บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

1. ชีววิทยาของเห็ดนางรม

1.1 การจำแนกเห็ดนางรม

ชื่อวิทยาศาสตร์	Pleurotus ostreatus [(Jacq.ex.Fr) Kummer)
ชื่อสามัญ	Oyster mushroom
Class	Basidiomycetes
Sub class	Homobasidiomycetes
Serier	Hymenomycetes
Order	Agaricales
Family	Tricholomataceae
Genus	Pleurotus
Species	ostreatus

(Smith, 1978, Raper, 1966; Zadrazil, 1978)

1.2 ชนิดของเห็ดนางรม

เห็ดนางรมที่เพาะเลี้ยงกันทุกวันนี้สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด (Type) คือ

ก. เห็ดนางรมชนิดสีขาว (White, Summer หรือ Florida type) เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 20°ซ โดยไม่จำเป็นต้องได้รับอุณหภูมิต่ำเสียก่อน ดอกเห็ดมีสีขาว มีขนาดเล็กและบางกว่าชนิดสีเทา ให้ผลผลิตสูงกว่าชนิดสีเทา

ข. เห็ดนางรมชนิดสีเทา (Gray, Winter type) เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20°ซ ดอกเห็ดมีสีเทา มีขนาดใหญ่และหนากว่าชนิดสีขาว

เห็ดทั้งสองชนิดนี้เพาะเลี้ยงบนวัสดุที่เหมือนกัน ในสภาพการเพาะเลี้ยงเดียวกัน หมวกเห็ดนางรมชนิดสีขาว มีส่วนประกอบของน้ำมากกว่าและมีน้ำหนักแห้งต่ำกว่าหมวกเห็ดชนิดสีเทา (Kalberrer, 1974) เห็ดทั้งสองชนิดนี้สามารถผสมกันได้ แสดงว่าเห็ดดังกล่าวนี้จัดว่าเป็นชนิด (species) เดียวกัน (Eger, 1978)

1.3 อัญฐานวิทยาของเห็ดนางรม

เห็ดนางรมจัดเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเน่าสีขาว (White rot fungi) โดยทำลายทั้งเซลลูโลสและลินินซึ่งเป็นส่วนประกอบของไม้ ดำรงชีพโดยเจริญบนลำต้นและกิ่งก้านของต้นไม้ที่ตายแล้วและบางครั้งอาศัยบนต้นไม้ที่มีชีวิต (Hashimoto and Taharashi, 1974) เป็นเชื้อราที่แพร่หลายในเขตอบอุ่นและจะเกิดดอกในฤดูใบไม้ร่วงหรือฤดูหนาวที่มีอุณหภูมิสูงถึง 15°ซ มีบางสายพันธุ์ต้องการอุณหภูมิในช่วงการออกดอก 15 - 20 °ซ ดอกเห็ดมีก้านดอกติดหมวกทางด้านข้าง เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 - 15 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีสีเทา สีน้ำตาลเทา หรือสีเทาอมน้ำเงิน มีครีบใต้หมวกเป็นสีขาวหรือสีเทา สปอร์มีขนาด 8-12 μm x 3-4 μm มีสีเทาออกม่วงหรือขาว (Zadrazil, 1978)

2. ปัจจัยเกี่ยวกับวัสดุเพาะ

ปกติเห็ดมีความต้องการธาตุอาหารจากอินทรีย์วัตถุ โดยผ่านขบวนการย่อยที่ค่อนข้างซับซ้อน มีการศึกษา พบว่า เห็ดมีความต้องการอาหารหลายชนิดซึ่งจำเป็นต้องใช้ในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน

2.1 แหล่งอาหารคาร์บอน (Carbon) เห็ดต้องการใช้คาร์บอนในการเจริญเติบโต และเป็นแหล่งให้พลังงานแก่เห็ด ได้แก่ กลูโคส ฟลุคโตส อาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก วัสดุที่ใช้เพาะเห็ดก็มีสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น เซลลูโลส ซึ่งต้องย่อยให้มีโมเลกุลเล็กลง จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

2.2 แหล่งอาหารไนโตรเจน (Nitrogen) เห็ดต้องการไนโตรเจนไปใช้สังเคราะห์โปรตีน แหล่งอาหารประเภทไนโตรเจน ได้แก่ ปุ๋ยประเภทไนเตรท แอมโมเนียม และสารอินทรีย์ที่มีส่วนประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยหมักที่ใช้เพาะเห็ด

2.3 แหล่งอาหารประเภทธาตุอาหาร (Element) ในการเพาะเห็ดจำเป็นต้องเพิ่มธาตุอาหารหลักเข้าไปในอาหารที่ใช้เพาะเห็ด ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ แคลเซี่ยม แมกนีเซี่ยม และซัลเฟอร์ แม้ว่าเห็ดจะต้องการธาตุอาหารหลักไม่มากนักก็ตาม แต่ธาตุอาหารเหล่านี้มีส่วนทำให้ขบวนการทางสรีรวิทยา และขบวนการทางการเจริญเติบโตเป็นไปตามปกติ ดังนั้น ปุ๋ยหมักที่ใช้ในการเพาะเห็ดจึงได้มีการใส่ ยิบซั่ม ($CaSO_4$) และดีเกลือ ($MgSO_4$) ลงไปด้วย (ปัญญา, 2532) การเติม $CaSO_4$,หรือ $CaCO_3$ เป็นส่วนประกอบของวัสดุเพาะ จะมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ซึ่งสำคัญมาก วัสดุเพาะที่มี pH 4-7 พบว่า pH 4 จะยับยั้งการเจริญของเส้นใย P.florida และ P.eryngii การเพิ่มค่า pH ระหว่าง 4-6 จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเห็ดทั้งสองชนิดนี้ pH ที่

เหมาะสมต่อ P.florida จะอยู่ในช่วง pH 5.5-6.5 การเพิ่มค่า pH ให้สูงกว่าจุดที่เหมาะสมจะยับยั้งการเจริญเติบโต (Zadrazil, 1978) การเจริญของเส้นใย P.ostreatus จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ปุ๋นขาว 2-6% โดยการใช้ 2-4% จะทำให้ผลผลิตดอกเห็ดของ Pleurotus ทั้ง 16 species เพิ่มขึ้น (Liu และ Sun, 1989)

3. ลักษณะทางเพศและวงจรชีวิตของเห็ดนางรม

3.1 วงจรชีวิตของเห็ดนางรม (Life cycle)

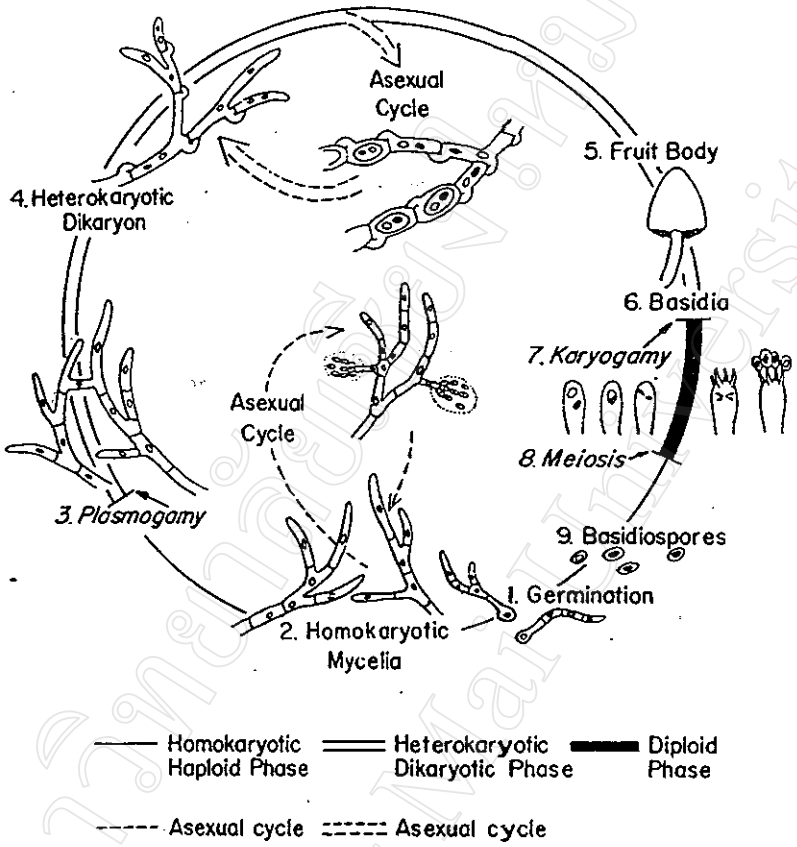
จากวงจรชีวิตของเชื้อราทำให้ทราบถึงลำดับและกำหนดเวลาของช่วงที่มีพัฒนาการในเวลาต่อมา เพราะเกี่ยวข้องกับลักษณะการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสและสัญฐานของเห็ด รูปแบบของการแสดงทางเพศเป็นปรากฏการทางธรรมชาติที่นำไปสู่การผสมพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์ทางเพศ (fertility) ได้แก่ การเกิดดอกเห็ด การรวมตัวของนิวเคลียส การแบ่งตัวแบบไมโอซิส และการเกิดลูกหลาน วงจรชีวิตของเชื้อราใน class Basidiomycetes ประกอบด้วย 9 ขั้นตอนด้วยกัน (ภาพที่ 1)

ขั้นที่ 1 สปอร์เริ่มงอกเป็นเส้นใย

ขั้นที่ 2 เส้นใยมีนิวเคลียสเดี่ยวซึ่งมีโครโมโซม n เดียว (haploid homokaryotic mycelium) สามารถเจริญแพร่ขยายออกไปอย่างอิสระได้ตลอดไป เส้นใยนี้อาจจะผ่านหรือไม่ผ่านวงจรการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (asexual cycle) โดยการสร้าง odidia (สปอร์ที่เกิดจากกิ่งก้านสั้น ๆ ของเส้นใย) หรือ chlamydospores (สปอร์ที่เกิดจากการรวมตัวของเส้นใย) ก็ได้

ขั้นตอนที่ 3 เกิดการผสมระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ผสมและเข้าคู่กันได้ดี 2 เส้นโดยเส้นใยรวมตัวกันแบบพลาสโมแกรมมี่ (plasmogamy)

ขั้นตอนที่ 4 ได้เส้นใยที่สมบูรณ์เพศ (fertile) ซึ่งตามปกติจะเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสไม่เหมือนกัน (heterokaryon) ซึ่งรู้จักกันในรูปเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryon) นิวเคลียสทั้งสองมีเพศที่สามารถเข้ากันได้และมีลักษณะทางพันธุกรรมไม่เหมือนกันต่างมีโครโมโซม n เดียว (haploid)เมื่อผสมกันแล้วในแต่ละเซลจะมีนิวเคลียสอยู่หนึ่งคู่ตลอดเส้นใย ตรงผนังกั้นแบ่งเขตเซลออกจากกันจะเกิดส่วนที่มีลักษณะโค้งงอขึ้นมา เรียกว่า ข้อยึดระหว่างเซล (clamp connection) เส้นใยนิวเคลียสคู่นี้สามารถขยายพันธุ์ได้เองตลอดไป และอาจจะผ่านหรือไม่ผ่านวงจรการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศโดยสร้าง odidia หรือ chlamydospores ก็ได้ แต่ถ้าผลิตสปอร์แบบไม่อาศัยเพศชนิดที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (uninucleate) เส้นใยที่งอกจากสปอร์จะมีนิวเคลียสเดี่ยว (homokaryotic mycelia) เหมือนกันตลอดเส้นใย ซึ่งจะเหมือนกับเส้นใยของพ่อหรือของแม่ก็ได้ แต่ถ้าผลิตสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่มีนิวเคลียสคู่ (binucleate) เส้นใยที่งอกจากสปอร์จะมีนิวเคลียสคู่ (dikaryon)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของเชื้อรา Class Basidiomycetes (Raper, 1978)

ขั้นที่ 5 ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเส้นใยนิวเคลียสคู่ จะเริ่มพัฒนาเนื้อเยื่อพิเศษกลายเป็นดอกเห็ด

ขั้นที่ 6 เนื้อเยื่อที่เกิดสปอร์ของดอกเห็ดจะพัฒนาเป็นแท่งที่คล้ายกระบองที่เรียกว่าแบซิเดีย (basidia) ในแต่ละแบซิเดีย มีนิวเคลียสอยู่สองอัน

ขั้นที่ 7 นิวเคลียสทั้งสอง (n+n) ในแบซิเดียจะรวมตัวกัน (karyogamy) เป็น diploid nucleus (2n) ช่วงนี้เป็นช่วงที่เซลมีนิวเคลียสเพียงนิวเคลียสเดียว

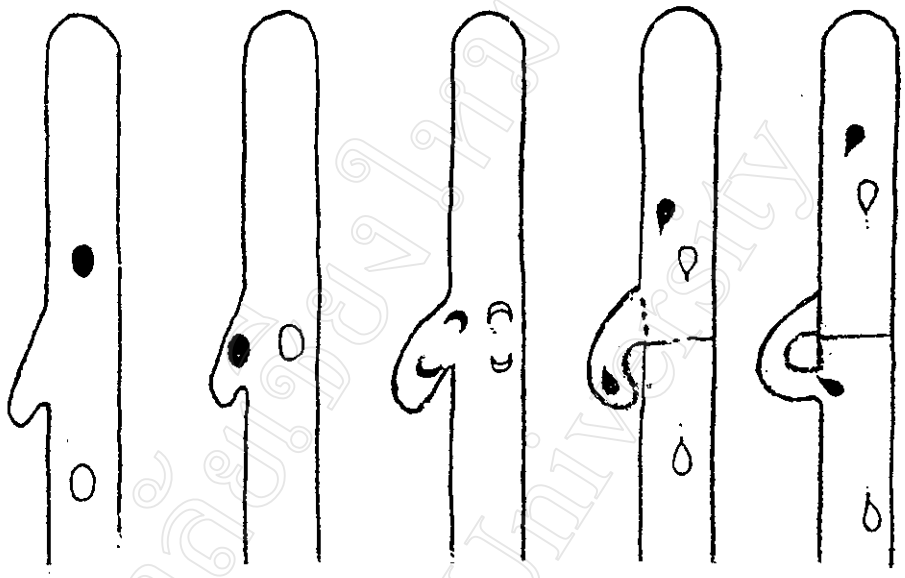
ขั้นที่ 8 เมื่อนิวเคลียสทั้งสองที่รวมตัวกันแล้วก็จะมีการแบ่งตัวแบบลดจำนวน (meiosis) ทันทีระหว่างนี้พันธุกรรมของฝ่ายพ่อและแม่ในนิวเคลียสเกิดการรวมตัวกันแล้วกระจายแยกออกจากกัน ผลสุดท้ายจะได้นิวเคลียสที่ลดจำนวนโครโมโซมเป็น haploid (n) จำนวน 4 อัน และแต่ละอันจะเคลื่อนไปสู่ปลายก้านชูสปอร์ (sterigma) ซึ่งเกิดตรงส่วนบนของแบซิเดียม นิวเคลียสทั้ง 4

อันจะพัฒนาไปเป็นแบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) (Raper, 1978) ปกติเห็ดจะสร้างสปอร์ 2 หรือ 4 สปอร์ต่อ 1 แบซิเดี่ยม เห็ดกระดุม (Agaricus bisporus) โดยทั่วไปจะมี 2 ก้านชูสปอร์ แต่ละก้านมีเพียง 1 สปอร์ มีรายงานว่าเปอร์เซ็นต์ความผันแปรของจำนวนสปอร์ต่อแบซิเดี่ยมในเห็ดชนิดนี้ ได้แก่ 2 สปอร์ 81.8% และ 4 สปอร์ 1.2% ในเห็ด Pleurotus spp. จะมีอยู่ 4 สปอร์ ในแต่ละแบซิเดี่ยมเกิดตรงส่วนปลายของก้านชูสปอร์ มีเห็ดหลายชนิดที่ก้านชูสปอร์ไม่ได้อยู่ตรงปลายของแบซิเดี่ยม แต่มีการพัฒนาอยู่รอบ ๆ แบซิเดี่ยม แบซิเดี่ยมสามารถจำแนกตามรูปร่างลักษณะได้ 3 ประเภทคือ รูปแบบเป็นคู่ตรงกันข้าม รูปแบบเป็นเส้นขนาน และรูปแบบไม่แน่นอน (Chang, 1978)

ขั้นที่ 9 จะมีการปล่อยสปอร์ออกมา และจะเริ่มต้นวงจรชีวิตของเห็ดอีกครั้งโดยการแบ่งเซลแบบไมโอซิสมักจะเกิดก่อนการงอกของสปอร์

โดยทั่วไปวงจรชีวิตเห็ดนางรมจะมีพฤติกรรมของนิวเคลียสอยู่ 3 ระยะด้วยกัน คือระยะที่เส้นใยมีนิวเคลียสเดี่ยวที่เหมือนกันทั้งหมด (homokaryotic haploid phase) ระยะที่เส้นใยมีนิวเคลียสคู่ซึ่งนิวเคลียสทั้งสองไม่เหมือนกัน (heterokaryotic dikaryotic phase) เกิดจากการรวมตัวแบบพลาสโมแกมมี และระยะที่นิวเคลียสที่หลอมรวมกันได้นิวเคลียสใหม่เป็น dipioid (2n) ซึ่งเป็นระยะที่สั้น ๆ เท่านั้น การรวมตัวแบบพลาสโมแกมมีระหว่างเส้นใยซึ่งมีนิวเคลียสเหมือนกัน (homokaryotic mycelia) ที่สามารถผสมเข้ากันได้ดีก็จะได้เส้นใยนิวเคลียสคู่ เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวซึ่งจะมีนิวเคลียสที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกันมักจะเป็นเซลที่มีนิวเคลียสเพียงนิวเคลียสเดียวซึ่งรู้จักกันในนามนิวเคลียสเดี่ยว(monokaryon) แต่อาจเป็นแบบมีหลายนิวเคลียส (multikaryon) คือแต่ละเซลมีนิวเคลียสอยู่หลายชนิดและมีอยู่หลายจำนวน หลังจากเส้นใยที่มีนิวเคลียสเหมือนกัน (homokaryotic mycelia) ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างกันที่มีลักษณะที่ผสมเข้ากันได้ หลอมรวมกันแล้วนิวเคลียสของคู่ผสมทั้งสองจะเข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึมเดียวกัน ใน class Basidiomycetes ส่วนใหญ่นั้นนิวเคลียสจะเคลื่อนเข้าไปทั้งสองฝ่ายแล้วอพยพเข้าไปทั้งเส้นใยกลายเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ชนิดที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryotic dikaryon)

ใน class Basidiomycetes มีบาง species ไม่เกิดการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสดังนั้นเมื่อเกิดการรวมตัวกันของเซลเส้นใยแล้ว เส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ (dikaryon) จะเกิดขึ้นจากการแบ่งตัวของเซลดังกล่าว เซลใหม่ที่ได้มีนิวเคลียสคู่ที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน นิวเคลียสทั้งสองนี้จะแบ่งตัวพร้อม ๆ กับการ แบ่งเซล (cell division) ตรงส่วนปลายสุดของเส้นใย หลังจากนิวเคลียสแต่ละอันแบ่งตัวก็จะมีผนังกั้นนิวเคลียสทั้งสองไว้ที่ปลายเส้นใย ปกติเซลของ clamp ซึ่งต่อมาจะทำหน้าที่เชื่อม septate ระหว่างเซลเกิดใหม่ที่อยู่ปลายเส้นใยกับเซลที่อยู่ถัดลงมา (ภาพที่ 2) (Raper, 1978)



ภาพที่ 2 การสร้างข้อยึดระหว่างเซล (clamp connection) ของเส้นใยเห็ด (Raper,1966)

3.2 รูปแบบการแสดงเพศ (Patterm of sexuality)

เชื้อราใน class Basidiomycetes นั้นส่วนใหญ่การแสดงออกทางเพศจะเป็นแบบ heterothallism ที่มีการศึกษารูปแบบทางเพศแล้วนั้น มีเพียงไม่กี่ร้อยชนิด(species)เท่านั้น ในจำนวนนี้มีเชื้อราที่จัดเป็น heterothallism ที่มีรูปแบบทางเพศควบคุมด้วยปัจจัยคู่ถึง 65 % และที่ควบคุมด้วยปัจจัยเดี่ยวเพียง 25 % ที่เหลืออีก 10 % อาจเป็นแบบ primary หรือ secondary homothallism ชนิด(species)ของเชื้อราที่ศึกษามีเพียง 10 % ของเชื้อราใน class Basidiomycetes ซึ่งมีกว่า 5,000 ชนิด (Raper, 1978)

1. ระบบผสมตัวเองได้ (Homothallism) ดอกเห็ดเกิดจากเส้นใยเพียงเส้นเดียวที่งอกจากสปอร์เดียว เชื้อรานี้สามารถผสมตัวเองได้ แต่ไม่จำเป็นต้องเป็น homozygous เสมอไป จากสถานะการณ์ที่ต่างกันและระบบควบคุมที่ไม่ค่อยแน่นอนอาจทำให้เกิด heterothallism ได้ homothallism มีสองชนิดพบในชนิด(species)ที่ผสมตัวเองได้ (Chang, 1982) homothallism แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1.1 Primary homothallism เป็นเห็ดที่สามารถผสมตัวเองได้โดยไม่มีปัจจัยที่ผสมเข้ากันไม่ได้ (incompatibility factor) เส้นใยที่ผสมตัวเองและสามารถสร้างดอกได้นี้ เจริญจากสปอร์เดี่ยว

ที่มีนิวเคลียสเดี่ยวที่เกิดหลังจากแบ่งตัวแบบไมโอซิส (meiosis) โดยไม่มีปัจจัยการเข้ากันไม่ได้อยู่เลย เส้นใยที่ผสมตัวเองและสามารถเกิดดอกเห็ดได้นี้จะมีนิวเคลียสเหมือนกัน (homokaryon) มันอาจเป็นเส้นใยที่นิวเคลียสคู่ (dikaryotic) ที่มีหรือไม่มีข้อยึดระหว่างเซลก็ได้ แต่บ่อยครั้งที่พบเส้นใยที่มีหลายนิวเคลียส (multikaryon) ที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซล การรวมกันของนิวเคลียส (karyogamy) และการแบ่งเซลแบบลดจำนวน จะเกิดขึ้นในแบซิเดีย (basidia) ของดอกเห็ด ในวงจรชีวิตแบบ homothallic นี้จะไม่มีระยะที่นิวเคลียสทั้งสองต่างกันเลย ดังนั้นการกระจายตัวและการรวมตัวของจีนอม (genom) ที่แตกต่างกันจึงไม่เกิดขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการกระจายตัวและการรวมตัวกันของจีนอมอาจเกิดขึ้นได้บ้าง เมื่อนิวเคลียสบางอันเกิดการกลายพันธุ์ไป (mutate) เห็ดที่มีรูปแบบทางเพศแบบนี้ได้แก่ เห็ดฟาง (Volvariella volvaceae) (Raper, 1978)

1.2 Secondary Homothallism มีลักษณะที่แตกต่างจาก Primary homothallism อย่างเห็นได้ชัด คือ มีปัจจัยที่เข้ากันไม่ได้ และถูกกำหนดโดยกลไกการกระจายตัวของนิวเคลียสโดยปกติแต่ละแบซิเดีย (secondary homothallism)จะมีเพียง 2 สปอร์ โดยนิวเคลียสที่เข้ากันได้ที่เกิดจากการแบ่งตัวแบบลดจำนวนแล้ว 2 นิวเคลียสจะเคลื่อนเข้าไปอยู่ในแต่ละแบซิดิโอสปอร์ และเส้นใยที่สามารถเกิดดอกเห็ดได้งอกจากสปอร์เดี่ยวนี้ จะมีนิวเคลียสที่ต่างกัน (heterothallic) ในเรื่องปัจจัยที่ควบคุมการเข้ากันไม่ได้ เส้นใยที่สามารถเกิดดอกเห็ดได้นี้ เป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสแตกต่างกัน (heterokaryon) โดยนิวเคลียสทั้งสองนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันด้วย ปกติเส้นใยนี้จะมีนิวเคลียสคู่ (dikaryon) ที่มีข้อยึดระหว่างเซลแต่อาจจะเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซลก็ได้หรืออาจเป็นเส้นใยหลายนิวเคลียส (multikaryon) ที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซล ในวงจรชีวิตของ secondary homothallism นี้จะไม่มีช่วงที่เป็น homothallism อยู่เลย รูปแบบของ secondary homothallism นี้อาจจะเป็นแบบปัจจัยเดี่ยวหรือปัจจัยคู่ก็ได้ ที่แตกต่างจาก heterothallism อย่างเห็นได้ชัด ก็คือการกระจายตัวของนิวเคลียสหลังจากแบ่งตัวแบบ ไมโอซิสจะเกิดแบซิดิโอสปอร์บางครั้งมีนิวเคลียสคู่ที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซลก็ได้ วงจรชีวิตเห็ดที่มีรูปแบบทางเพศแบบนี้ได้แก่ เห็ดกระดุม (Agaricus bisporus) (Raper, 1978)

2. ระบบผสมข้าม (Heterothallism) ลักษณะเพศที่เป็นแบบต้องผสมข้ามก็ต่อเมื่อแต่ละสปอร์จะได้รับนิวเคลียสที่เกิดจากการแบ่งตัวแบบลดจำนวนหนึ่งตัว และมีระบบการเข้ากันไม่ได้อยู่ด้วย ระบบการเข้ากันไม่ได้มี 2 แบบ คือ (1) ระบบปัจจัยเดี่ยวโดยลักษณะทางเพศจะถูกควบคุมด้วยปัจจัยทางพันธุกรรมเพียงปัจจัยเดียว คือปัจจัย A ซึ่งมีอยู่หลายคู่ยีน และ(2) ระบบสองปัจจัยเป็นระบบที่ลักษณะเพศถูกควบคุมด้วยปัจจัยทางพันธุกรรมสองปัจจัย คือ ปัจจัย A และ B ทั้งสองมีการกระจายแบบอิสระต่อกันแต่ละปัจจัยก็จะมีคู่ยีนอยู่จำนวนมาก ระบบทั้งสองนี้เรียกว่าระบบสองขั้วและสี่ขั้ว (bipolar and tetrapolar) ตามลำดับ ในเส้นใยที่เป็น haploid ที่มีนิวเคลียสเหมือนกันและคู่ยีนที่เหมือนกันของปัจจัยที่เข้ากันไม่ได้ ในระบบปัจจัยเดี่ยวหรือคู่ยีนที่เหมือนกัน

ของระบบสองปัจจัยนั้นจะไม่สามารถเกิดดอกเห็ดได้ เส้นใยจะสามารถสร้างดอกได้ก็ต่อเมื่อนิวเคลียสทั้งสองมีคู่ยีนที่แตกต่างกันมาผสมกันเพื่อให้ได้ dikaryon นิวเคลียสทั้งสองที่ไม่เหมือนกันนี้จะรวมกันในแบซิเดี่ยม แล้วแบ่งตัวแบบลดจำนวนทันที คู่ยีนของปัจจัยที่เข้ากันไม่ได้จะกระจายในช่วงแบ่งตัวแบบไมโอซิสและปัจจัยนี้จะถูก haploid นิวเคลียสที่เกิดหลังจากการแบ่งตัวแบบไมโอซิสพาไปยังแบซิดิโอสปอร์ ปกติแต่ละแบซิเดี่ยมจะสร้างสปอร์ 4 สปอร์ และแต่ละสปอร์มีนิวเคลียสที่เกิดจากการแบ่งตัวแบบไมโอซิส 1 ตัว เส้นใยนี้ถ้าผสมตัวเองจะไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ต่อเมื่อผสมข้ามจึงจะสร้างดอกเห็ดได้

2.1 ระบบที่ควบคุมโดยปัจจัยเดี่ยว [Unifactorial control (bipolar heterothallism)

ระบบนี้มีปัจจัย A ที่ควบคุมการผสมเข้ากันได้ ในการผสมข้ามคู่ยีนที่ต่างกันของปัจจัย A จะทำให้วงจรชีวิตสมบูรณ์โดยนิวเคลียสของเส้นใยหนึ่งเคลื่อนย้ายเข้าไปอยู่ในอีกเส้นใยหนึ่งแล้วกระจายไปทั่วเส้นใย และนิวเคลียสอีกเส้นใยหนึ่งก็เคลื่อนย้ายเข้าไปอยู่ในอีกเส้นใยหนึ่งสลับกัน ทำให้ทั้งสองฝ่ายได้เส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ และเกิดการสร้างข้อยึดระหว่างเซลที่แท้จริง (true clamp) และในที่สุดจะมีการเกิดดอกเห็ดบนเส้นใยนิวเคลียสคู่ ปัจจัย A เป็นหน่วยพันธุกรรมเดี่ยวในการผสมข้ามคู่ยีนทั้งสอง คือ A_1 และ A_2 การกระจายตัวในอัตรา 1:1 ในสปอร์ทั้งสี่ที่เกิดขึ้น บนแบซิเดี่ยม ที่มี 4 สปอร์ จะเป็น tetrad ซึ่งสปอร์สองตัวจะพาคู่ยีน A_1 และอีกสองสปอร์จะพาคู่ยีน A_2 เส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์ทั้ง 4 จะประกอบด้วยกลุ่มสองกลุ่ม ซึ่งผสมกันแล้วจะมีปฏิกิริยาร่วมกันแบบ bipolar เมื่อมีการจับคู่ผสมแบบพบกันหมด ดังแสดงในตารางที่ 1 ตัวอย่างเห็ดที่มีรูปแบบทางเพศแบบนี้ได้แก่ เห็ดหูหนู (Auricularia spp.)

ตารางที่ 1 แสดงความสามารถในการผสมกันได้ของเห็ดประเภท bipolar heterothallism

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

\- = ผสมเข้ากันไม่ได้

\+ = ผสมเข้ากันได้สมบูรณ์ (Raper, 1978)

2.2 ระบบที่ควบคุมโดยปัจจัยคู่ [Bifactorial control (Tetrapolar heterothallism)]

ระบบนี้มีปัจจัยที่ควบคุมการผสมติดอยู่ 2 ปัจจัย A และ B ปัจจัยทั้งสองอยู่คนละส่วนกันแต่ทำงานร่วมกัน ในการจับคู่ผสมกันปัจจัย A จะควบคุมการจับคู่ของนิวเคลียส (nuclear pairing) และการสร้างข้อยึดระหว่างเซล (clamp connection) (ภาพที่ 5) ปัจจัย B ควบคุมการเคลื่อนย้ายนิวเคลียส (nuclear migration) และการเชื่อมของข้อยึดระหว่างเซล (clamp fusion)

การที่ปัจจัย A มีคู่ยีน (allele) ที่แตกต่างกัน แต่ปัจจัย B ยีนเหมือนกัน (A≠B=) จะเข้ากันได้เพียงกึ่งเดียว คือไม่มีการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสและเป็นผลให้เกิดเส้นใยที่ไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryon) โดยเซลของเส้นใยตรงส่วนปลายจะมีนิวเคลียสคู่ แต่เซลส่วนที่ถัดเข้ามาของเส้นใยเป็นนิวเคลียสเดี่ยว และมีข้อยึดระหว่างเซลหลอก (false clamp) คือ ข้อยึดระหว่างเซลที่ไม่สามารถเชื่อมเซลที่ถัดจากส่วนปลายได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการขังนิวเคลียสลูกไว้หนึ่งอันทุกครั้งที่มีการแบ่งตัว จากการที่ไม่มีการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส นิวเคลียสที่ต่างกันของคู่นี้ จึงอยู่ในตำแหน่งที่เส้นใยทั้งสองแตะผสมกันเท่านั้น

ถ้าปัจจัย A มีคู่ยีนที่เหมือนกัน และปัจจัย B มีคู่ยีนที่แตกต่างกัน (A=B≠) จะเข้ากันได้เพียงครึ่งเดียวเช่นกัน คือมีการเคลื่อนย้ายนิวเคลียส และเป็นผลให้เกิดเส้นใยที่มีนิวเคลียสที่แตกต่างกัน (heterokaryon) แต่ไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ เส้นใยเกิดมีเซลที่มีนิวเคลียสหลายอัน (multikaryotic) ไม่มีข้อยึดระหว่างเซลแต่มีผนังกั้นเซล จำนวนนิวเคลียสต่อเซลจะแปรปรวนไม่แน่นอน

ถ้าปัจจัย A และปัจจัย B มีคู่ยีนที่แตกต่างกัน (A≠B≠) จะสามารถเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ทำให้เกิดเส้นใยนิวเคลียสคู่ ที่มีข้อยึดระหว่างเซลที่แท้ (truely clamp) เส้นใยนิวเคลียสคู่สามารถพัฒนาเกิดดอกเห็ดได้ ดังนั้นเห็ดที่มีรูปแบบทางเพศเช่นนี้จะผสมกันได้ปัจจัย A และ B ต้องมีคู่ยีนที่ให้เหมือนกันจึงจะผสมกันได้ (Raper, 1978) ดังแสดงในตารางที่ 2 เห็ด Pleuotus ostreatus มีรูปแบบการแสดงเพศแบบ tetrapolar heterothallism ที่สามารถผสมตัวเองได้ 25% ของการจับคู่ผสมแบบพบกันหมดและยังพบว่าปัจจัย A มี 63 ยีน และปัจจัย B มี 190 ยีน ในประชากรของ Pleurotus sp. (Ergenio และ Anderson, 1968)

ตารางที่ 2 แสดงความสามารถในการผสมกันได้ของเห็ดประเภท tetrapolar heterothallism

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	-

- = ผสมเข้ากันไม่ได้

+ = ผสมเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ เซลเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryon) มีข้อยึดระหว่างเซลอย่างสมบูรณ์

(+) = ผสมเข้ากันได้กึ่งเดียว จึงเป็นการผสมที่ไม่สมบูรณ์ เซลมีจำนวนนิวเคลียส 1, 3 อัน มีข้อยึดระหว่างเซลแต่เป็นข้อยึดที่ไม่สมบูรณ์

F = เข้ากันได้กึ่งเดียว จึงเป็นการผสมที่ไม่สมบูรณ์ จำนวนนิวเคลียสแต่ละเซลมีจำนวนไม่แน่นอนและมีจำนวนมาก ไม่มีข้อยึดระหว่างเซล (Raper, 1978)

4. วิธีการผสมพันธุ์เห็ด (Breeding methods)

ในอดีตการปรับปรุงพันธุ์เห็ดที่รับประทานได้ส่วนใหญ่จะคัดเลือกจากสายพันธุ์ที่มาจากธรรมชาติหรือชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) และคัดเลือกเพียงอย่างเดียว ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการรวมกันของลักษณะทางพันธุกรรม ปัจจุบันการผสมพันธุ์เห็ดที่รับประทานได้มีการทำกันอย่างแพร่หลาย โดยใช้เทคนิคการรวมกันของลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความเข้าใจดีเกี่ยวกับเชื้อราภายใต้สภาพควบคุม ในวงจรชีวิตและรูปแบบการแสดงเพศโดยมีจุดประสงค์เพื่อที่จะสร้างลักษณะ (characteristics) อย่างใดอย่างหนึ่งในสายพันธุ์ให้หลากหลายหรือการใช้สารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ตามมา ซึ่งสามารถนำเข้ามาอยู่ด้วยกัน (one organism) (Chang, 1982) งานด้านการผสมพันธุ์เห็ดกับการเพาะเลี้ยงเห็ดเป็นงานที่ต้องปฏิบัติในสภาพปลอดเชื้ออย่างเคร่งครัด ไม่เช่นนั้นการผสมพันธุ์จะไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้นต้องใช้เทคนิควิธีที่ปลอดเชื้อซึ่งสะดวกและง่ายต่อการปฏิบัติงาน (Quimio และคณะ, 1990) การผสมพันธุ์เห็ดนางรมทำได้ง่ายเมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดชนิดอื่นและพืชชั้นสูง ที่สำคัญคือสามารถทำในห้องปฏิบัติงานและไม่ต้องใช้พื้นที่มาก (Eger, 1978) วิธีการผสมสามารถแยกออกได้ 5 ขั้นตอน

4.1 การรวบรวมพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุ์ (Collection and storage of breeding material)

จุดเริ่มต้นของงานผสมพันธุ์คือ การเก็บรวบรวมพันธุ์ป่าจากหลาย ๆ พื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศและวัสดุที่อาศัยอยู่แตกต่างกัน ทำความสะอาดดอกเห็ดที่มีลักษณะดี จากนั้นวางด้านล่างของครีบบนชิ้นกระดาษสีขาวเนื้อแข็งและสะอาด โดยห่อหุ้มทั้งหมดด้วยกระดาษที่สะอาดและเก็บไว้ในภาชนะที่มีอากาศถ่ายเทดี เช่น ตระกร้า จากนั้นนำไปเก็บไว้ในห้องปฏิบัติงาน ต่อมาอีก 12-24 ชั่วโมง เก็บสปอร์ที่ปล่อยออกมาจากดอกเห็ดใช้งานต่อไป เอาดอกเห็ดทิ้ง พับกระดาษที่มีสปอร์ติดอยู่โดยพับให้สปอร์อยู่ข้างใน และเย็บปิดขอบกระดาษเข้าด้วยกัน เมื่อแผ่นกระดาษแห้งจะใส่ไว้

ในพลาสติกฟอยล์ที่มีผงซิลิก้าเจลบรรจุอยู่ด้วยแล้วปิดผนึก นำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 °ซ ภายใต้สภาพนี้สปอร์มีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลายาวนาน (Eger, 1978)

4.2 การงอกของสปอร์และการคัดแยกเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยว(Spore germination and isolation of monokaryons)

สปอร์จะงอกได้ง่ายในของเหลวและของแข็งที่ชื้นในเวลาสองวันสปอร์จะงอกเกือบ100 % สปอร์ที่หล่นบนกระดาษ (spore print) ที่ใช้ดักซึ่งมีการปนเปื้อน มีวิธีการดังนี้ คือ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อชนิดห่วง (loop) ขูดสปอร์จากผิวกระดาษดักสปอร์ที่มีสปอร์อย่างหนาแน่น แต่ถ้ามีไม่มากก็ตัดกระดาษออกมาหนึ่งชิ้น วางลงในน้ำประปาที่ฆ่าเชื้อแล้ว สปอร์จะแยกจากกระดาษ หลังจากเขย่าสปอร์ที่แขวนลอย ก็จะลดความหนาแน่นลงหลายขั้นตอนในอัตรา 2-10 ขึ้นอยู่กับจำนวนของสปอร์และการปนเปื้อน เมื่อได้สารละลายสปอร์ที่ลดความหนาแน่นของสปอร์แล้ว ใช้เข็มเขี่ยเชื้อชนิดห่วงจุ่มในสารละลายสปอร์ แล้วนำมาป้ายบนผิวหน้าของอาหารวุ้นในจานแก้ว จะทำให้สปอร์กระจายทั่วผิวหน้าอาหารวุ้น แม้ว่าต้องใช้เวลาในการตรวจสอบเส้นใยที่งอกจากสปอร์เดี่ยว และต้องตัดแยกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ก็ตามแต่วิธีนี้ก็เป็นวิธีที่ดีกว่าวิธีอื่นๆ เพราะแน่ใจได้ว่าได้เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryon) ที่แท้จริง ในการคัดเลือกจะเอาเฉพาะสปอร์ที่มีชีวิตเท่านั้น อย่างไรก็ตามจะเป็นความผิดพลาดอย่างมากถ้าจะคัดแต่เส้นใยของสปอร์ที่งอกก่อนและมีการเจริญอย่างรวดเร็ว บางครั้งเส้นใยที่เจริญช้า จะเกี่ยวพันกับปัจจัยที่เข้ากันไม่ได้ (incompatibility factors) อย่างในเห็ด Pleurotus ostreatus จาก Florida หรือกับลักษณะที่อาจมีความสำคัญต่อการผสมพันธุ์ ส่วนใหญ่เส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยวที่เจริญช้า จะไม่มีอิทธิพลต่ออัตราการเติบโตของเส้นใยนิวเคลียสคู่ เนื่องจากการเติบโตของเส้นใยอ่อนที่พึ่งย้ายใหม่ ๆ นั้นช้ามาก ดังนั้นจึงอาจเลี้ยงเส้นใยนี้ 8-10 จุด ในหนึ่งจานเลี้ยงที่เป็นวุ้น ต่อมา 5-6 วันจึงค่อยถ่ายเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร จากแต่ละโคโลนีไปเลี้ยงในจานเดี่ยวที่นั้นมันจะแสดงอัตราการเติบโตอย่างแท้จริง คือ โตช้ากว่าพวกนิวเคลียสคู่
มาก ๆ (Eger, 1978)

4.3 การหาชนิดของคู่ผสมของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Determination of mating type in monosporous isolates)

การพัฒนาสายพันธุ์เห็ดโดยการผสมข้ามเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางในการที่จะรวมลักษณะที่ดีของพ่อและแม่เข้าด้วยกัน เพื่อที่จะได้ชั่วลัดไปที่เกิดลักษณะใหม่ ๆ โดยมีการคัดเลือกอย่างต่อเนื่องและกำจัดลักษณะที่ไม่ดีออก โดยเฉพาะเห็ดที่มีสปอร์เดี่ยว จึงเป็นไปได้ที่จะรวมนิวเคลียสที่ต้องการจากรายงานผลการทดลองที่แสดงให้เห็นถึงลักษณะที่แตกต่างของ 2 สายพันธุ์

ที่เพาะในแปลงเพาะเดียวกันพบว่าเกิดสายพันธุ์ใหม่ขึ้นในชั่วที่ถัดมา ซึ่งเกิดจากการเชื่อมกันระหว่างเส้นใย 2 สายพันธุ์ (Fritsche, 1978)

รูปแบบการแสดงเพศของเห็ด Pleurotus ostreatus เป็นแบบ tetrapolar heterothallism ซึ่งหมายความว่า (Eger, 1974) ดอกเห็ด 1 ดอกจะมีสปอร์อยู่ 4 ชนิดซึ่งประกอบปัจจัย A และ B อย่างละ 2 ปัจจัยเส้นใยที่มีปฏิกริยาต่อกันจนเกิดเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่จะมีข้อยึดระหว่างเซล จะมีปัจจัย A และปัจจัย B ที่ต่างกันซึ่งเป็นปัจจัยที่ควบคุมการเข้ากันได้หรือไม่ได้ของคู่ผสม (incompatibility factor) ในธรรมชาติเห็ด Pleurotus ostreatus จะมีปัจจัย A 63 ยีน และปัจจัย B 190 ยีน เมื่อนำมาผสมกันโดยการจับคู่ผสมแบบพบกันหมดจะได้คู่ผสมทั้งหมด 63 x 190 = 11,970 คู่

จากความเป็นไปได้ในการจับคู่ผสมของเห็ด Schizophyllum commune ที่เป็น tetrapolar พวก Hymenomycetes มีเพียงเห็ด Pleurotus ostreatus เท่านั้นที่เกิดเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryon) ในบางสายพันธุ์ (stock) เส้นใยนิวเคลียสคู่จะเจริญอย่างรวดเร็วและมีลักษณะหยาบซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Eger, 1978) นอกจากนี้การผสมกันไม่ได้ของเส้นใย 2 ชนิด ยังพิจารณาได้จากบริเวณที่กลุ่มของเส้นใย 2 กลุ่มเจริญมาชนกันจะเห็นบริเวณที่ชนมีการหยุดการเจริญเติบโตเส้นใยไม่แน่นฟู สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าบนอาหารวุ้นที่ใช้เพาะเลี้ยงได้ หรือพิจารณาขั้นสุดท้ายถึงความสามารถที่ผลิตดอกเห็ดได้ (Bhandae และ Mehta, 1989; Elliott, 1979; Moessner, 1962) ในบางกรณีจำเป็นต้องตรวจแบบใช้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งจะต้องใช้กำลังขยายเป็นร้อยเท่าส่อง โดยไม่มีกระจกปิดสไลด์ (cover glass) ในกรณีที่ไม่ต้องการให้มีการปนเปื้อนก็ใช้จานแก้ว (petri dishes) ที่ปิดฝาโดยพลิกให้ก้นจานขึ้นเพื่อตรวจสอบ ตรวจสอบข้อยึดระหว่างเซลบริเวณขอบของกลุ่มเส้นใย (colony) จุดที่แตกแขนงของเส้นใยซึ่งเป็นจุดที่เกิดของข้อยึดระหว่างเซลตรงช่องว่าง ระหว่างเส้นใยที่ใกล้เคียงกันสองเส้น การเริ่มเจริญของแขนงใหม่หรือการโผล่พ้นออกมาของ protoplasma อาจทำให้เกิดการเข้าใจผิดว่าเป็นข้อยึดระหว่างเซล จากการที่มีข้อผิดปกติมากมายเกิดขึ้นตรงจุดที่เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวทั้งสองมาสัมผัสกัน การจำแนกเส้นใยที่งอกจากสปอร์เดี่ยวเป็นกลุ่มที่เข้ากันไม่ได้กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งได้ค่อนข้างง่าย

ตัวอย่างเช่น ถ้ามีเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวอยู่ 10 เส้นใย ก็ให้นำมาผสมกันคือนำเส้นใยมาเรียงไว้คู่กัน หนึ่งคู่ต่อจานแก้ว (petri dish) หนึ่งจานทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ควรจะได้เส้นใยนิวเคลียสคู่ภายใน 5 - 6 วัน ถ้าจำเป็นต้องตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ให้ตรวจหาตรงขอบของเส้นใยทั้งสองเพราะเส้นใยนิวเคลียสคู่บางครั้งจะเจริญไปทิศทางเดียวเท่านั้น ผลจากการผสมแบบพบกันหมดจะทำให้สามารถจำแนกกลุ่มที่ผสมได้และผสมไม่ได้ในที่สุด (Eger, 1978)

4.4การหาชนิดของคู่ผสมของเส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ที่คัดแยกออกมาแล้ว(Determination of mating type in dikaryon isolates)

ในกรณีที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้จะต้องใช้เวลาอย่างน้อย 4 - 5 สัปดาห์เพื่อสร้างดอกเห็ดใหม่และเพื่อหาชนิดของคู่ซึ่งได้อธิบายมาก่อนแล้ว ซึ่งใช้เวลานานมากถ้าเส้นใยนั้นลักษณะที่ต้องการสำหรับงานผสมพันธุ์ เช่น การต้านทานโรคหรือสารกำจัดศัตรูพืช หรืออุณหภูมิสูง (Eger, 1978) เราสามารถใช้วิธีที่เร็วกว่านี้ได้ในการผสมพันธุ์โดยปกติถ้ามีสายพันธุ์ที่ตรวจสอบอยู่จำนวนมาก โดยอาศัยปรากฏการณ์ที่นิวเคลียสจากการคัดเลือกสปอร์ที่มีนิวเคลียสเดี่ยวแล้วจึงนำมาผสมกัน แต่ในบางครั้งทำไม่ได้เพราะสปอร์มีจำนวนที่น้อย เส้นใยนิวเคลียสคู่หนึ่งนิวเคลียสจะอพยพเข้าไปในเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยว ถ้านิวเคลียสใดนิวเคลียสหนึ่งหรือทั้งสองนิวเคลียสจากเส้นใยนิวเคลียสคู่สามารถเข้ากันได้กับนิวเคลียสของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว แล้วก็จะเกิดการผสมได้ (compatible) ที่เรียกว่า di - mon - matings ทำให้เกิดเส้นใยนิวเคลียสคู่ขึ้นที่ปลายเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ซึ่งตามกฎแล้วมันจะประกอบด้วยนิวเคลียสเดิมของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวกับนิวเคลียสที่เข้ากันได้ของเส้นใยนิวเคลียสคู่ ผลที่ได้อาจเป็นการผสมที่เข้ากันได้เพียงกึ่งเดียว (hemicompattible mating) หรือนิวเคลียสเดิมกับนิวเคลียสที่อพยพเข้ามาอย่างรวดเร็ว โดยนิวเคลียสที่อพยพนั้นมาจากเส้นใยนิวเคลียสคู่ซึ่งทั้งคู่สามารถเข้ากันได้กับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ในกรณีที่ผสมเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์เหมือนกรณีที่แล้วนั้น ในที่สุดนิวเคียสทั้งคู่ของเส้นใยนิวเคลียสคู่จะอพยพเข้าไปด้วยกัน ได้เส้นใยนิวเคลียสคู่เหมือนเดิมตรงส่วนปลายของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ในการผสมแบบ di - mon - matings ระหว่าง Pleurotus ostreatus จากเยอรมันกับจากอเมริกาได้สังเกตพบการจำกัดการอพยพของนิวเคลียสในคู่ที่เข้ากันได้ (compattible)และเข้ากันได้เพียงกึ่งเดียว (hemicompattible) ส่วนการเกิดเส้นใยนิวเคลียสคู่จากการผสมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว 2 เส้นใยนั้นไม่มีปัญหา นอกจากนี้การอพยพของนิวเคลียสนั้นยังขึ้นอยู่กับสภาพการเพาะเลี้ยง และสภาพการถ่ายเชื้อเพื่อการผสม (Eger, 1978)

4.5 การผสมเพื่อสร้างสายพันธุ์ที่ออกดอกได้ในที่อุณหภูมิสูง (Breeding of varieties that fruit at elevated temperathures)

ยีนที่ไวต่ออุณหภูมิ (temperature-sensitive genes) มีอยู่ทั้งในสัตว์ พืช เชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส ซึ่งจะแสดงออกเฉพาะเมื่ออุณหภูมิสูงกว่าหรือต่ำกว่าอุณหภูมิเฉพาะ ยีนที่ไวต่ออุณหภูมินี้อาจเสริมและรวมกันใหม่(recombined) กับคู่ยีน(allele)ที่ไม่ไวต่ออุณหภูมิ (temperature-insensitive alleles) เห็ด Pleurotus ostredtus ชนิดที่สร้างดอกในอุณหภูมิต่ำถือว่าไวต่ออุณหภูมิต่ำด้วย แม้ว่าอุณหภูมิที่ไม่ออกดอกจะมีอุณหภูมิต่ำมากก็ตาม

จากการผสมพันธุ์ของเห็ด Pleurotus ระหว่างต้นตอพันธุ์ (stock) จากเยอรมันซึ่งไวต่ออุณหภูมิกับต้นตอพันธุ์จากอเมริกา ซึ่งไม่ไวต่ออุณหภูมิได้เส้นใยลูกผสมนิวเคลียสคู่ 4 ชนิดคือ

1. ขบวนการออกดอกนั้นไวต่ออุณหภูมิเหมือนต้นตอพันธุ์จากเยอรมัน

2. ไม่ไวต่ออุณหภูมิเหมือนต้นตอพันธุ์จากอเมริกา

3. การสร้าง primodia ไม่ไวต่อุณหภูมิ แต่การพัฒนาของดอกไวต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้น

4. การเริ่มเกิด initiation primodia ไม่ไวต่ออุณหภูมิแต่การเริ่มพัฒนาดอกนั้นไวต่ออุณหภูมิ แต่การขยายของหมวกเห็ดและการสร้าง basidiospore จะเกิดอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิสูงกว่า 20°ซ. ผลลัพธ์นี้แสดงว่าขั้นตอนการเกิดดอกในเห็ด Pleurotus ไม่ได้ควบคุมโดยยีนเดี่ยว (single gene) แต่ควบคุมโดยยีนจำนวนมากดังที่พบในเห็ด Coprinus macrorhizus ด้วยเหตุนี้จึงอาจคาดว่าอย่างน้อยที่สุดยีนแต่ละตัวจะมี 2 อัลลีล ภายใต้สภาพที่อุณหภูมิสูงและมีแสงสว่างเห็ด Pleurotus ชนิดที่มาจากอเมริกาจะมีดอกสีขาวหรือขาวซีด ในบางลูกผสมจะมีดอกที่แข็งแรง หรือดอกมีสีเข้ม ดังนั้นในการผสมข้ามสายพันธุ์เห็ด Pleurotus จากแหล่งภูมิศาสตร์ต่างกันจะทำให้ได้จีโนไทพ์ (genotypes) ของเห็ดดีขึ้น (Eger, 1978)