โครงงาน

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus* Singer.) โดยเทคนิคไฮบริไดเซชัน

ชื่อนิสิต นางสาวธีรนาฏ จิตต์สนธิ์ **เลขประจำตัวนิสิต** 6032122923

ภาควิชา พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus* Singer.) โดยเทคนิคไฮบริไดเซชัน

นางสาว ธีรนาฏ จิตต์สนธิ์

6032122923

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

Strain improvement of *Pleurotus citrinopileatus* Singer.

Using hybridization technique

Miss Teeranat Jitson

6032122923

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Bachelor of Science

Genetic Program, Department of Botany

Faculty of science, Chulalongkorn University

Academic Year 2020

หัวข้อวิทยาปฏิบัติ	การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus* Singer.) โดยเทคนิคไฮบริไดเซชัน
นิสิตผู้ดำเนินงาน	นางสาว ธีรนาฏ จิตต์สนธิ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนิตา ปาลิยะวุฒิ
คณะวิทยาศาสตร์	ภาควิชาพฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ประจำปีการศึกษา	2563

ภาควิชาพฤกษศาสตร์อนุมัติให้วิทยาปฏิบัติฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนิตา ปาลิยะวุฒิ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. วิชาณี แบนคีรี)

ลิขสิทธิ์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

หัวข้อวิทยาปฏิบัติ การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus* Singer.) โดยเทคนิคไฮบริไดเซชัน

นิสิตผู้ดำเนินงาน นางสาว ธีรนาฏ จิตต์สนธิ์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนิตา ปาลิยะวุฒิ

คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ประจำปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

เห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) เป็นเห็ดรับประทานได้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจแต่อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ต่ำและระยะเวลาในการเพาะปลูกที่ยาวนาน ยังคงเป็นหนึ่งในขีดจำกัดของการเพาะเห็ดนางรมทองเพื่อการค้าทางเศรษฐกิจ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมทองให้มีผลผลิตและระยะเวลาในการเพาะปลูกของดอกเห็ดที่ดีขึ้น โดยการใช้วิธีการผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryon) จำนวนทั้งหมด 20 สายพันธุ์ที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อแม่ (ALและBL) ผสมแบบพบกันหมดทุกคู่ โดยจะทำการประเมินลูกผสมผ่านกระบวนการเปรียบเทียบทั้งอัตราการเจริญของเส้นใยและประสิทธิภาพของผลผลิตด้วยค่า biology efficiency (B.E.) ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ (ALและBL) กับ สายพันธุ์ลูกผสม (C1-C18) ผลจากการคัดเลือกลูกผสมที่ได้ พบว่าสายพันธุ์ AL4 × BL1 (C10) ให้อัตราการเจริญของเส้นใยในอาหารเลี้ยง PDA สูงถึง 17.27 ± 0.23 มิลลิเมตร/วัน และในวัสดุเพาะขี้เลื่อยที่สูงถึง 7.11 ± 0.25 มิลลิเมตร/วัน ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (ALและBL) อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าลูกผสมสายพันธุ์ AL4 × BL1 (C10) ให้ค่าเฉลี่ย biology efficiency (B.E.) ได้ถึง 16.83% ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ลูกผสม C10 ที่พัฒนาโดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชันนี้สามารถให้สายพันธุ์เห็ดนางรมทองที่มีลักษณะของพันธุ์ที่ดีขึ้น

คำสำคัญ : *เห็ดนางรมทอง, นิวเคลียสคู่, นิวเคลียสเดี่ยว, การปรับปรุงพันธุ์เห็ด*

Senior Project	Improvement of New Hybrid *Pleurotus citrinopileatus* Singer. Strains Using hybridization Technique
By	Miss Teeranat Jitson
Senior Project Advisor	Assistant Professor Dr. jittra Piapukiew
Senior Project Co-Advisor	Assistant Professor Dr. Chanita Paliyavuth
Department	Botany
Program	Genetic
Academic year	2021

Abstract

Pleurotus citrinopileatus, is a precious edible mushroom with high nutritional and economic value. However, its low yield and long cultivation period limit its commercial cultivation. This study aimed to improve the characteristic and yield of *P. citrinopileatus* using mono-mono crossing technique. Twenty monokaryon cultures of the parental lines, AL and BL were crossed in all combinations. All obtained hybrids were cultured to evaluate their mycelial growth rates and biology efficiencies (B.E.) comparing with the parental lines. The selected hybrid, AL4 × BL1 (C10) gave the highest growth rate of 17.27 ± 0.23 and 7.11 ± 0.25 mm/day on PDA and sawdust substrate, respective that was significant difference from parent. In addition, the hybrid strain C10 showed the highest biological efficiency (B.E.) of 16.83%. The results obtained from this study indicated that C10 strain from the hybridization technique can lead to improve the growth and productivity of mushroom strains, especially *P. citrinopileatus*.

Keyword : *Pleurotus citrinopileatus, Dikaryon, Monokaryon*, *Hybridization*

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ พร้อมทั้งคำอบรมสั่งสอนจนโครงงานเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนิตา ปาลิยะวุฒิ และ ดร.วิชาณี แบนคีรี กรรมการสอบ และได้ให้ข้อคิดเห็น คำแนะนำในการเรียนและแก้ไขรายงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ตลอดมา

ขอขอบพระคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ประจำปีการศึกษา 2563

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และพี่ ๆ ในห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และคำสั่งสอนในการทำโครงงาน อีกทั้งอุปกรณ์และสถานที่ในการทำโครงงาน

ขอขอบคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่คอยให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และเป็นกำลังใจในการทำโครงงานครั้งนี้มาตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการดำเนินการ	14
บทที่ 4 ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	23
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	28

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 2.1. ความสามารถในการผสมกันได้ของเห็ดประเภท Tetrapolar heterothallism 7

ตารางที่ 4.1. ผลการทดสอบความเป็นลูกผสมทั้งหมด 75 คู่ผสม 18

ตารางที่ 4.2. ค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDA 19

ตารางที่ 4.3. ค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใยในวัสดุเพาะขี้เลื่อย 20

ตารางที่ 4.4. เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างผลผลิตของดอกเห็ดนางรมทอง 22

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 2.1. ลักษณะดอกเห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) 3

ภาพที่ 2.2. วงจรชีวิตของเห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus* (Singer, 1942)) 4

ภาพที่ 2.3. แสดงรูปแบบการทำงานของยีนที่ควบคุมด้วยปัจจัยเดี่ยว 6

ภาพที่ 2.4. แสดงรูปแบบการทำงานของยีนที่ควบคุมด้วยปัจจัยคู่ 7

ภาพที่ 2.5. การสร้าง clamp connection ของเส้นใยเห็ด 8

ภาพที่ 4.1. ลักษณะการกระจายตัวของสปอร์ 17

ภาพที่ 4.2. ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเห็ดนางรมทองที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว 19

ภาพที่ 4.3. ลักษณะการเดินของเส้นใยเห็ดนางรมทองบนอาหารเลี้ยง PDA เป็นเวลา 7 วัน 20

ภาพที่ 4.4. ลักษณะการเดินของเส้นใยเห็ดนางรมทองในวัสดุเพาะขี้เลื่อย เป็นเวลา 20 วัน 20

ภาพที่ 4.5. แสดงลักษณะสัณฐานของดอกเห็ดนางรมทองลูกผสมสายพันธุ์ C10 (AL4 × BL1) 21

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เห็ดนางรมทอง *(Pleurotus citrinopileatus* Singer, 1942) เป็นเห็ดที่อยู่ในสกุลนางรม ซึ่งเห็ดสกุลนี้จัดเป็นเห็ดที่มีการเพาะปลูกเป็น 1 ใน 5 อันดับแรกของประเทศที่ให้ปริมาณผลผลิตถึง 120,000 ตันต่อปี และมูลค่าสูงถึง 10,284 ล้านบาทต่อปี (สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย, 2559) โดยที่เห็ดนางรมทองนี้มีลักษณะของดอกเห็ดที่มีสีเหลืองสวยงาม มีกลิ่นหอม มีรสชาติอร่อย เนื้อแน่น สามารถนำมาปรุงอาหารได้หลายอย่าง และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน ไม่แพ้เห็ดชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้เห็ดนางรมทองยังให้ปริมาณแร่ธาตุหลายชนิด เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม (สุทธิชัย ปทุมล่องทอง, 2545) และยังพบว่าเห็ดชนิดนี้มีสารพลูโรทินโพลีแซคคาไรด์ (pleurotin polysaccharide) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ต่อต้านการเกิดมะเร็งและลดอนุมูลอิสระ (Lee et al., 2005) สำหรับในแง่ของผู้เพาะเห็ดพบว่าเห็ดนางรมทองเพาะง่าย เจริญเติบโตได้ดีในอากาศที่เย็นชื้น จึงทำให้ผู้เพาะเห็ดนางรมส่วนใหญ่หันมาเพาะปลูกเห็ดชนิดนี้

แม้ว่าเห็ดนางรมทองจะมีคุณประโยชน์มากเพียงใดแต่ก็ยังไม่เป็นที่นิยมของตลาด เนื่องจากเชื้อที่ใช้อยู่เกือบทั้งหมดเป็นเชื้อที่ถูกนำเข้ามาแล้วนำมาคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถปรับตัวให้เพาะได้ในประเทศไทย ประกอบกับเห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตประเภทราซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างสูง จึงทำให้เกิดการผันแปรทางพันธุกรรมได้แม้จะเก็บรักษาอย่างถูกวิธี ลักษณะที่เกิดขึ้นใหม่มักเป็นลักษณะด้อยที่ไม่พึงประสงค์ เช่น คุณภาพของดอกเห็ดที่ผลิตได้ลดลงและระยะเวลาในการเพาะปลูกที่ยาวนาน ส่งผลให้เกษตรกรได้ผลตอบแทนจากการลงทุนค่อนข้างน้อยหรือบางครั้งไม่คุ้มค่ากับการลงทุนจากสาเหตุดังกล่าวทำให้เกษตรกรมีความต้องการเห็ดนางรมทองสายพันธุ์ใหม่ที่มีความแข็งแรง เจริญเร็ว ให้ดอกที่มีคุณภาพและผลผลิตที่สูงตลอดจนต้องการสายพันธุ์ที่ให้ดอกในลักษณะที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิมเพื่อให้เป็นเห็ดเศรษฐกิจสกุลนางรมชนิดใหม่ที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรอีกทางเลือกหนึ่ง

ปัจจุบันการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดมีอยู่หลายวิธี เช่น การคัดเลือกและผสมพันธุ์ (selection and hybridization), การใช้สารก่อกลายพันธุ์ (Chemical mutagenesis) หรือการใช้เครื่องหมายสำหรับการคัดเลือก (selection marker) ซึ่งแต่ละวิธีนี้เป็นวิธีที่จะช่วยพัฒนาสายพันธุ์เห็ดในหลายด้าน เช่น การเพิ่มผลผลิต ต้านทานโรคและช่วยให้มีประสิทธิภาพในการดำรงชีวิตในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดด้วยวิธีการผสมพันธุ์ (hybridization) จึงเป็นหนึ่งในวิธีที่ได้รับความสนใจและประสบความสำเร็จมากในเห็ดที่รับประทานได้หลายชนิด โดยวิธีนี้เป็นการผสมข้ามระหว่างเห็ด 2 สายพันธุ์ที่มีเส้นใย 1 นิวเคลียส (n) และสามารถรวมกันให้ได้เส้นใยที่มี 2 นิวเคลียส (n + n) เพื่อเจริญไปเป็นดอกเห็ดที่สามารถนำมารับประทานได้โครงงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดนางรมทองโดยวิธีการผสมพันธุ์แบบเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (mono-mono crossing) เพื่อให้ได้สายพันธุ์เห็ดลูกผสมที่มีผลผลิตสูงหรือโตเร็วและมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่มีลักษณะที่ดีขึ้น เช่น รูปร่างและขนาดของดอกเห็ดให้เหมาะสมกับการเพาะในประเทศไทยและเพื่อให้ตอบโจทย์ความต้องการของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภคเห็ดได้ในปัจจุบัน

1.2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาวิจัยการปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมทองให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยง
2. เพื่อพัฒนาคุณสมบัติของเห็ดนางรมทองให้มีลักษณะที่ดีขึ้น เช่น ผลผลิตและระยะเวลาในการเพาะปลูก

1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สายพันธุ์เห็ดนางรมทองที่เหมาะสมกับการเพาะปลูกในประเทศไทย เพื่อใช้พัฒนาเป็นเห็ดเศรษฐกิจชนิดใหม่
2. ได้เห็ดนางรมทองชนิดใหม่ที่มีผลผลิตและระยะเวลาในการเพาะปลูกที่ดีขึ้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. ชีววิทยาของเห็ดนางรมทอง

2.1.1. การจัดจำแนกหมวดหมู่ของเห็ดนางรมทอง *(Pleurotus citrinopileatus* Singer, 1942) เป็นดังนี้

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Class	Agaricomycetes
Order	Agaricales
Family	Pleurotaceae
Genus	*Pleurotus*
Species	*Pleurotus citrinopileatus*

2.1.2. สัณฐานวิทยาของเห็ดนางรมทอง

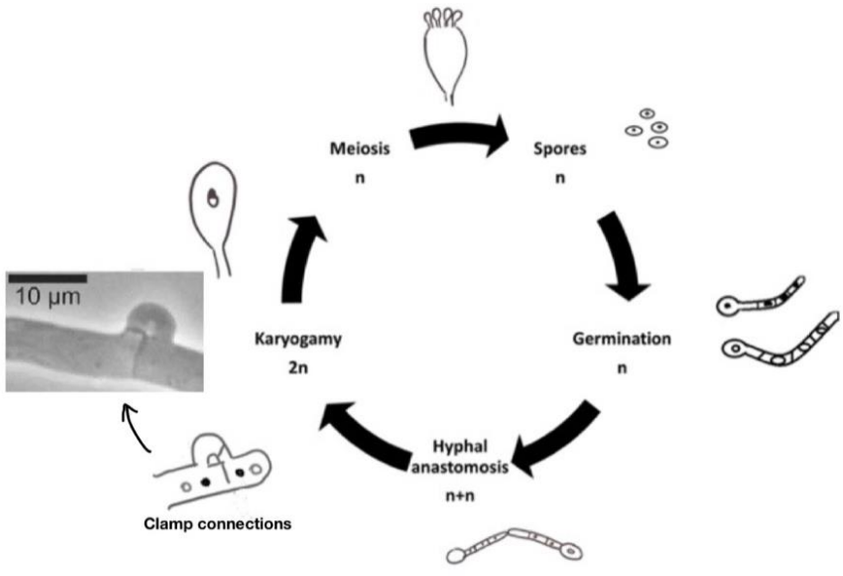
เห็ดนางรมทอง เป็นเห็ดพวกทำลายเนื้อไม้ (wood-destroying fungi) ดำรงชีวิตด้วยการเจริญอยู่บนซากของสิ่งมีชีวิต (saprophytic fungi) ซึ่งเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตได้ดีในอากาศเย็นชื้น โดยที่เส้นใยเห็ดเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส และเจริญเป็นดอกเห็ดได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80-95% จึงมักมีการทำการเพาะปลูกในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว (อนงค์ และอภิรัชต์, 2541) ดังนั้นเห็ดนางรมทองจึงจัดอยู่ในกลุ่มเห็ดเขตหนาวหรือกึ่งหนาวโดยมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศแถบยุโรป โดยเห็ดนางรมทองจะมีรูปร่างคล้ายหอยนางรมและมีลักษณะของดอกเห็ดที่มีสีเหลืองสวยงาม (ภาพที่ 2.1.) สามารถนำมารับประทานได้ มีรสชาติเปรี้ยว (Stamets, 2000) มีกลิ่นหอมซึ่งเกิดจากองค์ประกอบของสารได้แก่ 3-octanol, 3-octanone และ octen-3-ol (Zawirska et al., 2009) ทำให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นสารปรุงแต่งในอาหารได้ (ภัทระ, 2555) โดยบริเวณหมวกดอกของเห็ดนางรมทองนั้นจะมีผิวเรียบส่วนตรงกลางจะเว้าเป็นแอ่ง ซึ่งขอบหมวกจะเอียงลงเล็กน้อยและใต้หมวกจะเป็นครีบเมื่อดอกเห็ดบานเต็มที่แล้ว ส่วนบริเวณก้านดอกนั้นจะติดกับหมวกดอกเห็ดเป็นเนื้อเดียวกัน โดยดอกเห็ดนางรมทองนี้อาจขึ้นเป็นดอกเดี่ยวๆ หรือจะขึ้นเป็นกระจุกกันอยู่ก็ได้ (Bellettini et al., 2019)

ภาพที่ 2.1. ลักษณะดอกเห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus*)

2.1.3. วงชีพของเห็ดนางรมทอง

วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์ของเห็ดนางรมทองโดยทั่วไปเห็ดส่วนใหญ่จะมีวงจรชีวิตที่เป็นแฮพลอยด์ (haploid) ใน 1 นิวเคลียสมีโครโมโซมอยู่ 1 ชุด (n) โดยช่วงที่นิวเคลียสเกิดการรวมตัวกัน (karyogamy) แล้วผ่านระยะการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส เพื่อสร้างเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) จะมีจำนวน 2-4 สปอร์ (ภาพที่ 2.2.) โดยแต่ละสปอร์จะมีจำนวนโครโมโซม (chromosome) เพียงชุดเดียวซึ่งเป็นแฮพลอยด์สปอร์ (สุมาลี พิชญางกูร, 2541)

เมื่อเส้นใยงอกจากแฮพลอยด์สปอร์เป็นเส้นใยเริ่มต้นขั้นที่หนึ่ง (primary mycelium) ส่วนใหญ่จะเข้าสู่ระยะพักก่อน แล้วเส้นใยจึงจะเจริญต่อไปเป็นขั้นที่สอง (secondary mycelium) โดยผ่านกระบวนการรวมไซโทพลาสซึม (plasmogamy) ซึ่งจะมีความแตกต่างไปจากขั้นที่ 1 โดยการเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) เป็นผลจากการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสืบพันธุ์ โดยผลของการเกิดแคลมคอนเนกชันจะทำให้นิวเคลียสเคลื่อนที่มารวมกันกับเซลล์ที่อยู่ถัดมาเกิดเซลล์ที่มีสองนิวเคลียส (dikaryon) ซึ่งนิวเคลียสคู่ใหม่นี้อาจมีดีเอ็นเอ (deoxy nucleic acid) แตกต่างกันที่ยีนเพศ (mating genes) ทำให้เกิด heterogenic compatible หรือ homogenic incompatible โดยนิวเคลียสที่รวมตัวกันได้เกิดจากการสืบพันธุ์แบบมีเพศ เนื่องมาจากผลของการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสนี้เองทำให้เซลล์หนึ่งมีสองนิวเคลียสที่มีพันธุกรรมต่างกัน (dikaryon) ซึ่งเซลล์ที่ปลายสุดของเส้นใยจะมีการยืดยาวเพิ่มจำนวนเซลล์โดยจะคงสภาพของการเป็น dikaryon นี้โดยการสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) แล้วเส้นใยในขั้นที่ 2 นี้จึงการรวมตัวกันกลายเป็นตุ่ม (primodium) ที่จะเจริญไปเป็นดอกเห็ด



ภาพที่ 2.2. วงจรชีวิตของเห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus* (Singer, 1942)) (Barh et al., 2019)

2.2. รูปแบบระบบการสืบพันธุ์ของเห็ด

รูปแบบการแสดงเพศในราชั้นสูงจะมีทั้งพวกที่สามารถผสมตัวเองได้ (self-fertile) และพวกที่ผสมตัวเองไม่ได้ (self-sterile) โดยส่วนใหญ่กรณีที่ผสมตัวเองไม่ได้จะถูกบังคับให้มีการผสมข้าม (cross-mating) เกิดขึ้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะเป็นตัวจำกัดรูปแบบในการจับคู่ของคู่ผสม โดยความสามารถในการผสมกันได้ของเส้นใยนิวเคลียสเดียวนี้มี 2 รูปแบบคือ

2.2.1. ระบบการสืบพันธุ์ที่ผสมตัวเองได้ (Homothallism)

เป็นลักษณะของการรวมตัวกันของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดียวกัน (n) แล้วสามารถพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดได้โดยไม่ต้องเกิดการรวมตัวกับเส้ยใยที่เจริญมาจากสปอร์อื่น (Xu, 1995) โดย homothallism นี้ยังแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.2.1.1. Primary homothallism

เกิดขึ้นในเห็ดเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถผสมตัวเองได้โดยไม่มีปัจจัยของการผสมกันไม่ติดเกิดขึ้นเลย (incompatibility factor) เส้นใยที่สามารถผสมตัวเองได้ จะพัฒนามาจากสปอร์เดี่ยวที่มีนิวเคลียสเดียว (n) เส้นใยที่ผสมตัวเองนี้จะมีนิวเคลียสที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน (homokaryotic) ซึ่งอาจเป็นเส้ยใยที่มีนิวเคลียสคู่ที่จะมีข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) หรือไม่มีก็ได้แต่ที่พบบ่อย คือเส้นใยที่มีหลายนิวเคลียสที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) เมื่อเกิดการรวมกันของนิวเคลียส (karyogamy) จนเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ซึ่งจะเกิดขึ้นในเบซิเดีย (basidia) ของดอกเห็ด ก็จะไม่พบช่วงที่เส้นใยมีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryotic phase) อยู่ในวงจรชีวิตเลย ดังนั้นจึงไม่เกิดการกระจายตัวและการรวมตัวของจีโนมที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามบางครั้งอาจเกิดการรวมตัว และกระจายตัวของจีโนม ที่ต่างกันได้ ถ้านิวเคลียสตัวใดตัวหนึ่งเกิดการกลายพันธุ์ไป (Xu, 1995)

2.2.1.2. Secondary homothallism

เป็นลักษณะของระบบสืบพันธุ์ที่ขึ้นกับการกระจายตัวของนิวเคลียส ในกรณีนี้แต่ละเบซิเดีย (basidia) จะมีเพียง 2 สปอร์ โดยจะเกิดจากการที่นิวเคลียสที่มีการแบ่งตัวแบบไมโอซิส แล้วสามารถเข้าคู่กันได้ ซึ่งเส้นใยที่งอกจากสปอร์เดี่ยวเหล่านี้จะมีความสมบูรณ์เพศด้วยตัวเองและจะมียีนที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่เข้าคู่กันไม่ได้ โดยเส้นใยที่เข้าคู่กันไม่ได้นี้จะมีสองนิวเคลียสเดียวที่ต่างกัน (heterokaryon) ใน 1 สปอร์ ดังนั้นวงจรชีวิตของเส้นใยแบบนี้ อาจจะมีปัจจัยที่เข้ากันไม่ได้เพียงหนึ่งหรือสองปัจจัยก็ได้ (Xu, 1995)

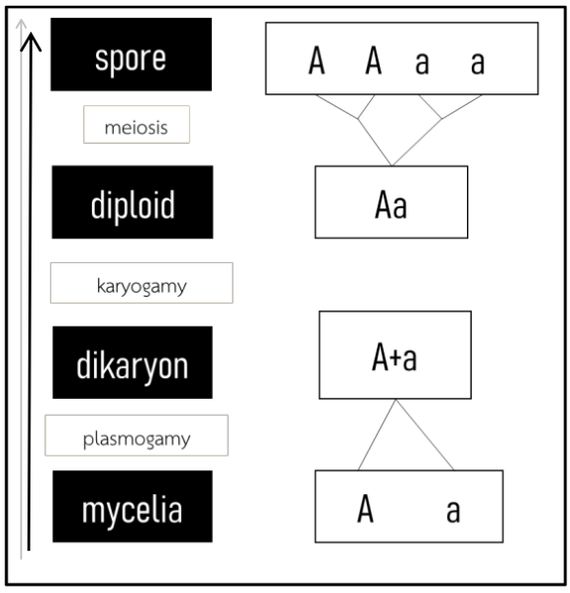
2.2.2. ระบบการสืบพันธุ์ที่ผสมตัวเองไม่ได้ (Heterothallism)

เป็นลักษณะของเส้นใยเห็ดที่ผสมตัวเองไม่ติด (self sterile) เส้นใยที่จะผสมกันได้ต้องเจริญมาจากสปอร์ที่มีคู่ของยีนในนิวเคลียสที่มีพันธุกรรมต่างกัน โดยมีปัจจัยควบคุมอยู่ 2 ปัจจัย คือ

2.2.2.1. ระบบปัจจัยเดี่ยว (Bipolar heterothallism)

เป็นระบบที่ถูกควบคุมด้วยปัจจัยทางพันธุกรรมของการผสมเข้ากันได้ของเส้นใยซึ่งจะถูกควบคุมด้วยยีน 1 คู่ คือจะต้องมีลักษณะของยีนปัจจัย A ที่ต่างกัน (Aa) ที่ตั้งอยู่บนตำแหน่งของโครโมโซมเดียวกัน และจะเกิดกระบวนการ plasmogamy รวมกันของนิวเคลียสเดี่ยวกลายเป็นเส้นใยที่มีสองนิวเคลียส (dikaryon) ได้ก็ต่อเมื่อเส้นใยทั้งสองฝ่ายมีลักษณะของยีนที่มีพันธุกรรมที่สามารถเข้ากันได้

(ดังภาพที่ 2.3) ส่วนการเพิ่มจำนวนเส้นใยนิวเคลียสคู่จะเกิดขึ้นพร้อมกับการสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) (ดังภาพที่ 2.5) (Xu, 1995)



ภาพที่ 2.3. แสดงรูปแบบการทำงานของยีนที่ควบคุมด้วยปัจจัยเดี่ยว

2.2.2.2 ระบบปัจจัยคู่ (Tetrapolar heterothallism)

เป็นระบบที่ถูกควบคุมด้วยปัจจัยทางพันธุกรรมของการผสมเข้ากันได้ของเส้นใย ซึ่งจะถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่ คือจะต้องมีลักษณะของยีนปัจจัย A และ B ที่ต่างกัน (AaBb) ที่ตั้งอยู่บนตำแหน่งของโครโมโซมเดียวกัน และจะเกิดกระบวนการรวมตัวกันของไซโทพลาสซึม (plasmogamy) ตามด้วยการรวมตัวของนิวเคลียสเดี่ยวกลายเป็นเส้นใยที่มีสองนิวเคลียส (dikaryon) ได้ก็ต่อเมื่อเส้นใยทั้งสองฝ่ายมีลักษณะของยีนที่มีพันธุกรรมที่สามารถเข้ากันได้ (ดังภาพที่ 2.4.)

ส่วนในกรณีที่มีคู่ยีนของปัจจัย A เหมือนกัน แต่ของปัจจัย B ต่างกันจะเกิดการผสมเข้าคู่กันติดเพียงกึ่งเดียว คือมีการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสและมีการสร้างเส้นใยที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryon) แต่ไม่สามารถสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) ได้ ดังนั้นก็จะไม่สามารถเกิดการสานตัวของเส้นใยนิวเคลียสคู่กลายเป็นดอกเห็ดได้นั้นเอง (Xu, 1995)

ตัวอย่างของเห็ดที่มีระบบสืบพันธุ์ที่ถูกควบคุมด้วยระบบปัจจัยคู่ ได้แก่ เห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) เป็นเห็ดประเภท tetrapolar heterothallism ซึ่งจะผสมกันได้ก็ต่อเมื่อมีคู่ของยีน A มีแอลลีลที่ต่างกันและยีน B ต่างกันด้วย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1.

ตารางที่ 2.1. แสดงความสามารถในการผสมกันได้ของเห็ดประเภท Tetrapolar Heterothallism

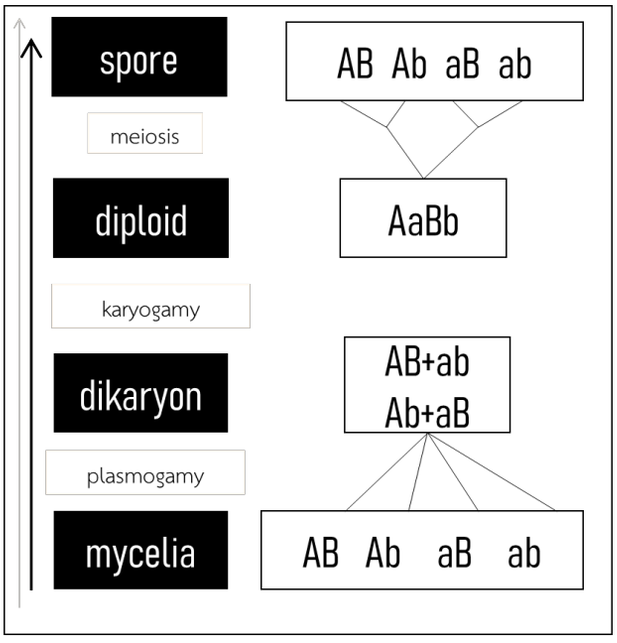
รูปแบบการผสม	A1B1	A1B2	A2B1	A2B2
A1B1	-	F	(+)	+
A1B2	F	-	+	(+)
A2B1	(+)	+	-	F
A2B2	+	(+)	F	-

– = ผสมเข้าไม่ได้เลย

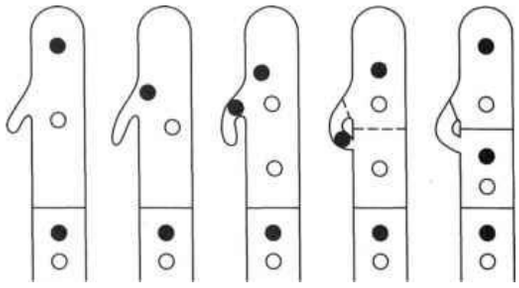
\+ = ผสมเข้ากันได้สมบูรณ์เป็น dikaryon ที่นิวเคลียสเคลื่อนที่ได้และเกิดดอกได้ มี clamp connection จริง

(+) = เข้ากันได้กึ่งเดียวสร้างดอกไม่ได้ คือ heterokaryon ส่วนใหญ่จะเคลื่อนที่ไม่ได้ มี clamp connection หลอก

F = เข้ากันได้กึ่งเดียวคือสร้างดอกไม่ได้ คือ heterokaryon เป็นแบบ multikaryon ไม่มี clamp connection



ภาพที่ 2.4. แสดงรูปแบบการทำงานของยีนที่ควบคุมด้วยปัจจัยคู่



ภาพที่ 2.5. การสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) ของเส้นใยเห็ดโดยการแบ่งนิวเคลียสจะเกิดพร้อมกับการแบ่งเซลล์ในเส้นใยนิวเคลียสคู่ที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) นิวเคลียสสีดำและสีขาวแสดงถึงนิวเคลียสที่ต่างกันที่สามารถผสมเข้าคู่กันได้ (Xu, 1995)

2.3. การปรับปรุงพันธุ์เห็ด

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดส่วนใหญ่นั้นมักจะถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมของสายพันธุ์เห็ดที่แตกต่างกันที่สามารถนำมารวมกันได้ โดยการปรับปรุงพันธุ์เห็ดจำเป็นต้องทราบถึง ระบบสืบพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์เห็ดที่นำมาจับคู่กัน, ความสามารถการเกิดดอกเห็ด, วงจรชีวิตและความมีชีวิตของสปอร์ ดังนั้นเห็ดที่จะนำมาใช้ควรมีการปรับตัวได้ดีในธรรมชาติและมีฐานพันธุกรรมที่กว้างเพื่อที่จะได้มีลักษณะให้เลือกมากพอสำหรับใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ (Barh et al., 2019)

2.4. วิธีการที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

2.4.1. การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการคัดเลือกพันธุ์ (Selection)

การคัดเลือกพันธุ์ใหม่ส่วนใหญ่จะนิยมใช้กันในทางการค้าซึ่งทำได้โดยจากการเพาะเลี้ยง multi-spore, จากการเพาะเลี้ยง single-spore หรือ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดที่คัดเลือกไว้โดยตรง ซึ่งวิธีเหล่านี้จะใช้ระยะเวลที่สั้นในการปรับปรุงพันธุ์ แต่การปรับปรุงพันธุ์จากวิธีคัดเลือกพันธุ์นี้จะทำได้ยากมาก ดังนั้นจึงควรมีการผสมพันธุ์ก่อนแล้วจึงใช้วิธีการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป

2.4.2. การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ (Hybridization)

การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์นี้เป็นวิธีที่ใช้กันมานาน และนิยมใช้กับการปรับปรุงพันธุ์สำหรับเห็ดที่กินได้ โดยจะให้มีการผสมข้ามระหว่างเห็ดสองสายพันธุ์ที่สามารถมีลักษณะทางพันธุกรรมที่สามารถผสมเข้าคู่กันได้จนเกิดเส้นใยมี 2 นิวเคลียส (n+n) เจริญกลายเป็นดอกเห็ดในที่สุดซึ่งจะประสบความสำเร็จมากในงานปรับปรุงพันธุ์เห็ดที่รับประทานได้หลายชนิด วิธีการผสมพันธุ์เห็ดที่นิยมใช้มี 3 วิธีดังนี้

2.4.2.1. การผสมของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Mono-mono crossing)

เป็นการพัฒนาสายพันธุ์เห็ดโดยการผสมของเส้นใยที่เป็นนิวเคลียสเดี่ยวเข้าด้วยกัน การผสมพันธุ์เกิดจากการเชื่อมเส้นใย 2 สายพันธุ์และมีการแลกเปลี่ยนสารภายในเซลล์ โดยมีการคัดเลือกอย่างต่อเนื่องและจำกัดลักษณะที่ไม่ดีออกเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางเพื่อที่จะได้ลูกผสมที่มีลักษณะใหม่ๆ (ชาญกิจ, 2555)

การผสมของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ระหว่างเห็ด Bailinggu สายพันธุ์ JZB2106012 กับพันธุ์ JZB2106013 ของ Wang et al., (2018) พบว่าการปรับปรุงพันธุ์เห็ด Bailinggu สามารถคัดลูกผสมได้ 25 สายพันธุ์และเมื่อนำมาเปรียบเทียบอัตราการเจริญและผลผลิตกับสายพันธุ์พ่อแม่ พบว่าลูกผสมสาย

พันธุ์ C4 ให้ผลผลิตและระยะเวลาในการเพาะปลูกที่ดีขึ้นมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (สายพันธุ์ JZB2106012 และ JZB2106013) ถึง 67.56% ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีการผสมระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดียวนี้จะสามารถคัดเลือกลูกผสมได้หลากหลายลักษณะที่สามารถให้ผลผลิตที่สูงกว่าสายพันธุ์ Bailinggu เดิม

2.4.2.2. การผสมของเส้นใยนิวเคลียสคู่ กับ เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Di-mono crossing)

เป็นวิธีที่ทำได้เร็วหากมีสายพันธุ์ (เส้นใยนิวเคลียสคู่) จำนวนมากสำหรับทดสอบอยู่แล้วก็จะสามารถผสมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryon) จากสายพันธุ์เหล่านี้แล้วนำไปทำการทดสอบโดยวิธีการผสมแบบได-มอน เกิดเส้นใยนิวเคลียสคู่บนปลายเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ซึ่งถือว่าเป็นกฎว่านิวเคลียสตัวใดตัวหนึ่งที่เข้ากันได้ของเส้นใยนิวเคลียสคู่ที่ไปผสมกับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวผลที่ได้อาจเป็นการผสมที่เข้ากันได้เพียงกึ่งเดียวหรือเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ในบางกรณีของนิวเคลียสทั้งคู่ของเส้นใยนิวเคลียสคู่จะย้ายเข้าไปด้วยกันได้ ถ้าเส้นใยมีนิวเคลียสคู่ตรงส่วนปลายของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว

ภัทราภรณ์ (2540) การผสมแบบเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ระหว่างเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ CM5 กับพันธุ์ลูกผสม KTCM4 (A4) ทำเพื่อปรับปรุงเห็ดนางรมสีเทาคัดได้ถูกผสม 9 สายพันธุ์ที่มีรูปร่างและคุณภาพดีโดยมีการเปรียบเทียบผลผลิตของลูกผสมทั้ง 9 สายพันธุ์ ซึ่งต่อมาคัดเลือกเหลือ 6 สายพันธุ์ (Q1-Q6) ที่มีผลผลิตสูงเพื่อใช้ศึกษาต่อไป สายพันธุ์ Q1 ให้ผลผลิตสูงสุดการผสมแบบไดมอน (di-mon) เป็นการทำผสมระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryon) จาก Q1 กับเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryons) จาก Q1-Q6 และพันธุ์พ่อแม่อื่นอีกห้าสายพันธุ์คือ KD1, KD2, KDCM2, KDCM3, KDCM4 (A4) คัดลูกผสมได้ 9 สายพันธุ์ที่มีลักษณะและคุณภาพดีจากนั้นนำมาเปรียบเทียบผลผลิตกับพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ CM5 กับเห็ดนางรมสีขาว CM1 หรือชนิดฟลอริดาที่อุณหภูมิห้องเห็ดนางรมชนิดฟลอริดาให้ผลผลิตสูงกว่าลูกผสมแบบ di-mon ของกลุ่มที่ให้ผลผลิตสูง อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ di-mon เหล่านี้จะให้ผลผลิตระดับเดียวกับสายพันธุ์เริ่มต้นคือเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ CM5 ที่เพาะในห้องเย็น

2.4.2.3. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Protoplast)

เป็นการเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์หลังจากนั้นโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจะมีความสามารถสร้างเพาะเซลล์ขึ้นมาใหม่แล้วมีการแบ่งเซลล์กลายเป็นแคลลัสและในที่สุดได้ต้นใหม่ขึ้นมาการแยกโปรโตพลาสต์ทำได้ 2 วิธีใหญ่ ๆ คือวิธีกล (mechanical method) แยกโปรโตพลาสต์โดยใช้ใบมีดตัดเนื้อเยื่อพืชที่พลาสโมไลซิส (plasmolysis) แล้ว เซลล์ที่ถูกมีดตัดผ่านจะมีโปรโตพลาสต์ไหลออกมา อาจช่วยโดยการใช้วิธีกดหรือบีบเบา ๆ นอกจากนี้การลดแรงดันออสโมซิสของสารละลายที่แช่เซลล์เหล่านี้สามารถทำให้โปรโตพลาสต์บวมดันหลุดออกมาตรงรอยตัดได้ง่ายวิธีนี้ได้โปรโตพลาสต์น้อยและเหมาะกับเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ และวิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic method) วิธีนี้ใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์เพื่อให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมาเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์เรียกว่าไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzyme) เนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ ได้แก่ เซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูเลส (hemicellulose) และสารระหว่างเซลล์คือ มิดเดิลลาเมลลา (middle lamella) นั้นมีกรดเพกติก จึงใช้เอนไซม์พวกเซลลูเลส (cellulase) และเพกทิเนส (pectinase) รวมกัน

อย่างไรก็ตามต้นที่ได้ลักษณะที่เป็นลูกผสม (hybrid plants) จากการรวมโปรโตพลาสต์จึงไม่เพียงแต่เปิดโอกาสให้สามารถผสมพันธุ์ระหว่างพืชต่างชนิดหรือต่างสกุล ซึ่งไม่สามารถกระทำได้ง่ายโดยวิธีผสมพันธุ์แบบปกติ นอกจากนี้การรวมโปรโตพลาสต์ยังเปิดโอกาสให้มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุ์กรรมใน

พืชที่ขยายพันธุ์โดยส่วนทางด้านลำต้น (vegetatively propagated crops) ในพืชที่เกสรผู้เป็นหมัน (sterile species) หรือพืชเกสรผู้เป็นหมัน (sterile species) หรือพืชที่มีอายุยาว

วิธีการรวมโปรโตพลาสต์มีด้วยกันหลายวิธีแตกต่างกันไปในส่วนขององค์ประกอบของสารชักนำการรวมตัว (เรียกทั่ว ๆ ไปว่า fusogen) และจำเป็นต้องตรวจสอบการรวมตัวโดยใช้ลักษณะที่มองเห็นด้วยตา (visual makers) เช่น กรณีโปรโตพลาสต์จากมีโซฟิลล์ของพืชชนิดหนึ่งที่มีสีเขียวเมื่อรวมกับโปรโตพลาสต์ที่ไม่มีสี (เช่น ที่ได้จากการเลี้ยงและแยกเซลล์ของราก, ใบเลี่ยง) เซลล์ heterokaryons จำแนกได้จากการทีโปรโตพลาสต์ทั้งหมดมีการสร้างคลอโรพลาส (chloroplasts) เช่นเดียวกับที่ได้จากเซลล์แม่ที่มาจากมีโซฟิลล์และมีไซโตพลาสซึมจำนวนมากจากเซลล์พ่อที่ไม่ใช่เซลล์มีโซฟิลล์

ประโยชน์จากการรวมโปรโตพลาสต์ เป็นที่คาดหวังว่าการรวมโปรโตพลาสต์ (Protoplast fusion, Somatic cell fusion, Hybridization หรือ Parasexual hybridization) เทคนิคการรวมสารพันธุกรรม (เช่น DNA-recombination) และการถ่ายยีนหรือดีเอ็นเอ (DNA-transfer) จะเป็นแนวทางหนึ่งในการรวมลักษณะที่ต้องการจากพืชต่างชนิดกันมาก ๆ (diverse species) หรือแม้กระทั่งพืชต่างสกุล (genera) เข้าด้วยกันซึ่งไม่อาจทำได้ในกรณีการผสมพันธุ์พืชโดยวิธีการปกติ (conventional breeding) หรือโดยวิธีการอื่น ๆ ปัจจุบันมีความพยายามอย่างมากในการที่จะรวมโปรโตพลาสต์ในการสร้างลูกผสมระหว่างพืชที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก ๆ เพื่อใช้ในการถ่ายทอดพันธุกรรมความต้านทานหรือทนทานต่อสภาพที่จำกัด (stress environment) รวมทั้งในการปรับปรุงลักษณะคุณภาพของผลผลิตและการเจริญเติบโต (จรชรัส, 2544)

การศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดฟาง (Volvariella volvacea) โดยการรวมโปรโตพลาสต์ของวีรวัฒน์ กนกนุเคราะห์ (2534) พบว่าเห็ดฟางสายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่เกิดขึ้นจากการปรับปรุงพันธุ์นี้มีขนาดของเส้นใยใหญ่ขึ้น และมีปริมาณดีเอนเอเพิ่มขึ้นเท่ากับจำนวนเซลล์รวมกัน เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ พบว่าสายพันธุ์เห็ดฟางที่เกิดขึ้นนี้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณดีเอนเอเป็น 2 เท่า และ 3 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณดีเอนเอมีผลต่อการสร้างตุ่มดอกเห็ดได้ดี เมื่อนำไปเพาะทดสอบในตะกร้าทดลอง จึงพบได้ว่า สายพันธุ์ฟิวแสนท์ที่ทดลองเพาะให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์ต้นแบบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติถึง 95%

2.4.3. ชนิดของการผสมพันธุ์

2.4.3.1. Intraspecific hybridization

เป็นการผสมพันธุ์แบบเฉพาะเจาะจง คือ การผสมพันธุ์ของสองสายพันธุ์จากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เกิดขึ้นภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ดังนั้นจึงทำให้สามารถเกิดขึ้นได้ระหว่างสิ่งมีชีวิตย่อยที่แตกต่างกันภายในสายพันธุ์การผสมพันธุ์แบบคัดเลือกเป็นอีกชื่อหนึ่งสำหรับการผสมพันธุ์แบบ Intraspecific hybridization (Barh et al., 2019)

2.4.3.2. Interspecific hybridization

เป็นการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ เป็นกระบวนการผสมพันธุ์สายพันธุ์จากสองสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามทั้งสองชนิดนี้ควรมาจากสกุลเดียวกัน เป็นประเภทของการผสมข้ามสายพันธุ์เนื่องจากประกอบด้วยความเกี่ยวข้องกัน การผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตไม่เป็นที่ยอมรับและเป็นไปได้

ตามแนวคิดของสายพันธุ์ทางชีววิทยา อย่างไรก็ตามการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างสปีชีส์หรือการผสมข้ามสายพันธุ์จะดำเนินการเพื่อใช้ประโยชน์จากยีนที่มีประโยชน์จากป่าและเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ที่ไม่ได้รับการพิสูจน์ให้เป็นสายพันธุ์ที่เพาะปลูก เป็นต้น (Barh et al., 2019)

2.4.3.3. Intergeneric hybridization

เป็นการผสมข้ามสายพันธุ์ที่เกิดระหว่างการผสม monokaryon ของเห็ด 2 สกุลที่ต่างกัน เป็นวิธีการที่ใช้สำหรับการรวบรวมลักษณะเฉพาะเช่นการผลิตเม็ดสีที่ไม่มีอยู่ในสกุลเดิม ให้มีในสายพันธุ์ที่ปรับปรุงขึ้นใหม่แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถสร้าง fruiting body ได้เนื่องจากเป็นหมัน (Barh et al., 2019)

2.5. ลักษณะดีเด่นเหนือกว่าพ่อแม่ (Heterosis หรือ Hybrid vigor)

เป็นลักษณะของลูกผสมดีเด่นที่อาจจะเกิดจากการผสมข้าม ซึ่งจะแสดงออกในรุ่นลูกที่มีค่าของลักษณะที่ต้องการนั้น ๆ สูงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ของลูกผสมนั้น การแสดงออกของลูกผสมแบบนี้เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ เช่น เพื่อเพิ่มผลผลิต โดยปฏิกิริยาทางพันธุกรรมของลูกผสมดีเด่นนี้ คือการแสดงออกของยีนแบบยีนข่มของแอลลีล (alleles) ในยีนเดียวกัน (dominance) แบบข่มเกินกว่าพ่อแม่ (overdominance) และแบบข่มของแอลลีลต่างยีน (epistasis) เป็นต้น (Mayo, 1980)

2.6. ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเส้นใยและการเกิดดอกของเห็ดนางรมทอง

2.6.1. ความชื้นของบรรยากาศ

ปัจจัยความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศในช่วงที่บ่มเชื้อหรือการเดินของเส้นใยในถุงเพาะเห็ดนั้นไม่มีความจำเป็นมากนัก แต่อย่างไรก็ตามก็ควรจะอยู่ในช่วง 60-80% (Zadrazil, 1978) ส่วนในช่วงการเจริญเติบโตของการเกิดดอกเห็ดควรมีการฉีดพ่นละอองน้ำ เพื่อเพิ่มความชื้นภายในโรงเพาะเห็ดวันละ 2-3 ครั้งและความชื้นสัมพันธ์ของอากาศควรอยู่ในระดับ 70-80% (ปัญญาและกิตติพงษ์, 2537)

2.6.2. อุณหภูมิ

เห็ดแต่ละชนิดมีความต้องการอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการทดลองของ Bellettini (2019) เลี้ยงเส้นใยเห็ดนางรมทอง ที่อุณหูมิ 24-29 องศาเซลเซียสบนอาหารเลี้ยง PDA พบว่าเส้นใยของเห็ดนางรมทองเจริญได้ดีที่สุดในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนการเลี้ยงเส้นใยในวัสดุเพาะอื่น ๆ เมื่อบ่มในอุณหภูมิ 21-27 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เส้นใยเจริญดีที่สุดคือ 25 องศาเซลเซียส ในวัสดุเพาะที่มีส่วนผสมของขี้เลื่อย ฟางและซังข้าวโพด เป็นต้น (Bellettini et al., 2019)

2.6.3. แสง

แสงเป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างดอกเห็ดและมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ดังนั้นถ้าแสงน้อยก้านดอกเห็ดจะยาวและหนาแต่ดอกจะเล็ก สีดอกเห็ดจะเข้ม ส่วนถ้าแสงมากเกินไปจะส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและส่งต่อสีดอกที่อ่อนลง ดังนั้น แสงเป็นปัจจัยที่ช่วยทำให้เกิดตุ่มดอกเห็ด (primodia) ในเห็ดตระกูลนางรม โดยที่แสงมีความจำเป็นต่อการพัฒนาของดอกเห็ดโดยควรมีความเข้มแสงที่ 10,000 ลักซ์ต่อชั่วโมง (Zadrazil, 1978)

2.6.4. ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศมีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้ยใยเห็ด ซึ่งจากการงานวิจัยของ Zadrazil (1978). พบว่าความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศที่สูงจนถึง 28% โดยปริมาตร จะกระตุ้นการเจริญของเส้นใยในเห็ดตระกูล *Pleurotus ostreatus* และ *Pleurotus florida* แต่ใน *Pleurotus eryngii* ถ้าความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์สูงถึง 37.5% โดยปริมาตร จะทำให้การเจริญของเส้นใยเห็ดทั้งสามชนิดในตระกูล *Pleurotus* ลดลงประมาณ 40% เมื่อเทียบกับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 0.03% และนอกจากนี้ยังทำการทดลองวัดปริมาณการเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ในวัสดุเพาะที่ใส่หัวเชื้อ 5% และ 10% พบว่าหลังจากใส่หัวเชื้อได้ 3 วัน ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์จะเพิ่มขึ้นมากกว่า 20 % โดยในหัวเชื้อที่ 10% จะให้ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าที่ 5% ความเข้มจนของคาร์บอนไดออกไซด์จะเพิ่มสูงสุดหลังจากเชื้อเจริญได้ 4 และ 6 วัน หลังจากนั้นจึงลดลง ส่วนการทดลองใช้หัวเชื้อ 1% แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเพิ่มขึ้นถึงจุดสูงสุดหลังจากเชื้อเจริญไปได้ 20 วัน โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ 30% แต่ที่ 30 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ 35% หลังจากนั้นความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์จะลดลงซึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์จะลดลงเร็วกว่าอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นการที่มีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในถุงเพาะสูงจะช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ จะทำให้ไม่สามารถที่จะเติบโตหรือบางทีอาจจะตายได้ (Zadirazil, 1978)

2.6.5. ก๊าซออกซิเจน

ในการเจริญของเส้นใยเห็ดนั้นต้องการทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซออกซิเจน ถึงแม้ว่าจะต้องการก๊าซออกซิเจนน้อยก็ตาม (semianerobic) แต่ทั้งนี้แล้วเส้นใยเห็ดจะเจริญได้ดีในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนน้อย แต่ถ้าไม่มีก๊าซออกซิเจนเลยจะทำให้เส้นใยเห็ดชะงักการเจริญ เห็ดจะต้องการออกซิเจนเป็นปริมาณมากในช่วงที่เกิดดอก (aerobic) (Zadirazil, 1978)

2.7. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับก้อนวัสดุเพาะ

2.7.1. วัสดุที่ใช้เพาะ

วัสดุที่ใช้ในการเพาะเห็ดนั้นสามารถนำวัสดุที่มีในท้องถิ่นมาเพาะได้เช่น ฟาง, ซังข้าวโพดและขี้เลื่อย แต่ตามปกตินิยมใช้ขี้เลื่อยเนื่องจากมีมากและหาง่ายเช่น ขี้เลื่อยไม้ก้ามปู และไม้ยางพารา เป็นต้น นอกจากนี้ปริมาณวัสดุเพาะจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดและปริมาณการเกิดดอกเห็ดด้วย (ปัญญาและกิตติพงษ์, 2537)

2.7.2. ปริมาณธาตุอาหารต่าง ๆ

เห็ดได้รับสารอาหารจากวัสดุที่ใช้เพาะ แต่การใช้ขี้เลื่อยเพียงอย่างเดียวเพื่อเพาะเห็ดจะทำให้มีสารอาหารต่าง ๆ ในวัสดุเพาะนั้นไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเห็ดซึ่งต้องมีการเติมธาตุอาหารต่าง ๆ ลงไปในวัสดุเพาะเพื่อให้เห็ดมีการเจริญเติบโตดีขึ้นในการเพาะเห็ดนางรมได้ มีการทดลองใช้กากกาแฟสดเป็นวัสดุทนแทนขี้เลื่อยไม้ยางพาราในอัตราส่วน 25%, 50% พบว่าการใช้กากกาแฟให้ผลผลิตสูงมากกว่าขี้เลื่อยถึง 41.5% และไม่มี caffeine ตกค้างอีกด้วย (วันทนา, 2556)

2.7.3. ความชื้น

ความชื้นในวัสดุเพาะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดและผลผลิตของเห็ด ดังนั้นถ้าหากวัสดุเพาะที่แห้งหรือมีน้ำอยู่ 40-50% จะส่งผลให้การเจริญของเส้นใยอาจจะมีน้อยหรือไม่มีการเจริญเลยก็เป็นได้ ในขณะที่วัสดุเพาะที่มีน้ำอยู่ 55-65% การเจริญก็จะดีกว่าแต่ถ้าหากมีการเพิ่มปริมาณน้ำเข้าไปในวัสดุเพาะมากขึ้นอีกก็จะส่งผลทำให้การเจริญของเส้นใยลดลงและถ้าปริมาณน้ำสูงถึง 75% เส้นใยก็จะหยุดการเจริญ ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าในวัสดุเพาะที่มีน้ำมากจะทำให้ขาดออกซิเจน (Zadirazil, 1978)

2.8. บทความที่เกี่ยวข้อง

สุวรรณี จันทร์ตา (2540) ศึกษาการคัดเลือกโมโนคาริออนของเห็ดนางรมเพื่อการผสมพันธุ์ พบว่าเส้นใยนิวเคลียสเดียวที่มีอัตราเจริญเร็วมาก เจริญเร็วและเจริญช้า เมื่อนำมาผสมข้ามกลุ่มกันจะสามารถเกิดการสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์และดอกเห็ดได้ดีมากกว่า การผสมพันธุ์ของเส้นใยนิวเคลียสเดียวที่อัตราการเจริญในกลุ่มเดียวกัน

ประยุกต์ ศรีวิไล และคณะ (2012) ศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสของ *Coprinopsis cinerea* ในระหว่างการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออน พบว่า เห็ดส่วนใหญ่ในกลุ่มเบสิดิโอไมซิทิสจะสามารถเกิดดอกเห็ดได้จากความสามารถของการเข้ากันได้ (compatible) หรือการเข้ากันไม่ได้ (incompatible) ของโมโนคาริออนและการพัฒนาของไดคาริออน ซึ่งการเข้ากันได้หรือไม่ได้จะถูกควบคุมโดยยีน 2 ยีน คือ A mating type และ B mating type โดยยีน B mating type ทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสผ่านเส้นใยและสร้างผนังกั้นเส้นใย ส่วนยีน A mating type ทำหน้าที่ในการ จับคู่นิวเคลียสและสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ ที่จะมีการทำงานรวมกันได้ก็ต่อเมื่อเส้นใยโมโนคาริออนนี้มีลักษณะของคู่ยีนที่ต่างกันในแต่ละเส้นใย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการดำเนินการ

3.1. วัสดุอุปกรณ์

- เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น จานเลี้ยงเชื้อ บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ แท่งแก้ว เป็นต้น
- อะลูมีเนียมฟรอยด์ (Aluminum foil) ของบริษัท Diamond, U.S.A
- ที่เจาะจุกคอร์ก (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร
- เข็มเขี่ย (Needle)
- มันฝรั่ง (Potato)
- พาราฟิล์ม (Parafilm) ของบริษัท Bemis, U.S.A
- เครื่องกวนสารให้ความร้อน (*hotplate*) รุ่น 1500W ของบริษัท EGO, Germany
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner) ของบริษัท MIT, Thailand
- ตู้อบ ของบริษัท รุ่น UN30 ของบริษัท MEMMERT, Germany
- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น SX – 500 ของบริษัท TOMY, Japan
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood) รุ่น Bioclean ของบริษัท Labservice, Thailand
- ไมโครเวฟ (Microwave) ของบริษัท Goldstar, Korea
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น Adventurer ของบริษัท kern, Germany
- ปิเปตต์ทิป (Pipette tip) ของบริษัท Merck KGaA, Germany
- ไมโครปิเปตต์ (Automatic adjustable micropipette) P20 (5-20 ไมโครลิตร), P200 (20 – 200 ไมโครลิตร) และ P1000 (0.1-1 มิลลิลิตร) ของบริษัท BIO-RAD LABORATORIE, U.S.A
- หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ,China
- ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส รุ่น EMOTECA1500 ของบริษัท FIOCHETTI, Italy
- สไลด์ (slide) ของบริษัท Sail brand, china
- กระจกปิดสไลด์ (Cover slips) ของบริษัท Menzel-Glaser, Germany
- กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope) รุ่น CX23 ของบริษัท OLYMPUS, Japan

3.2. สารเคมี

- น้ำตาลกลูโคส (glucose) ของบริษัท ฟาร์มมิเลียร์ จำกัด, ประเทศไทย
- ผงวุ้นสำหรับเลี้ยงเชื้อ (Agar powder) ของบริษัท himedia, India
- Ethanol ของบริษัท Sydney Solvents, Australia
- 70% alcohol ของบริษัท D.P. Ceramic Co., Ltd., Thailand

3.3. วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1. การเตรียมรอยพิมพ์และการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อของเห็ดนางรมทอง

คัดเลือกดอกเห็ดนางรมทอง 2 สายพันธุ์ที่ประกอบด้วย สายพันธุ์ AL ที่ได้รับการจัดซื้อมาจากร้านโกคีพานิช จังหวัดกรุงเทพมหานคร ส่วนสายพันธุ์ BL ได้รับการจัดซื้อมาจากฟาร์มเห็ดแม่ลูกอ่อน จังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งจะต้องทำการเลือกดอกเห็ดนางรมทองสายพันธุ์ AL และ เห็ดนางรมทองสายพันธุ์ BL ที่มีลักษณะสมบูรณ์ดีตามต้องการ และดอกเพิ่งบานเต็มที่มาตัดเอาเฉพาะส่วนหมวก (Pileus) ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ไปวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีแผ่นกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง นำเอาสปอร์ที่ได้ไปทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี Serial dilution จนได้ความเข้มข้น 1×10^{5} สปอร์ต่อมิลลิลิตร มากระจาย (spread plate) ลงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA; ภาคผนวก) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป และทำการแยกเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ดทั้ง 2 สายพันธุ์โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ (AL และ BL) และเก็บรักษาเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.2. การแยกสปอร์เดี่ยว

นำสปอร์ที่ได้จากข้อ 3.1.1. มาทำเป็นสารแขวนลอยของสปอร์โดยเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (Baral et al., 2018) เพื่อทำการเจือจางสารให้ลดลงเป็นลำดับ (serial dilution) เกลี่ยให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และสังเกตสปอร์เดี่ยวที่งอก germ tube ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกสปอร์เดี่ยวที่งอก germ tube และย้ายลงบนอาหารเลี้ยง PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C) เป็นเวลา 7 วัน ตรวจลักษณะเส้นใยที่ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากไม่พบข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) แสดงว่าเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryotic mycelium) หรือเส้นใยปฐมภูมิคัดเลือกเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยวเก็บรักษาไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในหลอดทดลอง โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C (Rosnina et al., 2016) เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.3. การผสมพันธุ์

นำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดนางรมทองทั้ง 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 3.3.2. มาสายพันธุ์ละ 5 ไอโซเลต เพื่อมาทำการผสมข้ามแบบพบกันหมดทุกคู่ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยจะทดสอบการเข้าคู่ผสมกันได้ของเส้นใย (compatibility) ตามวิธีของ Kumara และ Edirimana (2009) โดยดูจากการเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) ของเส้นใยที่จะอยู่ตรงบริเวณที่เส้นใยสานตัวกันหนาขึ้น (contact zone) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วทำการคำนวณความถี่ของการผสมพันธุ์ (mating frequency) เพื่อทำการตรวจสอบระบบของการสืบพันธุ์ หลังจากนั้นจะทำการเก็บรักษาเส้นใยลูกผสมที่ได้ ไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

$$\text{mating frequency} = \frac{\text{จำนวนลูกผสมทั้งหมด}}{\text{คู่ผสมทั้งหมด}} \times 100$$

3.3.4. การทดสอบการเจริญของเส้นใยลูกผสมที่ได้

นำเส้นใยลูกผสมที่ได้จากข้อ 3.3.3. มาทำการทดสอบการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 25°C โดยการวัดการเจริญเติบโตจากเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเป็นเวลา 7 วัน โดยจะมีการวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมที่มีอัตราการเจริญดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ หรือที่มีอัตราการเจริญสูงที่สุด มาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไปได้

3.3.5.การทดสอบความสามารถในการสร้างดอกเห็ดของสายพันธุ์เห็ดลูกผสมที่ได้

นำสายพันธุ์เห็ดลูกผสมที่ทำการคัดเลือกจากข้อ 3.3.4. มาอย่างน้อย 5 คู่ผสมและสายพันธุ์พ่อแม่ที่เตรียมไว้มาสายพันธุ์ละ 1 plate มาทำเป็นหัวเชื้อเส้นใยที่เจริญบนเมล็ดข้างฟ่าง 0.1 กิโลกรัมต่อขวด โดยใส่เชื้อต่อ 1 ขวด ปริมาณ 10 คอร์ก ทำการบ่มเป็นเวลา 11 วันที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C) รอจนเชื้อเดินเต็มขวดแล้วจึงนำหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างที่เตรียมไว้ย้ายลงในวัสดุเพาะถุงขี้เลื่อย (ประกอบด้วย ขี้เลื่อย 78%, รำละเอียด 16%, ปูนขาว 2%, ยิปซัม 0.5%, ดีเกลือ 0.3%) 800 กรัมต่อถุง (ภาคผนวก ก) แล้วจึงนำไปบ่มเชื้อเห็ดที่อุณหูมิห้อง (บรรณ บูรณะ และ ชนบท, 2547) เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยบนวัสดุเพาะขี้เลื่อยโดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ถุง เมื่อเส้นใยเจริญเต็มถุงขี้เลื่อยก็ทำการเปิดดอกเห็ดในโรงเรือนที่มีอุณหภูมิ 28±2 °C ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80-100% (Rosnina et al., 2016) เปรียบเทียบผลผลิตของดอกเห็ดที่ได้ของแต่ละสายพันธุ์ด้วยค่า biological efficiency (B.E.) ดังสมการ

$$\text{biological efficiency (B.E)} = \frac{\text{น้ำหนักสดของดอกเห็ด}}{\text{น้ำหนักแห้งของวัสดุเพาะ}} \times 100$$

และศึกษาสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดนางรมทองสายพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ รูปร่าง และขนาดของดอกเห็ด เป็นต้น

3.3.6. การวิเคราะห์สถิติ

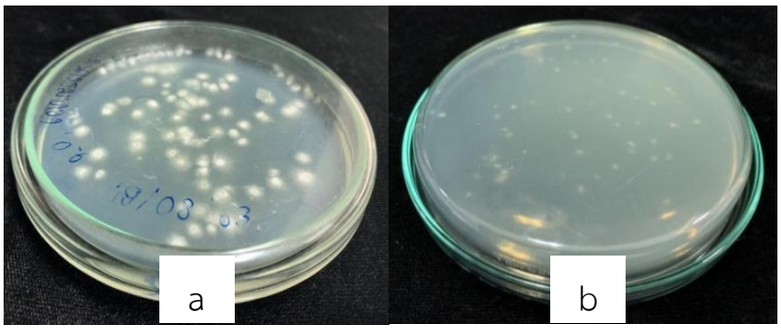
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. การคัดเลือกสปอร์เดี่ยว

เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตของสปอร์ทั้งสองสายพันธุ์ ที่ได้มาจากการเจือจางความเข้มข้นของสปอร์ ทั้งหมด 6 ความเข้มข้น ซึ่งจากการทดลองพบว่า การเจริญของสปอร์ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการเจริญเติบโตของสปอร์ที่ต่างกันโดยพบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน สายพันธุ์ AL จะสามารถกระจายตัวของสปอร์ที่มากเกินกว่าจะนับได้ที่ความเข้มข้น 10^{-6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ BL พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน มีการกระจายตัวของสปอร์ที่มากเกินกว่าจะนับได้ที่ความเข้มข้น 10^{-5} สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ดังภาพที่ 4.1**)** และเมื่อนำสปอร์เหล่านี้มาแยกสปอร์เดี่ยว พบว่า สายพันธุ์ AL สามารถแยกสปอร์เดี่ยวได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลต ส่วนสายพันธุ์ BL สามารถแยกสปอร์เดี่ยว 5 ไอโซเลต



ภาพที่ 4.1. ลักษณะการเจริญของโคโลนีที่เกิดจากสปอร์ **(a)** สายพันธุ์ AL **(b)** สายพันธุ์ BL

4.2. ผลการผสมพันธุ์

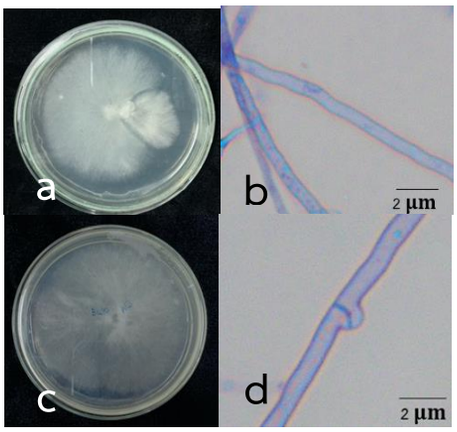
การทดสอบการผสมพันธุ์แบบ mono–mono crossing ระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (n) ของเห็ดนางรมทองสายพันธุ์ AL กับ สายพันธุ์ BL ที่เกิดขึ้นแบบพบกันหมดทุกคู่ พบว่าเมื่อทำการตรวจสอบโครงสร้าง clamp connection ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ดังภาพที่ 4.2) สามารถผสมกันได้ 18 คู่ผสม จากทั้งหมด 75 คู่ผสม ที่สามารถสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) ได้ โดยคิดเป็น mating frequency 24% (ดังตารางที่ 4.1.)

ตารางที่ 4.1. แสดงผลการทดสอบความสามารถในการผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ได้จากสปอร์ของสายพันธุ์พ่อแม่

ไอโซเลต	AL1	AL2	AL3	AL4	AL6
BL1	-	-	-	+	-
BL5	-	-	-	-	+
BL6	-	-	-	-	-
BL9	-	+	-	+	-
BL10	-	-	-	+	+
BL11	-	-	-	+	-
BL12	-	-	-	+	-
BL13	-	-	-	-	-
BL15	-	-	-	-	-
BL17	-	-	+	+	-
BL18	+	+	-	-	-
BL31	-	+	-	-	-
BL32	-	+	-	+	+
BL36	-	-	-	+	-
BL37	-	+	-	-	-

หมายเหตุ + แสดงถึงความสามารถในการเข้าคู่ผสมพันธุ์กันได้

\- แสดงถึงความไม่สามารถเข้าคู่ผสมพันธุ์กันได้



ภาพที่ 4.2. ลักษณะโคโลนีและเส้นใยของเห็ดนางรมทองที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายพันธุ์ AL กับ สายพันธุ์ BL แบบ mono – mono crossing **(a)** ลักษณะของโคโลนีที่ไม่สามารถเข้าคู่กันได้ และ **(b)** ลักษณะของเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (homokaryon) **(c)** ลักษณะของโคโลนีที่สามารถเข้าคู่กันได้ **(d)** ลักษณะของเส้นใยที่มี clamp connection แสดงถึงความสามารถในการผสมพันธุ์กันได้

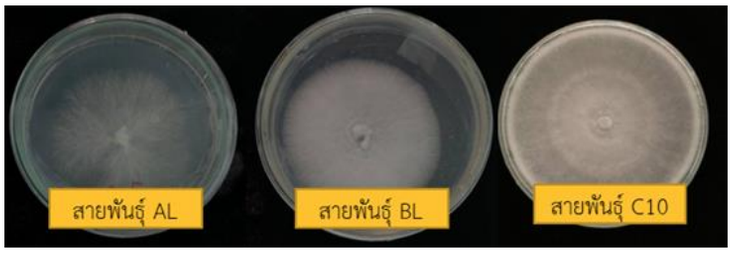
4.3. การทดสอบความสามารถการเจริญของเส้นใยลูกผสม

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ (AL และ BL) กับ สายพันธุ์ลูกผสมจำนวน 18 สายพันธุ์ (C1-C18) ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ระยะเวลาที่เชื้อเดินเต็มจานเพาะที่เร็วที่สุด 7 วัน (ภาพที่ 4.3.) มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลาง พบว่า การเจริญของเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryons) ทั้ง 18 สายพันธุ์มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีอยู่ระหว่าง 2.83-17.27 มิลลิเมตร/วัน (ดังตารางที่ 4.2.) และจากตารางพบว่าสายพันธุ์ลูกผสม C10 มีอัตราการเจริญบนอาหาร PDA สูงที่สุดจึงคัดเลือกมาศึกษาอัตราการการเจริญของเส้นใยเมื่อเพาะเลี้ยงในวัสดุเพาะขี้เลื่อย

ตารางที่ 4.2. ค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรมทอง สายพันธุ์พ่อแม่ (AL และ BL) และ สายพันธุ์ลูกผสม (C1-C18) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDA เป็นเวลา 7 วัน

ไอโซเลต	**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร/วัน)**	**ไอโซเลต**	**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร/วัน)**
AL	13.33 ± 0.42^{c}	C9	11.33 ± 0.58^{e}
BL	15.67 ± 0.58^{b}	C10	17.27 ± 0.23^{a}
C1	14.60 ± 0.00^{b}	C11	7.07 ± 0.81^{hi}
C2	5.63 ± 0.81^{j}	C12	11.93 ± 1.62^{de}
C3	9.93 ± 0.46^{fg}	C13	7.53 ± 0.81^{hi}
C4	7.50 ± 0.50^{hi}	C14	8.00 ± 0.00^{h}
C5	9.50 ± 1.32^{g}	C15	13.00 ± 0.00^{cd}
C6	10.00 ± 0.00^{fg}	C16	6.40 ± 0.53^{ij}
C7	10.87 ± 0.12^{ef}	C17	3.00 ± 0.00^{cd}
C8	2.83 ± 0.29^{k}	C18	9.67 ± 0.58^{g}

*****อักษรทางขวาแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range tests



ภาพที่ 4.3. ลักษณะการเจริญของโคโลนีเห็ดนางรมทองสายพันธุ์พ่อแม่ (AL และ BL) และ สายพันธุ์ลูกผสม บนอาหารเลี้ยงชนิด PDA เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยในวัสดุเพาะขี้เลื่อย ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ (AL และ BL) กับ สายพันธุ์ลูกผสม (C10) ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด (ดังภาพที่ 4.4.) พบว่าการเจริญของเส้นใยในสายพันธุ์ลูกผสม (C10) จะสามารถเจริญเต็มถุงเพาะขี้เลื่อยได้ภายใน 20 วันโดยให้ค่าเฉลี่ยของการเจริญอยู่ที่ 7.11 ± 0.25 มิลลิเมตร/วัน ซึ่งมีค่าที่สูงมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (AL และ BL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P \leq 0.05$ (ดัง ตารางที่ 4.3.)

ตารางที่ 4.3. ค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรมทอง สายพันธุ์พ่อแม่ (AL และ BL) และ สายพันธุ์ลูกผสม (C1-C18) ในวัสดุเพาะขี้เลื่อย เป็นเวลา 20 วัน

ไอโซเลต	**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร/วัน)**
AL	5.78 ± 0.30^{a}
BL	6.11 ± 0.33^{b}
C10	7.11 ± 0.25^{c}

*****อักษรทางขวาแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range tests

ภาพที่ 4.4. ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมทองสายพันธุ์พ่อแม่ (AL และ BL) และ สายพันธุ์ลูกผสม (C10) ในวัสดุเพาะขี้เลื่อย เป็นเวลา 20 วัน

4.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างผลผลิต

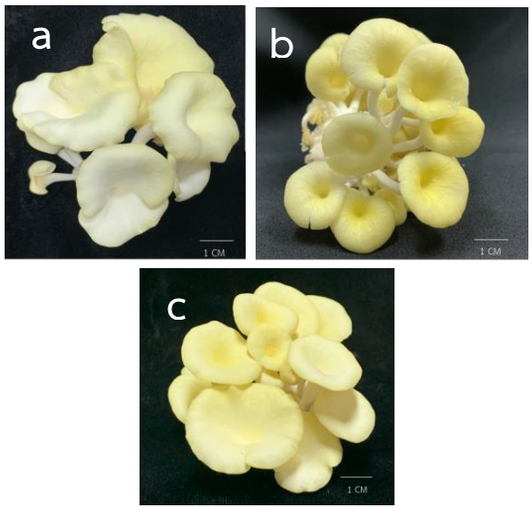
เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตสายพันธุ์พ่อแม่ (ALและBL) และ สายพันธุ์ลูกผสม (C10) ในถุงเพาะขี้เลื่อย 800 กรัม พบว่า น้ำหนักดอกเห็ดสดของสายพันธุ์ลูกผสม (C10) ในต่อถุงเพาะการทดลองที่มีการบ่มหัวเชื้อเป็นเวลา 20 วันและเปิดดอกใช้เวลาอีก 10 วัน พบว่าให้น้ำหนักดอกเห็ดสดอยู่ที่ 64.45 ± 7.59 กรัม ซึ่งมีค่าสูงมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (ALและBL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$, ดังตารางที่ 4.4.) และเมื่อนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการผลิตเห็ดด้วยค่า biological efficiency (B.E.) พบว่า สายพันธุ์ลูกผสม (C10) ให้เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ย biological efficiency (B.E.) สูงที่สุดอยู่ที่ 16.52% ซึ่งเมื่อทำการเก็บผลการทดลองทั้ง 2 รอบของการเก็บผลผลิตพบว่าค่าเฉลี่ย biological efficiency (B.E.) ของสายพันธุ์ลูกผสม (C10) มีค่า 15.87% (รอบที่ 1) และ 16.52% (รอบที่ 2) ซึ่งเป็นค่าที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับสายพันธุ์พ่อแม่ ($P > 0.05$, ตารางภาคผนวกที่ 8) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ลูกผสม (C10) มีประสิทธิภาพของการผลิตที่สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (ALและBL) อย่างที่มีความน่าเชื่อถือ

นอกจากนี้จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดนางรมทองสายพันธุ์ลูกผสม (C10) พบว่ามีขนาดที่ใหญ่มากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (ALและBL) โดยจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความกว้างของดอกเห็ด (46.91 ± 5.81 มิลลิเมตร), ความยาวของดอกเห็ด (41.80 ± 6.14 มิลลิเมตร) และความยาวของก้านดอก (41.33 ± 4.95 มิลลิเมตร) สูงมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (ALและBL) (ดังตารางที่ 4.4., ภาพที่ 4.5.)

ตารางที่ 4.4. เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างผลผลิตของดอกเห็ดนางรมทอง

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ยผลผลิต (กรัม/ถุง)	ค่า biological efficiency (%)	ความกว้างดอก (มิลลิเมตร)	ความยาวดอก (มิลลิเมตร)	ความยาวของก้านดอก (มิลลิเมตร)
AL	31.71 ± 13.29^{a}	9.67 ± 0.73^{a}	41.24 ± 5.25^{a}	38.45 ± 3.92^{a}	35.53 ± 7.53^{a}
BL	37.52 ± 15.94^{a}	10.96 ± 2.51^{a}	42.36 ± 7.33^{ab}	39.00 ± 6.20^{a}	36.40 ± 8.58^{ab}
C10	64.45 ± 7.59^{b}	16.52 ± 1.94^{b}	46.91 ± 5.81^{b}	41.80 ± 6.14^{a}	41.33 ± 4.95^{b}

*อักษรทางขวาแสดงความแตกต่างทางสถิติภายในคอลัมน์เดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range tests



ภาพที่ 4.5. แสดงลักษณะสัณฐานของดอกเห็ดนางรมทอง (a) สายพันธุ์ AL (b) BL และ (c) สายพันธุ์ลูกผสมC10

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดสอบการผสมพันธุ์โดยใช้วิธีแบบ mono–mono crossing จากเห็ดในสกุลนางรมที่มีระบบการสืบพันธุ์อาศัยเพศแบบ heterothallism (Larraya et al., 1999) การจะผสมพันธุ์เข้ากันได้ของเส้นใยนิวเคลียสเดียวจะต้องอาศัยเส้นใยที่มีพันธุกรรมต่างกัน จากการทดลองผสมพันธุ์เส้ยใยนิวเคลียสเดี่ยว (n) ระหว่างสายพันธุ์ AL และ BL ทั้งหมด 75 คู่ผสม พบว่าสามารถเกิดการผสมเข้าคู่กันของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (n) จนเกิดโครงสร้างข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) ได้ลูกผสมเพียง 18 คู่ผสม โดยคิดเป็น mating frequency ที่ 24% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bahukhandi and Sharma (2002) ที่ผสมพันธุ์ข้ามระหว่าง *P. sajor-caju*, *P. sapides* และ *P. cornocupiae* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของการผสมเข้ากันได้ (mating frequency) อยู่ที่ 15.38-20.59% ส่วน Rosnina et al. (2016) รายงานว่าการผสมพันธุ์ระหว่าง *P. citrinopiileatus* กับ *P. pulmonarius* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของการผสมเข้ากันได้ (mating frequency) อยู่ที่ 11% และงานวิจัยของ Wang et al. (2018) พบว่าจากการผสมพันธุ์ระหว่าง *P. tuoliensis* สายพันธุ์ JZB2106012 กับ สายพันธุ์ JZB2106013 มีเปอร์เซ็นต์ของการผสมเข้ากันได้ (mating frequency) อยู่ที่ 26.6% แสดงให้เห็นว่าการผสมเข้าคู่กัน (mating type) ในเห็ดสกุลนางรม (*Pleurotus*) ส่วนใหญ่มีระบบสืบพันธุ์อาศัยเพศที่เป็นแบบ tetrapolar heterothallism ซึ่งเป็นไปตามทฤกษฎีของ Oh (2017) การผสมพันธุ์ที่จะต้องเกิดการเข้าคู่กันตามอัตราส่วน 1:4 หรือประมาณ 25% ของการผสมกันแบบพบกันหมดทุกคู่ และนอกจากนี้ปัจจัยของการผสมเข้ากันได้ยังเกี่ยวข้องกับปัจจัยของยีนที่ควบคุมการสืบพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ประยุกต์ ศรีวิไล (2555) ที่ทำการศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสในระหว่างการผสมพันธุ์ของเห็ดที่มีระบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ พบว่าการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนส่วนใหญ่ที่จัดอยู่ในระบบสืบพันธุ์แบบการผสมข้าม (heterothallism) มักมีการเจริญพัฒนาของเส้นใยนิวเคลียสคู่ (n+n) ไปเป็นดอกเห็ดขึ้นอยู่กับการเข้ากันได้หรือไม่ได้ของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokayon) ของแต่ละสายพันธุ์โดยจะถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่ คือ ยีน A mating type และยีน B mating type โดยทั้ง 2 ยีนนี้จะมีลักษณะของแอลลีลที่ต่างกันโดยแต่ยีนจะทำงานร่วมกันได้ก็ต่อเมื่อเกิดการจับคู่ของเส้นใยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่สามารถเข้ากันได้

จากการทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของเส้นใยลูกผสม โดยการวัดการเจริญของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ ในวัสดุเพาะขี้เลื่อย พบว่าเห็ดนางรมทองสายพันธุ์ลูกผสม (C10) แสดงให้เห็นถึงอัตราการเจริญของเส้นใยที่สูงมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (ALและBL) ถึง 1.2 เท่า ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยในการปรับปรุงพันธุ์เห็ด *P. tuoliensis* สายพันธุ์ JZB2106012 กับ สายพันธุ์ JZB2106013 โดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชันของ Wang et al. (2018) ที่พบว่า ลูกผสมสายพันธุ์ C4 สามารถอัตราการเจริญของเส้นใยสูงมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ถึง 1.1 เท่า อันเป็นผลเนื่องจากลักษณะทางพันธุกรรมที่ลูกผสมมีลักษณะเด่นกว่าพ่อแม่ โดยส่วนใหญ่มักจะเกิดกับการผสมข้ามที่มียีนในรูป heterozygous (พันธุ์ทาง) ซึ่งสามารถแสดงลักษณะต่าง ๆ ออกมาเหนือกว่ายีนที่อยู่ในสภาพ homozygous (พันธุ์แท้) เนื่องจากยีนในสภาพ heterozygous ส่วนใหญ่มักเกิดจากปฏิกิริยายีนข่ม ซึ่งในลักษณะลูกผสมที่เด่นกว่าพ่อแม่นี้เมื่อยีนมารวมตัวกันจะเกิดการข่มยีนด้อยด้วยยีนเด่น โดยยีนเด่นที่เกิดการรวมตัวกันเป็นคู่จะสนับสนุนซึ่งกันละกัน (Allard,1961) มีผลให้ลักษณะที่เป็นพันธุ์ทางแสดงออกได้มากกว่าลักษณะของพ่อหรือแม่สายพันธุ์แท้ ทำให้ลูกผสมที่เกิดมีลักษณะเด่นกว่าพ่อและแม่ อย่างเช่น เห็ด

นางรมทองสายพันธุ์ลูกผสม (C10) ที่มีลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยที่ดีกว่าพ่อแม่ (heterosis) ซึ่งเกิดจากการข่มเกิน (Overdominance) ของลักษณะเด่นของทั้งพ่อและแม่ โดยผลของการแสดงออกในลูกผสม คือ ทำให้อัตราการเจริญของเส้นใยเร็วขึ้นและทำให้ประสิทธิภาพทางชีวภาพสูงขึ้นด้วย

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างคุณภาพของผลผลิต ด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลผลิตดอกเห็ดสด และ biological efficiency (B.E.) พบว่า สายพันธุ์ลูกผสม (C10) ให้ค่าเฉลี่ยของผลผลิตของดอกเห็ดสด และประสิทธิภาพของผลผลิตที่สูงมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (AL และ BL) ถึง 1.5 เท่า แสดงให้เห็นว่าการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการผสมพันธุ์นี้สามารถทำให้เกิดลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพของผลผลิตที่สูงกว่าสายพันธุ์เดิมได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2018) ที่ทำการปรับปรุงพันธุ์เห็ด *Bailinggu* ด้วยวิธีการผสมพันธุ์ (hybridization) พบว่าการปรับปรุงด้วยวิธีการผสมพันธุ์ (hybridization) จะทำให้ได้ผลผลิตที่สูงมากกว่าวิธีการคัดเลือกพันธุ์ (selection) จากการเปรียบเทียบสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการผสมพันธุ์มักถูกควบคุมอย่างเป็นระบบและคัดเลือกสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเห็ด เช่น จากในการทดลองมีการควบคุมความชื้นให้อยู่ที่ 84% โดยเป็นไปผลการศึกษาปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเกิดดอกเห็ดนางรมทองของ Zadrazil, (1978) ที่ควรควบคุมความชื้นให้อยู่ในช่วง 60-80% ที่จะสามารถสร้างผลผลิตจากการเกิดดอกเห็ดได้ดี ซึ่งในทางตรงกันข้ามการเจริญเติบโตของเห็ดที่ทำการปรับปรุงด้วยวิธีการคัดเลือกพันธุ์ (selection) มักได้รับอิทธิพลจากปัจจัยต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นสภาพแวดล้อมภายนอกที่ไม่ได้เกิดจากการควบคุม การคัดเลือกเส้นใยแบบสุ่ม เป็นต้น จึงเป็นผลทำให้ผลผลิตและค่าประสิทธิภาพของการสร้างผลผลิต biological efficiency (B.E.) ของสายพันธุ์พ่อแม่ (AL และ BL) น้อยกว่าสายพันธุ์ลูกผสม (C10) ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีไฮบริไดเซชัน ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์เห็ดด้วยวิธีการผสมพันธุ์นี้จึงสามารถช่วยให้ผลผลิตจากสายพันธุ์เห็ดนางรมทองมีลักษณะของดอกเห็ดที่มีคุณภาพรูปร่างของดอกและประสิทธิภาพของสายพันธุ์เห็ดที่สูงขึ้นได้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกสปอร์เดี่ยวจากทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า สามารถแยกสปอร์เดี่ยวจากสายพันธุ์ AL ได้ 5 ไอโซเลต ส่วนสายพันธุ์ BL 15 ไอโซเลต เมื่อนำมาทำการผสมพันธุ์แบบ mono-mono crossing โดยผสมแบบพบกันหมดทุกคู่ สามารถเกิดลูกผสมที่สามารถสร้างโครงสร้าง clamp connection ได้จำนวน 18 สายพันธุ์ คิดเป็นความถี่ของการเข้าคู่ผสม 24%

การทดสอบความสามารถการเจริญของเส้นใย พบว่าสายพันธุ์ C10 ให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารเลี้ยงชนิด PDA และ ในวัสดุเพาะขี้เลื่อย สูงถึง 17.27 ± 0.23 มิลลิเมตร/วัน และ 7.11 ± 0.25 มิลลิเมตร/วัน ตามลำดับ ซึ่งเจริญเร็วมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (AL และ BL) ถึง 2 เท่า

การทดสอบความสามารถคุณภาพของผลผลิต พบว่า สายพันธุ์ C10 สามารถให้ผลผลิตสูงถึง 64.45 ± 4.95 กรัม โดยเมื่อคำนวณประสิทธิภาพของการสร้างดอกเห็ดด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ biological efficiency (B.E.) พบว่าสูงถึง 16.52% แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ C10 สามารถให้ผลผลิตเชิงปริมาณที่สูงกว่าสายพันธุ์เดิม นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ C10 สามารถให้ขนาดดอกเห็ดทั้งความกว้าง, ความยาวของดอก และก้านดอกที่สูงถึง 46.91± 5.81 มิลลิเมตร 41.80 ± 6.14 มิลลิเมตรและ 41.33 ± 4.95 มิลลิเมตรตามลำดับ ดังนั้นจากงานวิจัยในครั้งนี้ลูกผสมสายพันธุ์ C10 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยเทคนิคไฮบริไดเซชันนี้สามารถให้สายพันธุ์เห็ดนางรมทองที่มีลักษณะของพันธุ์ที่ดีขึ้นได้

เอกสารอ้างอิง

จรชรัส มั่นถาวร. 2544. การสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอมและเห็ดนางรมโดยการรวมโพรโตพลาสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สถานบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชาญกิจ วงศ์เผ่าสกุล. 2555. การคัดเลือกเห็ดสกุล *Pleurotus sp.* ด้วยวิธี mono-mono crossing. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

บรรณ บูรณะชนบท. 2547. คู่มือเพาะเห็ด. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : เพ็ท-แพล้น พับลิชชิ่ง.

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์และกิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2537. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. สถานบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

ประยกุต์ ศรีวิไลและคณะ. 2012. พฤติกรรมการเคลื่อนย้ายนิวเคลียสของ *Coprinopsis cinerea* ในระหว่าง การผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนและความสัมพันธุ์ ระหว่างจำนวน แคลมป์เซลล์ต่อการเกิดดอกเห็ด. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ภัทระ ฉลาดแพทย์และวชิระ จึง. 2555. มหัศจรรย์เห็ด อาหารอายุวัฒนะและเป็นยาที่ทางการแพทย์ยอมรับ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : แฮปปี้บุ๊ค พับลิชชิ่ง.

ภัทราภรณ์ อิสระทะและวิเชียร ภู่สว่าง. 2540. การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมสีเทาโดยการผสมพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย. 2559. เพาะเห็ด กินได้ทำขายรวย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: เนชั่นบุ๊ค.

สุทธิชัย ปทุมล่องทอง. 2545. เห็ดพืชเศรษฐกิจยั่งยืน. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี: ธารบัวแก้ว.

สุมาลี พิชญางกูร. 2541. เห็ดโคลนและลูกผสมฟิวแสนท์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : สามเจริญพาณิชย์.

สุวรรณี จันทร์ตา. 2540. การคัดเลือกโมโนคาริออนของเห็ดนางรมเพื่อการผสมพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วันทนา นาคีสินธ์. 2556. การใช้กากกาแฟสดทดแทนขี้เลื่อยในการเพาะเห็ดนางรมฮังการี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2541. เห็ดเมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพมหานคร : ไทยวัฒนาพานิช.

อภิรัชต์ สมฤทธิ์, อัจฉรา พยัพพานนท์, ธารทิพย ภาสบุตร, อภิญญา สุราวุธ และ บุณโชค ไทยทัตกุล. 2545.เห็ดไทย 2544. จ่านวนพิมพ์ 500 เล่ม, กรุงเทพมหานคร: สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย.

Allard, R. W. 1961. Principles of plant breeding. Soil Science 91(6): 414.

Baral, D., Roy, A., and Thapa, S. 2018. Strain improvement in oyster mushroom (*Pleurotus* sp.) through hybridization. The Pharma Innovation Journal 7(4): 286-289.

Barh, A., Sharma, V. P., Annepu, S. K., Kamal, S., Sharma, S., and Bhatt, P. 2019. Genetic improvement in *Pleurotus* (oyster mushroom). a review.*3 Biotech* 9(9): 322.

Bahukhandi, D., and Sharma, R. K. 2012. Interspecific hybridization in Pleurotus species. Indian Phytopathology.

Bellettini, M. B., Fiorda, F. A., Maieves, H. A., Teixeira, G. L., Ávila, S., Hornung, P. S., and Ribani, R. H. (2019). Factors affecting mushroom Pleurotus spp. Saudi Journal of Biological Sciences 26(4): 633-646.

Kumara, K. W., and Edirimanna, I. C. S. 2009. Improvement of strains of two oyster Mushroom cultivars using duel culture technique. World Applied Sciences Journal 7(5): 654-660.

Larraya, L., Peñas, M. M., Pérez, G., Santos, C., Ritter, E., Pisabarro, A. G., and Ramírez, L. 1999. Identification of incompatibility alleles and characterisation of molecular markers genetically linked to the A incompatibility locus in the white rot fungus Pleurotus ostreatus. Current genetics 34(6): 486-493.

Lee, Y. L., Huang, G. W., Liang, Z. C., and Mau, J. L. 2007. Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. LWT-Food Science and Technology 40(5): 823-833.

Li, Q., W. Huang, C. Xiong, and J. Zhao. 2018. Transcriptome Analysis Reveals the Role of Nitric Oxide in *Pleurotus Eryngii* Responses to Cd^{2p}stress. Chemosphere 201: 294-302

Mayo, O. 1980. The theory of plant breeding. Oxford University, Oxford, 293.

Oh, M. J., Lim, J. H., Oh, Y. L., Shin, P. G., Jang, K. Y., Kong, W. S., and Yoo, Y. B. 2017. Characteristics and breeding of a cultivar *Pleurotus citrinopileatus*' Jangdari'. Journal of Mushroom 15(2): 73-77.

Rosnina, A. G., Tan, Y. S., Abdullah, N., and Vikineswary, S. 2016. Morphological and molecular characterization of yellow oyster mushroom, *Pleurotus citrinopileatus*, hybrids obtained by interspecies mating. World Journal of Microbiology and Biotechnology 32(2): 18.

Stamets, P. 2000. Growth parameters for gourmet and medicinal mushroom species, growing gourmet and medicinal mushrooms.

Xu, J. 1995. Analysis of inbreeding depression in Agaricus bisporus. Genetics 141(1): 137-145.

Zadrazil, F. 1978 Cultivation of Pleurotus. In The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms, 521-577.

Zawirska-Wojtasiak, R., Siwulski, M., Mildner-Szkudlarz, S., and Wasowicz, E. 2009. Studies on the aroma of different species and strains of Pleurotus measured by GC/MS sensory analysis and electronic nose. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria 8(1): 47-61

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ประกอบด้วย

มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
น้ำตาลเด็กซ์โตรส (Dextrose)	20	กรัม
วุ้น (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

*นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ใช้เวลานาน 15 นาที

2. อาหารในวัสดุเพาะต่อถุงขี้เลื่อย ประกอบด้วย

ขี้เลื้อย	800	กรัม (คิดเป็น 78%)
รำละเอียด	40	กรัม (คิดเป็น 16%)
ปูนขาว	8	กรัม (คิดเป็น 2%)
ยิปซัม	4	กรัม (คิดเป็น 0.5%)
ดีเกลือ	1.6	กรัม (คิดเป็น 0.3%)

ส่วนผสมของวัสดุที่ใช้ประกอบเป็นก้อนเชื้อมีในสูตรมาตรฐานที่ระบุไว้ในตาราง ดังนี้

ส่วนประกอบ	**ปริมาณ**
ขี้เลื้อย	100 กิโลกรัม
รำละเอียด	5 กิโลกรัม
ปูนขาว	1 กิโลกรัม
ยิปซัม	0.5 กิโลกรัม
ดีเกลือ	0.2 กิโลกรัม
น้ำ	60 เปอร์เซ็นต์

*นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วนาน 3 ชั่วโมง

ภาคผนวก ข

วิเคราะห์ผลของข้อมูล

ตารางภาคผนวกที่1 แสดงผลการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหารชนิด PDA เป็นเวลา 7 วัน

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร/วัน)*
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
AL	13.20	13.80	13.00	13.33 ± 0.42^{c}
BL	16.00	15.00	16.00	15.67 ± 0.58^{b}
C1	14.60	14.60	14.60	14.60 ± 0.00^{b}
C2	4.70	6.00	6.20	5.63 ± 0.81^{j}
C3	10.20	9.40	10.20	9.93 ± 0.46^{fg}
C4	7.50	8.00	7.00	7.50 ± 0.50^{hi}
C5	8.00	10.00	10.50	9.50 ± 1.32^{g}
C6	10.00	10.00	10.00	10.00 ± 0.00^{fg}
C7	11.00	10.80	10.80	10.87 ± 0.12^{ef}
C8	3.00	2.50	3.00	2.83 ± 0.29^{k}
C9	12.00	11.00	11.00	11.33 ± 0.58^{e}
C10	17.00	17.40	17.40	17.27 ± 0.23^{a}
C11	6.60	6.60	8.00	7.07 ± 0.81^{hi}
C12	11.00	13.80	11.00	11.93 ± 1.62^{de}
C13	8.00	8.00	6.60	7.53 ± 0.81^{hi}
C14	8.00	8.00	8.00	8.00 ± 0.00^{h}
C15	13.00	13.00	13.00	13.00 ± 0.00^{cd}
C16	7.00	6.00	6.20	6.40 ± 0.53^{ij}
C17	13.00	13.00	13.00	13.00 ± 0.00^{cd}
C18	9.00	10.00	10.00	9.67 ± 0.58^{g}

***** อักษรทางขวาแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range tests

<u>ตารางภาคผนวกที่2</u> แสดงผลการวัดอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยในวัสดุเพาะขี้เลื่อยเป็นเวลา 20 วัน

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใย เป็นเวลา 20 วัน (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นใย (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
AL	5.47	6.07	5.80	5.78 ± 0.30[a]
BL	6.27	6.33	5.73	6.11 ± 0.33[b]
C10	7.40	7.00	6.93	7.11 ± 0.25[c]

* อักษรทางขวาแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range tests

<u>ตารางภาคผนวกที่3</u> แสดงผลการวัดค่าเฉลี่ยน้ำหนักดอกเห็ดนางรมทองของแต่ละสายพันธุ์

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก (กรัม)			ค่าเฉลี่ยน้ำหนักรวมของดอกเห็ด (กรัม)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
AL	16.77	40.46	37.91	31.71 ± 13.29[a]
BL	22.23	54.03	36.31	37.52 ± 15.94[a]
C10	56.61	64.98	71.76	64.45 ± 7.59[b]

***** อักษรทางขวาแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range tests

ตารางภาคผนวกที่4 แสดงผลการวัดขนาดความกว้างเฉลี่ยของดอกเห็ดนางรมทองของแต่ละสายพันธุ์

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ยความกว้าง (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ยความกว้าง (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
AL	43.00	41.00	45.00	41.24 ± 5.25[a]
	37.60	42.00	39.40	
	36.60	51.00	44.00	
	48.00	41.00	35.00	
	45.00	30.00	40.00	
BL	26.40	37.00	50.00	42.36 ±7.33[ab]
	51.00	46.00	49.00	
	38.00	44.00	46.00	
	45.00	55.00	45.00	
	54.00	43.00	45.00	
C10	38.00	47.00	50.00	46.91 ± 5.81[b]
	52.60	46.00	44.00	
	45.00	45.00	41.00	
	56.00	44.00	48.00	
	60.00	41.00	46.00	

*อักษรทางขวาแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range tests

ตารางภาคผนวกที่5 แสดงผลเปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ย biological efficiency (B.E.) ของแต่ละสายพันธุ์(รอบ1)

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ย biological efficiency (B.E.) (%)			ค่าเฉลี่ย B.E. (%)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
AL	8.91	10.37	9.72	9.67 ± 0.73[a]
BL	9.72	13.85	9.31	10.96 ± 2.51[a]
C10	14.52	16.66	18.40	16.52 ± 1.94[b]

*อักษรทางขวาแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range test

<u>ตารางภาคผนวกที่8</u> แสดงผลเปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ย biological efficiency (B.E.) ของแต่ละสายพันธุ์ (รอบ2)

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ย biological efficiency (B.E.) (%)			ค่าเฉลี่ย B.E. (%)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
AL	10.46	8.10	10.43	9.66 ± 1.35[a]
BL	12.37	11.02	8.01	10.47 ± 2.23[a]
C10	16.49	15.93	15.20	15.87 ± 0.64[b]

*****อักษรทางขวาแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range tests

<u>ตารางภาคผนวกที่6</u> แสดงผลการวัดขนาดความยาวของดอกเห็ดนางรมทองของแต่ละสายพันธุ์

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ยความยาว (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ยความยาว (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
AL	38.4	40.0	36.0	38.45 ± 3.92[a]
	33.0	37.0	42.0	
	33.4	45.0	40.0	
	42.0	39.0	32.0	
	42.0	42.0	35.0	
BL	25.4	35.0	45.0	39.00 ± 6.20[a]
	29.0	44.0	37.0	
	35.0	38.0	45.0	
	43.0	46.0	42.0	
	45.0	36.0	39.6	
C10	35.0	40.0	45.0	41.80 ± 6.14[a]
	46.0	40.0	36.0	
	41.0	39.0	40.0	
	50.0	35.0	45.0	
	57.0	35.0	43.0	

*อักษรทางขวาแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range tests

<u>ตารางภาคผนวกที่7</u> แสดงผลการวัดขนาดความยาวของก้านดอกเห็ดนางรมทองของแต่ละสายพันธุ์

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ยความยาว (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ยความยาว (มิลลิเมตร)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
AL	24.00	41.00	44.00	35.53 ± 7.53[a]
	26.00	40.00	24.00	
	28.00	48.00	32.00	
	33.00	37.00	38.00	
	43.00	40.00	35.00	
BL	30.00	45.00	46.00	36.40 ± 8.58[ab]
	22.00	34.00	42.00	
	37.00	42.00	42.00	
	31.00	42.00	42.00	
	16.00	36.00	39.00	
C10	35.00	42.00	49.00	41.33 ± 4.95[b]
	39.00	39.00	42.00	
	39.00	41.00	42.00	
	49.00	34.00	49.00	
	40.00	35.00	45.00	

*อักษรทางขวาแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range tests