

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมโดยการผสมพันธุ์ระหว่าง
เส้นใยนิวเคลียสคู่กับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว

Improvement of Shiitake Mushroom

by Dikaryon - Monokaryon Crossing

ศิริพร เดชะอุป^{1/} และ วิเชียร ภู่อ่าง^{1/}

Siriporn Dechaoup^{1/} and Wichian Pooswang^{1/}

Abstract : Improvement of Shiitake mushroom [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] by dikaryon crossing was studied. Suitable growth stages of fruiting bodies for making spore print were those fully matured opened mushroom. Cultivars used as dikaryotic mycelium were L1 rainy season cultivar; and L2 winter season cultivar. Monokaryotic mycelium used were those grown from spores of both cultivars. A total of 104 combinations of dikaryon crossing were made and only 28 hybrids were obtained. Four of them were not able to produce fruiting bodies on the agar in the test tube, but all of them were able to do in the sawdust cultured bags. There was one dikaryon hybrid (H18), from a smooth and very fast growing monokaryotic L2 mycelium crossed with dikaryotic L1 mycelium, gave 14.57% higher yield after dressing than L2 but not statistically different. Almost all the high yield dikaryon hybrid had 4, 5 and 7 bands of isozyme esterase.

^{1/}ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/}Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200. Thailand.

บทคัดย่อ : ได้มีการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมโดยวิธีการผสมข้ามแบบไดมอน ระยะการเติบโตของดอกเห็ดหอมที่เหมาะสมสำหรับเก็บสปอร์ คือ ดอกที่เติบโตและบานเต็มที่แล้ว พันธุ์ที่ใช้เป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ คือ L1 ซึ่งเป็นพันธุ์ฤดูฝน และ L2 ซึ่งเป็นพันธุ์ฤดูหนาว ส่วนพวกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ใช้นั้น เพาะจากสปอร์สายพันธุ์ทั้งสอง ได้มีการผสมพันธุ์แบบไดมอนทั้งหมด 104 คู่ผสม ได้ลูกผสม 28 ตัว มีลูกผสมเพียงสี่ตัวที่ไม่สามารถ เกิดดอกเห็ดบนอาหารวันในหลอดทดลองได้ แต่ทั้งหมดสามารถเกิดดอกเห็ดได้ในถุงเพาะเชื้อ มีลูกผสมไดมอนตัวหนึ่ง (H18) ซึ่งเป็นเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่เจริญเร็วมากและเส้นใยเดินเรียบที่ได้จาก L2 ผสมข้ามกับเส้นใยนิวเคลียสคู่ของ L1 ทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าผลผลิตของ L2 หลังการตัดแต่งแล้ว 14.57% แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ลูกผสมไดมอนที่ให้ผลผลิตสูงเกือบทั้งหมดจะมีแถบของไอโซไซม์เอสเทอเรส 4, 5, และ 7 แถบ

Index words : เห็ดหอม การผสมพันธุ์ การผสมพันธุ์แบบไดมอน ไอโซไซม์เอสเทอเรส

Lentinula edodes, Shiitake mushroom, Breeding, Dimon crossing, Isozyme esterase

คำนำ

เห็ดหอม หรือ shiitake mushroom เป็นเห็ดที่นิยมนิยมนับทั่วโลกกันมากจึงเป็นเห็ดที่มีราคาแพง ชนิดหนึ่ง (วสันต์, 2536) ดังนั้นจึงเป็นเห็ดที่นิยม เพาะกันมากเป็นอันดับสองของเห็ดที่เพาะในโลก นิยมเพาะกันมากในแถบเอเชียตะวันออก เช่น ญี่ปุ่น และจีนมาเป็นเวลานาน (Bahl, 1994; Kawai *et al.*, 1995) ปัจจุบันเห็ดหอมได้รับความสนใจไปทั่วโลกทำให้เทคโนโลยีด้านการเพาะได้มีการปรับปรุงขึ้นอย่างรวดเร็ว (Kawai *et al.*, 1995) ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการสั่งเห็ดหอมเข้ามาบริโภคเห็ดที่สั่งเข้ามาบริโภคมีราคาแพงจากสาเหตุดังกล่าวจึงได้มีความพยายามที่จะเพาะเห็ดหอมในประเทศไทย ผลการทดลองพบว่าสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยสามารถเพาะเห็ดหอมได้ โดยเฉพาะแถบภาคเหนือของประเทศไทย (ปัญญา, 2537) สายพันธุ์เห็ดหอมที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย นำเข้ามาจากต่างประเทศและเป็นสายพันธุ์ที่ทนร้อน เนื้อบางและผิวไม่แตกอย่าง สายพันธุ์เขตหนาว ซึ่งออกดอกได้ใน

ฤดูหนาว หรือในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิ 12-22 องศาเซลเซียส (ราชบัณฑิตยสถาน, 2539) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทดลองโดยโครงการหลวงสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และกรมวิชาการ เกษตรพบว่าสายพันธุ์เห็ดหอมที่ปรับตัวได้ในประเทศไทย ยังจำกัดอยู่ในพื้นที่สูงและมีอากาศเย็น (ธวัชชัย, 2542)

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมซึ่งใช้วิธีการผสมพันธุ์แบบเส้นใยนิวเคลียสคู่ผสมกับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (di-mon crossing; dikaryon-monokaryon crossing) อาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ เห็ดหอมสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถเพาะได้ในสภาพพื้นที่และสภาพภูมิอากาศต่างๆ ได้ดี

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อสร้างเห็ดหอมสายพันธุ์ใหม่

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษา

ทราบแนวทางการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดหอม โดยการผสมพันธุ์ระหว่างเส้นใยนิวเคลียสคู่กับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (dikaryon-monokaryon crossing)

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2

อุปกรณ์ เห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2, อุปกรณ์ที่ใช้ในการเขี่ยเชื้อ, อาหารวุ้น พิเดโอ, อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสปอร์และแยกสปอร์เดี่ยว, อุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบข้อยึดระหว่างเซลล์, วัสดุที่ใช้ในการเพาะเห็ดลงถุงซีลื้อย

วิธีการ เพาะเห็ดหอมทั้งสองสายพันธุ์ลงถุงเพาะ (ถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 6 x12 นิ้ว) สายพันธุ์ละ 30 ถุง จากนั้นปล่อยให้เจริญเติบโตจนเต็มถุง แล้วทิ้งไว้จนเส้นใยเริ่มรัดตัวเกิดเป็นสีน้ำตาล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 เดือนจึงเปิดถุง แล้วกระตุ้นให้เกิดดอกโดยการใช้น้ำเย็นรดวันละ 3 เวลา (เช้า กลางวัน เย็น) รักษาสภาพความชื้นในโรงเรือนให้ชุ่มชื้นตลอดเวลาภายในระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ เห็ดจะเริ่มออกดอกจากนั้นอีกประมาณ 2 วัน จึงทำการเก็บเกี่ยวดอกเห็ดของทั้งสองสายพันธุ์มาคัดสปอร์ ส่วนการศึกษาระยะของดอกเห็ดที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการคัดสปอร์ โดยการเก็บดอกเห็ดทั้งหมด 3 ระยะ ดังภาพที่ 5 มาศึกษาเวลาที่เริ่มการปลดปล่อยสปอร์ และเวลาที่ใช้ในการงอกของสปอร์ จากนั้นตรวจสอบเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดหอมทั้งสองสายพันธุ์ โดยการแยกเส้นใยที่ออกจากสปอร์สายพันธุ์ละ 100 สปอร์ นำมาเลี้ยง

ประมาณ 7 วัน จึงนำมาตรวจสอบเพื่อหาเส้นใยที่ไม่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ของแต่ละสายพันธุ์ แล้วนำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ได้นำไปเลี้ยงในอาหารวุ้นใหม่ บันทึกลักษณะดอกของเห็ดหอมที่ใช้ในการคัดสปอร์ ระยะเวลาที่ใช้ในการเริ่มปลดปล่อยสปอร์และเวลาในการงอกของสปอร์ ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะก่อนที่จะพบการงอกของสปอร์ จำนวนเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวจากการตรวจที่ไม่พบข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection)

การทดลองที่ 2 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารวุ้น

อุปกรณ์ เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดหอม L1 และ L2, ขวดแบนขนาดบรรจุ 375 มิลลิลิตร, วัสดุสำหรับเตรียมอาหารพิเดโอ, หม้อนึ่งความดัน, กระบอกตวง, จุกสำลี, กระดาษ

วิธีการ เตรียมอาหารพิเดโอตามสูตรใส่อาหารพิเดโอลงในขวดแบนขวดละ 40 มิลลิลิตรนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ นาน 45 นาที หลังจากนั้นนำไปเอียงเพื่อเพิ่มพื้นที่ของผิววุ้นเมื่อวุ้นเย็นและแข็งตัวแล้ว จึงนำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงตรงจุดกึ่งกลางของเส้นที่ขีดเป็นแนวกากบาท (ทั้งแนวตั้งและแนวนอน) เลี้ยงเส้นใยเป็นระยะเวลา 2 วัน ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางทั้งแนวตั้งและแนวนอนแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นรอจนเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวทั่วขวดหนึ่งชนขอบวุ้นก่อน (วันที่ 9) จึงเริ่มวัดเส้นผ่าศูนย์กลางทั้งแนวตั้งและแนวนอนอีกครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย นำค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของวันที่ 9 ลบด้วยค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของวันที่ 2 ซึ่งเป็นระยะเวลา 7 วัน ค่าที่ได้จึงเป็นการเติบโตของเส้นใยใน 7 วัน ในหน่วยเซนติเมตร นำมาคิดเป็นอัตราการเติบโตต่อวันโดยหารด้วย 7 เมื่อได้ค่าอัตราการเติบโตของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว

แล้วจึงแบ่งเส้นใยออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มเจริญเติบโตช้ามาก, ช้า, เร็ว และเร็วมาก โดยแบ่งกลุ่มตามค่าเฉลี่ยและ 1 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยบันทึกการเติบโตของเส้นใย แบ่งกลุ่มตามอัตราการเติบโตของเส้นใยและลักษณะของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว

การทดลองที่ 3 ผสมพันธุ์แบบไดมอน (di-mon crossing) ระหว่างเห็ดหอม สายพันธุ์ L1 และ L2 และศึกษาอัตราการเติบโตของลูกผสม

อุปกรณ์ เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดหอม L1 และ L2 ที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาผสมกับเห็ดหอม L1 และ L2 ,หลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร, วัสดุสำหรับเตรียมอาหารฟิตีเอ, จุกสำลี, อุปกรณ์สำหรับตรวจข้อยี่ด ระหว่างเซลล์

วิธีการ เตรียมอาหารฟิตีเอใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกสำลี นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว นาน 45 นาที หลังจากนั้นนำหลอดมาเอียงเพื่อเพิ่มพื้นผิววัน ผนังเย็นและแข็งตัว แล้วให้นำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวกับเส้นใยนิวเคลียสคู่มาเลี้ยงด้วยกัน โดยวางไว้คนละตำแหน่งห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วปล่อยให้เส้นใยเดินชนกัน เพื่อให้เกิดการรวมตัวหรือผสมกันโดยมีจำนวนคู่ผสมทั้งหมด 104 คู่ผสม ตรวจสอบการผสมเข้ากันได้ โดยวิธีการตรวจข้อยี่ดระหว่างเซลล์เมื่อได้ลูกผสมตัวใหม่ ซึ่งมีข้อยี่ดระหว่างเซลล์ ให้ตัดไปเลี้ยงในหลอดวันหลอดใหม่ นำลูกผสมที่ได้ไปวัดการเติบโตของเส้นใยของลูกผสมซึ่งทำเช่นเดียวกับการวัดการเติบโตของเส้นใย นิวเคลียสเดี่ยวแต่เนื่องจากเส้นใยนิวเคลียสคู่เจริญเติบโตได้เร็วกว่า จึงใช้เวลาเพียง 7 วันก็เดินชนขอบวัน จากนั้นก็ความสามารถในการผสมเข้ากันได้โดยดูจากการปรากฏข้อยี่ดระหว่างเซลล์, ลักษณะการชนกันของเส้นใยคู่ผสมต่างๆ และวัดการเติบโตของลูกผสมเฉพาะที่มีข้อยี่ดระหว่างเซลล์

การทดลองที่ 4 ความสามารถในการเกิดปุ่มดอกของลูกผสม เปรียบเทียบกับเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2 ในสภาพอาหารวัน

อุปกรณ์ เห็ดหอมลูกผสมที่ได้จากการทดลองที่ 3 จำนวน 28 ตัว และเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2, อาหารวันเอียงปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 18 มิลลิเมตร ที่นึ่งในหม้อนึ่งความดันเรียบร้อยแล้ว, จุกสำลี

วิธีการ เลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมลูกผสมและเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2 ในหลอดทดลองที่มีอาหารฟิตีเอดังกล่าว ดูความสามารถในการเกิดปุ่มดอก ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปุ่มดอกและจำนวนปุ่มดอกที่ปรากฏ

การทดลองที่ 5 ลักษณะของแถบไอโซไซม์เอสเทอเรส (esterase isozyme)

อุปกรณ์ เส้นใยเห็ดหอมลูกผสมและสายพันธุ์พ่อแม่ (L1 และ L2), โกร่งสำหรับบดตัวอย่างพืช, เครื่องเหวี่ยง (centrifuge), ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส, เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter), eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, ชุดทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ slab gel, เครื่องจ่ายกระแสไฟ, ถังมือ, เครื่องแก้วต่างๆ, กระดาษกรอง, extraction buffer, ส่วนประกอบของเจล, electrode buffer, สีย้อมแอนไซม์, marker

วิธีการ นำเส้นใยเลี้ยงในอาหารเหลวที่บรรจุในขวดไซดาขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 150 มิลลิลิตร ในสภาพปลอดเชื้อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วันจึงนำเส้นใยมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วเก็บไว้ในถุงพลาสติก แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการสกัดแอนไซม์ต่อไป จากนั้นเตรียมสารเคมีแล้วนำเส้นใยเห็ดลูกผสมแต่ละตัวที่แช่แข็งมาบดให้

ละเอียดในโรงแท้งที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยก่อนทำการบดเส้นใยให้นำโรงแท้งที่จะบดไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อน ในการบดให้เติม 0.1 M Tris-buffer pH 8.2 โดยใช้ในสัดส่วน จำนวน 5 มิลลิตรต่อน้ำหนักของเส้นใย 3 กรัม แล้วทำการบดเพื่อให้เส้นใยและสารละลายเข้ากัน จากนั้นนำเส้นใยที่บดได้ร่วมกับสารดังกล่าวใส่ใน eppendorf tube เพื่อไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที (10,248.48 g) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นำสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ใส่ใน eppendorf tube ซึ่งมี glycerine 0.1 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำเก็บเข้าตู้แช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส ได้ไปแยกบนเจล โดยต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสทั้งหมดให้ครบเต็ม running buffer ลงใน chamber แล้วจึงใส่สารตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในช่องของ stacking gel โดยใช้เข็มสำหรับ Loading (50 ml) ค่อยๆหยดตัวอย่างให้ผ่านบัฟเฟอร์ลงในช่องเจลหยด bromophenol blue ประมาณ 20 ml ต่อช่องเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายต่อชั่วโมงเข้ากับ chamber ล่างและขั้วลบเข้ากับ chamber บน เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสคงที่ 22-26 mA 250 โวลต์ เปิดเครื่องควบคุม electrode buffer ที่ 4 องศาเซลเซียส ปลอ่ยให้ชุดอุปกรณ์อิเล็กโตรโฟรีซิส ดำเนินต่อไป ประมาณ 4-6 ชั่วโมง จนเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนลงส่วนล่างของเจลจึงหยุดการทำงานแล้วนำเจลที่ได้ออกจากแผ่นแก้วที่ประกบเพื่อนำมาทำการย้อมสีของแอนไซม์เอสเทอร์ส บันทึกลักษณะแถบไอโซไซม์เอสเทอร์ส และ ค่า R_f

การทดลองที่ 6 ทดสอบความสามารถในการเกิดดอกของเห็ดลูกผสม ที่ผ่านการเลี้ยงเส้นใยในถุงเพาะในระยะเวลาที่ต่างกัน 3 ระยะเวลา ศึกษาลักษณะดอกและผลผลิตในถุงเพาะเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ (L1 และ L2)

อุปกรณ์ เห็ดลูกผสมจำนวน 28 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ L1 และ L2 (พ่อแม่) , เครื่องชั่งละเอียด, ไม้บรรทัด, วัสดุอุปกรณ์ สำหรับการเพาะเห็ดหอมในถุงขี้เลื่อย, มีด

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสูตรแฟกทอเรียล (Factorial in CRD) มี 4 ปัจจัยที่ 1 คือสายพันธุ์เห็ดหอม ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเส้นใย ซึ่งมี 3 ระดับ คือ 60 , 100 และ 140 วัน นำเห็ดหอมเพาะลงในถุงพลาสติกโดยใช้สูตรอาหารมาตรฐานสำหรับการเพาะเห็ดหอมของภาควิชาพืชสวน โดยจะเตรียมการเพาะของ 140 วันก่อน ต่อจากนั้นอีก 40 วัน จึงเพาะของ 100 วัน และอีก 40 วัน หลังจากนั้นเพาะของ 60 วัน เมื่อครบเวลาการบ่มเส้นใย 140 , 100 และ 60 วัน จึงเริ่มทำการเปิดดอกเห็ดหอม โดยจะทำการวางก้อนของทุกสายพันธุ์บนพื้นในโรงเรือน ซึ่งมีการให้ความชื้นโดยการรดน้ำวันละ 3 เวลา คือ ตอนเช้า กลางวัน และเย็น บันทึกความสามารถในการเกิดดอก ผลผลิต น้ำหนักสดก่อนและหลังการตัดแต่ง (กรัม) และลักษณะ และคุณภาพดอก (สี ขนาด ความยาวก้านดอกและรูปร่างดอก)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากผลการทดลองที่ 1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2 พบว่าเห็ดหอมที่อยู่ในระยะที่ 1 คือระยะที่ดอกตูมและเชื้อหุ้มที่ได้ดอกยังปิดครีบอกอย่างสนิทนั้น ไม่สามารถปลดปล่อยสปอร์ได้ในขณะที่เห็ดหอมระยะที่ 2 ซึ่งเป็นระยะเชื้อหุ้มได้ดอกเริ่มเปิดให้เห็นครีบอกบ้าง กับระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อหุ้มได้ดอกเปิดกว้างมากนั้นมีความสามารถปลดปล่อยสปอร์จากดอกได้ โดยระยะที่ 3 จะใช้เวลา นับตั้งแต่เริ่มเตรียมการจนกระทั่งเริ่มปลดปล่อย

สปอร์เพียง 5 ชั่วโมงซึ่งน้อยกว่า ระยะ ที่ 2 ที่ใช้
เวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำสปอร์ที่ได้มา ทดสอบ
ความสามารถในการงอก พบว่าทั้งระยะที่ 2 และ
ระยะที่ 3 สปอร์ของเห็ดหอมสามารถงอกได้ โดยใช้
เวลา 5 วันเท่ากัน จากการศึกษาของ Tokimoto and
Komatsu (1978) พบว่าในการปลดปล่อยสปอร์
จะเกิดขึ้นที่บริเวณเนื้อเยื่อไฮยาโลพลาสซึม
(hyaloplasmic) ซึ่งจะอยู่ที่ขั้วของ สปอร์และปลาย
ของsterigmaเมื่อไฮยาโลพลาสซึมแบ่งตัวจะทำให้
เกิดการปล่อยสปอร์ ดังนั้นจึง ทำให้การปลดปล่อย
สปอร์ของเห็ดในระยะการเจริญเติบโตที่ต่างกันจึง
ใช้เวลาแตกต่างกัน เพราะระยะเวลาที่ใช้ในการ
แบ่งตัวของเนื้อเยื่อดังกล่าวอาจใช้เวลาไม่เท่ากัน
ส่วนการที่ระยะการเติบโต ของดอกเห็ดหอมระยะ
ที่ 1 ไม่มีการปล่อยสปอร์ก็อาจมีสาเหตุมาจากการที่
เนื้อเยื่อไฮยาโรพลาสซึมไม่มีการแบ่งตัว ดังนั้น
จากการทดลองนี้จึงทำให้สามารถเลือกระยะการ
เจริญเติบโตของดอกเห็ดหอมที่เหมาะสมเพื่อนำมา
ใช้ในการคัดสปอร์ โดยพบว่าระยะที่ 2 กับระยะที่ 3
เป็นระยะที่สามารถนำมาใช้ในการคัด สปอร์ได้

จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ
เส้นใย นิวเคลียสเดี่ยวของเห็ดหอมทั้งสายสองพันธุ์
คือ L1 และ L2 ในอาหารวุ้น พบว่าเส้นใยนิวเคลียส
เดี่ยวมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ซึ่งแบ่งออก
ได้ 4 กลุ่มคือ กลุ่มการเจริญเร็วมาก กลุ่มการเจริญเร็ว
กลุ่มการเจริญช้า และกลุ่มการเจริญช้ามาก เส้นใย
นิวเคลียสเดี่ยวส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มการเจริญเร็ว
จากการนำเส้นใยนิวเคลียส เดี่ยวทั้ง 4 กลุ่มมาผสม
พันธุ์แบบไดมอนกับเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2
จำนวน 104 คู่ผสม พบว่าได้เส้นใยลูกผสมตัวใหม่
(เส้นใยนิวเคลียสคู่) ที่ตรวจพบข้อยี้ระหว่างเซลล์
จำนวน 28 ตัว จำนวนลูกผสมที่ได้ส่วนใหญ่มาจากการ
ผสมพันธุ์ในกลุ่มที่ 3 (mono L2 x di L1) ซึ่งให้
จำนวนของ ลูกผสม 14 ตัว ซึ่งมีจำนวนลูกผสมมาก

กว่าการผสมพันธุ์ในกลุ่มที่ 4 (mono L2 x di L2)
กลุ่มที่ 1 (mono L1 x di L1) และ กลุ่มที่ 2 (mono L1
x di L2) ซึ่งมีจำนวนลูกผสม 8, 3 และ 3 ตัว ตามลำดับ
การให้ผลออกมาดังกล่าวอาจเป็นเพราะเห็ดหอมมี
ระบบการผสมพันธุ์แบบปัจจัยคู่ (bifactorial het-
erothallism หรือ tetrapolar mating system) (FAO,
1990 และ ฌฎฐยา, 2540) เป็นระบบที่การแสดงออก
ของเพศหรือระบบการเข้ากัน ไม่ได้ ถูกควบคุมด้วย
ปัจจัยทางพันธุกรรม 2 ปัจจัยคือ A และ B โดยทั้งสอง
ปัจจัยมีการกระจายแบบอิสระ ต่อกันซึ่งมีตำแหน่ง
บนแท่งโครโมโซมต่างกัน โดยแต่ละปัจจัยมีหลายคู่
ยีน (2 loci/multiple alleles) (Tokimoto and Komatsu,
1978; Peberdy *et al.* , 1993 and Miles , 1996)
การผสมพันธุ์จะประสบผลสำเร็จจนได้เส้นใย
นิวเคลียสคู่ นั้น เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวทั้งสองจะต้อง
พาเอาคู่ยีนที่ต่างกันมาจับคู่กัน หรือผสมข้ามจนเกิด
เส้นใย ที่มีข้อยี้ระหว่างเซลล์ที่สมบูรณ์ กลายเป็น
เส้นใย นิวเคลียสคู่ที่สามารถพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด
ได้ (ฌฎฐยา, 2540) ในระบบการผสมพันธุ์แบบ
ปัจจัยคู่ ทั้งปัจจัย A และ B จะควบคุมลักษณะที่แตก
ต่างกัน หรือมีผลต่อการผสมพันธุ์ โดยการผสมที่มี
ปัจจัย ต่างกันทำให้มีโอกาสได้ลูกผสมมากขึ้น ซึ่ง
จากการทดลองนี้พบว่า การผสมข้ามให้จำนวนลูก
ผสมมากกว่าการผสมตัวเอง

ความสัมพันธ์ระหว่างลูกผสมกับความ
สามารถในการเกิดปุ่มดอก นั้นพบว่า ลูกผสม H3,
H4, H21 และ H22 ซึ่งไม่สามารถเกิดปุ่มดอก ใน
หลอดทดลองได้ อย่างไรก็ตามกลับสามารถ
เกิดดอกในถุงเพาะได้ แต่ผลผลิตที่ได้อยู่ในระดับต่ำ
Tokimoto and Kawai (1975) กล่าวว่า การเกิด
ปุ่มดอกต้องการคาร์บอนและไนโตรเจน ในความ
เข้มข้นสูง แต่ถ้าไนโตรเจน สูงเกินไปจะยับยั้งการ
เกิดปุ่มดอก เช่น ถ้ากรด คาร์ซามิโนมีมากถึง 0.02 %

การเกิดปุ่มคอกต้องใช้ คาร์โบไฮเดรต ถ้ามีน้ำตาลมากถึง 8% ในรูปของแซคคาไรสการเกิดดอกจะยิ่งให้ผลมากขึ้น ซึ่งสาเหตุที่ทำให้สามารถเกิดดอกในหลอดไม่ได้ อาจเป็นเพราะสายพันธุ์ดังกล่าวได้รับปัจจัยสภาพแวดล้อมและอาหารไม่เพียงพอ

จากการตรวจสอบทางด้านพันธุกรรมโดยใช้ไอโซไซม์เอสเทอร์ส พบว่าลูกผสมที่ให้ผลผลิตดี จะมีลักษณะทางไอโซไซม์เอสเทอร์สที่ให้จำนวนแถบของไอโซไซม์เอสเทอร์สจำนวน 4, 5 และ 7 แถบ Royse and May (1993) กล่าวว่า การทดสอบลักษณะไอโซไซม์เอสเทอร์สของลูกผสมที่ได้เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่พบว่าลักษณะที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของลูกผสมจากเห็ดหอมสายพันธุ์พ่อแม่ ดังนั้นเทคนิคทางด้านอิเล็กโตรโฟลิซิส ซึ่งสามารถตรวจสอบความแตกต่างของไอโซไซม์ดังกล่าวได้จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมหรือความแตกต่างทางด้านสายพันธุ์ได้ แต่ข้อมูลจากไอโซไซม์เอสเทอร์สเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถบ่งชี้ความสามารถในการให้ผลผลิตได้ อาจต้องมีข้อมูลอื่นร่วมอีก

เมื่อนำลูกผสมที่ได้มาทดสอบผลผลิตพบว่ามี 6 คู่ผสมที่ให้ผลผลิตอยู่ในเกณฑ์ดี (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดหอมสายพันธุ์ L2 ซึ่ง 5 คู่ผสม มาจากการผสมข้าม (mono L2 x di L1) 1 คู่ผสมมาจากการผสมตัวเอง (monoL2 x di L1)

ของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว L2 โดยกลุ่มการเจริญของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่นำมาใช้ในการผสมพันธุ์คือกลุ่มเส้นใยเจริญเร็วมาก กลุ่มเส้นใยเจริญเร็ว และกลุ่มเส้นใยเจริญช้า ส่วนลักษณะการเดินเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ใช้ในการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตดีนั้น ใช้เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่มีลักษณะเดินเรียบและเดินฟู ดังนั้นในการผสมพันธุ์แบบใดมอนครั้งต่อไป ควรเลือกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่อยู่ในกลุ่มเส้นใยเจริญเร็วมาก กลุ่มเส้นใยเจริญเร็ว และกลุ่มเส้นใย เจริญช้า (ยกเว้นกลุ่มเส้นใยที่เจริญช้ามาก) ที่มีลักษณะการเดินเรียบและเดินฟู (ยกเว้นลักษณะ ของเส้นใยที่เดินเรียบและมีสีน้ำตาล) มาใช้ในการผสมพันธุ์แบบใดมอนจึงทำให้มีโอกาสได้ลูกผสมที่มีผลผลิตดีอย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลผลิตหลังการตัดแต่ง (ซึ่งเป็นน้ำหนักทางการค้า) พบว่าลูกผสม H18 (ได้จากการผสมข้ามระหว่าง monoL2 x diL1) ให้แนวโน้มผลผลิตหลังการตัดแต่งสูงกว่าลูกผสมตัวอื่น และเห็ดหอมสายพันธุ์ L2 แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อาจกล่าวได้ว่าการที่ลูกผสม H18 มีผลผลิตมากขึ้นซึ่งเกิดจากการผสมข้าม อาจเนื่องมาจากการได้รับยีนใหม่นั้นเอง

ส่วนลักษณะการเกิดสีของดอกลูกผสมเห็ดหอมที่ได้ จากการสังเกตพบว่าลูกผสมสามารถเกิดสีได้ทั้งน้ำตาลคล้ำและน้ำตาลอ่อน และการเกิดสีมีความแปรปรวนตลอดเวลา บางครั้งให้สีน้ำตาลอ่อน แต่ต่อมาเมื่อมีการให้น้ำหรือสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สีก็จะถูกกลับเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มได้

Table 1 Various characteristics of hybrids which gave higher yields than their parents.

Hybridization group	Hybrids (mono x di)	Name of hybrids	Pre-harvest weight (gram per bag)	Post-harvest weight (gram per bag)	The percentage of increasing the post-harvest yield of L2 strain	Number of isozyme bands
	Mono L2 x di L1 F4 x L1	H10	57.00	46.50	- 6.53	7
	Mono L2 x di L1 E1 x L1	H12	68.25	45.25	- 9.04	5
	Mono L2 x di L1 F3 x L1	H14	70.75	50.25	1.00	7
	Mono L2 x di L1 E4 x L1	H18	77.75	57.00	14.57	7
	Mono L2 x di L1 F5 x L1	H23	59.75	46.50	- 6.53	4
	Mono L2 x di L2 G7 x L2	H29	80.50	50.25	1.00	5
	L2	L2	67.50	49.75	-	7
LSD	-	-	NS	NS	-	-

ns = Non-significance at 95% confidential level

สรุปผลการทดลอง

1. ระยะการเจริญเติบโตของเห็ดหอมที่เหมาะสมสำหรับการนำมาดักสปอร์ คือ ระยะที่ 2 เป็นระยะที่เชื้อเห็ดได้ดอกเริ่มเปิดให้เห็นครีบดอกได้บ้าง หรือ ระยะที่ 3 ระยะที่เชื้อเห็ดได้ดอกเปิดกว้างมากทำให้เห็นครีบดอกได้ทั้งดอก
2. ในการผสมพันธุ์แบบไดมอน พบว่า กลุ่มการเจริญของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่นำมาใช้ในการผสมพันธุ์แล้วมีโอกาสทำให้ได้ลูกผสมที่มีผลผลิตสูง คือกลุ่มเส้นใยเจริญเร็วมาก กลุ่มเส้นใยเจริญเร็ว และกลุ่มเส้นใยเจริญช้าโดยลักษณะการเดินของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ใช้ในการผสมพันธุ์เป็นเส้นใยที่เดินเรียบ เดินฟู
3. ในการผสมพันธุ์แบบไดมอน พบว่า กลุ่มการผสมพันธุ์ที่ให้จำนวนลูกผสมมากที่สุดคือ กลุ่มการผสมพันธุ์แบบ mono L2 x di L1 ซึ่งเป็นการผสมข้าม
4. ลูกผสมบางตัวแม้ไม่สามารถเกิดปุ่มดอกในหลอดทดลองได้ ก็สามารถเกิดดอกในถุงเพาะได้แต่ให้ผลผลิตต่ำ
5. จากการศึกษาลักษณะของเห็ดหอมลูกผสมพบว่าลูกผสมที่ให้ผลผลิตหลังการตัดแต่ง ที่มีแนวโน้มให้ผลผลิตสูง แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติได้จากกลุ่มการผสมพันธุ์แบบ mono L2 x di L1 (ผสมข้ามแบบไดมอน) รองลงมาคือกลุ่มการผสมพันธุ์แบบ mono L2 x di L2 (การผสมตัวเองแบบไดมอน)
6. ในการศึกษาลักษณะทางไอโซไซม์เอสเทอเรสของลูกผสมพบว่าลูกผสมที่ให้ผลผลิตดี 6 สายพันธุ์มีจำนวนแถบไอโซไซม์เอสเทอเรสตั้งแต่ 4, 5 และ 7 แถบ แต่ข้อมูลจากไอโซไซม์เอสเทอเรสแต่เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถใช้ทำนายความสามารถในการให้ผลผลิตได้ อาจต้องอาศัยข้อมูลอื่นประกอบด้วย

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐธยา คำบุญรัตน์. 2540. การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมชนิดฟลอริดาโดยการผสมพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 75 หน้า.
- ธวัชชัย ชีมนุชหสเถียร. 2542. เทคโนโลยีกระตุ้นเห็ดหอมออกดอก. หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ. 7 กรกฎาคม. 2542. หน้า 7.
- ปัญญา โพธิ์จิตรัตน์. 2537. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 421 หน้า.
- ราชบัณฑิตยสถาน. 2539. เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษ ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 170 หน้า.
- วันดี เพชรรัตน์. 2536. การผลิตเห็ด. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่. สงขลา. 226 หน้า.
- Bahl, N. 1994. Handbook on Mushroom; 3rd ed. Chaman Enterprise. Delhi. India. pp 133.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1990. Technical guidelines
- Kawai, G., H. Kobayashi, Y. Fukushima and K. Ohsaki. 1995. Liquid culture induces early fruiting in Shiitake (*Lentinula edodes*), P 825-832. In; Elliott T.J.(ed.). Proceeding of the 14th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Oxford/17-22 September 1995. Wellesbourne, UK.
- Miles, P.G. 1996. Genetics and breeding of mushroom from Bensaude and Kniep to molecular genetics. P 11-23. In; Royse, D.J. (ed) Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceeding of the 2nd International Conference June 9-12, 1996. University Park, Pennsylvania.
- Peberdy, J.F., A.M. Hanifah and J.H. Jia. 1993. New perspectives on the genetics of *Pleurotus*. P 55-69. In; Chang, S.T, J.A. Buswell and S.W. Chiu.(eds). Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceeding of the First International Conference.
- Tokimoto, K. and A. Kawai. 1975. Nutrition Aspects on Fruit Body Development in Replacement Culture of *Lentinula edodes* (Berk) Sing. Rep. Tottori Mycol Inst (Jpn). 1, 61-68.
- Tokimoto, K. and M. Komatsu. 1978. Biological nature of *Lentinus edodes*. P 445-456 In Chang, S.T. and W.A. Hayes The Biology and Cultivation of Edible Mushroom. Academic Press. New York.