บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

เห็ดหอมเดิมมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Agaricus edodes* โดย Berkeley 1877 (Stamets, 1993) หลังจากนั้นได้มีการเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Cortinellus shiitake*, *Cortinellus edodes*, *Cortinellus berkeleyanus*, *Armillaria eddes* และต่อมาเป็น *Lentius edodes* ซึ่งเป็นชื่อที่ผู้เพาะเห็ดหอมคุ้นเคยกันมาก (Tokimoto and Komatsu, 1978) แต่ปัจจุบันได้มีการเปลี่ยนชื่อสกุลเป็น *Lentinula* โดย Pegler ซึ่งนักอนุกรมวิธานต่างเห็นด้วยกับการจำแนกของ Pegler ดังนั้นเห็ดหอมจึงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Stamets, 1993 and FAO, 1990)

เห็ดหอมเป็นเห็ดที่ประชาชนทางเอเชียตะวันออกนิยมรับบริโภคกันมาก โดยเฉพาะประเทศจีน และ ญี่ปุ่น ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่นิยมบริโภคเห็ดชนิดนี้ (วสันณ์, 2536)

การเพาะเห็ดหอมในครั้งแรกนั้นจะเพาะบนท่อนไม้เช่นไม้โอ๊ก ไม้ก่อ แต่ในปัจจุบันเราสามารถเพาะเห็ดหอมในถุงเพาะได้ (Chang and Miles, 1989) ข้อดีในการเพาะในถุงจะช่วยลดระยะเวลาในการบ่มเส้นใยเพื่อให้เกิดดอกได้และผลผลิตต่อน้ำหนักของวัสดุเพาะจะมากกว่าเพาะบนท่อนไม้ ส่วนข้อเสียของการเพาะในถุง คือ ต้องใช้เทคนิคการเตรียมถุงและต้องรักษาความสะอาดมากกว่าการเพาะบนท่อนไม้ การเพาะเห็ดหอมในถุงเพาะเพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดีนั้น ประการสำคัญที่สุดคือต้องเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสม โดยแต่ละสายพันธุ์จะอัตราการเติบโตบนอาหารต่างกัน และขึ้นกับ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการบ่มเชื้อเพื่อให้เกิดดอก การต้านทานต่อการปนเปื้อนเชื้อราชนิดอื่นๆ ผลผลิตที่ควรจะได้ต่อน้ำหนักวัสดุเพาะ เนื่องจากสายพันธุ์จะมีผลต่อการผลิตเห็ดหอมอย่างมาก และการใช้สายพันธุ์เดิมอยู่ตลอดอาจทำให้ผลผลิตค่อยๆลดลงตามระยะเวลาการใช้ การเปลี่ยนแปลงนี้อาจใช้ระยะเวลาตั้งแต่หลายเดือนไปเป็นปี การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้เป็นเรื่องซับซ้อนที่ยังควบคุมไม่ได้ ดังนั้นการผลิตเห็ดหอมเชิงการค้าควรจะมีสายพันธุ์ที่ดีหลายสายพันธุ์ เพื่อการผลิตอย่างมีเสถียรภาพ (Albert, 1993)

ลักษณะทางอัณฐานวิทยา

1. หมวกดอก (Cap หรือ Pileus) เป็นส่วนปลายสุดของดอกที่เจริญเติบโต หมวกดอกมีลักษณะกลม ผิวหมวกดอกด้านบนจะมีสีน้ำตาล น้ำตาลปนแดง หรือน้ำตาลเข้ม เห็ดหอมที่หมวก

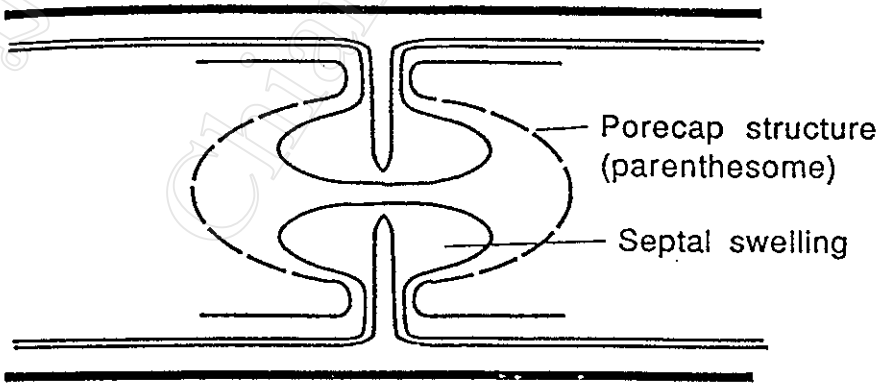
ดอกสีขาวจะพบน้อยมาก ขนาดของหมวกดอกจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ของเห็ดหอม เห็ดหอมบางพันธุ์อาจมีขนหรือเกล็ดหยาบๆติดอยู่บนหมวกดอกก็ได้

2 ครีบดอก (Gills หรือ Lamellae) ครีบดอกของเห็ดหอมจะมีลักษณะเป็นแผ่นบางสีขาว เรียงรัศมีรอบก้านดอก เมื่อดอกแก่ครีบดอกจะมีสีน้ำตาล

3 สปอร์ (Spore) สปอร์ของเห็ดหอมไม่มีสี ผนังบาง สปอร์มีลักษณะค่อนข้างกลม เมื่อสปอร์อยู่รวมกันจะมีสีขาว ขนาดของสปอร์ประมาณ 10.62x11.25 ไมครอน (วสันต์, 2536) การสร้างสปอร์และการปลดปล่อยสปอร์นั้น จะเกิดที่ครีบดอก โดยจะมีแบซิเดียเรียงเป็นแถวซึ่งมีระยะการเติบโตที่แตกต่างกัน ปกติจะมี 4 สปอร์ต่อ 1 แบซิเดีย มีจำนวนน้อยที่อาจจะมี 5 หรือ 6 สปอร์ การปลดปล่อยสปอร์เกิดบริเวณ ไฮยาโลพลาสมิก (hyaloplasmic) ซึ่งอยู่ที่ขั้วของสปอร์และปลายของ sterigma เมื่อไฮยาโลพลาสมิกแบ่งตัวจะทำให้เกิดการปล่อยสปอร์ (Tokimoto and Komatsu, 1978)

4 ก้านดอก (Stalk หรือ Stipe) ก้านของเห็ดหอมจะมีสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อนแต่ถ้าถูกกับอากาศจะมีสีเข้ม ก้านดอกของเห็ดหอมมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 ซม. เมื่อดอกเห็ดเจริญเต็มที่ก้านดอกของเห็ดหอมจะเหนียว (วสันต์, 2536)

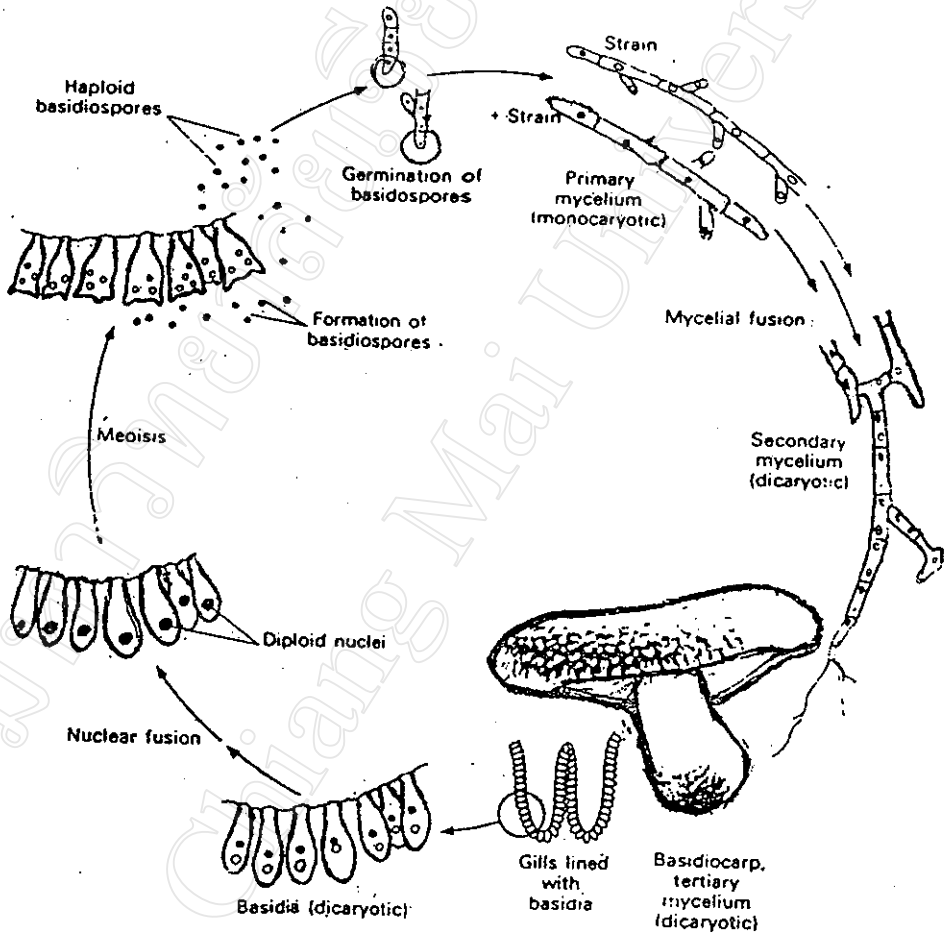
5. เส้นใย จากการศึกษาเส้นใยนิวเคลียสคู่ของเห็ดด้วยกล้องอิเลคตรอน พบว่าโครงสร้างผนังที่กั้นระหว่างเซลล์ ที่เรียกว่า dolipore structure นั้นมีลักษณะพองโต (septal swelling) และโครงสร้างเหมือนรอยปรุ (parenthesome) อีกด้วย (Tokimoto and Komatsu, 1978) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้างผนังกั้นระหว่างเซลล์ของเส้นใยเห็ด (Miles, 1993)

วงจรชีวิตของเห็ดหอม (Tokimoto and Komatsu, 1978)

เห็ดหอมจัดเป็นเห็ดที่มีวงจรชีวิตแบบ Heterothallic (ภาพที่ 2) คือเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่งอกจากสปอร์ต้องผสมข้ามกับเส้นใยที่เข้ากันได้จึงจะสามารถพัฒนาต่อไปจนเกิดเป็นดอกเห็ดได้ ลักษณะการงอกของสปอร์ การเจริญเติบโตของเส้นใยและการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยมีดังนี้



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของเห็ดหอม (วสันต์, 2536)

1. เมื่อดอกเห็ดหอมเจริญเติบโตเต็มที่ จะมีการสร้างสปอร์ เรียกว่าเบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) สปอร์พวกนี้มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว n = 8 (haploid) เมื่อสปอร์ปลิวไปตกในบริเวณที่เหมาะสมก็จะงอกเส้นใยออกมา จากนั้นเส้นใยจะแบ่งตัวแบบ mitosis เส้นใยที่งอกจากสปอร์ดังกล่าวนี้

แต่ละเซลล์จะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว n = 8 (haploid) เรียกว่าเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวหรือเส้นใยขั้นแรก (monokaryotic mycelium หรือ primary mycelium)

2. เส้นใยขั้นแรกที่เข้ากันได้ (compatible) ของต่างสปอร์กัน จะรวมตัวกันโดยผนังของเส้นใยเชื่อมต่อกันจากนั้น cytoplasm จะไหลรวมกัน เส้นใยที่เกิดใหม่จะมี 2 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ เรียกว่าเส้นใยขั้นที่สองหรือเส้นใยนิวเคลียสคู่ (secondary mycelium หรือ dikaryotic mycelium) เส้นใยขั้นที่สองจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและมีการสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) เชื่อมต่อระหว่างเซลล์

3. เส้นใยขั้นที่สองจะเพิ่มปริมาณมากขึ้น และรวมกันเป็นกลุ่มก้อน เรียกเส้นใยระยะนี้ว่า เส้นใยระยะที่ 3 (tertiary mycelium) และมีการสะสมอาหารมากขึ้น จากนั้นเส้นใยจะค่อยๆพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดและเจริญเติบโตต่อไป แต่ยังมี 2 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์

4. ดอกเห็ดพัฒนาจนมีรูปร่างคล้ายร่มจะมีการสร้าง basidium เป็นรูปกระป๋อง นิวเคลียสทั้งสองในเบซิเดียมจะรวมตัวกัน และมีโครโมโซมเป็น 2n จากนั้นมีการแบ่งตัวแบบ meiosis ทำให้นิวเคลียสที่เกิดใหม่มีจำนวนโครโมโซมลดลงเป็น n (haploid) ขณะเดียวกันเบซิเดี่ยมจะสร้าง sterigma ขึ้นมา 4 อัน ต่อมานิวเคลียสแต่ละอันจะเคลื่อนไปสู่ปลาย sterigma แล้วพองออกเป็นรูปร่างค่อนข้างกลม พัฒนาไปเป็นเบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) 4 อัน สปอร์ดังกล่าวเมื่อปลิวไปตกในบริเวณที่เหมาะสมก็จะพัฒนาไปเป็นเส้นใยต่อไป

ปัจจัยสภาพแวดล้อมต่อการเจริญเติบโตและการเกิดดอกของเห็ดหอม

ธาตุอาหาร

1. คาร์บอนและไนโตรเจน

แหล่งคาร์บอนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเห็ดหอม ได้แก่พวก โมโนแซคคาร์ไรด์ โอลิโกแซคคาร์ไรด์ และโพลี่แซคคาร์ไรด์ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตเข้มข้น 3-5% ในอาหารเหลวเป็นปริมาณที่พอเหมาะต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหอม สารคาร์บอนที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต เช่น เอธานอล และกลีเซอร์ลีน สามารถเสริมการเจริญของเส้นใยได้ดี (Tokimoto and Komatsu, 1978) อย่างไรก็ตามกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด รองลงมาก็คือ ฟรุคโตส และ ซูโครส (Kaur and Lakhanpal., 1995)

ส่วนแหล่งไนโตรเจน พวก peptone, L-amino acid, urea และเกลือแอมโมเนียมอื่นๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใย (Tokimoto and Komatsu, 1978) โดย peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด (Kaur and Lakhanpal., 1995) ในขณะที่ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของไนเตรตและไนไตรท์ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะ

สมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยจะแตกต่างไปตามชนิดของไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต 0.03% หรือกรดคาร์ซามิโน (casamino acid) 0.03% หรือ แอมโมเนียมทาร์เทรต 0.06% (Tokimoto and Komatsu, 1978)

การเกิดปุ่มดอกต้องการคาร์บอนและไนโตรเจนในความเข้มข้นสูงแต่ถ้ามีไนโตรเจนสูงเกินไป เช่น ถ้ากรดคาร์ซามิโนสูงถึง 0.02 % จะยับยั้งการเกิดปุ่มดอก การเกิดปุ่มดอกต้องใช้คาร์โบไฮเดรต ถ้ามีน้ำตาลมากถึง 8% ในรูปของแซคคาโรส การเกิดดอกจะยิ่งให้ผลมากขึ้น การพัฒนาของดอกเห็ดจะเกิดขึ้นพร้อมกับการใช้คาร์บอนและไนโตรเจนอย่างรวดเร็ว และพบว่าน้ำหนักแห้งและปริมาณคาร์บอนของเส้นใยที่ยังไม่พัฒนาเป็นดอกเห็ดจะคงที่ ยกเว้นตอนเริ่มเกิดดอก ระยะแรกเส้นใยจะมีคาร์โบไฮเดรลดลง (Tokimoto and Kawai, 1975)

2. แร่ธาตุและไทเอมีน

แมงกานีส เหล็ก และสังกะสีอย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และการเพิ่มแมกนีเซียม ซัลเฟอร์ โปแตสเซียม และฟอสฟอรัส จะทำให้การเติบโตของเห็ดหอมดีขึ้น ส่วนผสมของทองแดง โมลิบดินัม และโคบอลท์จะเร่งการเติบโตภายใต้สภาพ เหล็ก สังกะสี และแมงกานีสที่มีอยู่จำนวนมาก ไทเอมีนจะเป็นปัจจัยสำหรับการเจริญเติบโต โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมประมาณ 100 ไมโครกรัม (Ishikawa, 1967) สำหรับการเติบโตของปุ่มดอกเห็ด ไทเอมีนในวัสดุเพาะให้ผลไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Tokimoto and Kawai, 1975) ปริมาณไทเอมีนและกิจกรรมของไทเอมีนจะมีมากในครีบเห็ด (Ono and Kawasaki, 1968) การเพิ่มอะดีนีน หรือ ไซโตไคซีนลงไปในวัสดุเพาะจะกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ แต่ ไคเนติน IAA และ GA ไม่มีผล (Ishikawa, 1967) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Kaur *et al.* (1995) พบว่า ไทเอมีนไฮโดรคลอไรด์ 20 ppm GA 20-40 ppm และ แมงกานีส 2 ppm ทำให้การเจริญเติบโตของเห็ดหอมดีขึ้น

สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH)

หลังจากเส้นใยเห็ดหอมเจริญในอาหารเหลวจะทำให้ pH ในอาหารเริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว การลด pH นั้นเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น อะซีติก ซัคซินิค และออกซาลิก pH ช่วง 3-6 เส้นใยสามารถเจริญเติบโตได้ แต่ pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 5-6 ทั้งที่เลี้ยงในอาหารวุ้นและอาหารเหลว อย่างไรก็ตาม หาก pH ในอาหารคงที่ พบว่าที่ pH 3.5 จะทำให้การเจริญเติบโตของเส้นใยดีที่สุด ส่วน pH 3.5-4.5 สามารถทำให้เกิดปุ่มดอกและเกิดดอกได้ดี การเกิดกรดอินทรีย์ในวัสดุเพาะ อย่างน้อยอาจช่วยให้วัสดุเพาะเป็นกรดได้ (Tokimoto and Kawai, 1975)

ออกซิเจน

เส้นใยเห็ดหอมที่เจริญในอาหารเหลวที่มี pH คงที่เท่ากับ 3.5 จะเจริญได้ดีเมื่อได้รับออกซิเจน เมื่อค่าของ Kd มีค่าเป็น 0.2-0.3 x 10^{-6} gm. mole of O_2 /atm. min. ml of medium (Ishikawa, 1967)

แสง

แสงจำเป็นต่อการเกิดดอก แต่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย ความเข้มแสงต่ำสุดประมาณ 10^{-2} ถึง 10^{-4} lux จะช่วยให้เกิดปุ่มดอกได้ โดยความเข้มแสงที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 10 lux การได้รับแสงนานขึ้นจะช่วยเพิ่มการเกิดดอกได้ ความยาวคลื่นแสงที่ทำให้เกิดปุ่มดอกได้อยู่ระหว่าง 370 ถึง 420 นาโนเมตร การได้รับแสงความยาวคลื่นดังกล่าวทำให้เส้นใยพัฒนากลายเป็นดอก คลีบเห็ด และสปอร์ได้ (Komatsu, 1963) ในสภาพความมืด หรือความสว่างน้อยกว่า 5 lux มีผลทำให้การพัฒนาของหมวกดอกเห็ดและครีบเห็ดลดลง และมักไม่พบก้านชูสปอร์ (Tokimoto and Kawai, 1975)

อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดหอมประมาณ 25 °C ถ้าต่ำกว่า 5 °C และมาก 35 °C การเจริญเติบโตของเส้นใยจะหยุดชะงักลง ในสภาพอุณหภูมิในอาหารเหลวสูง เช่นที่ 45 °C จะทำให้เส้นใยตายภายในเวลา 40 นาที (Tokimoto and Komatsu, 1978) อุณหภูมิต่ำชักนำให้เกิดดอก แต่ก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (Ando *et al*, 1969)

การเพาะเห็ดหอมในถุงพลาสติก

การเพาะเห็ดหอมในถุงพลาสติกเริ่มแรกนั้นเกิดขึ้นที่ญี่ปุ่น ไต้หวัน และจีน เป็นเทคนิคที่ทำให้ได้ผลผลิตของเห็ดหอมเร็วกว่าการเพาะด้วยท่อนไม้ และการเพาะเห็ดหอมในถุงพลาสติกนิยมทำกันมากในปัจจุบัน วัสดุที่ใช้เพาะได้แก่ ขี้เลื่อย รำละเอียด เมล็ดข้าวฟ่าง ธาตุอาหารต่างๆ และวิตามิน ขี้เลื่อยที่นิยมใช้นั้นจะเป็นขี้เลื่อยไม้เนื้ออ่อน บางครั้งอาจใช้ผสมร่วมกับไม้เนื้อแข็ง (FAO,1990) Royse (1985) รายงานว่าขี้เลื่อย 80% ข้าวโพดป่น 10% และข้าวฟ่าง 10% เป็นสูตรที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเพาะเห็ดหอมและเป็นสูตรที่นิยมใช้ในทางการค้า หลังจากผสมวัสดุเพาะแล้วควรปรับความชื้นให้อยู่ระหว่าง 55-68%

ระยะเวลาที่เส้นใยเดินได้ตั้งแต่ 18-100 วัน ควรได้รับแสง 4/20 ชั่วโมง (มืด/สว่าง) อุณหภูมิ 23-25 °C เมื่อปล่อยให้เจริญต่อไปผิวหน้าของก้อนเห็ดจะมีสีน้ำตาล และมีของเหลวผลิตที่ใต้ถุงพลาสติกซึ่งเป็นลักษณะที่ปกติ การใช้ระยะเวลาบ่มให้นานจะมีผลทำให้ผลผลิตสูงขึ้นกว่าการบ่มที่ใช้ระยะเวลาสั้น (FAO, 1990)

เมื่อสิ้นสุดการบ่ม จะตัดพลาสติกส่วนบนของถุงออก จะพบเส้นใยที่รัดก้อนขี้เลื่อย การตัดควรเหลือถุงพลาสติกไว้บ้างเพื่อช่วยเก็บความชื้น จากนั้นจึงนำก้อนเห็ดดังกล่าวไปวางไว้ในสภาพที่มีความชื้น 95-98% ความเข้มแสง 50 lux 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 14-16 °C ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ควรต่ำกว่า 1200 ppm จากนั้นจะเริ่มปรากฏปุ่มเห็ดภายใน 7-10 วัน และเริ่มแก่ภายใน 11-14 วัน (FAO, 1990)

การกระตุ้นให้เกิดดอกของเห็ดหอม

การกระตุ้นเห็ดหอมควรได้รับสภาพอากาศที่มีความหนาวเย็น สำหรับพื้นที่ที่อุณหภูมิสูงให้นำก้อนเชื้อไปเก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 10 °C นาน 2 คืน สำหรับสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำบ้าง ก็สามารถเปิดก้อนได้เลย แล้วใช้น้ำเย็นฉีดพ่นติดต่อกันประมาณ 1 วันหรือนำก้อนไปแช่น้ำเย็นประมาณ 18 °C นาน 1 คืน จากนั้นนำก้อนที่ผ่านความเย็นแล้วไปวางไว้ในโรงเรือนที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่า 85% ระบบการถ่ายเทอากาศดี อุณหภูมิปานกลาง 25-28 °C มีแสงสว่างเล็กน้อย (บรรณ, 2542) อย่างไรก็ตามขั้นตอนหนึ่งที่ควรทำก่อนการกระตุ้นให้เกิดดอกของเห็ดหรือเปิดดอกควรมีการทดสอบการสร้างปุ่มดอกของลูกผสมให้ได้ในห้องปฏิบัติการก่อน ซึ่งการทดสอบดังกล่าวจะช่วยลดงานที่ต้องทำในโรงเรือนได้อย่างมาก (สุมาลี, 2541)

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมโดยการผสมข้าม

เห็ดหอมมีระบบการผสมพันธุ์แบบปัจจัยคู่ (bifactorial heterothallism หรือ tetrapolar mating system) (FAO , 1990; และ ฉัฏฐยา, 2540) เป็นระบบที่การแสดงออกของเพศหรือระบบการเข้ากันไม่ได้ ถูกควบคุมด้วยปัจจัยทางพันธุกรรม 2 ปัจจัยคือ A และ B โดยทั้งสองปัจจัยมีการกระจายแบบอิสระต่อกัน แสดงว่ามีตำแหน่งบนแท่งโครโมโซมคนละแท่ง โดยตำแหน่งทั้งสองของปัจจัย A และ B จะมีหลายคู่ยีน (2 loci/multiple alleles) (Tokimoto and Komatsu, 1978; Peberdy *et al* , 1993 and Miles , 1996) การผสมพันธุ์จะประสบผลสำเร็จจนได้เส้นใยนิวเคลียสคู่นั้น เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวทั้งสองจะต้องพาเอาคู่ยีนที่ต่างกันมาจับคู่กัน หรือผสมข้ามจนเกิดเส้นใยที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ที่สมบูรณ์ กลายเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ที่สามารถพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดได้ (ฉัฏฐยา , 2540) ในระบบการผสมพันธุ์แบบปัจจัยคู่นี้ ทั้งปัจจัย A และ B จะควบคุมลักษณะที่แตกต่างกันหรือมีผลต่อการผสมพันธุ์ ดังตารางที่ 1 (Miles, 1996)

ในช่วงผสมพันธุ์ ปัจจัย A จะควบคุมการจับคู่กันของนิวเคลียสและการเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์ ปัจจัย B จะควบคุมการเคลื่อนย้ายหรืออพยพของนิวเคลียสและการเชื่อมกันของปลายข้อยึดระหว่างเซลล์

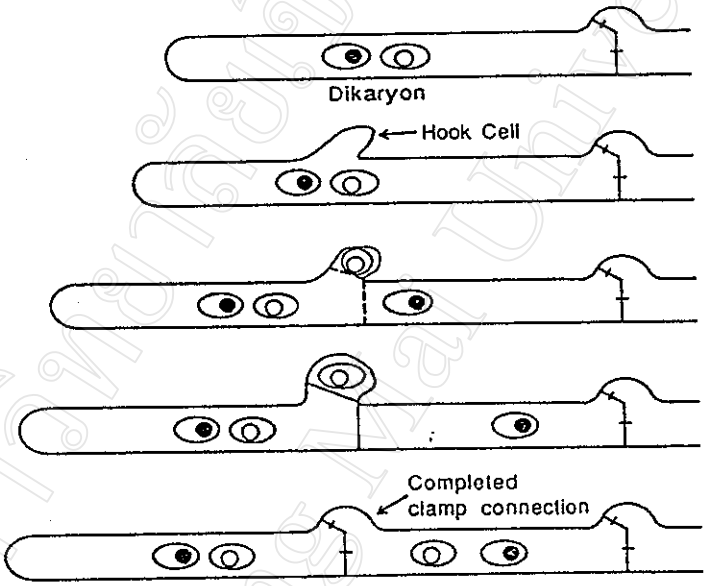
ตารางที่ 1 การควบคุมการแสดงออกของเพศที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเส้นใย

การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (Morphogenesis event)	ปัจจัยควบคุมการแสดงออกของเพศ (Control by mating type factors)	
	A ต่าง	B ต่าง
การเคลื่อนย้ายนิวเคลียส (nuclear migration)		X
การจับคู่ของนิวเคลียส (nuclear pairing)	X	
การแบ่งตัวของนิวเคลียสทั้งสอง (conjugate division)	X	
การเริ่มเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์ (Hook-cell formation)	X	
เกิดผนังกั้นข้อยึดระหว่างเซลล์ (Hook-cell septation)	X	
การเชื่อมกันของข้อยึดระหว่างเซลล์ (Hook-cell fusion)		X

หมายเหตุ : X แทนการมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง

ถ้าปัจจัย A มีคู่ยีนที่ต่างกัน ปัจจัย B มีคู่ยีนเหมือนกัน (A≠B=) เรียกว่าผสมเข้ากันได้เพียงกึ่งเดียว (hemicompatible) มีการจับคู่กันของนิวเคลียส แต่ไม่มีการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสจึงไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ แม้ว่าจะมีนิวเคลียสที่ต่างกัน (heterokaryon) โดยเซลล์ปลายเส้นใยมีนิวเคลียสคู่และเซลล์ถัดปลายลงมาจะมีนิวเคลียสเดี่ยวกับมีข้อยึดหลอกระหว่างเซลล์ (ข้อยึดระหว่างเซลล์ไม่เชื่อมกับเซลล์ที่มีถัดมา ดังนั้นจึงขังนิวเคลียสลูกไว้หนึ่งตัวทุกครั้งที่มีการแบ่งเซลล์) สรุปคือ เส้นใย A≠B= มีนิวเคลียสที่ต่างกัน แต่เนื่องจากไม่มีการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส ดังนั้นนิวเคลียสจึงจำกัดอยู่ตรงบริเวณที่เส้นใยสัมผัสกัน ส่วนการที่ปัจจัย A เหมือนกันแต่ปัจจัย B ต่างกัน (A=B≠) ก็เป็นการผสมที่เข้ากันได้เพียงกึ่งเดียว เช่นกัน มีการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส ถือว่าเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryon) ที่ประกอบด้วยเส้นใยที่เซลล์มีหลายนิวเคลียส (multikaryotic cells) แต่จำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์ไม่แน่นอน เกิดผนังกั้นเซลล์ขึ้น แต่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซลล์จึงไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ สรุปคือ เส้นใย A=B≠ ถือว่ามีนิวเคลียสที่ไม่เหมือนกัน และเนื่องจากการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสจะไม่มีข้อจำกัดและเกิดขึ้นตลอดเส้นใยของทั้งคู่ บางครั้งสามารถจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานว่าแตกต่างจากเส้นใยที่มีนิวเคลียสที่ต่างกัน (heterokaryon) และที่เหมือนกัน (homokaryon) โดยมันจะไม่สร้างเส้นใยที่มีลักษณะฟู (aerial hyphae) และมีลักษณะการเติบโตที่ไม่ดีและไม่ปกติ จึงเรียกว่ามีลักษณะแบน (flat) เนื่องจากเส้นใยมีลักษณะที่แบนติดวุ้นนั่นเอง ถ้าคู่ยีนทั้งสองต่างกันคือ (A≠B≠) จะสามารถผสมเข้ากันได้ดี ทำให้เกิดเส้นใย

นิวเคลียสคู่ที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ที่สมบูรณ์ คือสามารถสร้างดอกเห็ดได้อย่างไม่มีข้อจำกัด (ณัฏฐยา, 2540) การเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์ (ภาพที่ 3) นั้นจะเกิดร่วมกับการแบ่งตัวของนิวเคลียสทั้งสอง โดยข้อยึดระหว่างเซลล์นั้นจะเริ่มเกิดเมื่อเซลล์อยู่ในระยะเมตาเฟส และจะสิ้นสุดในระยะเทโลเฟส โดยที่ระยะเมตาเฟสนั้นจะมีโครโมโซม n=8 ซึ่งเท่ากับจำนวนที่เกิดจากการแบ่งตัวแบบลดจำนวนในแบซิเดียม (basidium) (Tokimoto and Komatsu, 1978)



ภาพที่ 3 การเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์ นิวเคลียสที่เข้ากันได้จะถูกกระตุ้นทำให้เกิดการแบ่งตัว เริ่มเกิดตะขอของเซลล์เพื่อให้นิวเคลียสที่เกิดจากการแบ่งตัวเข้าไปอยู่ แล้วเชื่อมกับอีกเซลล์จนกลายเป็นข้อยึดระหว่างเซลล์ที่สมบูรณ์ การเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์จะเกิดที่ปลายเซลล์ (เส้นใย) (Miles, 1993)

การที่ปัจจัย A และ B อิสระจากกัน ดังนั้นในการผสมข้ามระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่มีชีนการแสดงออกของเพศเป็น A1B1 กับ A2B2 มีโอกาสที่จะได้สปอร์ทั้ง 4 ที่สร้างใน basidium เป็น A1B1, A2B2, A1B2, A2B1 และการจับกลุ่มผสมของเส้นใยทั้ง 4 กลุ่ม เป็นดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รูปแบบการผสมเข้ากันได้ของเห็ดที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบปัจจัยคู่

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

- \- ผสมเข้ากันไม่ได้
- \+ ผสมกันได้อย่างสมบูรณ์ เป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryon) มีข้อยึดระหว่างเซลล์อย่างสมบูรณ์
- (+) ผสมได้กึ่งเดียว เซลล์มีจำนวนนิวเคลียส 1 ถึง 3 อัน ข้อยึดระหว่างเซลล์ไม่สมบูรณ์
- F ผสมได้กึ่งเดียว แต่ละเซลล์มีนิวเคลียสจำนวนมากไม่แน่นอน ข้อยึดระหว่างเซลล์ไม่สมบูรณ์ (ภัทราภรณ์, 2540 ; ณัฏฐยา, 2540)

การผสมพันธุ์โดยการผสมข้ามนิยมทำในเห็ด *Agaricus bitorquis Lentinula edodes* และ *Pleurotus spp.* บนผิววุ้น โดยวางสายพันธุ์ที่ต้องการผสมไว้ 2 จุด แล้วให้เส้นใยเจริญมาผสมกัน หากผสมเข้ากันได้จะทำให้ได้เส้นใยนิวเคลียสคู่ตัวใหม่ที่ได้รับพันธุกรรมของเห็ดต่างสายพันธุ์กันสองสายพันธุ์ เห็ดลูกผสมที่ได้จะเจริญแตกต่างไปจากเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวเดิมคือ เส้นใยจะเติบโตอย่างแข็งแรง และสามารถเจริญต่อไปจนกลายเป็นดอกเห็ดได้ ซึ่งทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ในด้านผลผลิต การให้ผลผลิตเร็ว คุณภาพของดอกเห็ด ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะที่ได้มาจากการผสมข้าม (FAO, 1990) การผสมปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามอีกแบบหนึ่งก็คือการใช้เส้นใยนิวเคลียสคู่ผสมกับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ซึ่งเรียกการผสมพันธุ์นี้ว่า di-mon crossing การผสมพันธุ์ด้วยวิธีการนี้ทำให้นิวเคลียสใดนิวเคลียสหนึ่งหรือทั้งสองนิวเคลียสของเส้นใยนิวเคลียสคู่ที่เข้ากันได้กับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว โดยจะเข้าไปรวมกันที่ปลายของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ทำให้ได้เส้นใยนิวเคลียสคู่ตัวใหม่ เส้นใยนิวเคลียสคู่นี้จะมีนิวเคลียสตัวใหม่ของเส้นใยนิวเคลียสคู่กับนิวเคลียสเดิมของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (ภัทราภรณ์, 2540) อย่างไรก็ตามการผสมพันธุ์เห็ดโดยการผสมแบบ di-mon crossing โดยการศึกษาของ Pan *et al.* (1994) พบว่าน่าจะเป็นวิธีการที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ได้ดี

ไอโซไซม์

Isozyme คือ เอนไซม์ชนิดเดียวกันที่มียีนต้นแบบมากกว่าหนึ่งยีน ทำให้มีโมเลกุลต่างกัน หรือเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่มีรูปร่างแตกต่างกัน (สุวรรณี, 2540) ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีองค์ประกอบต่างกัน คุณสมบัติของไฟฟ้าและโครงสร้างต่างกันแต่มีปฏิกิริยาเคมีชนิดเดียวกัน ไอโซไซม์ต่างๆเราสามารถสกัดได้จากพืช อาศัยเทคนิคทางด้านอิเลคโตรโฟลีซิส ซึ่งสามารถตรวจสอบความแตกต่างของไอโซไซม์ดังกล่าวได้ การตรวจสอบดังกล่าวสามารถเป็นตัวบ่งชี้ความสัมพันธุ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ หรือความแตกต่างทางด้านสายพันธุ์ (Royse and May, 1993) โดยเอนไซม์สามารถแบ่งได้ออกเป็น 6 กลุ่มใหญ่ๆโดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยา คือ

1. Oxido-reductase กลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาเกี่ยวกับออกซิเดชั่น รีดักชั่น (การถ่ายทอด e^-) ตัวอย่างได้แก่ ดีไฮโดรจีเนส ออกซีเดส รีดักเตส เปอร์ออกซิเดส เป็นต้น
2. Transferases เอนไซม์กลุ่มนี้จะเร่งปฏิกิริยาเกี่ยวกับการย้ายหมู่ต่างๆ เช่น หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่ฟอสเฟส จากสารประกอบชนิดหนึ่งให้กับสารอีกตัวหนึ่ง เช่น aminotransferase transaminase เป็นต้น
3. Hydrolyases เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เร่งสลายพันธะต่างๆของสารด้วยน้ำ เช่นการสลายพันธะเอสเตอร์ พันธะเปปไทด์ ฯลฯ เช่น esterase peptidase
4. Lyases เป็นเอนไซม์ที่เร่งการทำลายพันธะคู่ระหว่าง C=C , C=O, C=N โดยมีการเติมหมู่ต่างๆไปยังพันธะคู่เหล่านั้น เช่น decarboxylase aldolase ฯลฯ
5. Isomerases เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไปมาระหว่างไอโซเมอร์ในปฏิกิริยา recemization และ epimerization ตัวอย่างเช่น recemase epimerase mutase
6. Lygases เป็นเอนไซม์กลุ่มที่มีการเร่งปฏิกิริยาเกี่ยวกับการสร้างพันธะ C-O, C-S และ C-N โดยอาศัยพลังงานจากการสลาย ATP ได้แก่ synthetase carboxylase kinase (พนม, 2531)

ในการแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดหอม ได้มีการใช้ไอโซไซม์ esterase และศึกษาร่วมกับอัตราการเติบโตของเส้นใยที่เพาะในวัสดุเพาะ จนสามารถคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหอม 4 สายพันธุ์จากสายพันธุ์ทั้งหมด 22 สายพันธุ์ จากนั้นได้ทำการคัดเลือกโดยศึกษาการพัฒนาของดอก (Levanon *et al.*, 1993) นอกจากนี้ไอโซไซม์เอสเทอร์เรสที่ใช้ polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าค่า R_f เท่ากับ 0.47 สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดหอมทั้ง 7 สายพันธุ์ จึงสรุปว่าควรนำ esterase zymograms มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอม (Lee *et al.*, 1997)

งานวิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์เห็ด

การทดสอบผลผลิตของเห็ดหอม 60 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและคุณภาพของดอกดีนั้นมี 4 สายพันธุ์ คือ FRI188 (สายพันธุ์อุณหภูมิกลาง) ให้ผลผลิต 132 กรัมต่อวัสดุเพาะ 1

กิโลกรัม ตามด้วยสายพันธุ์ FRI169, FRI259 และ FRI262 (สายพันธุ์อุณหภูมิสูง) ซึ่งให้ผลผลิต 130, 121 และ 119 กรัมตามลำดับ จากนั้นนำสายพันธุ์เห็ดหอมสายพันธุ์ FRI188 มาทดสอบวิธีการกระตุ้นให้เกิดดอก และการเกิดดอก จากการทดสอบพบว่าการใช้น้ำเย็น 12 C° ให้ผลผลิตมากที่สุด คือ 283 กรัม ส่วนการแช่น้ำให้ผลผลิต 245 กรัม (Bak, 1996)

จากการทดสอบความสามารถในการเกิดดอกของสายพันธุ์เห็ดหอมที่ได้จากการหลอมรวมด้วยไฟฟ้า (electrofusion) 16 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับลูกผสมที่ได้จากการจับคู่ผสมระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว จำนวน 2 สายพันธุ์ พบว่า ลูกผสมที่ได้จาก electrofusion ให้ผลผลิตมากกว่าลูกผสมที่ได้จากการจับคู่ผสมกลับไปกลับมา ผลผลิตของเห็ดมีความสัมพันธ์ทางบวกกับการเจริญเติบโตของเส้นใย (Tokimoto *et al.*, 1998)

การปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดหอมโดยการใช้เทคนิคหลอมรวมโปรโตพลาส ระหว่าง Lc1 กับอีก 70 สายพันธุ์ ทำให้ได้สายพันธุ์ Shanghai 8 เป็นสายพันธุ์การค้าและใช้กันอย่างกว้างขวางในจีน (Oi *et al.*, 1999)

อิทธิพลของพันธุกรรมที่แตกต่างกันของเห็ดหอมนั้นมีผลต่อผลผลิตของเห็ดหอมที่เพาะในถุงพลาสติก โดยสายพันธุ์ KS-10 และ KS-9 มีช่วงพันธุกรรมที่กว้างจะให้ผลผลิตสูง ขณะที่สายพันธุ์ KS24 และ KS6 (สายพันธุ์หนาว) ให้ดอกเห็ดคุณภาพดีแต่ผลผลิตจะต่ำ (Ohga, 1998)

การจำแนกสายพันธุ์และชนิดของเห็ด โดยปกติสามารถจำแนกได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด เช่น สี ขนาด รูปร่างดอก ลักษณะการเพาะเช่น อุณหภูมิที่เกิดดอก อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใย นอกจากนี้ยังได้มีการใช้ไอโซไซม์เข้ามาช่วยในการจำแนกสายพันธุ์เห็ดได้ แต่ในปัจจุบันการจำแนกชนิดและสายพันธุ์เห็ดสามารถจำแนกได้ในระดับ DNA (Sunagawa *et al.*, 1995)

การผสมพันธุ์เห็ดหอมระหว่างสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในญี่ปุ่นกับสายพันธุ์ป่าจากไต้หวันและนิวกินี พบว่าสายพันธุ์ป่าที่นำมาจากประเทศปาปัวนิวกินีและไต้หวันสามารถผสมพันธุ์ได้กับสายพันธุ์เห็ดหอมที่ใช้เพาะเลี้ยงทั่วไปในประเทศญี่ปุ่นได้ และลูกผสมที่ได้ไม่เป็นหมัน จึงถือว่าจัดอยู่ในชนิดเดียวกัน นอกจากนี้สายพันธุ์ป่าที่ได้จากนิวกินีและไต้หวัน มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในญี่ปุ่นทั้งในด้านลักษณะทางกายภาพ และสัณฐานวิทยา ลูกผสมที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ญี่ปุ่นในด้านการเจริญเติบโตของเส้นใยและการออกดอก (Mori *et al.*, 1974)