บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

เห็ดโคนญี่ปุ่นมีชื่อสามัญว่า black poplar mushroom เนื่องจากในธรรมชาติมักพบขึ้นอยู่กับต้นไม้เนื้ออ่อนจำพวกไม้ poplar (Kibby, 1979) ในประเทศญี่ปุ่นเรียกกันว่า yanagi matsutake และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Agrocybe cylindracea*

การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Segedin และ Pennycook, 2001)

Kingdom : Fungi

Phylum : Basidiomycota

Class : Basidiomycetes

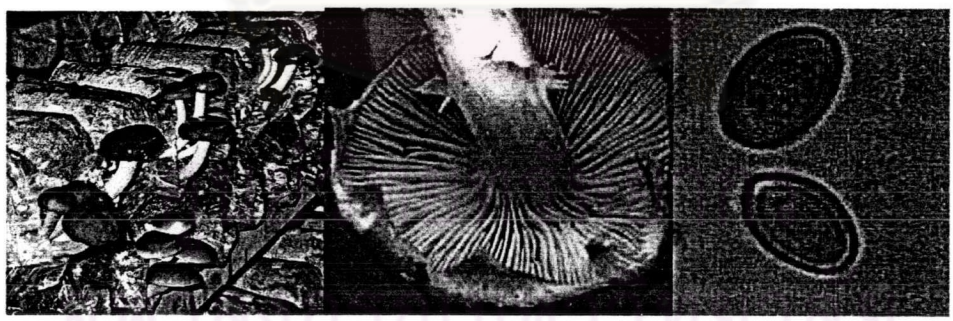
Order : Agaricales

Family : Bolbitiaceae

Genus : *Agrocybe*

Species : *Agrocybe cylindracea*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา



ภาพที่ 2 หมวกดอก ครีบดอก ก้านดอก และสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่น

หมวกดอก : หมวกดอกมีลักษณะค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 4-10 เซนติเมตร ดอกเห็ดที่ออกใหม่จะมีลักษณะกลม ขนาดเล็ก ตรงกลางหมวกจะนูนสูงขึ้นมา ดอกจะมีสีน้ำตาลเข้ม มีเยื่อหุ้มสีขาวอยู่บริเวณใต้หมวก เมื่อดอกเห็ดแก่สีของหมวกจะซีดลงเป็นสีน้ำตาลอ่อน ตรงกลางหมวกที่เคยนูนจะยุบและแบนราบ ขนาดดอกจะขยายใหญ่ขึ้น

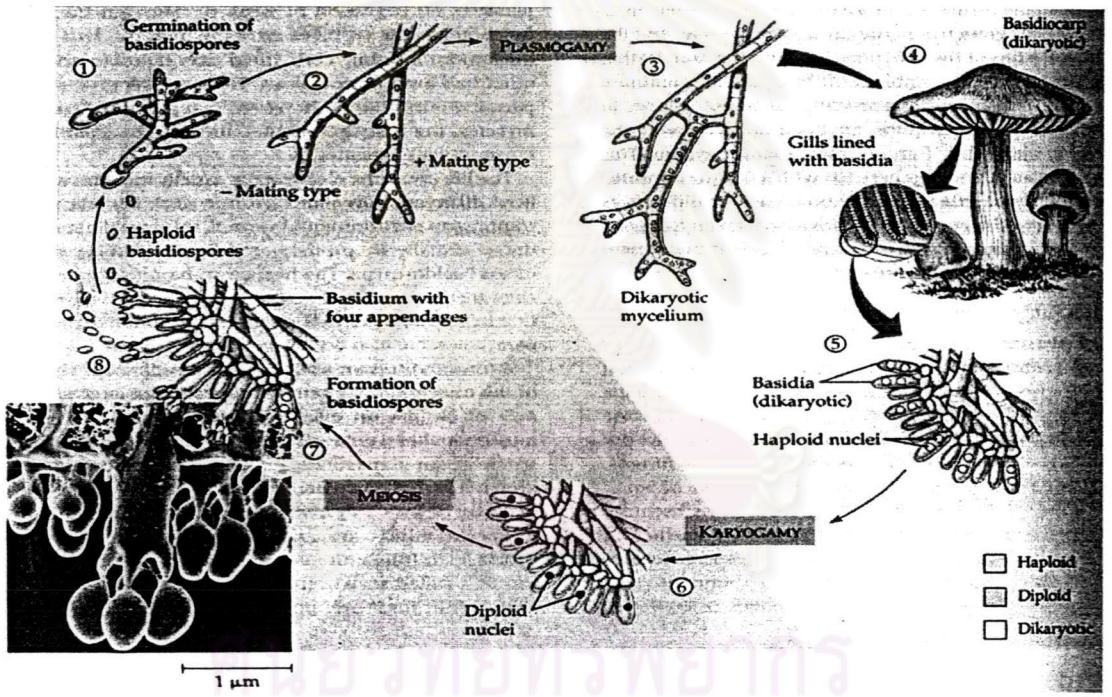
จนเยื่อหุ้มส่วนกลางล่างใต้ดอกเห็ดจะฉีกขาด แล้วเปลี่ยนแปลงเป็นวงแหวนสีน้ำตาลเข้มติดอยู่ที่ก้านดอกเห็ด เมื่อดอกเห็ดแก่เต็มที่วงแหวนนี้จะเห็นไม่ชัดเจน

ครีบดอก : เป็นแบบ forked gills ซึ่งบริเวณใกล้ๆ ขอบหมวกดอกแตกแขนงออกคล้ายส้อม สีน้ำตาลอ่อน

ก้านดอก : เป็นแบบ central stalk คืออยู่กึ่งกลางหมวกดอก เส้นใยแน่น ก้านดอกกลมและค่อนข้างยาวประมาณ 5-11 เซนติเมตร มีสีขาว แต่จะมีเส้นสีน้ำตาลแทรกอยู่

สปอร์ : รูปร่างรี แบบ elliptical สีน้ำตาล ผนังหนา ขนาด 3-5x10-14 ไมโครเมตร

วงชีพเห็ดโคนญี่ปุ่น



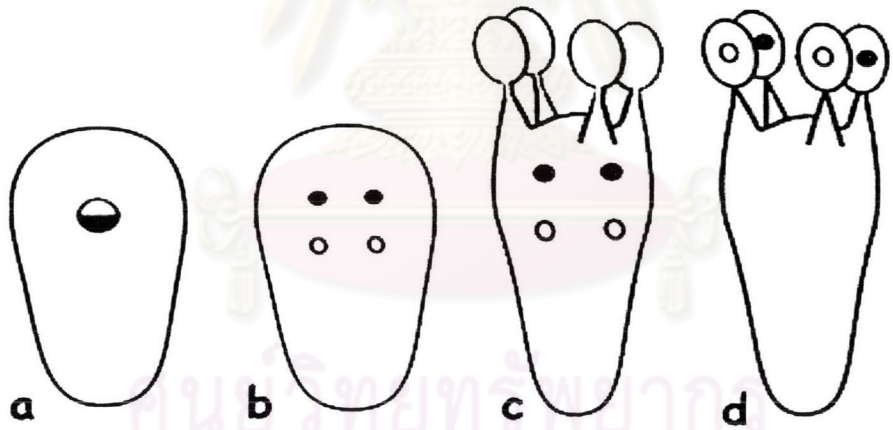
ภาพที่ 3 วงชีพเห็ดแบบเฮเทโรทัลลิค (Stamets และ Chilton, 1983)

เห็ดโคนญี่ปุ่นเป็นเห็ดในสกุล *Agrocybe* มีวงชีพเป็นแบบเฮเทโรทัลลิค (Meinhardt และ Leslie, 1982) เส้นใยแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ เส้นใยระยะที่หนึ่ง งอกออกมาจากเบสิดิโอสปอร์ มีโครโมโซมเป็นแฮพพลอยด์ ในระยะแรกของการงอก จะมีหลายนิวเคลียสใน 1 เซลล์ ต่อมาจึงมีผนังมากั้นทำให้ได้เส้นใยที่มี 1 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ เส้นใยระยะนี้ยังไม่พบแคลมพ์คอนเนคชั่น ซึ่งเมื่อเกิดการรวมตัวกันของเส้นใยระยะที่หนึ่ง จะเจริญไปเป็นเส้นใยระยะที่สอง เมื่อเกิดใหม่ๆ จะมีลักษณะคล้ายกับเส้นใยระยะที่หนึ่ง แต่สามารถตรวจพบแคลมพ์คอนเนคชั่นได้ ในหนึ่งเซลล์จะพบมี 2 นิวเคลียสภายในเส้นใยกว้าง เส้นใยระยะที่สองนี้เมื่ออายุมากขึ้น จะมีการเปลี่ยนแปลงคือผนังเซลล์หนาขึ้น

และภายในเส้นใยอาจจะแคบลงกว่าเดิม เส้นใยระยะนี้เมื่อได้รับภาวะที่เหมาะสมจะรวมตัวกันเป็นตุ่มเห็ดซึ่งมีสัณฐานเป็นกลุ่มของเส้นใยที่ยึดกันแน่นจากนั้นจะเจริญเป็นดอกเห็ดต่อไป (Raper, 1966)

การเกิดของสปอร์เห็ดโคนญี่ปุ่น (Alexopoulos, 1996)

ภายในเนื้อเยื่อของครีบดอกเห็ดแต่ละเซลล์ประกอบด้วย 2 นิวเคลียส จะมีการรวมกันของนิวเคลียส ได้นิวเคลียสแบบดิพลอยด์ (2n) เฉพาะเซลล์ที่จะมีการเจริญไปเป็นเบสิเดียมเท่านั้น การสร้างและพัฒนาเบสิเดียมและเบสิดิโอสปอร์ เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ตรงปลายเริ่มบวมพองออกเพื่อทำหน้าที่เป็นเบสิเดียม และนิวเคลียสทั้งสองของเซลล์ตรงปลายนี้รวมตัวกันเป็นดิพลอยด์ (ภาพที่ 4-a) ซึ่งนิวเคลียสที่เป็นดิพลอยด์นี้ จะแบ่งตัวแบบไมโอซิสได้นิวเคลียสชนิดแฮพลอยด์ (n) 4 นิวเคลียส (ภาพที่ 4-b) และบน เบสิเดียมนี้เกิดก้านสั้นๆ (sterigma) จำนวน 4 อันขึ้นด้วย (ภาพที่ 4-c) โดยนิวเคลียสทั้งสี่จะเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในก้านเหล่านี้ จนในที่สุดเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในเบสิดิโอสปอร์ที่พัฒนาขึ้นตรงปลายก้าน (ภาพที่ 4-d) ซึ่งเมื่อเจริญเต็มที่แล้วแต่ละเบสิดิโอสปอร์มี 1 นิวเคลียส



ภาพที่ 4 กลไกการสร้างสปอร์ของเห็ด (Alexopoulos, 1996)

การงอกของสปอร์ (Jennings และ Lysek, 1996)

สปอร์คือ หน่วยของเชื้อราที่หยุดการเจริญเติบโต ไซโตพลาสมจะมีความหนาแน่น ผนังหนาขึ้นและอัตราเมตาบอลิซึมเป็นไปอย่างช้าๆ การงอกของสปอร์เป็นการบ่งชี้ถึงการเริ่มมีปฏิกิริยาตอบสนองของสปอร์ต่อการเกิดทัลลัส ซึ่งมักจะเกิดขึ้นหลังจากช่วงระยะพักตัว และจะพบการเปลี่ยนแปลงในอัตราเมตาบอลิซึมก่อนเกิดการงอกของเส้นใยออกมาจากสปอร์

การงอกของสปอร์มีกลไกดังนี้

1. สปอร์ได้รับการกระตุ้นจากภายนอก โดยทั่วไปจะเกิดจากปฏิกิริยาที่เรียกว่า rehydration เพราะสปอร์คือส่วนที่ถูก dehydrated มักจะถูกกระตุ้นให้งอกได้จากน้ำหรือความชื้น
2. สปอร์ดูดซับน้ำเข้าไปและเริ่มเกิดการพองตัวขึ้น (swelling) จนมีขนาดประมาณ 1.5 – 3 เท่าของขนาดเดิม
3. หลังจากสปอร์พองตัวขึ้นแล้วก็จะเกิด germination tube โผล่ทะลุผนังสปอร์ ออกมา
4. เริ่มมีเส้นใยแทงตัวทะลุออกมาตาม germination tube ในตอนแรกจะเป็นเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียส ต่อมาจึงมีผนังมากั้นทำให้ได้เส้นใยที่มี 1 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์

ปัจจัยที่มีผลยับยั้งหรือกระตุ้นการงอกของสปอร์ (Moore และ Frazer, 2002)

ความหนาแน่นของสปอร์มากเกินไป จะมีผลในการยับยั้งการงอกของสปอร์ ทั้งนี้ไม่ใช่เพียงแค่การแก่งแย่งอาหารและออกซิเจนเท่านั้น แต่ยังรวมถึงการเกิดสารชีวเคมีอื่นๆ ที่มีผลยับยั้งการงอกของสปอร์ ซึ่งมีการค้นพบสารชีวเคมีเหล่านี้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น Bacon และ Sussman (1973) พบว่าสปอร์ที่อยู่กันอย่างหนาแน่นจะตรวจพบ N,N-dimethylguanosine ซึ่งจะมีผลยับยั้งการงอกของสปอร์ Macko และคณะ (1976) พบว่า methylcis-3,4-dimethoxycinnamate (MDC) จะมีผลยับยั้งการงอกของสปอร์ เช่นกัน ซึ่งสารเหล่านี้มักเป็นส่วนประกอบที่เกิดจากโครงสร้างของ germ tube

อุณหภูมิก็มีผลต่ออัตราการงอกของสปอร์เช่นกัน โดยสปอร์จะงอกได้ดีหากกระตุ้นด้วยอุณหภูมิสูงหรือต่ำในช่วงอุณหภูมิหนึ่ง ซึ่งหากต่ำหรือสูงเกินไปกว่าช่วงที่เหมาะสมมากเกินไปก็จะทำให้อัตราการงอกของสปอร์ลดลง จนถึงกับไม่สามารถงอกได้เลย (Ross, 1979) นอกจากนี้สารเคมีอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และเพอร์รอกซิเดส มีผลในการยับยั้งการงอกของสปอร์

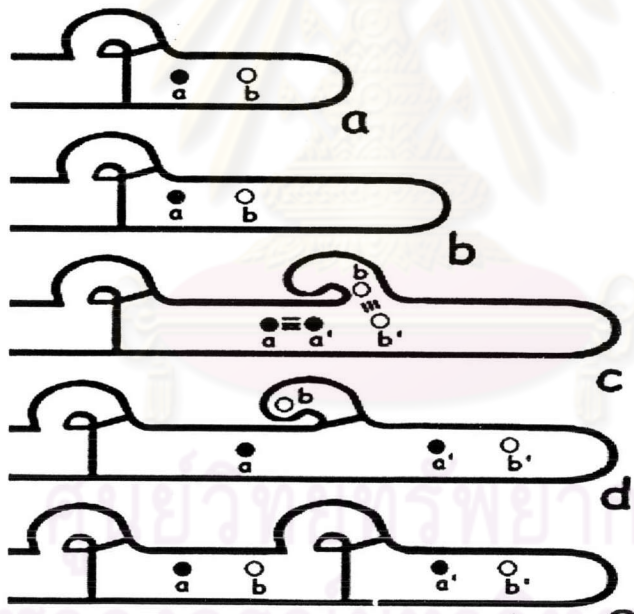
รูปแบบการผสมพันธุ์ (mating type) **ของเห็ดโคนญี่ปุ่น**

เห็ดโคนญี่ปุ่นเป็นเห็ดพวกเฮเทโรทัลลิค (เห็ดพวกนี้จะเกิดการสร้าง fruiting body ได้ก็ต่อเมื่อเกิดการผสมกันของเส้นใยที่เจริญมาจากต่างสปอร์กัน) มีรูปแบบการผสมหรือปัจจัยที่ควบคุมการผสมพันธุ์แบบ tetrapolar (Osiewacz, 2002) ซึ่งรูปแบบการผสมแบบนี้จะมี incompatibility factor ที่ควบคุมอยู่ 2 loci โดยทั้ง 2 loci จะเป็นอิสระต่อกัน กำหนดให้เป็น A และ B ซึ่งคู่ผสมจะผสมกันได้ก็ต่อเมื่อ A และ B ไม่ซ้ำกันเลย เช่น A_1B_1 กับ A_2B_2 , A_1B_2 กับ A_2B_1 เป็นต้น

ในเห็ด 1 ดอก มี incompatibility factor 4 factor คือ $A_1A_2B_1B_2$ เมื่อสร้างสปอร์ จะได้สปอร์ที่มี incompatibility factor 4 แบบ คือ A_1B_1 A_1B_2 A_2B_1 และ A_2B_2 เมื่อปล่อยให้ผสมกันเอง ทั้งหมดจะได้อัตราส่วนของคู่ที่ผสมได้ : คู่ที่ผสมทั้งหมด = 1 : 4 (Cees, 1996)

การเกิดแคลมพ์คอนเนคชัน (Alexopoulos, 1996)

การเกิดแคลมพ์คอนเนคชัน เริ่มจากตรงปลายเส้นใยซึ่งมีสองนิวเคลียสที่ต่างเพศกันอยู่ (นิวเคลียส a และนิวเคลียส b) จะยืดตัวยาวขึ้น (ภาพที่ 5-a, b) ต่อมานิวเคลียสของทั้งสองเพศจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นพร้อมกัน ได้นิวเคลียสทั้งหมด 4 นิวเคลียส (นิวเคลียส a & a' และ นิวเคลียส b & b') และเกิดการแตกกิ่งก้านตรงด้านข้างของเส้นใยยื่นออกไป แล้วนิวเคลียสของเพศหนึ่ง (นิวเคลียส b) เคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในกิ่งนั้น (ภาพที่ 5-c) เกิดผนังกั้นขึ้นที่โคนของกิ่งกั้นนิวเคลียส b ไว้ นิวเคลียส a' และนิวเคลียส b' เคลื่อนที่ไปยังส่วนปลายของเส้นใย ขณะที่นิวเคลียส a เคลื่อนที่ไปยังส่วนต้นของเส้นใย (ภาพที่ 5-d) จากนั้นจะเกิดผนังกั้นเส้นใยตรงใต้กิ่ง ทำให้ได้เซลล์ใหม่เกิดขึ้นตรงส่วนปลายของเส้นใย ส่วนนิวเคลียสเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในกิ่งด้านข้าง (นิวเคลียส b) เคลื่อนที่กลับมารวมกับอีกนิวเคลียสหนึ่งของเพศตรงข้ามที่อยู่ภายในเส้นใย (นิวเคลียส a) ทำให้เกิดสภาพไดแคริออนขึ้น 2 เซลล์คือ เซลล์ตรงปลายที่มีสองนิวเคลียสต่างกันคือนิวเคลียส a' และนิวเคลียส b' กับเซลล์ตรงส่วนต้นของเส้นใยที่มี 2 นิวเคลียสต่างกันโดยมีนิวเคลียส a และ นิวเคลียส b (ภาพที่ 5-e)



ภาพที่ 5 กลไกการเกิดแคลมพ์คอนเนคชัน (Alexopoulos, 1996)

สรรพคุณทางเภสัชของเห็ดโคนญี่ปุ่น

Kiho และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษาผลของ D-glucan ซึ่งสกัดได้จากเห็ดโคนญี่ปุ่นที่มีต่อเซลล์มะเร็งในหนู พบว่ามีผลยับยั้งการเจริญของเนื้องอกอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งและมีผลปานกลางต่อเซลล์มะเร็ง

Semerdzieva (1992) พบว่าสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่นมีชีวิตอยู่ได้ถึง 12 ปี และสารสกัดจากสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่นมีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ได้

Murcia และคณะ (2002) ได้ทำการทดสอบสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของเห็ดหลายชนิดรวมทั้งเห็ดโคนญี่ปุ่นด้วย โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารทั่วๆไป พบว่าเห็ดโคนญี่ปุ่นมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการอ็อกซิไดส์สูงกว่า นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเห็ดหอม (*Lentinus edodes*)

ปัจจัยและสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนญี่ปุ่น

เห็ดโคนญี่ปุ่นมีความต้องการพื้นฐานเช่นเดียวกับเห็ดชนิดอื่นทั่วๆไป ดังนี้ (Carlile และ Watkinson, 1994)

1.ธาตุอาหาร(nutrition)

เห็ดไม่สามารถสังเคราะห์อาหารเองได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยอาหารสำเร็จรูปจากแหล่งต่างๆ เช่น ไม้ผุหรือปุ๋ยหมัก เป็นต้น เห็ดมีน้ำย่อยที่สามารถย่อยอาหารเชิงซ้อน โดยเฉพาะพวกที่ให้พลังงาน เช่น ธาตุคาร์บอน ที่อยู่ในรูปเชิงซ้อนได้แก่ พวกลิกนิน (lignin) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulouse) และเซลลูโลส (cellulose) โดยเส้นใยเห็ดนำเอาไปใช้เป็นพลังงานการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโต

2. อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิก็นับว่ามีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย และดอกเห็ดโคนญี่ปุ่นอยู่ไม่น้อย อุณหภูมิ 24-28 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเส้นใยและดอกของเห็ดโคนญี่ปุ่น

3. ความชื้น (humidity)

องค์ประกอบเห็ดทุกส่วนโคนญี่ปุ่น ไม่ว่าเส้นใยหรือดอกเห็ดจะมีน้ำเป็นองค์ประกอบ อยู่มากถึง 90% ยกเว้นสปอร์ น้ำมีความจำเป็นต่อกระบวนการต่างๆและการรักษาสภาพอุณหภูมิภายในเซลล์ ดังนั้นทุกขั้นตอนของการเพาะเห็ดโคนญี่ปุ่น ไม่ว่าจะเป็นช่วงของการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด การเกิดดอก การเจริญเติบโตของดอกเห็ด ล้วนแต่ต้องการความชื้นสูง โดยจะต้องควบคุมบรรยากาศให้มีความชื้นสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 80-90 %

4. อากาศ (air)

คำว่าอากาศในที่นี้ หมายถึง ก๊าซออกซิเจนหรืออากาศบริสุทธิ์ จากภายในวัสดุเพาะหรือโรงเรือนเพาะเห็ด ทุกระยะของการเจริญเติบโตของเห็ดโคนญี่ปุ่น ล้วนแล้วแต่ต้องการอากาศในการหายใจทั้งสิ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งระยะของการสร้างและการเจริญเติบโตของดอกเห็ด

5. แสง (light)

ช่วงที่เส้นใยเห็ดเจริญเติบโตไม่ต้องการแสง ช่วงที่เส้นใยสะสมอาหารและกำลังจะรวมตัวเป็นดอกเห็ดพบว่าแสงมีความจำเป็นในการกระตุ้นให้เส้นใยของเห็ดรวมตัวกันเป็นดอกเห็ด แสงรำไรที่ส่องเข้าไปในโรงเรือนอย่างสม่ำเสมอและทั่วถึง จะทำให้ดอกเห็ดพัฒนาได้สมบูรณ์ดียิ่งขึ้น หากแสงไม่เพียงพอดอกเห็ดจะโน้มไปหาแสงที่มีความเข้มข้นสูง หากแสงมากเกินไปดอกเห็ดจะมีสีคล้ำและแห้ง

6. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ระดับความเป็นกรดเป็นด่างที่เห็ดโคนญี่ปุ่นต้องการ อยู่ในระดับ pH ประมาณ 6.5 - 7.5

การเพาะเห็ดโคนญี่ปุ่น

ขั้นตอนการผลิตจะเป็นชนิดเดียวกับการเพาะเห็ดชนิดอื่น ที่มีขั้นตอนสำคัญทั่วไปดังนี้ (สุทธิชัย ปทุมล่องทอง, 2545)

1.การแยกเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ และเลี้ยงเส้นใยบนอาหารวุ้น

เป็นวิธีการเตรียมเชื้อเห็ดให้บริสุทธิ์ โดยใช้เนื้อเยื่อจากดอกเห็ดสดหรือเส้นใยเห็ด นำมาเลี้ยงให้เจริญบนอาหารวุ้น ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งต้องปฏิบัติภายในตู้ถ่ายเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว สำหรับดอกเห็ดที่นำมาแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อควรคัดเลือกจากสายพันธุ์ที่ต้องการ ดอกเห็ดมีขนาดใหญ่และควรเป็นดอกเห็ดที่เก็บมาใหม่ๆ การเจริญของเส้นใยขึ้นกับสายพันธุ์เห็ด สำหรับการเจริญบนจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาประมาณ 14 วัน

2. การทำหัวเชื้อเห็ด

วัสดุที่ใช้ทำหัวเชื้อที่นิยมกันมากที่สุดคือ เมล็ดข้าวฟ่าง โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างมาล้างน้ำให้สะอาดและแช่น้ำไว้ประมาณ 8 ชั่วโมง นำไปนึ่งจนกระทั่งเมล็ดข้าวฟ่างบาน นำไปผึ่งพอให้เมล็ดข้าวฟ่างแห้งหมาดๆ กรองลงในขวดที่สะอาดและแห้งประมาณครึ่งขวด อุดจุกสำลีหุ้มกระดาษและรัดด้วยยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30-40 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นแล้วนำไปเลี้ยงเชื้อเห็ดโดยเทคนิคปลอดเชื้อ ใช้เชื้อเห็ดจากอาหารวุ้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส

3.การทำก้อนเชื้อ

สำหรับสูตรอาหารผสมที่ใช้ มีดังนี้

ขี้เลื่อยไม้ยางพารา	100	กิโลกรัม
รำข้าวละเอียด	6	กิโลกรัม
หินปูน (แคลเซียมคาร์บอเนต)	1	กิโลกรัม
ดีเกลือ	0.2	กิโลกรัม
น้ำ	55 - 65	กิโลกรัม

ผสมวัสดุเหล่านี้ให้เข้ากันดี เมื่อผสมคลุกเคล้าอาหารผสมน้ำให้เข้ากันแล้ว นำมาบรรจุลงถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 7X12 นิ้ว หนา 0.12 มิลลิเมตร ให้มีน้ำหนักประมาณ 800-1,000 กรัม ใส่คอขวด จุกสำลี และหุ้มด้วยกระดาษหรือใช้ฝาครอบพลาสติกปิดจุดสำลีกันเปียก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15-20 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 1-2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใส่เชื้อจากหัวเชื้อเห็ด โดยเทเมล็ดข้าวฟ่างซึ่งเส้นใยเห็ดเจริญคลุมอยู่ลงถุงก้อนเชื้อ ถุงละ 15 - 20 เม็ด นำไปบ่มไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิประมาณ 24-30 องศาเซลเซียส

4. การทำให้เกิดดอกเห็ดและการเก็บเกี่ยว

เมื่อเส้นใยเห็ดเจริญเต็มถุงก้อนเชื้อ สังเกตเห็นเส้นใยมีสีน้ำตาลเข้ม จึงย้ายก้อนเชื้อไปยังห้องเปิดดอกซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 24-30 องศาเซลเซียส และความชื้นต้องไม่ต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ทำการเปิดดอกโดยถอดจุกสำลีออก นำถุงก้อนเชื้อมาวางเรียงไว้บนชั้นเพาะในโรงเรือนที่มีอากาศถ่ายเทได้ดีควรจะให้น้ำวันละ 2 ครั้ง ในช่วงเช้าและบ่าย ส่วนการเก็บดอกเห็ด กระทำเมื่อกลุ่มดอกเห็ดโตเต็มที่ และที่สำคัญคือแผ่นเยื่อหุ้มหมวกส่วนล่างยังคงอยู่หรือยังไม่ฉีกขาด

ผลของอุณหภูมิที่มีต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดและการสร้างดอกเห็ด

สภาวะแวดล้อมหรือสิ่งกระตุ้นภายนอกมีผลต่อการเจริญของเห็ด ทั้งนี้จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับปฏิกิริยาต่างๆ ของเซลล์ โดยจะมีผลกระทบกับการแสดงออกของยีน (gene expression) และส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สารประกอบที่จำเพาะต่อความเครียด (stress) นั้นๆ ออกมาเพื่อปกป้องเซลล์เห็ดไม่ให้ได้รับความเสียหาย และช่วยในกระบวนการรักษาสมดุลของเซลล์เห็ดไว้ (Kuei และ Zuei, 2004)

ซึ่งปัจจัยต่างๆ ของสิ่งแวดล้อมนั้นแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ปัจจัยที่มีชีวิต กับปัจจัยที่ไม่มีชีวิต ปัจจัยที่มีชีวิตได้แก่ แบคทีเรีย เห็ดรา แมลง และพาหะนำโรคต่างๆ ส่วนปัจจัยที่ไม่มีชีวิตนั้น ก็มีผู้สนใจทำการศึกษาและรายงานผลการศึกษาไว้มากมาย ประกอบด้วย อุณหภูมิ (Gonzalez และคณะ, 1988) ความชื้น (Carlile และ Watkinson, 1994) ความเค็ม (LaRosa และคณะ, 1989 ; Burk และ Jennings, 1990) อากาศ (Frelling และ Bennett, 1985) โลหะหนัก (Curle และ Kapoor, 1988 ; Gruhn และ Miller, 1991) รังสีต่างๆ (Chappell และ Hahlbrock, 1984) และ pH (LeJohn และ Braithwaite,1984) ซึ่งในบรรดาปัจจัยต่างๆของสิ่งแวดล้อมข้างต้น อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางที่สุด ซึ่งอุณหภูมิที่สูงเกินไป (heat shock) หรือต่ำเกินไป (cold shock) จะไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์หรือสะสมสารในกลุ่มของโปรตีน ที่จะเพิ่มความต้านทานต่อความเครียดจากอุณหภูมิ (Ketola และ Atkinson, 1983)

เมื่อเห็ดได้รับความเครียดจากอุณหภูมิ ปฏิกิริยาทางสรีรวิทยาเกือบทั้งหมดก็จะมุ่งเน้นไปในการผลิตโปรตีนกลุ่มใหม่ เพื่อต้านสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆอันเกิดจากความเครียดของอุณหภูมิ

ดังกล่าว โปรตีนกลุ่มใหม่นี้รู้จักกันในชื่อของฮีทช็อคโปรตีน (heat shock proteins : HSPs) (Neidhardt และคณะ, 1984 ; Lindguist และ craig, 1988 ; Freeman และคณะ,1989) ซึ่งการสร้าง HSPs นี้เป็นลักษณะที่ควบคุมโดยยีนมากคู่ที่ซับซ้อน (Griffin, 1994) ปรากฏการณ์นี้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1962 โดย Ritossa (1962) ค้นพบในตัวอ่อนของแมลง *Drosophila buskii* และเริ่มค้นพบอย่างแพร่หลายมากขึ้นในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา

ช่วงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสร้าง HSPs นั้นจะแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่น ในยีสต์ *Saccharomyces cererisiae* นั้นอยู่ที่ 36 องศาเซลเซียส (McAlister และ Finkelstein, 1980) และในเชื้อรา *Fusarium oxysporum* อยู่ในช่วง 40-43 องศาเซลเซียส (Freeman และคณะ, 1989) แต่โดยทั่วๆไป อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจากอุณหภูมิในช่วงที่เหมาะกับสรีระวิทยา (physiological หรือ optimum temperature) ประมาณ 4-5 องศาเซลเซียส จะไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ HSPs (Kuei และ Zuei, 2004)

ในเห็ดรา HSPs มีหน้าที่ในการเพิ่มความต้านทานต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น สามารถจับกับออแกนเนลต่างๆ ได้ โดย Neuman และคณะ (1987) ทำการศึกษากลไกของ HSPs พบว่า HSPs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high-molecular weight HSPs) จะจับกับบริเวณใกล้ๆนิวเคลียส Loomis และ Wheeler (1982) ทำการศึกษาใน *A. ambisexua* พบว่า HSPs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low-molecular weight HSPs) จะจับกับโครมาติน ส่วน Plesofsky และ Brambl (1985) ทำการศึกษาใน *N. crassa* และ *Physarium sp.* พบว่า HSPs ที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถยืดระยะเวลาของระยะอินเตอร์เฟส (interphase) ซึ่งมีผลให้เซลล์ใช้ระยะเวลานานขึ้นในการแบ่งเซลล์ ซึ่งเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ให้เจริญเติบโตช้าลงนั่นเอง

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดโดยใช้วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์

ในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีการคัดเลือกพันธุ์นั้น มักจะใช้การคัดเลือกลักษณะที่ต้องการจากกลุ่มประชากรที่มี genetic variation สูงๆ ตัวอย่างในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดโดยวิธีนี้ ได้แก่ การปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมโดย มุกดา คูหิรัญ (2531) ได้ทำการผสมพันธุ์เห็ดหอม (*Lentinus edodes*) โดยการเพาะจากสปอร์และเนื้อเยื่อ จากการผสมระหว่างเห็ดหอมสายพันธุ์ป่า ซึ่งมีลักษณะที่ดีในการทนต่ออุณหภูมิร้อนของอากาศได้ กับสายพันธุ์ที่ปลูกเพื่อเป็นการค้าซึ่งมีลักษณะที่ดีของดอกเห็ด กล่าวคือมีรูปทรงของดอกสวยงาม สีเข้ม พบว่าเส้นใยระยะที่สองของลูกผสม ที่เกิดจากการผสมเส้นใยระยะที่หนึ่ง มีลักษณะของทั้งสองสายพันธุ์รวมกันอยู่คือ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิห้อง และเมื่อนำไปเพาะให้เกิดดอกเห็ดก็ปรากฏลักษณะที่ดีเหมือนสายพันธุ์ที่ปลูกเพื่อการค้า

ในประเทศไทย มีการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการสร้างดอกของเห็ดโคนญี่ปุ่น โดย อัจฉราวรรณ น้อยกล่ำ และ ประสิทธิ์ วัฒนวงศ์วิจิตร (2542) พบว่า ที่อุณหภูมิ

25-30 องศาเซลเซียส สามารถเกิดการสร้างดอกได้ นอกจากนี้เห็ดที่เพาะในถุงเพาะขนาดใหญ่ (800 กรัม/ถุง) จะให้ผลผลิตเห็ดที่ดีกว่าเห็ดที่เพาะในถุงขนาดเล็ก (400 กรัม/ถุง)

ส่วนในยุโรปมีการศึกษาที่คล้ายกันโดย Zervakis และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยของเห็ดโคนญี่ปุ่นบนอาหารจำพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งผลการศึกษาสรุปได้ว่า เห็ดโคนญี่ปุ่นสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกลักษณะทนร้อนที่ต้องการ จากกลุ่มเส้นใยที่งอกมาจากสปอร์ของเห็ดโคนญี่ปุ่นในอุณหภูมิสูง เนื่องจากไม่สามารถที่จะไปทำการคัดเลือกเห็ดชนิดนี้จากหลายๆแหล่งหรือจากหลายๆสายพันธุ์ได้ เพราะเห็ดชนิดนี้เท่าที่ทำการเพาะอยู่ในประเทศไทยค่อนข้างจะมีอยู่ในวงแคบ กอปรกับไม่มีเห็ดชนิดนี้ขึ้นอยู่ตามธรรมชาติ จึงน่าจะใช้เส้นใยที่ได้จากสปอร์ซึ่งจะมีความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ เพราะในกระบวนการสร้างสปอร์มีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ที่จะมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซม ซึ่งก็คือยีนหรือ DNA ระหว่างกัน ทำให้แต่ละสปอร์มีความแตกต่างกันไป ไม่เหมือนกันทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิสูงของเห็ดชนิดนี้โดยจีรนันท์ วงศ์อามาตร และ จารุณี สมบาน (2544) ได้ทำการศึกษาความทนทานต่ออุณหภูมิของสปอร์เห็ดโคนญี่ปุ่น และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสปอร์เดี่ยวที่ทนร้อนของเห็ดโคนญี่ปุ่นสามารถงอกได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานที่มีการตีพิมพ์เกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์เห็ดโคนญี่ปุ่น ให้มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงแต่อย่างใด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เห็ดโคนญี่ปุ่นให้มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูง โดยคัดเลือกเส้นใยที่งอกจากสปอร์ ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงที่มีอัตราการเจริญเติบโตดีในสภาวะอุณหภูมิสูง นำมาผสมกันให้เกิดเป็นเส้นใยระยะที่สองซึ่งถือว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่ จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตดีในสภาวะอุณหภูมิสูง ไปเพาะลงในถุงขี้เลื่อย ทดสอบอัตราการเจริญในถุงขี้เลื่อยที่อุณหภูมิห้อง รวมทั้งชั่งน้ำหนักสดของดอกเห็ดที่เกิดขึ้น วิเคราะห์หาสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญและผลผลิตดีที่สุดในอุณหภูมิห้อง นำไปเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป ทำการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ดังกล่าวข้างต้นทั้งหมด 3 รุ่น เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะทนร้อนเพิ่มขึ้น

ในงานปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะวิธีการผสมเส้นใยเป็นการค่อยๆ เพิ่มยีน (gene) ที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ ซึ่งเป็นลักษณะที่ควบคุมโดยยีนมากคู่ที่ซับซ้อน (Griffin, 1994) ที่เรียกว่า โปลียีน (polygene) เข้าไปทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์นานมาก ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์เห็ดโคนญี่ปุ่นในครั้งนี้ จึงเป็นเพียงแค่การเริ่มต้นเท่านั้น สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้น่าจะมีลักษณะทนร้อน และปริมาณผลผลิตที่เพิ่มขึ้นเพียงพอที่จะพัฒนาเป็นสายพันธุ์เพื่อการค้าต่อไปได้