บทที่ 1
บทนำ

เห็ดฟาง (Volvariella volvacea) เป็นเห็ดที่คนไทยนิยมบริโภคกันมาก และเป็นเห็ดที่มีปริมาณการผลิต และมูลค่าการผลิตสูงที่สุดในประเทศ แต่ละปีมีการผลิตเห็ดฟางออกสู่ตลาดประมาณ 70,000 ตัน คิดเป็นมูลค่ามากกว่า 900 ล้านบาท ปริมาณเห็ดในท้องตลาดและราคาจำหน่ายมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงตามผลผลิตที่ได้ต่อปี การที่ปริมาณการผลิตและราคาเห็ดฟางขึ้นลงมากเช่นนี้ ส่งผลให้เกิดผลเสียต่อความนิยมในการบริโภคเห็ดฟาง และขบวนการผลิตต่อเนื่องตามมาด้วย (ยงยุทธ์ สายฟ้า และคณะ, 2529)

เทคโนโลยีในการผลิตเห็ดฟางที่เกษตรกรไทยใช้อยู่ค่อนข้างล้าหลังกว่าหลายประเทศในทวีปเอเชียด้วยกัน สายพันธุ์เห็ดฟางที่มีอยู่ไม่เหมาะสมสำหรับการเพาะเห็ดฟางเพื่อการอุตสาหกรรม ผลผลิตที่ได้แปรปรวนไปตามสภาพดินฟ้าอากาศ ผลผลิตต่ำและมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ เป็นผลทำให้ผลผลิตของเห็ดฟางไม่เพียงพอสำหรับการส่งออกจำหน่าย (กรมวิชาการเกษตร, 2529 ก)

ข้อจำกัดของสายพันธุ์เห็ดฟางที่มีอยู่นี้ส่งผลให้ประเทศไทยไม่สามารถเพาะเห็ดฟางเพื่อการส่งออกแข่งขันกับตลาดต่างประเทศได้ และมีผลทำให้เกษตรกรไทยต้องผลิตเห็ดฟางเพื่อขายสดในตลาดภายในประเทศเป็นส่วนใหญ่ เห็ดฟางที่เพาะออกจำหน่ายก็เน่าเสียง่าย จึงจำเป็นต้องขายอย่างรวดเร็ว จนมีผลกระทบทำให้ราคาของเห็ดฟางในตลาดขึ้นลงรวดเร็วมาก (กรมวิชาการเกษตร, 2529 ข)

เกษตรกรจำเป็นต้องมีสายพันธุ์เห็ดฟางที่มีคุณภาพในการให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดีและมีประสิทธิภาพในการให้ผลผลิตสม่ำเสมอ รวมทั้งให้ผลผลิตสูงอย่างต่อเนื่อง (Deacon, 1980) ในด้านเศรษฐกิจเห็ดฟางที่เพาะได้ควรมีราคาที่เหมาะสม สามารถแข่งขันกับผลผลิตของประเทศอื่น ๆ ได้ด้วย (กรมวิชาการเกษตร, 2529 ก, 2529 ข)

เห็ดฟาง เป็นเห็ดชนิดหนึ่งที่ขึ้นง่าย ภาษาตลาดเรียกว่า Paddy straw mushroom พบในทางตอนใต้ของประเทศจีน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย พม่า และไทย (Chang และ Miles, 1989) เมื่อเริ่มเกิดสายใยจะเจริญอยู่ในอาหารที่ใช้เพาะ แล้วต่อมาจะกลายเป็นตุ่มดอก (Fruiting primordia) ซึ่งจะค่อย ๆ เจริญเป็นดอกเห็ด และส่วนที่ห่อหุ้มเป็นกระเปาะอยู่ที่ฐานดอกเห็ด หมวกเห็ดกางออกมีขนาดประมาณ 5-6 ซม. เนื้อหมวกเห็ดหนาพอสมควร เป็นสีเทาอ่อนหรือเทาแก่ ขอบหมวกเรียบ ด้านล่างของหมวกมีครีบบาง ๆ แผ่เป็นวงรัศมีรอบลำต้นเมื่อเห็ดมีอายุมากขึ้น ครีบหมวกจะเปลี่ยน

เป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีน้ำตาลแก่ ก้านหมวกเห็ดมีสีขาว ผิวเรียบและเนื้อภายในละเอียดแน่น (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2530; Ho, 1985)

สปอร์ของเห็ดฟาง มีความกว้างประมาณ 5-6 ไมโครเมตร และมีความยาวอยู่ในช่วงระหว่าง 7-10 ไมโครเมตร มีรูปร่างกลมรี ปลายข้างหนึ่งของสปอร์มีตุ่มเล็ก ๆ ติดอยู่หนึ่งอัน สปอร์มีสีชมพูหรือน้ำตาลแก่ (Chang และ Miles, 1989)

Chang และ Yau (1971) ได้รายงานว่าเส้นใยของเห็ดฟางส่วนใหญ่เป็นแบบผสมพันธุ์ในสายเดียวกัน (Homothallic) และไม่พบการสร้าง Clamp connections สร้างสปอร์ 2 ชนิด คือ สปอร์ที่ใช้สำหรับการผสมพันธุ์ (sexual basidiospores) และสปอร์ผนังหนา (asexual chlamydospores) เซลล์ของสปอร์และเซลล์ของเส้นใยมีหลายนิวเคลียส โดยที่จำนวนนิวเคลียสภายในเซลล์แต่ละเซลล์จะมีจำนวนไม่แน่นอน ส่วนใหญ่จะพบประมาณ 1-15 นิวเคลียสต่อเซลล์ ที่พบสูงสุดจะมีนิวเคลียสอยู่ภายในเซลล์มากถึง 31 นิวเคลียส ตำแหน่งของนิวเคลียสไม่แน่นอน อาจอยู่กลางเส้นใยหรือติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ รูปร่างของนิวเคลียสมีทั้งกลม (spherical) และรี (oval) เส้นผ่าศูนย์กลางของนิวเคลียสยาวประมาณ 1.68-2.94 ไมโครเมตร

พัฒนาการของการเกิดดอก

วงชีวิตของเห็ดฟางมีการเจริญเติบโตแบ่งได้เป็น 6 ระยะคือ ระยะที่เจริญเป็นหัวเข็มหมุด (pin head) ระยะที่เจริญเป็นตุ่มดอกเล็ก ๆ (tiny button) ระยะที่ตุ่มดอกขยายใหญ่ขึ้น (button) ระยะที่เจริญเป็นรูปไข่ (egg) ระยะที่ก้านดอกยืดยาวออก (elongation) และระยะที่เจริญเป็นดอกสมบูรณ์ (mature) (Chang และ Yau, 1971)

นับจากวันที่เริ่มต้นเพาะเห็ดบนฟางเป็นเวลา 8-12 วัน เส้นใยจะเจริญเป็นหัวเข็มหมุดขึ้นบนฟาง หลังจากนั้น 2-3 วัน หัวเข็มหมุดจะเจริญไปเป็นตุ่มดอกเล็ก ๆ แล้วค่อยขยายใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ ภายใน 1 วัน ก็จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นรูปไข่ จากนั้นก้านดอกจะยืดยาวออกกลายเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ ในที่สุด (Chang และ Yau, 1970)

การเกิดดอกเห็ดขึ้นกับปัจจัยที่สำคัญ 3 ปัจจัยคือ อุณหภูมิ-ต้องเป็นอุณหภูมิระหว่าง 28-32°ซ. ความชื้นสัมพัทธ์มีค่าระหว่าง 85-95% และความเข้มของแสงที่เหมาะสมสำหรับการออกดอกคือ 50 แรงเทียน (Chang และ Miles, 1989)

คุณค่าทางโภชนาการของเห็ดฟางประกอบด้วย โปรตีน 2.68% น้ำตาล 2.60% ไขมัน 2.24% เถ้า 0.91% วิตะมินซี 206.27 มก. ต่อน้ำหนักสด 100 กรัม (Chang และ Yau, 1971; Ho, 1985; Orillo และ Carangal, 1961)

สายพันธุ์ของเห็ดฟางที่แยกได้จากดอกเดียวกัน มีความแตกต่างกันในแง่ของการเจริญ ความหนาแน่นของเส้นใย และความสามารถในการสร้างสปอร์ผนังหนา พบว่าสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญสูง เส้นใยหนาแน่นดี สร้างสปอร์ผนังหนาได้น้อย และสร้างตุ่มดอกมาก มีแนวโน้มที่จะให้ผลผลิตสูง (ยงยุทธ์ สายฟ้า และคณะ, 2528)

การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในธรรมชาตินั้นมีความถี่ต่ำมาก ประมาณ 10^{-5} ถึง 10^{-6} ถ้าต้องการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วยวิธีการกลายพันธุ์ จะต้องอาศัยปัจจัยภายนอกช่วยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น อาจใช้รังสี หรือสารเคมีเป็นตัวชักนำ (Crow, 1964)

การเปลี่ยนแปลงเซลล์ให้มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มมากขึ้นเป็นชุด หรือน้อยกว่าเดิมนั้นก็ถือว่าเป็นการกลายพันธุ์ หรือเปลี่ยนจำนวนชุดโครโมโซมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นมีคุณลักษณะที่ดีขึ้นกว่าเดิมได้ (Robinson, 1978) วิธีการหนึ่งที่นิยมใช้กันคือการใช้สาร colchicine ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของยีสต์ colchicine มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างสปินเดิ้ล ไฟเบอร์ (spindle fiber) ทำให้จำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นภายในเซลล์ ในขบวนการของการแบ่งเซลล์ เนื่องจากโครโมโซมไม่ถูกแยกออกไปอยู่คนละขั้วเหมือนสภาพปกติ จากเหตุดังกล่าว ทำให้เซลล์นั้นมีจำนวนชุดโครโมโซมภายในนิวเคลียสมากกว่า 1 ชุด ทำให้จำนวนชุดเพิ่มขึ้นกว่าที่ควรเป็น (Esser และ Kuenen, 1967; Stansfield, 1969)

การรวมโปรโตพลาสต์ (Protoplast fusion) ของเซลล์ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิด เป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้จำนวนชุดโครโมโซมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น โดยการนำเซลล์มาละลายเอาผนังเซลล์ออกให้เป็นโปรโตพลาสต์ (Protoplast) แล้วนำมาหลอมรวมกัน เหมาะสำหรับสิ่งที่มีชีวิตที่ไม่มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศ เนื่องจากการรวมกันของโปรโตพลาสต์ มีผลในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของเซลล์ วิธีนี้จึงมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์วิธีหนึ่ง โดยการสร้างลูกผสม (Fusants) ใหม่ ที่มีโครโมโซมเป็นชุดหรือหลายชุด (Polyploid) ซึ่งอาจจะให้ลักษณะแข็งแรง ดอกใหญ่ ดังที่ได้ศึกษากันในกลุ่มพืช (Peberdy และคณะ, 1976)

หลักสำคัญในการเตรียมโปรโตพลาสต์ คือ ต้องมีเอนไซม์ที่จะใช้ย่อยผนังเซลล์ของราออกไปเพื่อทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ (Peberdy, 1985)

เทคนิคและวิธีการรวมตัวของโปรโตพลาสต์ มี 3 ขั้นตอน คือ

1. การเตรียมโปรโตพลาสต์ (protoplast preparation) คือ การเตรียมเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่ปราศจากผนังเซลล์ โดยเอาผนังเซลล์ออกหรือทำลายผนังเซลล์ให้เหลือเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ที่ล้อมรอบไซโตพลาสซึม (cytoplasm) เท่านั้น ถ้าการลอกผนังเซลล์เกิดสมบูรณ์ผลที่ได้คือ โปรโตพลาสต์ (Protoplast) แต่ถ้าการละลายหรือทำลายผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ ผลที่ได้คือสเฟียโรพลาสต์ (Sphaeroplast) (Tanaka และ Phaff, 1965) วิธีเตรียมโปรโตพลาสต์ที่ดีที่สุดในขณะนี้คือ การใช้เอนไซม์ย่อยสลายในกลุ่มของ lytic enzyme

เอนไซม์ย่อยสลายที่นิยมใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์และรา คือ เอนไซม์จากหอยทาก (Helix pomatia) ชื่อ Helicase เอนไซม์ Zymolyase จาก Arthrobacter luteus และเอนไซม์ Glucanases หรือ Novozyme 234 จาก Trichoderma harzianum (Davies, 1988; Peberdy, 1985)

โปรโตพลาสต์จะถูกทำลายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมซิส โดยจะมีรูปร่างกลมในสารละลายที่มีแรงดันออสโมซิสภายนอกเท่ากับภายในเซลล์ หรือพอเหมาะ สารละลายที่พอเหมาะนี้เรียกว่า โปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ (protoplast buffer) มีองค์ประกอบสำคัญคือ osmotic stabilizer ซึ่งมักใช้สารละลายของน้ำตาล หรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น 0.8-1.2 โมลาร์ซูโครส (sucrose), 0.8-1.2 โมลาร์ซอร์บิทอล (sorbitol), 0.8-1.2 โมลาร์แมนนิทอล (mannitol) หรือสารละลายของเกลืออนินทรีย์บางชนิดที่ความเข้มข้นเหมาะสม เช่น 0.6 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ เป็นต้น (Peberdy, 1985)

ปัจจัยหลายอย่างมีผลต่อการ เตรียมโปรโตพลาสต์ เช่น อายุของเชื้อที่ใช้ พบว่าอายุของเชื้อที่จะนำมาเตรียมโปรโตพลาสต์ได้ดีที่สุดคือ เมื่อเชื้อมีอายุอยู่ในระยะ exponential phase องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีความสำคัญ เพราะจะทำให้องค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกันไป การเติมกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบระหว่างการเลี้ยงเชื้อจะช่วยให้ผนังเซลล์ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยสลายง่ายขึ้นนอกจากนั้น การเติมสารบางชนิดให้เซลล์ เช่น thiol compound จำพวก dithiothreitol, β-mercaptoethanol หรือ thioglycolate ก่อนจะนำมาเตรียมเป็นโปรโตพลาสต์ จะช่วยให้เตรียมโปรโตพลาสต์ได้ง่ายขึ้น (Gascon และคณะ, 1964)

Yamada และคณะ (1983) ได้เตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของรา Collybia veltipes และ Pleurotus ostreatus อายุ 2-3 วัน เปรียบ

เทียบกันพบว่าโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้จาก C. veltipes มีจำนวนมากกว่าโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้จาก P. ostreatus ถึง 2 เท่า ใช้เวลาบ่มในเอนไซม์ย่อยสลายนาน 3-4 ชม. องค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างกันทำให้เอนไซม์ย่อยสลายทำงานได้ไม่เท่ากัน

ในปี ค.ศ.1983 Keller ได้ทดลองเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา Claviceps purpurea ซึ่งเป็นเชื้อราที่ผลิต ergot alkaloids นำโปรโตพลาสต์ที่ได้ไปทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้ ethyl methane sulfonate (EMS) และ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) เป็น mutagens พบว่าได้มิวแตนท์ง่ายกว่าการเตรียมมิวแตนท์จากเซลล์

Hong และ Yeup (1985) ได้ทดลองเตรียมโปรโตพลาสต์จากสปอร์และเส้นใยของเห็ดหอม (Lentinus edodes) ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเบต้า-กลูคูโรนิเดส โดยใช้เชื้ออายุ 3 วัน บ่มนาน 4 ชม. และเมื่อทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้บนอาหารวุ้นแข็ง เปรียบเทียบกันพบว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากสปอร์มีความสามารถในการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่สูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยประมาณ 10 เท่า

Morinaga และคณะ (1985) ใช้เอนไซม์ผสมของไคติเนส เซลลูเลส ไซโมไลเอส และเบต้า-กลูคูโรนิเดส เป็นเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของ Coprinus pellucidus อายุ 4 วัน โดยบ่มนาน 3 ชม. ได้โปรโตพลาสต์ประมาณ 59.5×10^3 เซลล์ต่อ มล. และทำให้โปรโตพลาสต์เจริญกลับสู่สภาพเส้นใยบนอาหารวุ้นโปเตโตซูโครสได้

Kropp และ Fortin (1986) ได้ทดลองใช้เอนไซม์ย่อยสลายสำเร็จรูป 4 ชนิด คือ ไคติเนส โนโวไซม์ 234 เซลลูเลส และไซโตเฮลิเคส เปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์แบบผสมระหว่างโนโวไซม์กับเซลลูเลส โนโวไซม์กับไคติเนส โนโวไซม์กับไซโตเฮลิเคส และเซลลูเลสกับไคติเนส กับไซโตเฮลิเคส พบว่าโนโวไซม์ 234 เป็นเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ที่เหมาะสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเชื้อรา Laccaria bicolor มากที่สุด โดยสามารถเตรียมโปรโตพลาสต์ได้สูงสุด 12.4×10^6 เซลล์ต่อ มล. ใช้เวลาบ่มนาน 4 ชม. ซึ่งการเติมไคติเนสหรือเซลลูเลสไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนโปรโตพลาสต์แต่อย่างใด เมื่อเติมลงไปพร้อมกับโนโวไซม์ ไซโตเฮลิเคสจะช่วยป้องกันมิให้โปรโตพลาสต์หลุดออกจากเส้นใย

ในปี ค.ศ. 1988 Billich และคณะ พบว่า Streptomyces หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูง สำหรับย่อยสลายผนังเซลล์ของ

Fusarium scirpi โดยนำเส้นใยของ Fusarium หนัก 35 มก. บ่มในสารละลายเอนไซม์ 20 ไมโครลิตรต่อ มล. ที่ 25°ซ ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที จะได้จำนวนโปรโตพลาสต์ ประมาณ $1x10^9$ เซลล์ต่อ มล.

Homolka และคณะ (1988) พบว่ารา Oudemansiella mucida เป็นเชื้อราที่สามารถผลิต mucidin ซึ่งเป็นยาต่อต้านเชื้อราได้ในปริมาณจำกัด จึงทดลองเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อราชนิดนี้ เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้สามารถผลิต mucidin ได้ในปริมาณสูงขึ้น โดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการฉายแสงอุลตราไวโอเลต และการเติมสาร N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) เปรียบเทียบกัน จากวิธีการดังกล่าวสามารถปรับปรุงสายพันธุ์ของราได้ โดยฉายแสงอุลตราไวโอเลตในระยะเวลาสั้น ๆ หรือเติมสารก่อการกลายพันธุ์ที่มีความเข้มข้นต่ำให้กับโปรโตพลาสต์ แล้วจึงนำโปรโตพลาสต์ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง เพื่อให้โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่อีกครั้งหนึ่ง

Hebraud และ Fevre (1988) ทดลองเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา 4 สปีชีส์ คือ Hebeloma cylindrosporum Hebeloma edurum Hebeloma sinapizans และ Suillus vellini โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ 2 ชนิด คือ เซลลูเลส และดริสเลส พบว่าจำนวนของโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้ขึ้นกับชนิดของ osmotic stabilizer และอายุของเส้นใย

Barrett และคณะ (1989) ทำการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเอคโตไมคอไรซาสายพันธุ์ที่มีประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตให้พืชเศรษฐกิจ จำนวน 5 ชนิด คือ Cenococcum geophilum Pisolithus tinctorius Suillus luteus Laccaria bicolor และ Laccaria laccata ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโนโวไซม์ 234 พบว่าโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา 3 สปีชีส์แรก ไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้ ส่วนโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา L. bicolor และ L. laccata มีร้อยละของการกลับคืนสู่สภาพเส้นใยเท่ากับ 0.1% และ 0.9% ตามลำดับ

2. การรวมโปรโตพลาสต์ (Protoplast fusion) คือการนำโปรโตพลาสต์มารวมกันในสารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) และในแคลเซียมไอออน (Ca^{++}) เนื่องจาก PEG เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการชักนำให้โปรโตพลาสต์มารวมกลุ่มกันได้ดี (fusogenic property) ช่วยกระตุ้นให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ของพืช (Peberdy และคณะ, 1976) โปรโตพลาสต์ของสัตว์ (Osserman และคณะ, 1974) โปรโตพลาสต์ของแบคทีเรีย (Haska, 1971) โปรโตพลาสต์ของยีสต์ (Kitamura และคณะ, 1974) และโปรโตพลาสต์ของรา (Anne และ Peberdy, 1976)

โพลีเอทธิลีนไกลคอล เป็นสารโพลีเมอร์ที่มีสูตรโมเลกุลคือ $CH_2OH-(CH_2-O-CH_2)_n-CH_2OH$ มีน้ำหนักโมเลกุลหลายขนาด แต่พบว่าที่ใช้ได้ดีกับเชื้อราคือ น้ำหนักโมเลกุล 4000 และ 6000 (Peberdy, 1985)

ในปี ค.ศ. 1977 Van Solingen และ Van der Plaat ได้นำ PEG มาใช้กับโปรโตพลาสต์ของยีสต์ ทำให้เซลล์มาเกาะกันเป็นกลุ่ม และเยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์จะเปิดเชื่อมกันทำให้เกิดการรวมของโปรโตพลาสต์

Anne และ Peberdy (1976) ทดลองทำการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อราสปีชีส์เดียวกัน (Intraspecific fusion) ของ auxotrophs 6 ชนิด คือ Penicillium chrysogenum P. patulum P. roquefortii Aspergillus nidulans A. niger และ Cephalosporium acremonium พร้อมทั้งทำการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อราต่างสปีชีส์ (Interspecific fusion) ระหว่าง P. notatum และ P. chrysogenum โดยใช้โพลีเอทธิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุล 6000 เพื่อทำให้เกิดการรวมตัว พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการรวมของโปรโตพลาสต์ ร้อยละ 0.62

Abe และคณะ (1982) ได้นำเส้นใยของเห็ด Tricholoma matsutake อายุ 15-25 วัน มาทดลองเตรียมโปรโตพลาสต์ โดยใช้ 0.5% เซลลูเลส ผสมกับ 0.5% ไซโมไลเอส และ 1.5% เบต้า-กลูคูโรนิเดส เป็นเอนไซม์ย่อยสลาย บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 3 ชม. โดยทำการเขย่าตลอดเวลา พบว่าโปรโตพลาสต์จะเริ่มหลุดออกจากเส้นใยเมื่อเวลาผ่านไป 30-60 นาที และได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดในเวลาดังกล่าว ต่อมาทำการรวมโปรโตพลาสต์เข้าด้วยกัน โดยใช้สารละลายที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบในสภาวะที่เป็นด่าง โปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้บนอาหารแข็ง โดยใช้เวลาประมาณ 3-4 วัน เซลล์ที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์พบว่าจะมีขนาดใหญ่กว่าเดิม

มีการสร้างลูกผสมระหว่างโปรโตพลาสต์ของเชื้อเห็ดต่างสปีชีส์โดยมีมาร์คเกอร์ (Interspecific protoplast fusion) ซึ่งอยู่ในจีนัส Pleurotus ได้แก่ P. ostreatus $ileu^-$; P. columbinus ade^-; P. pulmonarius lys^- และ P. sajor-caju met^- พบว่าลูกผสมระหว่างโปรโตพลาสต์ของสายพันธุ์ $ileu^-$ กับ ade^- สามารถสร้างดอกเห็ดบนอาหารที่มีส่วนผสมของขี้เลื่อยได้ ขณะที่ลูกผสมระหว่างโปรโตพลาสต์ของสายพันธุ์ $ileu^-$ กับ met^-, lys^- กับ met^- และ ade^- กับ met^- ไม่สามารถสร้างฟรุตติ้งบอดี้ได้ (Toyomasu และคณะ, 1986; Toyomasu และ Mori, 1987 a, 1987 b)

ในปี ค.ศ. 1988 Kitamoto และคณะได้ทดลองใช้เอนไซม์ที่แยกได้จากเชื้อรา Trichoderma harzianum ย่อยสลายผนังเซลล์ของราหลายชนิด โปรโตพลาสต์ที่เตรียม

ได้จากเอนไซม์ดังกล่าวมีจำนวนมากกว่าที่เตรียมจากเอนไซม์สำเร็จรูป อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำให้โปรโตพลาสต์หลุดออกจากเส้นใยคือ อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 2 ชม. ถ้าบ่มเส้นใยไว้นานเกินกว่า 4 ชม. หรือใช้ปริมาณเอนไซม์มากเกินไปโปรโตพลาสต์จะถูกทำลาย ความสามารถในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นกับสปีชีส์ของเชื้อราที่ย่อยสลาย พบว่าสามารถใช้ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราได้ดีจากมากไปหาน้อย ตามลำดับดังนี้ Basidiomycetes Ascomycetes Deuteromycetes และ Zygomycetes คาดว่าผลที่ได้น่าจะเกิดจากความแตกต่างในการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เบต้า-1,3-กลูคาเนส และไคติเนส นั่นเอง

ในปีเดียวกันนั้น Stasz และคณะ ได้นำเอาวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ไปใช้ในการสร้างลูกผสมของรา Trichoderma harzianum เพื่อปรับปรุงให้ได้สายพันธุ์ใหม่ ซึ่งเป็น Biological control agent สำหรับจุลชีพที่ทำให้เกิดโรคพืช โดยเตรียมโปรโตพลาสต์จากเอนไซม์โนโวไซม์ และรวมโปรโตพลาสต์เข้าด้วยกันโดยอาศัยสารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอล พบว่าได้ลูกผสมที่มีคุณสมบัติดีกว่า และมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ โดยมีอัตราการเจริญเติบโตในอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป

3. การเกิดผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ (Protoplast regeneration) เมื่อโปรโตพลาสต์จากสายพันธุ์ 2 ชนิด มารวมกันแล้ว โปรโตพลาสต์ที่ได้จะสร้างผนังเซลล์กลับไปเป็นเซลล์ปกติ เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์และสร้างโคโลนีได้ใหม่ สำหรับการเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ปกติเกิดขึ้นได้โดยการที่โปรโตพลาสต์นั้นจะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ (Hong และ Yeup, 1985) ตามปกติเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม โปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาอีกครั้งหนึ่ง สภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป ส่วนใหญ่จะเลี้ยงให้เจริญบนอาหารวุ้นแข็งกว่าปกติโดยมีวุ้นอยู่ร้อยละ 3 ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้อย่างรวดเร็ว (Peberdy, 1979)

เส้นใยเห็ดที่สามารถเตรียมโปรโตพลาสต์ และทำให้เกิดผนังเซลล์ใหม่ได้แล้ว คือ เห็ดพวก Pleurotus (Toyomasu และคณะ, 1986; Toyomasu และ Mori, 1987 a, 1987 b) และเห็ดหอม (Lentinus edodes) (Hong และ Yeup, 1985)

การรวมโปรโตพลาสต์ที่ต่างกลุ่มกัน ให้มาหลอมรวมตัวกัน อาจจัดแบ่งได้เป็น 3 แบบ โดยยึดหลักการจัดหมวดหมู่ตามอนุกรมวิธาน ดังนี้คือ

1. Intraspecific fusion เป็นการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อที่อยู่ในสปีชีส์ (species) เดียวกัน อาจแตกต่างสายพันธุ์ (strain) หรือต่างเพศ เซลล์ลูกผสมที่เกิดโดยวิธีนี้มักมีความคงตัว (stable) สูง เนื่องจากเซลล์พ่อและแม่ที่ผสมกันมีความแตกต่างในทางพันธุกรรมน้อย (Peberdy และคณะ, 1976)

ได้มีรายงานถึงการรวมกันของโปรโตพลาสต์ที่เตรียมจากเส้นใยของเชื้อรา และเชื้อเห็ดในสปีชีส์เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ดังนี้

สปีชีส์ของเชื้อรา	เอกสารอ้างอิง
1. Penicillium chrysogenum	Anne และ Peberdy (1976)
2. Aspergillus nigers	Anne และ Peberdy (1976)
3. Cephalosporium acremonium	Anne และ Peberdy (1976)
4. Pleurotus ostreatus	Toyomasu และ Mori (1987 a)
5. Pleurotus pulmonarius	Toyomasu และ Mori (1987 a)
6. Trichoderma harzianum	Stasz และคณะ (1988); Pe'er และ Chet (1990)

2. Interspecific fusion เป็นการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อที่อยู่ต่างสปีชีส์ ได้รวบรวมรายงานของการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา และเชื้อเห็ดที่อยู่ในสกุลเดียวกันแต่ต่างสปีชีส์ได้ดังนี้

สปีชีส์ของเชื้อราที่รวมกัน	เอกสารอ้างอิง
1. Penicillium chrysogenum กับ Penicillium notatum	Anne และ Peberdy (1976)
2. Pleurotus ostreatus กับ Pleurotus columbinus	Toyomasu และคณะ (1987)
3. Pleurotus columbinus กับ Pleurotus sajor-caju	Toyomasu และคณะ (1987)

3. Intergeneric fusion คือการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อต่างสกุล โดยยังไม่พบรายงานของการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อราและเชื้อเห็ดด้วยวิธีนี้เลย

ปกติลูกผสมที่เกิดจากวิธี interspecific และ intergeneric fusion มักจะไม่ค่อยคงตัว นั่นเป็นเพราะความแตกต่างกันอย่างมากของนิวเคลียสของเชื้อราคู่ผสม

ที่นำมารวมกัน ทำให้การรวมกันของนิวเคลียสเกิดขึ้นยาก นิวเคลียสของลูกผสมที่ได้จะเกิดการแยกตัวไปเหมือนกับสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีอยู่เดิม เมื่อเลี้ยงไปได้สักระยะหนึ่ง (Anne และ Peberdy, 1976)

การคัดเลือกลูกผสม

การคัดเลือกลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์จะทำได้ง่ายเมื่อสายพันธุ์พ่อแม่มี genetic marker ซึ่งเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะเป็น regeneration medium จะสามารถแยกลูกผสมออกจากพ่อแม่ได้ง่าย (Davies, 1988) สำหรับการตรวจเพื่อพิสูจน์ว่าลูกผสมที่ได้เป็นลูกผสมที่แท้จริงหรือไม่นั้น อาจทำควบคู่กันได้คือ ตรวจสัณฐานวิทยา (morphology) (Esser และ Kuenen, 1967) ตรวจปริมาณดีเอนเอทั้งหมด (DNA content) โดยใช้ตามวิธีของ Stumpf, 1947; Burton, 1956 ตรวจการเข้ากันได้ของดีเอนเอ (DNA homology) (Vipada Youtananukorn และ Oshima, 1978) การย้อมนิวเคลียสตามวิธีของ Suzuki และคณะ, 1982 หรือเปรียบเทียบการใช้หรือการสร้างสารประกอบคาร์บอนตามวิธีของ Tanaka และ Phaff, 1965 เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย