4.1 การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการคัดเลือกพันธุ์ (selection)

ในทางการค้าจะคัดเลือกพันธุ์ใหม่จากการเพาะเลี้ยง multispore หรือจากการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยว หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดที่คัดเลือกไว้โดยตรง ซึ่งวิธีเหล่านี้จะใช้ระยะเวลาสั้นๆ ในการปรับปรุงพันธุ์ แต่การปรับปรุงทางพันธุกรรมจากวิธีคัดเลือกพันธุ์นี้จะทำได้ยากมาก ดังนั้นจึงควรมีการผสมพันธุ์ก่อน แล้วจึงใช้วิธีการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป

4.2 การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ (hybridization)

การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการนี้เป็นวิธีที่ทำกันมานาน โดยจะให้มีการผสมข้ามระหว่างเห็ดสองสายพันธุ์ ที่สามารถเข้าคู่กันได้ ให้เส้นใยที่มีสองนิวเคลียส และเกิดเป็นดอกเห็ดในที่สุด ซึ่งจะประสบความสำเร็จมากในงานปรับปรุงพันธุ์เห็ดที่กินได้หลายชนิด

5. วิธีการที่ใช้การปรับปรุงพันธุ์ในเห็ดบางชนิด

5.1 การคัดเลือกสปอร์เดี่ยว (monospore หรือ spore selection) ในเห็ด *Agaricus bisporus* และ *Volvariella volvacea*

เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยง multispore แล้ว วิธีการเลี้ยงสปอร์เดี่ยวจะสามารถคัดเลือกพันธุ์ใหม่ที่ดีกว่า เนื่องจากให้ลักษณะที่หลากหลายมากกว่า เช่น อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย รูปทรงของดอกเห็ด และการให้ผลผลิต จากการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ของ *Agaricus bisporus* ด้วยวิธีการคัดเลือก พบว่า ปัจจัยต่าง ๆ ที่สามารถถ่ายทอดได้ จะคัดได้จากการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยวมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ multispore

ในการเตรียมการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยวของ *Agaricus bisporus* ดอกเห็ดจะต้องยังไม่บานเต็มที่ มีเยื่อบางๆ ปิดครีบเห็ดอยู่ นำดอกเห็ดมาทำความสะอาด และวางบนกระดาษกรองที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยง ซึ่งทั้งสองผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาครอบไว้ เมื่อเยื่อที่หุ้มครีบเห็ดอยู่ฉีกขาดจะปล่อยสปอร์ให้ตกลงบนกระดาษกรอง สิ่งที่ได้บนกระดาษกรอง เรียกว่า พิมพ์สปอร์ (spore print) นำไปเก็บในตู้เย็นเพื่อรอการนำไปใช้ต่อไป ส่วนในกรณีของเห็ดฟาง และ *Pleurotus sp.* ดอกเห็ดที่ใช้ในการดักสปอร์ต้องเป็นเห็ดที่เพิ่งบานใหม่ๆ พิมพ์สปอร์ของเห็ดฟางควรเก็บในอุณหภูมิห้อง เพราะอุณหภูมิต่ำจะทำให้การงอกของสปอร์ลดลง

เมื่อต้องการนำพิมพ์สปอร์มาใช้ ให้ตัดกระดาษเป็นแถบยาวใส่ลงในน้ำกลั่น ทำให้ความเข้มข้นของสปอร์ลดลง เมื่อได้แล้วนำสารแขวนลอยสปอร์ 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงในจานอาหารวุ้น ทิ้งไว้ 5-7 วัน สปอร์จะเริ่มงอก แยกสปอร์เดี่ยวไปเลี้ยงบนอาหารใหม่

อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยว คือการใช้เข็มเขี่ย หรือ forceps ที่ปลอดเชื้อตัดเนื้อเยื่อจากครีบเห็ดวางบนอาหารวุ้น ประมาณ 5-10 วินาที แล้วย้ายชิ้นเนื้อเยื่อไปยังอาหารวุ้นใหม่ทำเช่นนี้อีกสองครั้ง ปิดฝาจานทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง เมื่อสปอร์งอกแยกสปอร์เดี่ยวไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ หลังจากนั้น 2-3 สัปดาห์ จะสามารถคัดเลือกครั้งแรกได้ โดยสังเกตจากการเจริญเติบโตของเส้นใย เส้นใยที่เจริญเติบโตช้า แน่น หรือฟูเป็นปุย (fluffy) มักจะให้ผลผลิตต่ำ จากนั้นนำไปทดสอบทางด้านผลผลิต และคุณภาพของเห็ดต่อไป

5.2 การคัดเลือกจากการเพาะเลี้ยง multispore

การเตรียม multispore การทำสารละลายสปอร์ และการเก็บสปอร์ ทำเช่นเดียวกับในหัวข้อ 5.1 แต่จะนำสารละลายสปอร์มาเทลงในอาหารวุ้นที่ยังไม่แข็งตัว ทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัวประมาณ 3-5 วัน เส้นใยจะเริ่มเจริญบนผิวอาหารวุ้น อีกวิธีหนึ่งที่ใช้คือ จุ่มเข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในน้ำกลั่น ให้ตรงปลายเข็มชื้น นำไปแตะบนพิมพ์สปอร์ หรือในสารละลายสปอร์ นำเข็มไปลากบนผิวอาหารวุ้นใหม่ หลังจากนั้นหนึ่งสัปดาห์ จะสามารถทำการคัดเลือกครั้งแรกได้

5.3 การผสมข้าม (cross-breeding)

การผสมข้ามจะทำในเส้นใยที่มีนิวเคลียสเหมือนกัน ในกลุ่มที่ผสมตัวเองไม่ได้ เช่น *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* และ *Pleurotus sp.* เส้นใยที่มีนิวเคลียสเหมือนกัน (homokaryon) สองชนิด หรือสปอร์เดี่ยว(monokaryon) สองอัน ที่นำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นเดียวกัน และปล่อยให้มีการเดินมาชนกัน ถ้าเส้นใยที่มีนิวเคลียสเหมือนกัน(homokaryon)นั้นสามารถผสมเข้ากันได้จะเกิดเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกัน(heterokaryon)ขึ้น สังเกตได้ว่าเส้นใยจะหนา เป็นปุย (fluffy) และเป็นเส้น (stringy) ในขณะที่ถ้าไม่สามารถผสมเข้ากันได้ เส้นใยจะบาง และเดินโตช้า เส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกัน(heterokaryon) จะสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์(clamp connection)ขึ้น ลูกผสมที่ได้จะเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปจนเป็นดอกเห็ด ทำการคัดเลือกอีกครั้งหนึ่งโดยพิจารณาจากการให้ผลผลิต การให้ดอกเห็ดเร็ว และคุณภาพของดอกเห็ดประกอบ

6. อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิส หมายถึงการเคลื่อนย้ายอนุภาคที่อยู่ในสารละลายด้วยกระแสไฟฟ้า โดยอาศัยคุณสมบัติของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าบวกหรือลบ ซึ่งจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบหรือขั้วบวกในสนามไฟฟ้าด้วยอัตราการเคลื่อนที่และทิศทางต่างกันไปตามแต่ชนิดของประจุบนอนุภาคนั้น ๆ (พิสสวรรณ, 2531)

ชนิดของอิเล็กโทรโฟรีซิส มี 3 ชนิด คือ

1. Moving boundaries หรือ Free electrophoresis หลักการก็คือสารตัวอย่างจะถูกบรรจุไว้ในระหว่างกลางของสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งอยู่ในหลอด เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าให้กับสารในหลอด องค์ประกอบแต่ละส่วนในสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางและอัตราเร็วที่ขึ้นกับชนิดและจำนวนของประจุ วิธีนี้จัดเป็นต้นแบบของอิเล็กโทรโฟรีซิส

2. Zone electrophoresis หลักการคือหยดสารตัวอย่างหรือใส่สารตัวอย่างลงในตัวกลางที่เป็นสารกึ่งแข็ง เช่น แป้ง หรือเจล เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าไปในตัวกลางที่แช่ในสารละลาย โมเลกุลในสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ไปบนหรือผ่านไปในสารตัวกลางนั้นได้ตามแต่ชนิด ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลนั้นๆ และเกิดเป็นแถบตามชนิดของโมเลกุลขึ้น zone electrophoresis มีหลายแบบ เช่น

2.1 Paper electrophoresis สารตัวกลางที่ใช้เป็นกระดาษและใช้แรงดันไฟฟ้าค่อนข้างต่ำ จุ่มกระดาษลงในสารละลายบัฟเฟอร์แล้ววางในถาดที่บรรจุสารละลายไว้ หยดตัวอย่างเป็นจุดหรือเป็นแถบลงบนกระดาษนี้ แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลาง โมเลกุลในสารตัวอย่างก็จะเคลื่อนที่แยกออกจากกันตามคุณสมบัติของโมเลกุล

2.2 Gel electrophoresis ใช้สารตัวกลางจำพวกเจลที่เป็นสารกึ่งแข็ง เช่น แป้ง (strach) หรือโพลีอะคริละไมด์ (polyacrylamide) การแยกโมเลกุลจะอาศัยสภาพของเนื้อเจลและขนาดช่องที่เกิดขึ้นจากการเตรียมเจลในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน แต่เดิมนิยมใช้แป้งมันเป็นสารตัวกลาง แต่ปัจจุบันนิยมใช้โพลีอะคริละไมด์ เนื่องจากสามารถปรับขนาดช่องของเนื้อเจลได้โดยการปรับความเข้มข้นของเจล นอกจากนี้เจลยังมีคุณสมบัติที่ดีคือไม่ดูดซับสารตัวอย่างที่ผ่านเข้ามาตามช่องโมเลกุลจึงเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ โดยที่โมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้ในอัตราเร็วที่สูงกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่

3. Continuous electrophoresis หรือ Curtain electrophoresis หลักการให้สารผสมตัวอย่างที่ต้องการแยกเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางในสนามไฟฟ้าอย่างต่อเนื่อง การเคลื่อนที่แยกตัวของโมเลกุลต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในสารตัวอย่างจะขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ อัตราการใส่ตัวอย่าง ความเข้มข้นของสนามไฟฟ้า และความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ สารตัวกลางที่ใช้คือกระดาษกรอง

7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์เห็ด

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดได้ทำมานานแล้วโดยในระยะแรกเป็นเพียงการคัดเลือกพันธุ์เท่านั้น แต่ในปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าทางด้านการผสมพันธุ์และใช้เทคโนโลยีต่างๆ เข้ามาช่วยมากขึ้น จากการศึกษาการผสมพันธุ์เห็ดนางรมโดยการคัดเลือกโมโนคาริออน แล้วแบ่งเส้นใยออกเป็น 4 กลุ่ม คือเส้นใยที่เจริญเร็วมาก เจริญเร็ว เจริญช้า และเจริญช้ามาก ผสมแบบพบกันหมดพบว่าการเกิดดอกเห็ดได้ดีนั้นจะได้จากการผสมข้ามระหว่างสามกลุ่มแรกที่เส้นใยมีอัตราการเจริญเร็ว การผสมในกลุ่มเดียวกันหรือกับพวกที่เส้นใยมีอัตราการเจริญช้ามากจะให้ผลผลิตไม่เป็นที่น่าพอใจ (สุวรรณีและวิเชียร, 2539)

จากการศึกษาระดับความเป็นกรดเป็นด่างที่เห็ดฟางสามารถเจริญเติบโตได้ พบว่า เห็ดฟางมีความสามารถค่อนข้างพิเศษในการที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีระดับความเป็นกรดเป็นด่างที่กว้างมากกล่าวคือ ระดับตั้งแต่ 4.5-8.5 แต่ก็มิได้หมายความว่าจะให้ผลผลิตสูงในระดับนี้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าระดับความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์คือ 7.5(Chang,1972)

ในการทดลองดักสปอร์พบว่าเห็ดจะปล่อยสปอร์ออกมาเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียสและเมื่อนำสปอร์มาเลี้ยงในอาหารวุ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับดูเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ จะพบว่าอุณหภูมิเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการงอกของสปอร์ ซึ่งจากการทดลองพบว่าสปอร์งอกดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้หากให้สปอร์ของเห็ดฟางที่แช่ใน phosphate buffer เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อระดับความหนาแน่นของสปอร์ 900 สปอร์ต่อพื้นที่ 1

ตารางมิลลิเมตรแล้ว พบว่าการงอกของสปอร์มีสูงถึง 94 เปอร์เซ็นต์(Chang, 1972) คือเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความหนาแน่นของสปอร์มากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจาก สปอร์ที่กำลังงอกจะหายใจและคายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาสะสมอยู่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นี้จะเป็นตัวเร่งอัตราการเจริญของเส้นใยเห็ด (Cayley, 1937) ได้มีการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *Volvariella diplasia* พบว่าน้ำหนักของเส้นใยจะมากที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Richard ที่ pH 6 อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน(Kalra และคณะ, 1999)

สำหรับการวินิจฉัยความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์เห็ดมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งการใช้ลักษณะการแสดงออกภายนอก(phenotype)ของเห็ดไม่สามารถบ่งบอกอย่างมีนัยสำคัญถึงความแตกต่างของสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันได้ การศึกษาไอโซไซม์โดยวิธีอิเล็กโทร-โฟรีซิส น่าจะเป็นวิธีการตรวจสอบความผันแปรของพันธุ์พืชที่ดี มีความใกล้เคียงกับการตรวจสอบระดับ DNA(Simpson และ Withers, 1986) ซึ่งเส้นใยของเห็ดสามารถที่จะนำมาศึกษาแถบของเอนไซม์แต่ละชนิดได้(Zervakis และคณะ, 1994) มีรายงานว่า สามารถใช้ capillary electrophoresis ในการจำแนกสายพันธุ์เห็ดได้ (Kirihara , 1999) จากการวิเคราะห์หารูปแบบไอโซไซม์ esterase, peroxidase และ acid phosphatase ของเห็ดนางรมลูกผสม โดยใช้ polyacrylamide gel 8.5% ผลปรากฏว่า ไซโมแกรมของเส้นใยเห็ดลูกผสมมีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนกับไซโมแกรมของเส้นใยพ่อแม่(เจนฟาง, 2540) จากการทดลองของ Chang (1972) พบว่าไซโมแกรมของเส้นใยเห็ดฟางที่ได้จากการหารูปแบบไอโซไซม์ peroxidase มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับผลผลิตและระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน และจากการทดสอบถึงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของ RNA โดยให้เส้นใยเห็ดฟางได้รับอุณหภูมิต่ำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (cold-shock) แล้ววิเคราะห์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าการได้รับอุณหภูมิต่ำนี้จะชักนำให้เกิดรูปแบบใหม่ของการแสดงออกของยีน (Chen , 1999)