บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางชีววิทยา

1.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางฟ้า

1.1.1 การจำแนกเห็ดนางฟ้า

ชื่อวิทยาศาสตร์ เห็ดนางฟ้า *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer

เห็ดนางฟ้าภูฐาน *Pleurotus pulmonarius*

Class	Basidiomycetes
Order	Agaricales
Family	Tricholomotaceae
Genus	*Pleurotus*

(Singer, 1975 , Smith, 1978)

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดนางฟ้าที่มีการเพาะอยู่ในประเทศไทยมีอย่างน้อย 2 ชนิด คือ

2.1 เห็ดนางฟ้าดั้งเดิม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus sajor-caju* ดอกเห็ดมีสีขาวนวลถึงสีน้ำตาลอ่อน ต้องการอุณหภูมิค่อนข้างต่ำในการออกดอก (18-25 องศาเซลเซียส) (ดีพร้อม, 2523) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใย อุณหภูมิ 19-21 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมต่อการเกิดดอกมากที่สุด (Chang and Miles, 1989) ลักษณะของดอกเห็ดนางฟ้า ประกอบด้วย ก้านดอกและหมวกดอก ที่ก้านดอกไม่พบวงแหวนและเปลือกหุ้มโคนก้าน การเจริญของดอกเห็ดเป็นแบบ gymnocarpic ก้านดอกติดกับหมวกตรงกลางหรือด้านข้าง ครีบติดกับก้านแบบ decurrent (วสันณ์, 2536) โคนก้านดอกเห็ดคล้ายเห็ดเป๋าฮื้อ ครีบสร้างสปอร์สั้นยาวสลับกันไปยาวลงมาถึงก้าน แต่ไม่ถึงโคนก้าน สปอร์มีรูปไข่ ไม่มีสี (อานนท์, 2523) เห็ดนางฟ้าจะออกดอกเดี่ยวๆหรือเป็นกลุ่ม ดอกเห็ดลักษณะเหมือนเห็ดเป๋าฮื้อและเห็ดนางรม เมื่อโตเต็มที่อาจเจริญเป็นแฉกม้วนเข้าทำให้ดูคล้ายกับปะการัง ดอกเห็ดสดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-14 เซนติเมตร น้ำหนักดอกๆละ 30-120 กรัม มีเนื้อสัมผัสกรอบ เส้นใยของเห็ดนางฟ้ามีสีขาว เส้นใยจะไม่มีการสร้าง coremium เหมือนเห็ดเป๋าฮื้อ (วีระศักดิ์, 2529) เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เส้นใยมีสีใสมีผนังกั้นแบ่งออกเป็นช่องๆ เส้นใยขั้นที่ 1 หรือเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryon) ไม่มีการสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) ส่วนเส้นใย

ขั้นที่ 2 หรือเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryon) จะพบการสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) บริเวณผนังกั้นเซลล์ (ภาพที่ 1) ลักษณะการสืบพันธุ์ทางเพศเป็นแบบผสมข้าม โดยมียีนควบคุมการผสมแบบ tetrapolar (วสันณ์, 2536)

2.2 เห็ดนางฟ้าภูฐาน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus pulmonarius* ดอกมีสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งมีความทนทานต่อช่วงอุณหภูมิสูงหรือต่ำในการออกดอกได้ค่อนข้างกว้าง (15-32 องศาเซลเซียส) (ดีพร้อม, 2523) ลักษณะดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน มีหมวกดอก (pileus) ขนาด 2-15 เซนติเมตร แผ่กว้างคล้ายกับใบลาน ดอกมีเนื้อสัมผัสเหนียว สีของดอกแปรเปลี่ยนได้ตามสภาพแวดล้อม ได้แก่ เมื่อได้รับแสงมากและอากาศเย็นจะมีสีเข้มมากขึ้น ผิวของดอกด้านบนเรียบไม่มีขน (ในขณะที่พบขนบนผิวดอกเห็ดนางรม) เมื่อดอกเห็ดยังอ่อนขอบดอกจะม้วนงอเข้าไปทางครีบ โดยจะคลี่ออกเมื่อโตเต็มที่ ขอบดอกจะบานขึ้นไปทางด้านบนตรงข้ามกับรอยต่อระหว่างหมวกดอกกับก้านจะมีรอยเว้าเข้าข้างใน ก้านดอกมีขนาด 0.3-1.6 เซนติเมตร ยาว 3.2-13.2 เซนติเมตร ครีบดอก มีครีบเล็กๆ จำนวนมาก ปลายขอบดอกมีลักษณะคล้ายครีบของปลา เป็นแผ่นบางเล็กๆ สั้นและยาวสลับกัน สปอร์มี 4 อัน เกิดที่ปลายก้านชู (sterigma) บนแบสิเดียม (basidium) สปอร์มีรูปร่างคล้ายกับไข่หรือเมล็ดข้าว กว้างประมาณ 2.5-3.5 ไมครอน ยาวประมาณ 6.0-7.5 ไมครอน เส้นใยของเห็ดนางฟ้าภูฐานเหมือนเส้นใยของเห็ดนางฟ้า (Chang and Miles, 1989)

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยและการเกิดดอกเห็ด

3.1 อุณหภูมิ อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งต่อการเจริญของเห็ด การสร้างส่วนสืบพันธุ์และการงอกสปอร์ (Bisby, 1943) ในการเพาะเห็ดนางฟ้าปรากฏว่าที่อุณหภูมิ 15 และ 35 องศาเซลเซียส เห็ดนางฟ้าไม่เกิดดอก สำหรับอุณหภูมิ 25 องสาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะในการเกิดดอก (Jandaik and Kapoor, 1974) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นดอกของเห็ดนางฟ้าประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส การให้ก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าได้รับอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาหนึ่ง ช่วยชักนำให้เห็ดนางฟ้าออกดอกดีขึ้น (วสันณ์, 2536)

3.2 ความชื้น ความชื้นในกรณีของการเพาะเห็ดแบ่งเป็น 2 อย่าง คือ ความชื้นบนวัสดุเพาะและความชื้นในอากาศ

ความชื้นวัสดุเพาะ (moisture) การเพิ่มความชื้นในวัสดุเพาะทำได้โดยการรดน้ำแต่ต้องระมัดระวังมิให้มากเกินไปหรือเปียกเกินไป เพราะจะทำให้เส้นใยชะงักการเจริญจนมีจุลินทรีย์พวกอื่น เช่น บักเตรี เจริญแทน การปล่อยให้วัสดุเพาะเปียกเกินไปยังทำให้อากาศในวัสดุเพาะลดลงจนเกิดการขาดออกซิเจน เส้นใยอาจเจริญไม่ดีหรือไม่เจริญ หรือตายได้ แต่ถ้าทิ้งให้แห้งเกินไปก็จะขาดน้ำ จนสารที่เป็นอาหารไม่ละลาย หรือสูญเสียน้ำออกไปจากเส้นใยเห็ดทำให้เส้นใยเจริญไม่ได้

ภาพที่ 1 แสดงข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) ของเห็ดนางฟ้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ความชื้นในอากาศ (humidity) การเพิ่มความชื้นในอากาศทำได้โดยการพ่นละอองน้ำในอากาศ ถ้าการหมุนเวียนของอากาศมีมากเกินไป ก็มักจะทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ (relative humidity) ลดลง ดอกเห็ดโดยทั่วไปบอบบาง และมีน้ำเป็นส่วนประกอบมากถึงประมาณ 90% ถ้าความชื้นในอากาศมีน้อยก็จะเกิดการระเหยน้ำออกไปจากดอกเห็ด ทำให้ดอกเห็ดแห้งและชะงักการเจริญ ถ้าความชื้นมากไปจะเกิดเส้นใยฟูขึ้นแถวโคนดอกเห็ด ดอกเห็ดที่ได้จะมีลักษณะคุณภาพต่ำ คือ ฉ่ำน้ำ และการเกิดดอกจะลดลงมาก (ดีพร้อม, 2524) เห็ดนางฟ้าต้องการความชื้นสูง สภาพของโรงเรือนควรมีความชื้นไม่ต่ำกว่า 80-85 % (วสันณ์, 2536)

3.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีผลต่อการพัฒนาสัณฐานวิทยาของเห็ดเป็นอย่างมาก โดยทั่วไปเห็ดต้องการสภาพะความเป็นกรดด่างpH ที่ 4-8 ซึ่งจะมีความแตกต่างกันในเห็ดแต่ละชนิด ผลของความเป็นกรด มีความเกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างและสลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ด้านความสามารถในการใช้ประโยชน์จากวัสดุที่เจริญ ระดับความเป็นกรด-ด่าง ในการเจริญของเห็ดชนิดต่างๆ เช่นเห็ดหูหนู เส้นใยเจริญได้ที่ pH 2.8-9.0 โดยมีช่วงที่เหมาะสมที่ pH 5.0-5.4 ในเห็ดนางรมสีเทา เส้นใยเจริญได้ที่ pH 5.4-6.0 ส่วนเห็ดนางฟ้า เส้นใยเจริญที่ pH 5.5-6.5 (Chang and Miles, 1989) และเห็ดนางฟ้าภูฐาน เส้นใยเจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกลาง (pH 7.0) หรืออยู่ในช่วง pH 6.5-7.5 (Chang and Miles, 1989)

3.4 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด คาร์บอนไดออกไซด์สูงที่มีผลกระตุ้นการเจริญของเส้นใยเห็ดอยู่ที่ 28%โดยปริมาตร ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมทั้ง *Pleurotus ostreatus* และ *Pleurotus florida* แต่เมื่อเพิ่มถึง 37.5 % โดยปริมาตร จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรมถึง 40% เมื่อเทียบกับพวกที่เลี้ยงที่ 0.03 % คาร์บอนไดออกไซด์ (Zadrazil, 1974)

3.5 ออกซิเจน (O_2) เส้นใยเห็ดต้องการก๊าซออกซิเจนในการเจริญเติบโตทั้งในระยะเส้นใยและระยะการพัฒนาไปเป็นดอก ในระยะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดสามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนน้อยมาก (semianerobic) และจะต้องการออกซิเจนปริมาณปกติ (aerobic) ในระยะการพัฒนาไปเป็นดอก (Zadrazil, 1974)

4. สารสำคัญบางอย่างต่อการเจริญเติบโตของเห็ด

4.1 คาร์บอน (Carbon) หากเอาเชื้อราของเห็ดมาตากหรืออบให้แห้งจะพบว่าปริมาณน้ำหนักแห้งทั้งหมดจะมีอยู่ครึ่งหนึ่งเป็นสารคาร์บอน สารคาร์บอนเหล่านี้มีบทบาทในการประกอบเป็นอินทรีย์วัตถุต่างๆ อันเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซล (cell) และแหล่งที่สร้างพลังงานเพื่อใช้ในการดำรงชีพของเชื้อราเห็ด ดังนั้นในการเจริญเติบโตของเชื้อราเห็ด ความต้องการพวกคาร์บอนจะมีมากกว่าสารอื่น (สมาน, 2523)

4.2 ไนโตรเจน (Nitrogen) ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรตีนและกรดต่างๆภายในเซลล์ การเจริญเติบโตของเห็ด จะเกิดขึ้นไม่ได้เลยหากปราศจากโปรตีน ถึงแม้ว่าจะมีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถเอาไนโตรเจนไปใช้ในรูปของอนินทรียสาร (inorganic nitrogen) เช่นในรูปของไนเตรท (nitrate) ไนไตร (nitrite) แอมโมเนีย เป็นต้น แต่สำหรับเห็ดแล้วไม่สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของอนินทรีย์สารได้เลย โดยเฉพาะอย่างยิ่งไนโตรเจนในรูปของไนไตร (nitrite) และในรูปของแอมโมเนีย โดยทั่วไปไนโตรเจนที่เห็ดสามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ได้ จะต้องอยู่ในรูปของอินทรียสาร (organic nitrogen) เช่น พวกโปรตีน หรือ อะมิโนแอซิด (amino acid) อันเป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งของโปรตีน (สมาน, 2523)

4.3 กำมะถัน โดยทั่วไป เชื้อรามีความต้องการกำมะถันในระดับหนึ่ง ในอาหารวุ้นที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา หากมีกำมะถันอยู่บ้าง ก็สามารถทำให้เชื้อราส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี กำมะถันที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมากจะอยู่ในรูปดีเกลือ ($MgSO_4$) (สมาน, 2523)

4.4 ฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสมีบทบาทในการเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อราที่จะใช้พวกคาร์โบไฮเดรท (พวก แป้ง น้ำตาล เซลลูโลส) เป็นอาหาร แต่ก็ต้องการเพียงพอกับการเจริญเติบโตของเชื้อรา (สมาน, 2523)

5. รูปแบบการแสดงเพศ (Pattern of sexuality)

เชื้อราใน class Basidiomycetes ส่วนใหญ่การแสดงออกทางเพศจะเป็นแบบระบบที่ต้องผสมข้าม (heterothallism) ที่ได้มีการศึกษารูปแบบทางเพศแล้ว มีเพียงไม่กี่ร้อยชนิด (species) ซึ่งเท่ากับ 10% ของเชื้อราในชั้น Basidiomycetes ที่มีกว่า 5,000 ชนิด ในจำนวนนี้มีเชื้อราที่จัดเป็น heterothallism ที่มีรูปแบบทางเพศควบคุมด้วยปัจจัยคู่ถึงร้อยละ 65% และที่ควบคุมด้วยปัจจัยเดี่ยวเพียง 25 % ที่เหลืออีก 10 % อาจเป็นแบบ primary homothallism หรือ secondary homothallism (Raper, 1978)

1. ระบบที่ผสมตัวเองได้ (Homothallism) คือเส้นใยที่งอกออกมาจากสปอร์เดียวกันสามารถผสมกันเองได้ (ผสมตัวเอง) โดยแขนงของเส้นใยเดียวกันจะผสมกันและเจริญเติบโตต่อไปเกิดการพัฒนาเป็นดอกเห็ด (Raper, 1966) homothallism แบ่งออกเป็น 2 ประเภท

1.1 Primary homothallism เกิดขึ้นกับเห็ดเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถผสมตัวเองได้โดยไม่มีปัจจัยที่ผสมตัวเองไม่ติดอยู่เลย เส้นใยที่ผสมตัวเองนี้เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวที่มีนิวเคลียส ที่เกิดจากการแบ่งตัวแบบลดจำนวนโครโมโซม (meiosis) เพียงนิวเคลียสเดียว โดยไม่มีปัจจัยที่เกี่ยวกับการผสมตัวเองไม่ติดอยู่เลย เส้นใยสามารถเกิดดอกเห็ดได้นี้เป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสเหมือน (homokaryotic) คือมีนิวเคลียสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน นิวเคลียสนี้อาจเป็นนิวเคลียสคู่ที่มีหรือไม่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ก็ได้ แต่บ่อยครั้งจะมีหลายนิวเคลียส (multikaryotic) ที่ไม่มีข้อ

ยึดระหว่างเซลล์ การรวมตัวกันของนิวเคลียส (karyogamy) และการแบ่งตัวแบบไมโอซิสจะเกิดในแบสิเดีย (basidia) ของดอกเห็ด โดยไม่มีช่วงที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryotic phase) อยู่ในวงจรชีวิตเลย ดั้งนั้นการกระจายและการรวมตัวกันใหม่ของจีโนม (genomes) จะไม่เกิดขึ้นเลย อย่างไรก็ตามอาจมีเกิดขึ้นได้บ้าง หากนิวเคลียสตัวใดตัวหนึ่งเกิดการกลายพันธุ์ขึ้น เห็ดที่มีรูปแบบทางเพศแบบนี้ได้แก่ เห็ดฟาง (*Volvariella volvaceae*) (Raper, 1978)

1.2 Secondary homothallism มีลักษณะที่แตกต่างจาก primary homothallis คือปัจจัยที่ผสมไม่ติด หรือเข้ากันไม่ได้มาเกี่ยวข้องซึ่งจะถูกกำหนดโดยกลไกการกระจายตัวของนิวเคลียสแบสิเดียแต่ละแบสิเดีย ของเห็ดรูปแบบนี้ (secondary homothallism) จะมีสปอร์อยู่เพียง 2 สปอร์เท่านั้น นิวเคลียสสองตัวที่เกิดจากการแบ่งตัวแบบไมโอซิส และสามารถเข้ากันได้ จะเข้าไปอยู่ในแบสิดิโอสปอร์ เส้นใยที่งอกจากสปอร์ที่สามารถสร้างดอกเห็ดได้นี้ที่จริงเป็นเส้นใยที่มีคู่ยีนต่างกัน (heteroallellic) ในแง่ที่เกี่ยวกับปัจจัยที่เข้ากันได้ เส้นใยที่สามารถเกิดดอกเห็ดได้นี้เป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryotic) หมายความว่ามีนิวเคลียสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างกัน ปกติจะเป็นแบบนิวเคลียสคู่ (dikaryotic) ที่มีหรือไม่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ก็ได้ หรืออาจเป็นแบบหลายนิวเคลียส (multikaryotic) ที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ เห็ดใน secondary homothllism นี้จะไม่มีวงจรชีวิตที่จะมีนิวเคลียสที่เหมือนกัน (homokaryotic phase) เลย เห็ดที่เป็น secondary homothallism นี้อาจมีปัจจัยที่เข้ากันไม่ได้เพียงหนึ่งหรือสองปัจจัยก็ได้ รูปแบบที่ทำให้แตกต่างไปจากพวกที่ต้องผสมข้าม (heterothallic) ก็คือ นิวเคลียสที่เกิดจากการแบ่งตัวแบบไมโอซิส มักจะมีการกระจายอยู่ในแบสิดิโอสปอร์ เห็ดที่มีรูปแบบทางเพศแบบนี้ได้แก่ เห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) (Raper, 1978)

2. ระบบผสมข้าม (Heterothallism) เป็นเส้นใยเห็ดที่ผสมตัวเองไม่ติด (self sterile)เส้นใยที่ผสมกันได้ต้องเจริญมาจากสปอร์ที่คู่ของยีนในนิวเคลียสต่างกัน โดยมีปัจจัยควบคุมการผสมข้ามกันได้มาเกี่ยวข้อง แบ่งออกเป็น 2 แบบ (Raper, 1978)

2.1 การควบคุมด้วยปัจจัยเดี่ยว [Unifactorial control (bipolar heterothallism)] ลักษณะการแสดงออกของเพศควบคุมด้วยปัจจัยทางพันธุกรรมเพียงปัจจัยเดียว คือ ปัจจัย A จะควบคุมความสามารถในการผสมเข้ากันได้ของคู่ยีน โดยในการเข้าคู่กันของยีนจะต้องมีปัจจัย A ที่ต่างกัน ($A \neq$) คือจะมีการเคลื่อนย้ายนิวเคลียส โดยนิวเคลียสจากเส้นใยหนึ่งจะเข้าไปอยู่ในอีกเส้นใยหนึ่ง ขบวนการนี้เกิดขึ้นในเส้นใยทั้งสองฝ่ายทำให้ได้นิวเคลียสคู่ ที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ที่แท้จริง (true clamps) การเกิดดอกเห็ดจะได้จากการเจริญของเส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่นี้ ในการจับคู่ระหว่างคู่ยีนที่ต่างกัน เช่น A_1 และ A_2 จะมีการกระจายตัวในอัตรา 1 : 1 โดยปกติสปอร์ของเห็ดจะมี 4 สปอร์บน basidium ซึ่งเป็น tetrad ทำให้ได้สปอร์สองตัวที่มียีน A_1 และอีกสองสปอร์มียีน A_2

เส้นใยที่เจริญจากสปอร์ทั้ง 4 จะสามารถจับคู่ผสมกันได้สองพวก ซึ่งจะมีปฏิกิริยาร่วมแบบ bipolar เมื่อมีการจับคู่แบบพบกันหมด (ตารางที่ 1) เห็ดที่มีรูปแบบทางเพศแบบนี้ ได้แก่เห็ดหูหนู (*Auricularia spp.)* (Raper, 1978)

ตารางที่ 1 แสดงรูปแบบของ bipolar ในระบบที่ผสมตัวเองไม่ได้ แบบปัจจัยเดี่ยว

รูปแบบการผสม	A_1	A_1	A_2	A_2
A_1	-	-	+	+
A_1	-	-	+	+
A_2	+	+	-	-
A_2	+	+	-	-

- = การผสมเข้ากันไม่ได้ และไม่มีปฏิกิริยาร่วมต่อกัน

+ = การผสมเข้ากันได้ และเกิดปฏิกิริยาร่วมต่อกันอย่างสมบูรณ์

2.2 การควบคุมด้วยปัจจัยคู่ [Bifactorial control (tetrapolar heterothallism)]

ในการผสมนั้นจะมีปัจจัยควบคุมทางเพศ อยู่ 2 ปัจจัย คือ ปัจจัย A และ ปัจจัย B ซึ่งปัจจัยทั้งสองอยู่คนละส่วนกันแต่ทำงานร่วมกัน ในการจับคู่ผสมกัน ปัจจัย A ควบคุมการจับคู่กันของนิวเคลียส (nuclear paring) และการสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp formation) ปัจจัย B ควบคุมการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส (nuclear migration) และการเชื่อมของข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp fusion)

ถ้าที่ปัจจัย A มีคู่ยีน (allele) ที่แตกต่างกัน แต่ปัจจัย B ยีนเหมือนกัน (A≠ B=) จะสามารถเข้ากันได้เพียงกึ่งเดียว (ตารางที่ 2) หรือเรียกว่า hemicompatible คือไม่มีการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสเกิดขึ้น ผลคือเกิดเส้นใยที่ไม่สามารถเกิดดอกเห็ดได้ มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryon) โดยเซลล์ปลายจะเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ แต่เซลล์ที่ถัดมาจะยังคงเป็นนิวเคลียสเดี่ยว และมีข้อยึดหลอก (false clamp) คือข้อยึดระหว่างเซลล์จะไม่หลอมเชื่อมกับเซลล์ที่อยู่ถัดลงมา ดังนั้นในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้ง จะขังนิวเคลียสลูกไว้หนึ่งตัว กรณีที่ปัจจัย A เหมือนกัน แต่ปัจจัย B แตกต่าง (A= B≠) เป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryon) อันประกอบด้วยเซลล์ที่มีนิวเคลียสหลายตัว (multikaryon) มี septa แบ่งกั้นเซลล์ แต่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ การที่ A=B≠ เป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryon) จากการที่มีการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสอย่างไม่จำกัด และเกิดขึ้นตลอดเส้นใยของทั้งคู่ที่ผสมกันบางครั้งก็บอกความแตกต่าง จากทั้ง heterokaryon และ

homokaryon อื่น ได้จากการที่เส้นใยไม่ค่อยฟู คือ มักจะแบนราบ (flat) มีการชะงักการเจริญเติบโตของเส้นใยอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 2 แสดงรูปแบบของ tetrapolar ในระบบที่ผสมตัวเองไม่ได้ แบบระบบปัจจัยคู่

รูปแบบการผสม	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
A_1B_1	-	F	(+)	+
A_1B_2	F	-	+	(+)
A_2B_1	(+)	+	-	F
A_2B_2	+	(+)	F	-

- = การผสมที่ไม่สามารถเข้ากันได้เลย

+ = การผสมที่สามารถผสมเข้ากันได้สมบูรณ์ เกิดเส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ ที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์เกิดขึ้นสมบูรณ์ สามารถให้ดอกเห็ดได้

(+) = การผสมเข้ากันได้เพียงครึ่งเดียว การเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสเป็นแบบจำกัด เกิดเส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ตรงส่วนปลาย และมีนิวเคลียสเดี่ยวถัดมาเป็นส่วนใหญ่ และการสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ สร้างดอกเห็ดไม่ได้

F = การผสมเข้าคู่กันได้เพียงครึ่งเดียว เกิดเส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกันชนิดที่มีหลายนิวเคลียส (multikaryotic heterokaryon) และไม่เกิดการสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ สร้างดอกเห็ดไม่ได้ เส้นใยจะราบ (flat) (Raper, 1978)

กรณีที่มีคู่ยีนต่างกันทั้งสองปัจจัย ($A \neq B \neq$) จะสามารถผสมเข้าคู่กันได้ดีและทำให้เกิดเส้นใยนิวเคลียสคู่ที่ไม่มีข้อจำกัดในความสมบูรณ์ในการผสมเข้ากันได้ และมีข้อยึดระหว่างเซลล์ที่จริง ปัจจัย A และ ปัจจัย B ไม่มีการเชื่อมโยงกันแต่จะกระจายตัวอย่างอิสระจากกัน ดังนั้นในการกระจายตัวของพ่อแม่และรวมกันใหม่ในขบวนการแบ่งเซลแบบไมโอซิส จะได้ลูกผสมในอัตราส่วน 1:1:1:1 เช่น การผสมข้ามระหว่าง A_1B_1 X A_2B_2 สปอร์ทั้ง 4 ใน basidium อาจสร้าง tetrad ของทั้ง 4 คือ A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1, A_2B_2 เส้นใยจะพัฒนามาจากการจับคู่กันของ 4 กลุ่มนี้ เห็ดที่พบในกลุ่มนี้ คือ เห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* เป็นต้น

6. การปรับปรุงพันธุ์เห็ด

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนั้น เห็ดจะถูกควบคุมโดยพันธุกรรมของสายพันธุ์ที่แตกต่างกันหรือที่สามารถรวมกันได้ เห็ดที่จะนำมาใช้ควรมีการปรับตัวได้ดีในธรรมชาติ และมีฐานพันธุกรรมกว้างเพื่อที่จะได้มีลักษณะให้เลือกมากพอสำหรับใช้ในงานปรับปรุงสายพันธุ์

วิธีการที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ด มีหลายวิธี

6.1 การปรับปรุงโดยวิธีการคัดเลือกพันธุ์ (selection)

ในทางการค้าจะคัดเลือกพันธุ์ใหม่จากการเพาะเลี้ยง multispore หรือจากการเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยว หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดที่คัดเลือกไว้โดยตรง ซึ่งวิธีเหล่านี้ใช้ระยะเวลาสั้น ในการปรับปรุงพันธุ์ แต่การปรับปรุงทางพันธุกรรมจากวิธีคัดเลือกพันธุ์นี้ทำได้ยากมาก ดังนั้นจึงควรมีการผสมพันธุ์ก่อน แล้วจึงใช้วิธีการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป

6.2 การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ (hybridization)

การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำกันมานาน โดยจะให้มีการผสมข้ามระหว่างเห็ดสองสายพันธุ์ ที่สามารถเข้าคู่กันได้ ให้เส้นใยที่มีสองนิวเคลียสและเกิดเป็นดอกเห็ดในที่สุด ซึ่งจะประสบความสำเร็จมากในงานปรับปรุงพันธุ์เห็ดที่รับประทานได้หลายชนิด (Raper , 1978)

วิธีการผสมพันธุ์เห็ดที่นิยมใช้คือ

6.2.1 การผสมของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (mono-mono crossing) เป็นการพัฒนาสายพันธุ์เห็ด โดยการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ที่มีเส้นใยเป็นนิวเคลียสเดี่ยวเข้าด้วยกัน การผสมพันธุ์เกิดจากการเชื่อมต่อระหว่างเส้นใย 2 สายพันธุ์และมีการแลกเปลี่ยนสารภายในเซลล์ โดยมีการคัดเลือกอย่างต่อเนื่องและกำจัดลักษณะที่ไม่ดีออก เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง เพื่อที่จะได้ลูกผสมที่เกิดลักษณะใหม่ๆ (Fritche, 1978)

Simchen (1965) ได้ทำการทดลองการผสมแบบมอน-มอน (mon-mon crossing) ในเห็ด *Schizophyllum commune* ซึ่งวิธีการผสมพันธุ์แบบมอน-มอน (mon-mon crossing) นี้แสดงลักษณะที่หลากหลายของพันธุกรรมของลูกผสมออกมา

6.2.2 การผสมของเส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่กับเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (di-mon crossing) แล้วหาชนิดคู่ผสม วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้เร็วหากมีสายพันธุ์ (เส้นใยนิวเคลียสคู่) จำนวนมากสำหรับทดสอบอยู่แล้ว ก็สามารถสร้างเส้นใยนิวเคลียเดี่ยว (monokaryon) จากสายพันธุ์เหล่านี้ แล้วทำการทดสอบโดยวิธีการผสมแบบได-มอน (di-mon crossing) เกิดเส้นใยนิวเคลียสคู่ขึ้นที่ปลายเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ซึ่งถือเป็นกฎว่านิวเคลียสตัวใดตัวหนึ่งที่เข้ากันได้ของเส้นใยนิวเคลียสคู่ที่ไปผสมกับนิวเคลียสของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ผลที่ได้อาจเป็นการผสมที่เข้ากันได้เพียงกึ่งเดียว (hemicompattible mating) หรือเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ ในบางกรณีนิวเคลียสทั้งคู่ของเส้นใยนิวเคลียสคู่ จะอพยพเข้าไปด้วยกัน ได้เส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่เดิมตรงส่วนปลายของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Eger, 1978)

Simchen (1964) ได้ทำ di-mon crossring ในเห็ด *Schizophyllum commune* และได้ดูความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญของเส้นใยของ monokaryon ของพ่อแม่กับ dikaryon ของลูกผสม

ที่ได้ ปรากฏว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน เพราะยีนจะแสดงออกในรูปที่เป็น monokaryon และ dikaryon ที่ต่างกัน

7. อิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซีส หมายถึงการเคลื่อนย้ายอนุภาคที่อยู่ในสารละลายด้วยกระแสไฟฟ้า โดยอาศัยคุณสมบัติของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าบวกหรือลบ ซึ่งจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบหรือขั้วบวกในสนามไฟฟ้าด้วยอัตราการเคลื่อนที่และทิศทางต่างกัน ตามแต่ชนิดของประจุบนอนุภาคนั้นๆ (พิสสวรรณ, 2531)

ไอโซไซม์เป็นโพลีเปบไทด์ (polypeptide) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนจะถูกกำหนดโดยตรงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ไอโซไซม์ที่ต่างกันชัดเจนในองค์ประกอบของกรดอะมิโนจะมีประจุไม่เหมือนกัน รวมทั้งขนาดโมเลกุลและรูปร่างก็แตกต่างกันด้วย เมื่อนำมาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส ในสนามไฟฟ้าบนสารตัวกลางที่มีลักษณะเป็นเจล (gel) เอนไซม์หนึ่งๆ ก็จะเคลื่อนที่ด้วยอัตราความเร็วที่ต่างกัน ก่อให้เกิดแถบบนสารตัวกลางหรือเจล 1 รูปแบบ (pattern) ในเอนไซม์แต่ละรูปแบบ เมื่อย้อมสีเจลก็จะสามารถเห็นตำแหน่งต่างๆของแถบไอโซไซม์ (isozyme banding) เมื่อนำแถบไอโซไซม์ เหล่านี้มาเขียนเป็นแผนภาพเรียกว่าไซโมแกรม (zymogram) หรือรูปแบบของแถบไอโซไซม์ (isozyme banding pattern) การเปลี่ยนแปลงของแถบไอโซไซม์ ที่เกิดอย่างสม่ำเสมอระหว่างไซโมแกรมของแต่ละพันธุ์ จะเป็นไปตามความแตกต่างของจีโนไทป์ (genotype)ระหว่างพันธุ์และสภาพทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตที่นำมาเปรียบเทียบกันนั้น (ดวงพร, 2530)

ขนิษฐา (2543) ศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ esterase, acid phosphatase และ peroxidase ของเห็ดฟางพันธุ์ V_1 , V_2 , เส้นใยสปอร์เดี่ยวและลูกผสม พบว่าเส้นใยของเห็ดฟางทั้งหมดมีรูปแบบไอโซไซม์ esterase ที่แตกต่างกัน จำนวนแถบสีที่ปรากฏมีตั้งแต่ 2-6 แถบ บางแถบเห็นไม่ชัดเจนแต่สามารถบอกได้ถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแถบไอโซไซม์ ของเส้นใยงอกจากสปอร์ 13 สายใย และลูกผสม 18 สายเชื้อ ในแง่ของการเจริญของเส้นใยและการให้ผลผลิต แต่ยังไม่สามารถเปรียบเทียบและแยกความแตกต่างได้ชัดเจน