หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เห็ดเป็นพืชชั้นต่ำจำพวกเฮทเทอโรโทรพที่มนุษย์นำมาใช้เป็นอาหารเห็ดโดยทั่วไปมีโปรตีน เกลือแร่ และวิตามินเป็นส่วนประกอบที่สูงกว่าพืชผักชนิดอื่นๆ นอกจากการมีคุณค่าทางอาหารสูงแล้ว เห็ดบางชนิดยังมีสรรพคุณทางยาอีกด้วย ปัจจุบันเกือบจะถือได้ว่าเห็ดเป็นอาหารที่มีความจำเป็นต่อประชากรมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากมูลค่าการนำเข้าและการส่งออกของเห็ดระหว่างปี พ.ศ. 2531-2536 (ตารางที่ 1) มูลค่านี้ยังไม่ได้รวมกับเห็ดที่มีการลักลอบนำเข้ามาในประเทศอีกส่วนหนึ่งด้วย ในบรรดาเห็ดนำเข้านี้เห็ดหอมแห้งจัดเป็นพวกที่มีการนำเข้ามาในประเทศปริมาณสูงสุด เนื่องจากเป็นที่นิยมเพราะรสชาดอร่อย ดอกใหญ่ เนื้อหนา กลิ่นหอม สีสวย และมีราคาถูกกว่าเห็ดหอมที่ผลิตได้ภายในประเทศ

เห็ดหอมหรือที่ชาวญี่ปุ่นเรียกว่า Shiitake มีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เรียกกันมาแต่ดั้งเดิมว่า *Lentinus edodes* (Berk.) Sing จนกระทั่งปี 1983 Pegler ได้ให้ชื่อที่ถูกต้องว่า *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler เห็ดหอมเป็นเห็ดที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง เป็นอาหารที่มีผู้รู้จักกันดีทางซีกโลกตะวันออก มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีสรรพคุณทางยาป้องกันโรค เช่น ลดการสะสมของไขมันในหลอดเลือด ความดันโลหิตสูง มีสารต่อต้านเนื้องอกไวรัส และมะเร็ง (พิมพ์กานต์ และ อุทัย, 2526 และ Chang และ Miles, 1989) นอกจากสารสกัดจากดอกและสปอร์ของเห็ดหอมมีคุณสมบัติเป็น antiviral agents โดยสามารถยับยั้งการเจริญและการติดเชื้อ influenza A/SW15 virus ที่ infect ในหนู (Tsunoda และ Ishida, 1969) แล้ว สารประเภทโพลีแซคคาไรด์บางชนิดที่สกัดได้จากเห็ดหอม มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Chihara และคณะ, 1969 และ 1970, Fujii และคณะ, 1978 และ Sugano และคณะ, 1982) สามารถลดการสะสมของโคเรสเตอรอลในเลือด (Suzuki และ Oshima, 1976) ที่สำคัญคือมีสาร Lentinan (β1,3-glucan) ซึ่งมีคุณสมบัติต่อต้านเนื้องอก มะเร็ง และเอดส์ โดยกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ภูมิต้านทาน (Hamuro และคณะ, 1976 และ Flynn, 1991) ปัจจุบันประเทศญี่ปุ่นมีการสกัดสาร Lentinan นี้เพื่อใช้ควบคู่กับสารเคมีในการบำบัดโรคมะเร็ง สารออกฤทธิ์ในเห็ดหอมและคุณสมบัติต่างๆได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 (Przybylowicz และ Donoghue, 1988) Triratana และคณะ (1992) ศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดหอมต่อการจับตัวของเกล็ดเลือด พบว่าสามารถยับยั้งการจับตัวของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองเมื่อถูกกระตุ้นโดยเอดีพีและคลอลาเจน อันจะทำให้สามารถป้องกันการอุดตันในหลอดเลือดเนื่องจากการจับตัวของเกล็ดเลือดได้

ตารางที่ 1 แสดงมูลค่าการนำเข้าและส่งออกของเห็ดแห้งระหว่างปี พ.ศ. 2531-2536

ปี พ.ศ.	การนำเข้า		การส่งออก	
	ปริมาณ (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)	ปริมาณ (กิโลกรัม)	มูลค่า (บาท)
2531	1,440	147,589	49,375	10,541,918
2532	57,435	11,133,695	56,112	17,722,296
2533	89,332	17,241,159	67,546	11,627,771
2534	118,256	23,161,564	51,927	8,564,566
2535	173,398	34,072,855	39,694	6,852,469
2536	159,739	30,286,202	46,559	8,535,996

ที่มา : ข้อมูลสถิติการค้าระหว่างประเทศ กรมศุลกากร กระทรวงการคลัง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 Biologically active compounds found in *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler.

Compound	Effect(s)	Type of compound	Activity
Eritadenine	lowers cholesterol antiviral	adenine derivative	accelerates cholesterol metabolism and excretion
Ac 2P	antiviral	polysaccharide	inhibits viral replication
Virus-like particles	antiviral antitumor	double stranded RNA	induces interferon production
KS-2	antiviral antitumor	polysaccharide	induces interferon production
Lentinan	antitumor	polysaccharide	stimulates T-helper cells in immune system
LAP-1	antitumor	polysaccharide	immune system modulator
Polyphenol oxidase	antitumor	protein	unknown
Unknown	reduces blood-coagulation	possibly nucleosides or nucleotides	inhibits platelet aggregation
Cortinellin	antibacterial	unknown	broad spectrum antibiotic
Unknown	antifungal	disulfide	unknown
FBP	antiviral	protein	inhibits viral infection in plant

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประเทศที่ผลิตเห็ดหอมส่งออกมากได้แก่ประเทศในเขตร้อน เช่น ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน และเกาหลี ซึ่งมีผลผลิตรวมกันมากกว่า 95 เปอร์เซนต์ของผลผลิตเห็ดหอมทั้งหมดของโลก การเพาะเห็ดหอมส่วนมากจะใช้วิธีเพาะบนวัสดุที่เป็นท่อนไม้ และไม้ที่นิยมเพาะกันคือไม้สกุลโอค (Fagaceae) เช่น oak (*Quercus*), beech (*Fagus*), chestnut (*Castenea*), hornbeam (*Carpinus*) และ chinapin (*Castanupsis*) (Przybylowicz และ Donoghue, 1988) ปัจจุบันจากการเพาะเห็ดแบบดั้งเดิมประสบปัญหาต่างๆมากมาย อาทิเช่น การขาดแคลนท่อนไม้ที่นำมาใช้เพาะ สภาพภูมิอากาศ ความเสียหายที่เกิดจากการปนเปื้อนและการเข้าทำลายของจุลินทรีย์อื่น ล้วนแล้วแต่เป็นขีดจำกัดสำหรับการผลิตเห็ดหอมเพื่อเป็นการค้าโดยวิธีดั้งเดิม จึงได้มีการพยายามพัฒนาเทคนิคใหม่ๆขึ้นมาแทน เช่น ใช้วัสดุเพาะพวกขี้เลื่อยและส่วนอื่นๆของพืชแทน ท่อนไม้ (Han และคณะ, 1981)

ประเทศไทยมีการเพาะเห็ดหอมในเชิงพานิชย์ และอุตสาหกรรมแบบท่อนไม้ในภาคเหนือตั้งแต่ปี พ.ศ. 2517 เพื่อทดแทนการปลูกฝิ่นของชาวเขาหรือเกษตรกรในที่สูง ไม้ที่นิยมใช้ได้แก่กลุ่มไม้ก่อ เช่น ไม้ก่อเดือย (*Castanopsis accuminotissima* Redd.), ไม้ก่อแป้น (*C. indica*), ไม้ก่อตาหมู (*C. fissa* (Champ) Rehdet. Wils) , ไม้ก่อตาหมูหลวง (*Quercus semiserrat* Roxb.) , ไม้ก่อขี้กวาง (*Q. acutissima* Carr.) ฯลฯ (ดีพร้อม, 2525) แต่เนื่องจากไม้ก่อเป็นไม้สงวนของประเทศมีความสำคัญต่อการอนุรักษ์ต้นน้ำและขึ้นได้เฉพาะในบางพื้นที่ ทำให้เป็นอุปสรรคสำหรับการหาแหล่งวัสดุเพาะเห็ดหอม จึงมีการศึกษาการเพาะเห็ดหอมในถุงพลาสติกโดยใช้วัสดุจากการเกษตร (สุทธพรรณ และ อรุณี, 2528) Triratana และ Osathaphant (1988) พบว่าการเพาะเห็ดหอมในประเทศไทยสามารถทำได้โดยวิธีใช้ถุงพลาสติกและใช้วัสดุเหลือใช้ในการเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม เช่น ขี้เลื่อยจากไม้ยาง ไม้เหียง ไม้เปา ไม้เต็ง และไม้ยางพารา ในบรรดาวัสดุเหล่านี้ พบว่าขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นวัสดุเพาะที่ให้ผลผลิตดีที่สุด

ข้อมูลเกี่ยวกับอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็ดหอม ได้รับการศึกษาและวิจัยกันมาอย่างต่อเนื่อง (พิมพ์กานต์ และคณะ, 2529) งานวิจัยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาถึงวิธีการและสภาวะแวดล้อมที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยสายพันธุ์เห็ดหอมที่นำมาเพาะมักเป็นสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ยังไม่มีการผลิตเห็ดหอมจากสายพันธุ์ที่ค้นพบในธรรมชาติของไทยเลย การเพาะเห็ดหอมจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับอาหารที่เหมาะสมแล้ว ยังขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์ที่ใช้ในแต่ละสภาพแวดล้อมอีกด้วย (Myra, 1984) การคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง ผลผลิต ลักษณะดอก ตลอดจนสารประกอบที่มีอยู่ในดอก เหล่านี้ล้วนแล้วแต่เป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องคำนึงถึงทั้งสิ้น เห็ดหอมพันธุ์ต่างๆที่นำเข้ามาจากต่างประเทศซึ่งเดิมมีลักษณะดอกและผลผลิตดี เมื่อเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่ต่างไปจากเดิมอาจมีผลทำให้ได้ลักษณะดอกและผลผลิตที่ต่ำลงได้ ดังนั้นเพื่อที่จะได้ เห็ดหอมที่มีลักษณะตรงต่อความต้องการ การศึกษาและจำแนกลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์เห็ดหอมที่มีอยู่แล้วภายในประเทศและ/หรือที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ตลอดจนสายพันธุ์ลูกผสมที่สร้างขึ้นจึงเป็นสิ่งจำเป็น ทั้งนี้เพื่อที่จะอำนวยประโยชน์และความสะดวกต่อการทำการปรับปรุงพันธุ์

การวิจัยและพัฒนาวิธีจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมสามารถทำได้หลายแบบ โดยมากมักใช้ลักษณะภายนอก เช่น ผลผลิตของดอก สีดอก ขนาดดอก ฯลฯ ลักษณะและสมบัติเหล่านี้ล้วนแล้วแต่ต้องใช้เวลาในการติดตามทดสอบนาน (มากกว่า 6 เดือน) ทำให้การปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมไม่ได้รับการพัฒนาไปได้รวดเร็วเท่าที่ควร เมื่อปี 1981 Toyomasu และ Zenyozi ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมโดยใช้รูปแบบของการสังเคราะห์ไอโซไซม์บางชนิด Royse และ May (1987) ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมโดยการวิเคราะห์ไอโซไซม์ของเอนไซม์หลายชนิด เช่น peptidase, aspartate aminotransferase, diaphorase, malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, glucosephosphate isomerase, phosphoglycerate kinase, mannose phosphate isomerase และ superoxide dismutase อย่างไรก็ตามการจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีติดตามไอโซไซม์ ถึงแม้จะทำได้ไม่ยากแต่การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แยกได้ซึ่งมีหลายรูปแบบนั้น จะให้ผลไม่ค่อยถูกต้องแน่นอนมากนัก นอกจากนี้การสังเคราะห์เอนไซม์ของสิ่งมีชีวิตยังขึ้นกับปัจจัยและภาวะแวดล้อมภายนอกมากมายหลายประการ

ตั้งแต่ปี ค.ศ.1970 ที่เทคนิคทางรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA) ได้ถูกศึกษาและพัฒนาอย่างกว้างขวางเป็นต้นมา ทำให้การศึกษาระดับดีเอ็นเอสามารถกระทำได้ง่ายขึ้น จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอเกิดขึ้นอย่างมากมาย เทคนิคทางรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอที่สำคัญๆ ได้แก่ ความสามารถในการตัดชิ้นดีเอ็นเอตรงบริเวณจำเพาะโดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) เทคนิคการต่อดีเอ็นเอที่ถูกตัดอย่างจำเพาะโดยอาศัยปลายเหนียว (sticky end) ที่ได้จากการตัด เทคนิคการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ (sequencing) เทคนิคการไฮบริไดเซชันของกรดนิวคลีอิค (nucleic acid hybridization) เพื่อหาลำดับเบสที่มีความจำเพาะโดยอาศัยการจับของลำดับกรดนิวคลีอิคคู่สม (complementary nucleic acid sequences) เทคนิคการโคลนดีเอ็นเอ (DNA cloning) ที่เป็นการนำชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งอาจเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอของไวรัส แล้วใส่ให้เข้าไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย จะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจำนวนมากสามารถนำไปศึกษาในด้านต่างๆได้ต่อไป เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ที่สามารถเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในดีเอ็นเอของยีนแล้วนำยีนที่ถูกเปลี่ยนนี้ใส่กลับให้เซลล์หรือสิ่งมีชีวิตอื่น และเทคนิคที่ได้รับความนิยมสูงอีกเทคนิคหนึ่งคือเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยอาศัยไพรเมอร์ (primers) และเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) เทคนิคต่างๆเหล่านี้ทำให้การศึกษาในระดับของดีเอ็นเอเป็นไปได้อย่างสะดวก ถูกต้อง และรวดเร็วยิ่งขึ้น

ในการศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ (genetic variation) ในประชากรของสิ่งมีชีวิต ได้มีการนำเทคนิคทางรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอมาใช้กันอย่างกว้างขวาง การศึกษาความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอ โดยการทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) กำลังเป็นวิธีที่นิยมใช้จำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตอย่างมาก เทคนิคนี้อาศัยความต่างกันของบริเวณที่จำเพาะต่อเอนไซม์ ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันในสายพันธุ์ที่ต่างกัน ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนที่ต่างกัน เมื่อนำมาแยก

และเปรียบเทียบกันโดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีสจะทำให้เกิดลักษณะของ RFLP ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยถ่ายชิ้นดีเอ็นเอเหล่านี้ลงบนแผ่นเมมเบรน ด้วยเทคนิค Southern blot แล้วนำไปทำไฮบริไดเซชันกับตัวติดตาม (DNA probe) ที่เตรียมไว้ เมื่อตรวจจับตัวติดตามที่เกิดการไฮบริไดซ์ก็จะพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (RFLP haplotype) ที่แตกต่างกันออกไป จาก RFLP haplotype ที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำไปวิเคราะห์หาความแตกต่างหรือความเหมือนของสายพันธุ์ และใช้จำแนกและจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสายพันธุ์เดียวกันหรือใกล้เคียงกันได้

สำหรับเทคนิควิเคราะห์ RFLP นี้ได้มีผู้นำไปใช้ศึกษาสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆอย่างกว้างขวาง เช่น การวิเคราะห์สายพันธุ์ของยุงก้นปล่องที่เป็นพาหะและไม่เป็นพาหะนำโรคมาเลเรีย ด้วยดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจาก repetitive sequences (สุมาลี และคณะ,2530) การวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อ *Brugia malayi* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค Lymphatic filariasis ด้วยดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากส่วน repetitive sequences (Sim และคณะ, 1986) Vincent และคณะ (1986) จัดกลุ่มของ *Histoplasma capsulatum* โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจาก *H. capsulatum* (Downs strain) ในปี 1987 Anderson และคณะ ศึกษาสายพันธุ์ของ *Armillaria mellea* (เชื้อราโรคพืช) โดยใช้ลักษณะของ Restriction Fragment Polymorphisms Klich และ Mullaney (1987) ใช้ RFLP ของดีเอ็นเอของโครโมโซม ในการศึกษาความแตกต่างของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus oryzae* ในปี 1990 Wren และคณะ ได้ใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อ *Clostridium difficile* ชนิดที่มีพิษและไม่มีพิษ โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากส่วนของยีน toxin A

การจัดกลุ่มและจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดโดยวิธี RFLP นี้มีการทำกันมาแล้วในเห็ดบางชนิด เช่น Castel และคณะ (1987) ทำการแยกเห็ดแชมปิญอง *Agaricus brunnescens* ออกจาก *Agaricus bitorquis* โดยใช้ RFLP จากดีเอ็นเอของโครโมโซม Hintz และคณะ (1988) ได้ใช้ RFLP ของดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียในการติดตามการถ่ายทอดไมโตคอนเดรียใน *Agaricus bitorquis* ในปี 1990 Kimula และคณะ ศึกษายีน Lignin peroxidase (LPO) จากพวก basidiomycetes โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมจากชิ้นยีน LPO ของ *Phanerochaete chrysosporium* และปี 1992 Toyomasu และคณะ ได้ใช้ ลักษณะของ RFLP ของไมโตคอนเดรีย ในการศึกษาสายพันธุ์ของเห็ด นางฟ้า *Pleurotus sp.* เหล่านี้เป็นต้น

จากที่กล่าวมาทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เทคนิคของ RFLP analysis นี้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเห็ดหอมในประเทศไทย การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการผันแปรของดีเอ็นเอในเห็ดหอมและหาวิธีจัดกลุ่มเห็ดหอมสายพันธุ์ในประเทศและต่างประเทศ ที่ใช้ในการศึกษาทดลองอยู่ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ดของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เครื่องหมายจากดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้น อันจะเป็นการอำนวยประโยชน์ต่อการปรับปรุงและคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์เห็ดหอม ที่เหมาะสมต่อลักษณะสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงทางการค้า และสามารถใช้เทคนิคนี้ในการติดตามการถ่ายทอดลักษณะของพ่อ-แม่

ในการทำสายพันธุ์ลูกผสมให้มีลักษณะเป็นที่ต้องการของตลาด ทั้งยังสามารถนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเห็ดที่มีความสำคัญชนิดอื่นๆ ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย