



การคัดเลือกพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus* sp. ด้วยวิธี Mono-Mono Crossing
Pleurotus sp. mushroom Selection with Mono-Mono Crossing

ชาญกิจ วงศ์เผ่าสกุล

วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

มีนาคม 2555

การคัดเลือกพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus* sp. ด้วยวิธี Mono-Mono Crossing

Pleurotus sp. mushroom Selection with Mono-Mono Crossing

ชาญกิจ วงศ์เผ่าสกุล

โครงการด้านชีววิทยานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

มีนาคม 2555

การคัดเลือกพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus* sp. ด้วยวิธี Mono-Mono Crossing

Pleurotus sp. mushroom Selection with Mono-Mono Crossing

ชาญกิจ วงศ์เผ่าสกุล

โครงการด้านชีววิทยานี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการโครงการด้านชีววิทยา

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวรณ์ รัตนเลิศสุรณ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิรินันท์ เอี่ยมประภา)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุจยา ฤทธิศร)

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ประสบความสำเร็จลงได้อย่างดีด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.สุภาภรณ์ รัตนเลิศนุสรณ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาโครงการฯ ซึ่งกรุณาให้ความรู้คำปรึกษา แนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ รวมทั้งกำลังใจที่ดีตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลองจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คณะผู้ดำเนินการทดลองขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

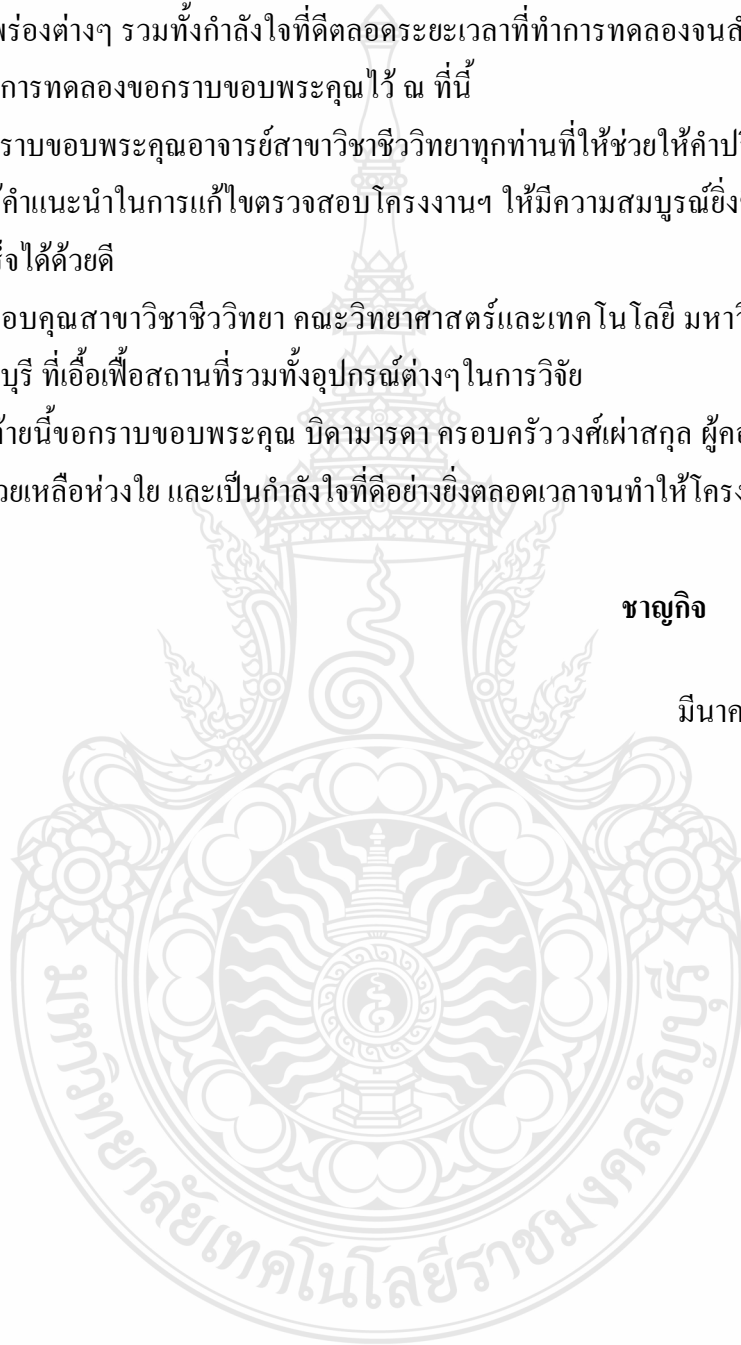
ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิชาชีววิทยาทุกท่านที่ช่วยให้คำปรึกษาและแก้ปัญหาต่างๆ และให้คำแนะนำในการแก้ไขตรวจสอบโครงการฯ ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นเพื่อทำโครงการครั้งนี้จนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่รวมทั้งอุปกรณ์ต่างๆ ในการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา ครอบครัววงศ์เผ่าสกุล ผู้คอยอบรมสั่งสอนในสิ่งที่ดี คอยช่วยเหลือห่วงใย และเป็นกำลังใจที่ดีอย่างยิ่งตลอดเวลาจนทำให้โครงการสำเร็จได้ด้วยดี

ชาญกิจ วงศ์เผ่าสกุล

มีนาคม 2555



ชาญกิจ วงศ์เฝ้าสกุล 2555 : การคัดเลือกพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus* sp. ด้วยวิธี Mono-Mono Crossing
 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) ปรธานกรรมการที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุกาญจน์ รัตนเลิศ
 นุสรณ์

บทคัดย่อ

การศึกษาเทคนิคการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus* sp. โดยวิธีโมโน-โมโน(Mono-Mono Crossing) ระหว่างเห็ดนางรม(*Pleurotus ostreatus*(Jacq:Fr)Kummer) และเห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus sajorcaju*(Fr.)Singer) พบลูกผสมที่ได้จากการทดลอง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ C3, สายพันธุ์ C4, สายพันธุ์ C5, และสายพันธุ์ C6 โดยสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตดีที่สุดและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นที่ต้องการของตลาด คือลูกผสมสายพันธุ์ C3 มีลักษณะเด่นคือ มีขอบหมวกเห็ดหยาบ ผิวของหมวกเห็ดมีขนละเอียดสีขาวปกคลุมคล้ายขนกำมะหยี่ เนื้อหมวกมีสีตาลขอบขาว ขอบของกริบไม่เรียบ มีจำนวนดอกเห็ด 3-6 ดอกต่อการออกหนึ่งครั้ง และให้น้ำหนักดอกเห็ดสดสูงถึง 50 กรัมต่อการเก็บหนึ่งครั้ง สายพันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะเด่นรองลงมาได้แก่ลูกผสมสายพันธุ์ C5 สายพันธุ์ C6 และสายพันธุ์ C4 ตามลำดับ

คำสำคัญ : Mono-Mono Crossing เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้าภูฐาน

.....
/...../.....
 ลายมือชื่อประธานกรรมการ



Chankit Wongpaosakul 2012 : *Pleurotus* sp. mushroom Selection with Mono-Mono Crossing.
Bachelor of Science (Biology). Thesis Advisor : Asst. Prof. Dr. Sukarn Rattanalerdnusorn

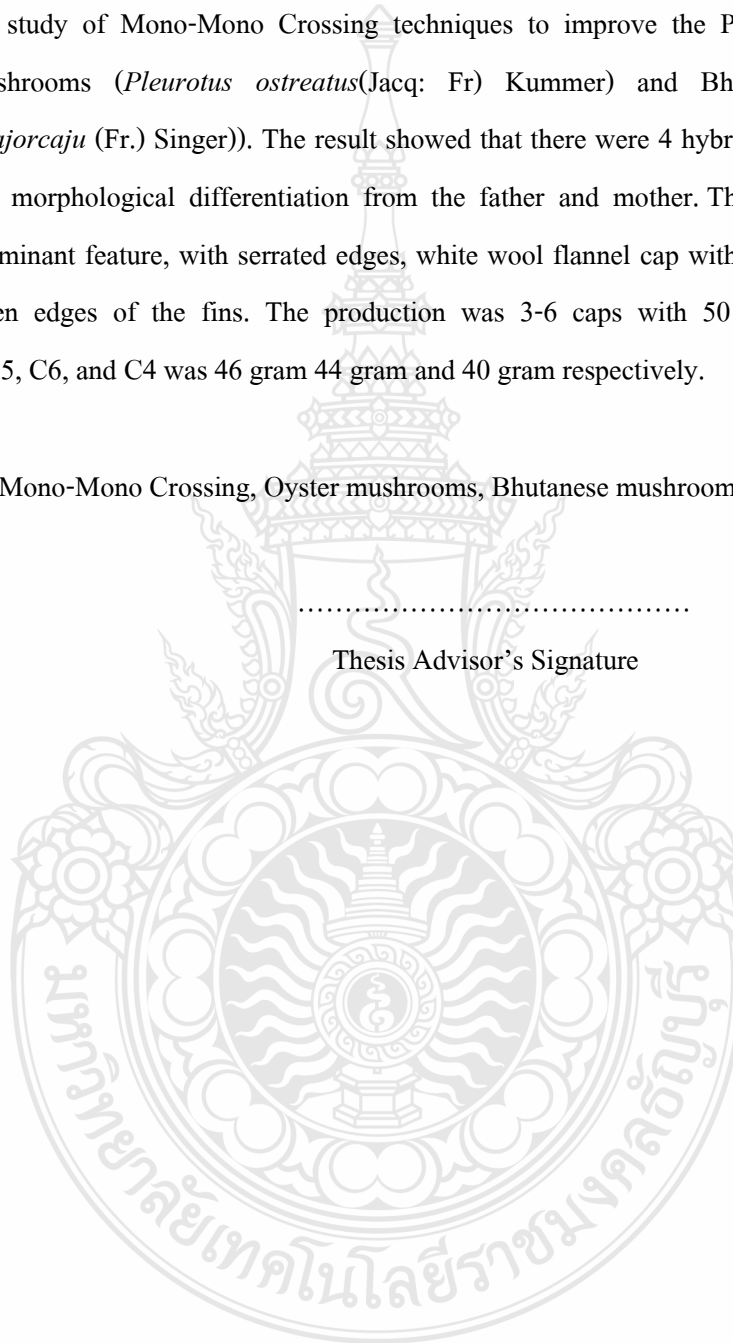
ABSTRACT

The study of Mono-Mono Crossing techniques to improve the *Pleurotus* mushroom (Oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*(Jacq: Fr) Kummer) and Bhutanese mushroom (*Pleurotus sajorcaju* (Fr.) Singer)). The result showed that there were 4 hybrids C3, C4, C5, and C6 with the morphological differentiation from the father and mother. The hybrid strain C3 showed a dominant feature, with serrated edges, white wool flannel cap with, brown texture and white, uneven edges of the fins. The production was 3-6 caps with 50 gram weight. The production C5, C6, and C4 was 46 gram 44 gram and 40 gram respectively.

Keywords : Mono-Mono Crossing, Oyster mushrooms, Bhutanese mushroom

...../...../.....

Thesis Advisor's Signature



สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	14
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	19
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	32
เอกสารอ้างอิง	34
ประวัติผู้ดำเนินการทดลอง	35

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การผสมข้ามสายพันธุ์เห็ดเห็ดนางรม(<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq:Fr)Kummer) และเห็ดนางฟ้าภูฐาน (<i>Pleurotus sajorcaju</i> (Fr.)Singer) แบบ Mono-Mono Crossing	15
2 ลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ ขนาดของหมวกดอก ขนาดของก้านดอก น้ำหนักดอกต่อการเก็บหนึ่งครั้ง ของสายพันธุ์พ่อ-แม่ และลูกผสม	20
3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์พ่อและแม่ ได้แก่ นางรม A, ภูฐาน A, นางรม B และภูฐาน B	21-22
4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ C1, C2 และC3 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ แบบ Mono-Mono Crossing	23-24
5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ C4, C5 และC6 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ แบบ Mono-Mono Crossing	25-26

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 เห็นนางรม	4
2 เห็นนางฟ้าภูฐาน	5
3 ส่วนประกอบของดอกเห็ด	7
4 วงชีวิตของเห็ดแบบ Heterothallic	9
5 ลักษณะเส้นใยลูกผสม C3 บนอาหาร PDA อายุ 21-28 วัน	27
6 ลักษณะ Clamp connection ลูกผสม C3	28
7 ขั้นตอนการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดสกุล <i>Pleurotus</i> sp. แบบ โมโน-โมโน (Mono-Mono Crossing)	29
8 ลักษณะสัณฐานวิทยาดอกเห็ดลูกผสม C3 ที่เกิดจากการผสมระหว่าง นางรม A และนางฟ้าภูฐาน A	30
9 เชื้อเห็ดบริสุทธิ์บนอาหาร PDA	31

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เห็ดจัดเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเห็ดเป็นอาหารที่มีความปลอดภัยจากการใช้สารเคมีและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ทำให้เห็ดเป็นที่นิยมบริโภคกันมากในภาวะเศรษฐกิจตกต่ำดั่งนั้นอาชีพการเพาะเห็ดจึงจัดว่าเป็นอาชีพที่น่าสนใจและทำรายได้ให้เป็นอย่างดี เพราะ การเพาะเห็ดนั้นเป็นการนำวัสดุที่เหลือใช้จากการเกษตร วัสดุจากธรรมชาติที่หาได้ในท้องถิ่น เช่น ฟางข้าว ไม้คั้น ไม้ฝ้าย เปลือกมันสำปะหลัง ทะลายปาล์ม ขี้เลื่อย เปลือกถั่วเขียว แล้วแต่ความเหมาะสมกับท้องถิ่น ทำให้ต้นทุนต่อหน่วยต่ำลงแต่ผลตอบแทนสูง จากการประมาณการผลิตและมูลค่าของเห็ดชนิดต่างๆของทั่วโลกคาดว่าปริมาณผลผลิตเห็ดรวมในละปีประมาณ 120,000 ตัน มีมูลค่า 12,000 ล้านบาท ซึ่งในจำนวนนี้พบว่า เห็ดฟางมีปริมาณผลผลิตมากที่สุด คือ 75% ของเห็ดทั้งหมด สำหรับด้านการส่งออกเห็ดของไทยในแต่ละปีรวมเห็ดแห้ง เห็ดสด และเห็ดกระป๋อง มีปริมาณ 30% และมีบางส่วนที่ส่งออกทางชายแดนซึ่งไม่สามารถเก็บเป็นสถิติได้ ด้านการนำเข้ามีบ้างในเห็ดบางชนิดที่ผลิตได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการหรือผลิตออกมาแล้วยังไม่เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย ได้แก่ เห็ดหอมและเห็ดแชมปิญอง ประเทศที่ผลิตเห็ดฟางมากที่สุด คือ สหรัฐอเมริกา จีน และฝรั่งเศส ตามลำดับ เห็ดที่ผลิตรองลงมาคือเห็ดสกุลนางรม 21.5% และเห็ดหอม 12.2% โดยมีประเทศญี่ปุ่นและจีนเป็นผู้ผลิตเห็ดสกุลนางรม และเห็ดหอมมากที่สุด ทำให้ประเทศไทยต้องนำเข้าเห็ดนางรม และเห็ดหอมจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากทั้งๆที่เห็ดสกุลนางรมในประเทศไทยมีคุณภาพไม่ด้อยกว่าสายพันธุ์ต่างประเทศ และเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศในประเทศไทย จากข้อความข้างต้นจะเห็นว่าในปัจจุบันมีความต้องการบริโภคเห็ดมากขึ้นเรื่อยๆ แต่กำลังการผลิตเห็ดนางรมในประเทศไทยน้อย จึงมีการนำเข้าเห็ดสกุลนางรมจากต่างประเทศ ทำให้เงินที่ประเทศต้องเสียจากการนำเข้าเห็ดเข้าประเทศไทยปีละหลายพันล้านบาท เนื่องจากரசชาติเห็ดสกุลนางรมในประเทศไทยมีรูปร่างและสีสันดอกเห็ดความกรอบของเนื้อเห็ด รสชาติไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคในประเทศจึงมีการนำเข้าเห็ดนางรมจากต่างประเทศ โดยเฉพาะเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*(Jacq:FrKummer) และเห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus sajorcaju*(Fr.)Singer) ดังนั้นจึงศึกษาวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ลูกผสมของเห็ดนางรม(*Pleurotus ostreatus* (Jacq:Fr)Kummer) และเห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajorcaju*(Fr.)Singer)แบบ โมโน-โมโน (Mono-Mono Crossing) เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะพื้นฐานวิทยา เช่น รูปร่างและสีสันดอกเห็ด

ความกรอบของเนื้อเห็ด รสชาติเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคและเป็นที่ต้องการของท้องตลาด และสามารถออกผลผลิตได้ตลอดทั้งปี เพื่อลดภาวะการนำเข้าเห็ดนางรมจากต่างประเทศให้น้อยลง

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาศาสตร์พันธุ์ลูกผสมเห็ดนางรม(*Pleurotus ostreatus* (Jacq:Fr)Kummer) และเห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajorcaju*(Fr.)Singer)

1.2.2 เพื่อศึกษาเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์และการเพาะเลี้ยงเห็ดลูกผสมแบบโมโน-โมโน (Mono-Mono Crossing)



บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 ความสำคัญของเห็ด

เห็ด ในพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2542 เห็ด คือ ส่วนของเชื้อราที่ออกเป็นดอกแบ่ง เป็น 2 ชนิด ชนิดหนึ่งไม่มีพิษกินได้ เช่น เห็ดหอม เห็ดนางรม เห็ดฟาง อีกชนิดหนึ่งที่มีพิษ บางชนิดกินแล้วถึงตาย เช่น เห็ดระโงกหินเห็ดขี้ควาย และเห็ดที่มีสีส้มสวยงามบางชนิดเห็ด (Fungi) ทางวิทยาศาสตร์ เป็นประเภทของสิ่งมีชีวิตประเภทใหญ่ประเภทหนึ่ง เดิมเคยจัดอยู่ในอาณาจักรเดียวกับพืช แต่ปัจจุบันถูกจัดอยู่ในอาณาจักรเห็ดรา หรือฟังไจ (Kingdom Fungi) เป็นสิ่งมีชีวิตที่เซลล์มีนิวเคลียสหรือมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส เรียกว่า ยูคาริโอต (eukaryote) อาจเป็นสิ่งมีชีวิตที่เซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ไม่มีคลอโรฟิลล์ สังเคราะห์อาหารเองไม่ได้ กินอาหารโดยวิธีการสร้างน้ำย่อยแล้วปล่อยออกมาย่อยสารอินทรีย์จนเป็นโมเลกุลเล็กๆ และดูดซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ (saprophyte) ได้แก่ สิ่งมีชีวิตประเภท เห็ด รา และยีสต์เห็ดจัดเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเห็ดเป็นอาหารที่มีความปลอดภัยจากการใช้สารเคมีและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง (สมศักดิ์ วรรณศิริ และคณะ, 2529) ทำให้เห็ดเป็นที่นิยมบริโภคกันมากซึ่งในภาวะเศรษฐกิจตกต่ำเช่นนี้ อาชีพการเพาะเห็ดจัดว่าเป็นอาชีพที่น่าสนใจและทำรายได้ให้เป็นอย่างดี เพราะการเพาะเห็ดนั้นเป็นการนำวัสดุที่เหลือใช้จากการเกษตร วัสดุจากธรรมชาติที่หาได้ในท้องถิ่น เช่น ฟาง ข้าว ใสนุ่น ใส่ฝ้าย เปลือกมันสำปะหลัง ทะลายปาล์ม ขี้เลื่อย เปลือกถั่วเขียว แล้วแต่ความเหมาะสมกับท้องถิ่น ทำให้ต้นทุนต่อหน่วยต่ำลงแต่ผลตอบแทนสูง การเพาะเห็ดสามารถเพาะได้ทั้งในกลางแจ้งโดยบรรจุวัสดุเพาะแล้วเติมอาหารเสริมลงไป

Cohen (2002) พบว่าสาเหตุที่ทำให้เห็ดนางรมได้รับความสนใจมากในการบริโภคเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการเช่นมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และเกลือแร่ในปริมาณที่สูง แต่มีไขมันและโซเดียมในปริมาณที่ต่ำนอกจากนี้เห็ดจำพวก *Pleurotus* sp. ยังสามารถสร้างเอนไซม์ laccase, peroxidase, cellulose, hemicellulose และ xylanase ได้ดี

2.2 ลักษณะฐานฐานวิทยาเห็ดนางรม

เห็ดนางรม เป็นเห็ดที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางถิ่นประเทศแถบยุโรป เห็ดพวกนี้เจริญเติบโตได้ดีในพวกไม้โอ๊ค (oak) ไม้เมเปิ้ล (maple) ไม้พีช (peach) ฯลฯ และสามารถเจริญเติบโตได้ทั่วไปในเขตอบอุ่น ต่อมาได้มีการนำเข้ามาทดลองเพาะเลี้ยงในประเทศไทย พบว่าเห็ดชนิดนี้สามารถปรับตัวและเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทย จึงได้มีการเผยแพร่วิธีการเพาะเห็ดชนิดนี้จนเป็นที่รู้จักของ

ประชาชนโดยทั่ว ๆ ไป เห็นนางรมจัดเป็นเห็ดที่ประชาชนนิยมรับประทานกันมาก ทั้งนี้เนื่องจากเห็ดนางรมมีลักษณะคล้ายเห็ดมะม่วงหรือเห็ดขอนขาวที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติบนต้นไม้ที่พุ่ม เห็ดนางรมเป็นเห็ดสีขาวสะอาด มีคุณค่าทางอาหารสูง และมีรสชาติหอมหวาน นอกจากนี้เนื้อของเห็ดนางรมยังไม่เหนียวมากเหมือนเห็ดมะม่วงหรือเห็ดขอนขาว และที่สำคัญก็คือ เห็ดนางรมมีสารบางอย่างที่มีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคไม่แพ้เห็ดชนิดอื่นๆจึงทำให้ประชาชนรู้จักเห็ดชนิดนี้เป็นอย่างดี

เห็ดนางรม จัดเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางอาหารสูงโดยเฉพาะโปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน ไม่แพ้เห็ดชนิดอื่นๆ นอกจากนี้เห็ดนางรมยังให้ปริมาณแร่ธาตุหลายชนิด เช่น แคลเซียมฟอสฟอรัส โปรแตสเซียม และให้พลังงานค่อนข้างสูง เห็ดนางรมมีวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 สูงกว่าเห็ดชนิดอื่นๆและยังมีกรดโฟลิกสูงกว่าพืชผักเนื้อสัตว์ กรดพวกนี้ช่วยป้องกันรักษาโรคโลหิตจาง จึงเหมาะสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง และยังเหมาะต่อผู้ที่ต้องการลดน้ำหนัก เพราะเห็ดมีปริมาณของไขมันน้อย และมีปริมาณโซเดียมต่ำ จึงเหมาะที่จะใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ที่ เป็นโรคหัวใจและโรคไตอักเสบ ประกอบกับเห็ดนางรมเพาะง่ายสามารถเจริญเติบโตได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย จึงได้มีการเพาะเห็ดนี้กันอย่างแพร่หลายโดยทั่วไป

เห็ดนางรม มีสรรพคุณช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ลดน้ำตาลในเลือด ปรับสภาพความดันโลหิต ลดการอักเสบ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อร้าย



ภาพที่ 1 เห็ดนางรม(*Pleurotus ostreatus*(Jacq:Fr)Kummer)

2.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาเห็ดนางฟ้าภูฐาน

เห็ดนางฟ้าภูฐาน มีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกับเห็ดนางรมเห็ดชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์(family) เดียวกัน ชื่อ“เห็ดนางฟ้าภูฐาน” เป็นชื่อที่ดั่งขึ้นในเมืองไทย คนไทยบางคนเรียกว่าเห็ดแขก เนื่องจากมีผู้พบเห็นเห็ดนี้ครั้งแรกที่ประเทศอินเดีย พบขึ้นตามธรรมชาติบนต้นไม้เนื้ออ่อนที่กำลังผุในแถบเมืองแจมมู(jammu) เห็ดนางฟ้าถูกนำไปเลี้ยงในอาหารร่วนเป็นครั้งแรกโดย jandaik ในปี ค.ศ.1974 ต่อมา Rangaswami และ Nadu แห่ง Agricultural university, Coimbatore ในอินเดียเป็นผู้นำเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดนางฟ้าเข้ามาฝากไว้ที่ American Type -Culture Collection (ATCC) ในอเมริกาเมื่อปี ค.ศ.1975 ได้ทราบว่าประมาณปี ค.ศ. 1977 ทางกองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร เป็นผู้นำเชื้อจาก ATCC เข้ามาประเทศไทย เพื่อทดลองเพาะดู ปรากฏว่าสามารถเจริญได้ดี

อีกสายพันธุ์หนึ่ง เป็นเห็ดที่ที่ผู้นำเข้ามาจากประเทศภูฐาน มาเผยแพร่แก่นักเพาะเห็ดไทย ได้มีการเรียกชื่อเห็ดนี้ว่า เห็ดนางฟ้าภูฐาน มีหลายสายพันธุ์ซึ่งชอบอุณหภูมิที่แตกต่างกัน บางพันธุ์ออกได้ดีในฤดูร้อน บางพันธุ์ออกได้ดีในฤดูหนาว เป็นที่นิยมนำมาเพาะเป็นการค้ากันมากลักษณะของดอกเห็ดนางฟ้า มีลักษณะคล้ายกับดอกเห็ดเป่าอื้อ และดอกเห็ดนางรม เมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดเป่าอื้อ ดอกเห็ดนางฟ้าสีจะอ่อนกว่าและมีก้านอยู่ชิดกันมากกว่า เห็ดนางฟ้าสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นได้นานหลายวัน เช่นเดียวกับเห็ดเป่าอื้อ เนื่องจากเห็ดชนิดนี้ไม่มีการย่อยตัวเหมือนกับเห็ดนางรม ด้านบนของดอกมีสีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลอ่อน ในอินเดียดอกเห็ดมีขนาดตั้งแต่ 5-14 เซนติเมตรและจะมีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 30-120 กรัม เห็ดนางฟ้ามีรสอร่อย เวลานำไปปรุงอาหารจะมีกลิ่นชวนรับประทาน เห็ดชนิดนี้สามารถนำไปตากแห้งเก็บไว้เป็นอาหารได้เมื่อนำเห็ดมาปรุงอาหารก็นำไปแช่น้ำเห็ดจะคืนรูปเดิมได้

เห็ดนางฟ้ามีสรรพคุณช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ลดน้ำตาลในเลือด ปรับสภาพความดันโลหิต ลดการอักเสบ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อร้าย



ภาพที่ 2 เห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus sajorcaju*(Fr.)Singer)

2.4 การจัดจำแนก

เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้าภูฐาน เป็นเห็ดที่อยู่ในสกุล (Genus) เดียวกันแต่ต่างชนิดกัน (Species) กัน ซึ่งสามารถจัดจำแนก (Classification) ได้ดังนี้

Kingdom:Myceteae (Fungi)

Divison:Amastigomycota

Subdision:Basidiomycotina

Class:Basidiomycetes

Subclass:Holobasidiomycetidae II

Order:Agaricales

Family:Tricholomataceae

Genus:Pleurotus

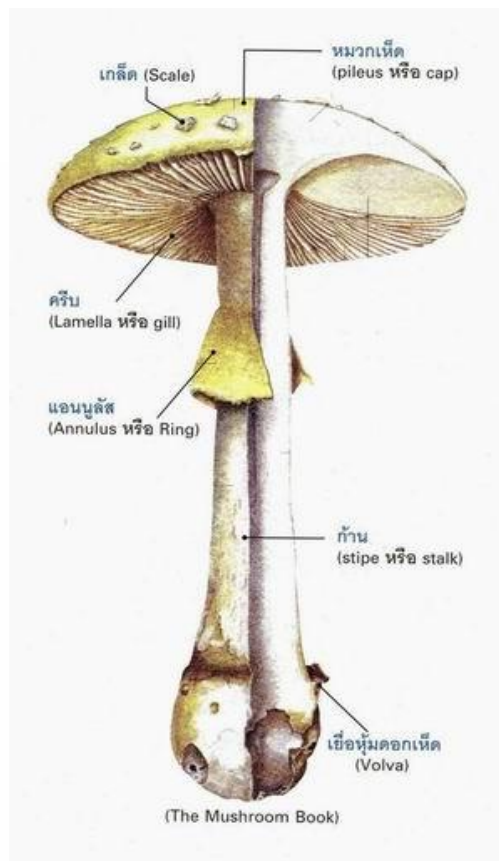
ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อสามัญของเห็ดทั้ง 2 ชนิดนี้ มีดังต่อไปนี้

เห็ดนางรม(the oyster mushroom):*Pleurotus ostreatus*

เห็ดนางฟ้าภูฐาน(the phoenix mushroom):*Pleurotus sajor-caju*

2.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เป็นเห็ดในสกุล *Pleurotus* sp. ซึ่งเห็ดในสกุลนี้จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงคือ ดอกเห็ดเกิดเดี่ยวๆหรือเป็นกลุ่ม รูปทรงของดอกคล้ายพัด (flabellate)หรือเปลือกหอย (dimidiate) ดอกเจริญยึดติดกับวัสดุโคนมีก้านดอก(stalk, stipe) อวบสั้น อยู่บริเวณตรงกลางหรือด้านข้างของหมวกดอก(cap, pileus) ผิวด้านบนของหมวกดอกอาจพบเม็ดสี (pigment) ครีบดอก(gill, lamellae) เจริญลี้มนำตาลลงมาบนก้าน(decurrent) แบบ dolipore แบ่งเป็นเส้นใยเป็นช่องๆและมีแคลมป์คอนเนกชัน(clamp connection)ดอกเห็ดมีการสร้างสปอร์ที่บริเวณด้านข้างของครีบใต้หมวกดอกโดยสปอร์จะมีรูปร่างยาวรีและมีสีใส สปอร์พิมพ์ (spore-print) มีสีขาว สีครีม สีชมพู หรือสีเทา ส่วนสีของดอกเห็ดมีสีขาว สีเทา สีน้ำตาล สีทอง และสีชมพู



ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของดอกเห็ด

ที่มา <http://www.siamsouth.com/smf/index.php?topic=17428.0>

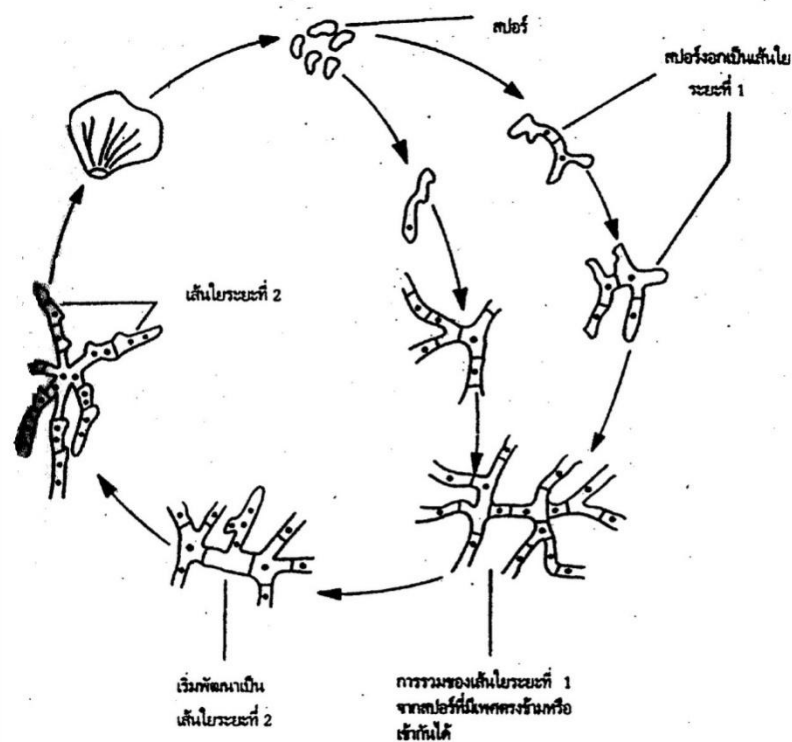
2.6 วงจรชีวิต

เห็ดในสกุล *Pleurotus* sp. มีวงจรชีวิตเป็นแบบเฮเทอโรทาเลียค (heterothallic life cycle) โดยมีวงจรชีวิตชนิดแฮพโลไบออนติก (haplobiontic) ชนิดแฮพลอยด์ (haploid) ดังนั้นเซลล์ทั่วไปจึงมีสถานะของโครโมโซมเป็นโมโนพลอยด์ (monoploid) สปอร์เหล่านี้มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (โมโนพลอยด์) เมื่อสปอร์ตกในที่ที่เหมาะสมจะงอก (germinate) เส้นใยออกมา เส้นใยนี้จะมีผนังขวาง (septum) กัน โดยแต่ละเซลล์มีหนึ่งนิวเคลียส (monokaryon) และเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียสเหมือนกัน (homokaryotic mycelium) เรียกเส้นใยระยะนี้ว่าเส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) เส้นใยในระยะนี้จะมีการเจริญโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) เมื่อเส้นใยนี้ไปสัมผัส (amastomosis) กับเส้นใยปฐมภูมิที่มีเมททิงไทป์ (mating type) เส้นใยที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะมีนิวเคลียส 2 นิวเคลียสในหนึ่งเซลล์ (dikaryon, $n+n$) และเป็นนิวเคลียสที่ต่างกัน (heterokaryon) เรียกเส้นใยในระยะนี้ว่าเส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) เส้นใยในระยะนี้จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วและมีการสร้างแคลมป์คอนเนกชัน ต่อมาเส้นใยทุติยภูมิจะขยายปริมาณมากขึ้นและรวมตัวกันแน่นเป็นกลุ่มก้อน เรียก

เส้นใยระยะนี้ว่าเส้นใยตติยภูมิ(tertiary mycelium) ซึ่งเซลล์ของเส้นใยยังคงสภาพเป็นไดคาริออน เส้นใยในระยะนี้จะค่อยๆพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด (fruiting body) เมื่อดอกพัฒนาไปถึงระยะหนึ่งจะมีการสร้างเบสิดิอัส(basidia) ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปกระบอง และมีนิวเคลียสทั้งสองที่อยู่ภายในจะรวมตัว (เกิดkaryogamy) ได้นิวเคลียสที่เป็นดิพลอยด์(2n) จากนั้นจะมีการแบ่งแบบไมโอซิส(meiosis) ทำให้โครโมโซมลดลงเป็นแฮพลอยด์(n) แต่ละเบสิดิอัสจะสร้างสเตอริกมา(sterigma) 4 อัน ต่อมานิวเคลียสแต่ละอันจะเคลื่อนที่ไปสู่ปลายสเตอริกมาพร้อมกับพองออกเป็นรูปร่างค่อนข้างกลมแล้วมีการพัฒนาไปเป็นเบสิดิอัสสปอร์จำนวน 4 อัน เมื่อดอกเห็ดเจริญเต็มที่ที่จะมีการปลดปล่อยสปอร์และถ้าสภาวะแวดล้อมเหมาะสมสปอร์จะงอกเป็นเส้นใย แล้ววงจรชีวิตก็จะเริ่มใหม่อีกครั้งหนึ่ง

2.7 การสืบพันธุ์

เห็ดในสกุล *Pleurotus* sp.เป็นแบบเฮเทอโรแทลิก เป็นเห็ดที่ไม่สามารถผสมตัวเองได้ ภายในทาลัส(thallus) เดียวกัน ดังนั้นการสืบพันธุ์แบบใช้เพศจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อนิวเคลียสจากต่างทาลัสซึ่งมีเมทิงไทป์ต่างกันมาผสมกันเท่านั้น โดยระบบการสืบพันธุ์ (mating system, breeding system)จะเป็นเททราโพลาร์(tetrapolar) คือ มีแฟกเตอร์(factor) หรือยีน (gene) 2 ชุด ได้แก่ แฟกเตอร์A และ B ซึ่งใน 1 แฟกเตอร์ประกอบด้วย 2 อัลลีล (แฟกเตอร์A ประกอบด้วยอัลลีลA1, และA2 ส่วนแฟกเตอร์B ประกอบด้วยอัลลีลB1 และB2) ซึ่งแฟกเตอร์ทั้ง 2 นี้อยู่ต่างโครโมโซมกัน ดังนั้นเมื่อมีการแยกตัวออกจากกันในขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสจึงทำให้สามารถสร้างเบสิดิอัสสปอร์ที่ต่างกันได้ 4 ชนิด(ภายในเห็ดหนึ่งดอก) คือ A1B1,A1B2,A2B2 และ A2B2



ภาพที่ 4 วงชีวิตของเห็ดแบบ Heterothallic

ที่มา http://klarod.blogspot.com/2010_07_01_archive.html

2.8 ปัจจัยที่ีผลต่อการเจริญของเส้นใยและการงอกของดอก(Zadrazil,1974)

2.8.1 อุณหภูมิ เป็นปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งต่อการเจริญของดอกเห็ดการสร้างส่วนสืบพันธุ์และการงอกของสปอร์ ในการเพาะเห็ดนางรมปรากฏว่าที่อุณหภูมิ 15 และ 35 องศาเซลเซียส เห็ดนางรมไม่เกิดดอก สำหรับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดดอก อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นดอกของดอกเห็ดนางรมจะอยู่ที่ประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส

2.8.2 ความชื้น ในกรณีของการเพาะเห็ดแบ่งเป็น 2 อย่าง คือ ความชื้นบนวัสดุเพาะและความชื้นในอากาศความชื้นบนวัสดุ(moisture) การเพิ่มความชื้นในวัสดุเพาะทำได้โดยการรดน้ำแต่ต้องระมัดระวังไม่ให้มากเกินไปหรือเปียกเกินไป เพราะจะทำให้เส้นใยชะงักการเจริญจนมีจุลินทรีย์พวกอื่น เช่น แบคทีเรีย เจริญแทน การทำให้วัสดุเปียกเกินไปทำให้อากาศในวัสดุเพาะลดลงจนเกิดการขาดออกซิเจน เส้นใยอาจเจริญไม่ดีหรือตายได้แต่ถ้าทิ้งให้แห้งเกินไปก็จะขาดน้ำจนสารที่เป็นอาหารไม่ละลาย หรือสูญเสียน้ำออกไปจากเส้นใยเห็ดทำให้เส้นใยเจริญไม่ได้ความชื้นในอากาศ (humidity) การเพิ่มความชื้นในอากาศทำได้โดยการพ่นละอองน้ำในอากาศถ้าการหมุนเวียนของ

อากาศมีมากเกินไปก็มักจะทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ลดลง ในดอกเห็ดมีน้ำเป็นส่วนประกอบถึง 90% ถ้าความชื้นในอากาศมีน้อยก็จะเกิดการระเหยของน้ำในดอกเห็ดออกไป ทำให้ดอกเห็ดแห้งและชะงักการเจริญเติบโตได้ ถ้าความชื้นมีมากเกินไปจะเกิดเส้นใยฟูขึ้นแถวโคนดอกเห็ด ดอกเห็ดที่เกิดขึ้นจะมีคุณภาพต่ำ และการเกิดดอกจะลดลง

2.8.3 ความเป็นกรด-ด่าง(pH) มีผลต่อการพัฒนาสัณฐานวิทยาของเห็ดเป็นอย่างมาก โดยทั่วไปเห็ดต้องการสภาพความเป็นกรด-ด่าง pH ที่ 4-8 ซึ่งมีความแตกต่างกันในเห็ดแต่ละชนิด ผลของความเป็นกรด มีความเกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างสลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านความสามารถในการใช้ประโยชน์จากวัสดุที่เจริญ

2.8.4 คาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด คาร์บอนไดออกไซด์สูงมีผลกระตุ้นการเจริญของเส้นใยอยู่ที่ 28 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรมทั้ง *Pleurotus ostreatus* และ *Pleurotus florida* แต่เมื่อเพิ่มถึง 37.5 เปอร์เซ็นต์ จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรม

2.8.5 ออกซิเจน เส้นใยเห็ดต้องการก๊าซออกซิเจนในการเจริญเติบโตทั้งในระยะเส้นใยและระยะการพัฒนาไปเป็นดอก ในระยะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดสามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนน้อยมากและต้องการออกซิเจนปริมาณปกติในระยะการพัฒนาไปเป็นดอก

2.9 สารอาหารสำคัญบางอย่างที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด(อนันต์,2552)

2.9.1 คาร์บอน หากเราพิจารณาของเห็ดมาดากหรืออบให้แห้งจะพบว่าปริมาณน้ำหนักแห้งทั้งหมดจะมีอยู่ครึ่งหนึ่งที่เป็นสารคาร์บอน สารคาร์บอนเหล่านี้มีบทบาทในการประกอบเป็นอินทรีย์วัตถุต่าง ๆ อันเป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์และแหล่งสร้างพลังงานเพื่อใช้ในการดำรงชีพของเชื้อราเห็ด ดังนั้นการเจริญเติบโตของเชื้อราเห็ดจึงมีความต้องการพวกคาร์บอนมากกว่าสารอื่น

2.9.2 ไนโตรเจน ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรตีนและกรดต่างๆภายในเซลล์ การเจริญของเห็ดจะเกิดขึ้นไม่ได้เลยหากปราศจากโปรตีน ถึงแม้ว่าจะมีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถเอาไนโตรเจนไปใช้ในรูปของอนินทรีย์สาร เช่น ในรูปของไนเตรท ไนโตร และแอมโมเนียม เป็นต้น แต่สำหรับเห็ดแล้วไม่สามารถใช้ในโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ได้ โดยเฉพาะในรูปของไนเตร และรูปแบบของแอมโมเนีย โดยทั่วไปและไนโตรเจนที่เห็ดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จะต้องอยู่ในรูปของสารอินทรีย์สาร เช่น โปรตีน หรือ อมิโนแอซิด อันเป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งของโปรตีน

2.9.3 กำมะถัน โดยทั่วไปแล้วเชื้อรามีความต้องการกำมะถันในระดับหนึ่ง ในอาหารวุ้นที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา หากมีกำมะถันอยู่บ้างจะทำให้เชื้อราเจริญได้เป็นอย่างดี กำมะถันที่ใช้ในอาหารเลี้ยงส่วนมากจะอยู่ในรูปของคิเกลีอ

2.9.4 ฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสมีบทบาทในการเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อรา ที่จะใช้พวกคาร์โบไฮเดรต (พวกแป้ง น้ำตาล เซลลูโลส) เป็นอาหาร แต่ก็ต้องการให้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา

2.10 การเลือกดอกเห็ดทำพันธุ์

- 2.10.1 ควรเป็นดอกที่สมบูรณ์หมวกดอกควรมีลักษณะงอโค้งคล้ายเห็ดมะม่วง
- 2.10.2 ดอกไม้แก่หรืออ่อนเกินไปควรอยู่ในระยะก่อนที่จะมีการสร้างสปอร์
- 2.10.3 มีก้านดอกที่แข็งแรงไม่มีเชื้อจุลินทรีย์หรือเชื้อทำลายดอกเห็ด
- 2.10.4 สีของดอกควรเป็นสีขาวหรือเทาขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์และต้องไม่มีสีอื่นปะปน
- 2.10.5 ควรคัดดอกเห็ดจากถุงก่อนเชื้อที่ให้ผลผลิตสูงกว่าก้อนอื่น

2.11 การปรับปรุงพันธุ์เห็ด

มังกร(2540) การปรับปรุงพันธุ์เห็ดโดยผสมพันธุ์กรรมที่แตกต่างกันหรือที่สามารถรวมกันได้ เห็ดที่นำมาใช้ควรเป็นเห็ดที่การปรับตัวได้ดีในธรรมชาติ และมีฐานพันธุ์กรรมกว้างเพื่อที่จะได้มีลักษณะให้เลือกได้มากพอสำหรับใช้ในงานวิจัย

2.11.1 วิธีการที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดมีหลายวิธี

2.11.1.1 การปรับปรุงโดยวิธีการคัดเลือกพันธุ์(Selection)ในทางการค้าจะคัดเลือกพันธุ์ใหม่จากการเพาะเลี้ยง Multispore หรือจากการเลี้ยงสปอร์เดี่ยว หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดที่คัดเลือกไว้โดยตรง วิธีเหล่านี้จะใช้เวลาสั้น ในการปรับปรุง แต่การปรับปรุงทางพันธุกรรมจากการคัดเลือกพันธุ์ทำได้ยากมาก ดังนั้นจึงควรมีการผสมพันธุ์กันก่อนแล้วจึงใช้วิธีการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป

2.11.1.2 การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ (Hybridization) การปรับปรุงพันธุ์วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันมานาน โดยจะให้มีการผสมข้ามระหว่างเห็ดสองสายพันธุ์ ที่สามารถเข้าคู่กันได้ ให้เส้นใยมีสองนิวเคลียสและเจริญเป็นดอกเห็ดในที่สุด ซึ่งจะประสบความสำเร็จมากในการปรับปรุงพันธุ์ที่รับประทานได้หลายชนิด วิธีการผสมพันธุ์เห็ดที่นิยมใช้ 3 วิธี ดังนี้

ก. การผสมของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว(Mono-Mono Crossing)เป็นการพัฒนาสายพันธุ์เห็ดโดยการผสมของเส้นใยที่เป็นนิวเคลียสเดี่ยวเข้าด้วยกัน การผสมพันธุ์เกิดจากการเชื่อมต่อระหว่าง

เส้นใย 2 สายพันธุ์และมีการแลกเปลี่ยนสารภายในเซลล์ โดยมีการคัดเลือกอย่างต่อเนื่องและกำจัดลักษณะที่ไม่ดีออก เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางเพื่อที่จะได้ลูกผสมที่มีลักษณะใหม่ ๆ

ข. การผสมของเส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ กับเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (Di-Mono Crossing) แล้วหาชนิดคู่ผสมวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้เร็วหากมีสายพันธุ์ (เส้นใยนิวเคลียสคู่) จำนวนมากสำหรับทดสอบอยู่แล้วก็จะสามารถเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Monocaryon) จากสายพันธุ์เหล่านี้แล้วนำไปทำการทดสอบโดยวิธีการผสมแบบ ได-มอน (Di-Mono Crossing) เกิดเส้นใยนิวเคลียสคู่บนปลายเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ซึ่งถือว่าเป็นกฎว่านิวเคลียสตัวใดตัวหนึ่งที่เข้ากันได้ของเส้นใยนิวเคลียสคู่ที่ไปผสมกับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว ผลที่ได้ อาจเป็นการผสมที่เข้ากันได้เพียงกิ่งเดียวหรือเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ในบางกรณีของนิวเคลียสทั้งคู่ของเส้นใยนิวเคลียสคู่จะย้ายเข้าไปด้วยกัน ได้เส้นใยที่มีนิวเคลียสคู่ตรงส่วนปลายของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว

ภัทรภรณ์(2540) การผสมแบบโมโน-โมโน (Mono-Mono Crossing)ระหว่างเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ CM5 กับพันธุ์ลูกผสม KDCM4(A4) ทำเพื่อปรับปรุงเห็ดนางรมสีเทา คัดได้ลูกผสม 9 สายพันธุ์ที่มีรูปร่างและคุณภาพดีโดยมีการเปรียบเทียบผลผลิตของลูกผสมทั้งเก้า ซึ่งต่อมาคัดเหลือ 6 สายพันธุ์ (Q1-Q6) ที่มีผลผลิตสูงเพื่อใช้ศึกษาต่อไป สายพันธุ์ Q1 ให้ผลผลิตสูงสุดการผสมแบบไดมอน (Di-mon) เป็นการผสมระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Monokaryon) จาก Q1 กับเส้นใยนิวเคลียสคู่ (Dikaryons) จาก Q1-Q6 และพันธุ์พ่อแม่อื่นอีกห้าสายพันธุ์คือ KD1, KD2, KDCM2, KDCM3, KDCM4(A4) คัดลูกผสมได้ 9 สายพันธุ์ที่มีลักษณะและคุณภาพดีจากนั้นนำมาเปรียบเทียบผลผลิตกับพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ CM5 กับเห็ดนางรมสีขาว CM1 หรือชนิดฟลอริดา ที่อุณหภูมิห้องเห็ดนางรมชนิดฟลอริดาให้ผลผลิตสูงกว่าลูกผสมแบบ Di-mon ของกลุ่มที่ให้ผลผลิตสูง อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ Di-mon เหล่านี้จะให้ผลผลิตระดับเดียวกับสายพันธุ์เริ่มต้นคือเห็ดนางรมสีเทาพันธุ์ CM5 ที่เพาะในห้องเย็น

ค. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ หมายถึง การเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์หลังจากนั้นโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีความสามารถสร้างเพาะเซลล์ขึ้นมาใหม่ แล้วมีการแบ่งเซลล์กลายเป็นแคลลัสและในที่สุดได้ต้นใหม่ขึ้นมา การแยกโปรโตพลาสต์ ทำได้ 2 วิธีใหญ่ ๆ คือวิธีกล (Mechanical method) แยกโปรโตพลาสต์โดยใช้ใบมีดตัดเนื้อเยื่อพืชที่พลาสโมไลซ์แล้ว เซลล์ที่ถูกมีดตัดผ่านจะมีโปรโตพลาสต์ไหลออกมา อาจช่วยโดยการใช่วิธีกดหรือบีบเบา ๆ นอกจากนี้การลดแรงดันออสโมซิสของสารละลายที่แช่เซลล์เหล่านี้ทำให้โปรโตพลาสต์บวมดันหลุดออกมาตรงรอยตัดได้ง่าย วิธีนี้ได้โปรโตพลาสต์น้อยและเหมาะกับเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ และวิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic method) วิธีนี้ใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์เพื่อให้โปรโตพลาสต์หลุดออกมา เอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์เรียกว่า ไฮโดรไลติกเอนไซม์(hydrolytic enzyme) เนื่องจากองค์ประกอบของผนัง

เซลล์ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และสารระหว่างเซลล์คือ มิดเดิลลามลลา(middle lamella) นั้น มีกรดเพกติก จึงใช้เอนไซม์พวกเซลลูเลสเฮมิเซลลูเลสและเพกทิเนสรวมกัน

อย่างไรก็ตามต้นที่ได้ลักษณะที่เป็นลูกผสม (hybrid plants) ดังนั้นการรวมโปรโตพลาสต์ จึงไม่เพียงแต่เปิดโอกาสให้สามารถผสมพันธุ์ระหว่างพืชต่างชนิดหรือต่างสกุล ซึ่งไม่สามารถ กระทำได้ง่ายโดยวิธีผสมพันธุ์แบบปกติ ยังเปิดโอกาสให้มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในพืชที่ ขยายพันธุ์โดยส่วนทางด้านลำต้น (vegetatively propagated crops) ในพืชที่เกสรผู้เป็นหมัน (sterile species) หรือพืชที่เกสรผู้กึ่งเป็นหมัน (subfertile species) และพืชที่มีอายุยาว

วิธีการรวมโปรโตพลาสต์มีด้วยกันหลายวิธี แตกต่างกันไปในส่วนขององค์ประกอบของ สารชักนำการรวมตัว (เรียกทั่ว ๆ ไปว่า fusogen) และจำเป็นต้องตรวจสอบการรวมตัวโดยใช้ ลักษณะที่มองเห็นด้วยตา (visual markers) เช่น กรณีโปรโตพลาสต์จากมิโซพิลล์ของพืชชนิดหนึ่งที่มี สีเขียวเมื่อรวมกับโปรโตพลาสต์ที่ไม่มีสี (เช่น ที่ได้จากเซลล์เยื่อและแยกเซลล์ของราก, ใบเลี้ยง) เซลล์ heterokaryons จำแนกได้จากการที่โปรโตพลาสต์ทั้งหมดมีการสร้างคลอโรพลาส (Chloroplasts) เช่นเดียวกับที่ได้จากเซลล์แม่ที่มาจากมิโซพิลล์ และมีไซโตพลาสซึมจำนวนมากจาก เซลล์พ่อที่ไม่ใช่เซลล์มิโซพิลล์

ประโยชน์จากการรวมโปรโตพลาสต์ เป็นที่คาดหวังว่าการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion, somatic cell fusion/hybridization หรือ parasexual hybridization) เทคนิคการรวมสาร พันธุกรรม (เช่น DNA-recombination) และการถ่ายยีนหรือดีเอ็นเอ (DNA-transfer) จะเป็นแนวทาง หนึ่งในการรวมลักษณะที่ต้องการ จากพืชต่างชนิดกันมาก ๆ (diverse species) หรือแม้กระทั่งพืช ต่างสกุล (genera) เข้าด้วยกัน ซึ่งไม่อาจทำได้ในกรณีการผสมพันธุ์พืชโดยวิธีการปกติ (conventional breeding) หรือโดยวิธีการอื่น ๆ ปัจจุบันมีความพยายามอย่างมาก ในการรวม โปรโตพลาสต์ในการสร้างลูกผสมระหว่างพืชที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก ๆ เพื่อใช้ในการ ถิ่นทอดพันธุกรรมความต้านทานหรือทนทานต่อสภาพที่จำกัด (stress environment) รวมทั้ง ในการปรับปรุงลักษณะคุณภาพของผลผลิต และการเจริญเติบโต (จรัชรืต, 2544)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์
2. กล้องจุลทรรศน์ microscope
3. ขวดกลม
4. ขี้าวฟาง
5. เข็มเย็บ มีดผ่าตัด
6. ขี้เลื่อย
7. คอขวดพลาสติก
8. เครื่องซั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
9. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น หลอดทดลอง จานเพาะเลี้ยง
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์
11. ตู้เปื้อยเชื้อ (lamina airflow)
12. ถังพลาสติกทนร้อน
13. น้ำกลั่น
14. ขางรัดและกระดวย
15. สำลี
16. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
17. เห็ดนางฟ้าภูฐาน (the phoenix mushroom): *Pleurotussajor-caju*
18. เห็ดนางรม (the oyster mushroom): *Pleurotusostreatus*
19. อาหารเลี้ยงเชื้อPDA(Potato dextrose agar)

วิธีการทดลอง

3.1 การปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus* sp.

วางแผนการทดลองการผสมข้ามสายพันธุ์แบบ โมโน-โมโน (Mono-Mono Crossing) ระหว่างเห็ดนางรม 2 สายพันธุ์ ได้แก่ นางรมสายพันธุ์ A และนางรมสายพันธุ์ B และเห็ดนางฟ้าภูฐาน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ A และเห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ B โดยทำการผสมข้ามสายพันธุ์พ่อและแม่ ดังตารางที่ 1 สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด พ่อแม่ และ

สายพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ ขอบดอกเห็ด ผิวหมากเห็ด ครีบ ก้าน จำนวนดอกเห็ดต่อครั้ง และการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ลูกผสม

ตารางที่ 1 การผสมข้ามสายพันธุ์เห็ดเห็ดนางรม(*Pleurotus ostreatus*(Jacq:Fr)Kummer) และเห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajorcaju*(Fr.)Singer) แบบ Mono-Mono Crossing

พ่อ		แม่		ลูกผสม
นางรม A	+	นางรม B	=	C1
เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ A	+	เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ B	=	C2
นางรม A	+	เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ A	=	C3
นางรม A	+	เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ B	=	C4
นางรม B	+	เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ A	=	C5
นางรม B	+	เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ B	=	C6

3.2 การเตรียมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว(monokaryon)

3.2.1 ขั้นตอนการแยกเชื้อเห็ดเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร

3.2.1.1 ใช้เข็มเย็บหุบแอลกอฮอล์พร้อมลนไฟฆ่าเชื้อที่ปลายเข็มเย็บไล่ขึ้นมาเรื่อยๆจนถึงส่วนของด้ามที่ใช้จับการลนเข็มควรลนในแนวตรงเพื่อให้เข็มเย็บถูกเปลวไฟให้มากที่สุดถือเข็มให้ปลายเข็มอยู่ในอากาศนาน 15-20 วินาทีและอย่าให้ปลายเข็มสัมผัสกับส่วนใดๆภายในตู้เชื้อ

3.2.1.2 ใช้มือฉีกดอกเห็ดออกเป็น 2 ส่วนแล้วใช้เข็มเย็บจิกชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อภายในดอก โดยเลือกเนื้อเยื่อระหว่างก้านดอกกับหมวกเห็ดใช้เข็มเย็บจิกเนื้อเยื่อติดมาเพียงเล็กน้อยก็พอสอดเข็มเย็บที่มีเนื้อเยื่อติดอยู่ที่ส่วนปลายเข้าไปวางเนื้อเยื่อบนอาหารวุ้น PDA ค้างเข็มออกลนไฟฆ่าเชื้อที่จานอาหารวุ้นก่อนปิดฝา

2.2.1.3 นำจานอาหารวุ้นเก็บในที่มืดและอุณหภูมิสูงจะช่วยให้เส้นใยเห็ดเดินเต็มได้เร็วขึ้นภายใน 10-15 วันเมื่อเส้นใยเดินเต็มอาหารวุ้นแล้วนำไปขยายลงในเมล็ดข้าวฟ่างต่อไป

3.2.2 การตรวจเส้นใย นำเส้นใยมาเติมสี phloxine B ผสมโปดัสเซียมไฮดรอกไซด์ 2% เพื่อตรวจสอบข้อผิดพลาดระหว่างเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าไม่พบข้อผิดพลาดระหว่างเซลล์ แสดงว่าเป็นเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryon) หากพบข้อผิดพลาดระหว่างเซลล์แสดงว่าเป็นเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryon)

3.2.3 การผสมพันธุ์ โดยตัดเส้นใยวุ้นจาก PDA ที่ตรวจเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วโดยใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่มี PDA วางคู่ผสมห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มที่

อุณหภูมิห้องอีก 14-21 วัน ก็จะสามารถตรวจสอบการผสมที่เข้ากันได้ โดยการตรวจหาข้อผิดพลาดระหว่างเซลล์ เส้นใยที่ใช้ตรวจสอบให้นำมาจากบริเวณที่มีการเชื่อมประสานระหว่างเส้นใยทั้ง 2 สายเชื้อ ถ้าตรวจพบข้อผิดพลาดระหว่างเซลล์ (clamp connection) แสดงว่าคู่ผสมคู่ นั้นผสมกันได้

3.2.4 การวัดการเจริญเติบโตของเส้นใย เตรียมวุ้นอาหาร PDA ใส่จานเพาะเลี้ยง นำเชื้อที่ต้องการวัด วางลงตรงกลางจานเลี้ยง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใย

3.3 ขั้นตอนการเพาะเชื้อเห็ดในถุงขี้เลื่อย

3.3.1 การเลี้ยงเชื้อเห็ดลูกผสมบนอาหารวุ้น PDA นำชิ้นส่วนของเส้นใยขนาด 1x1 เซนติเมตร วางบนอาหารวุ้น PDA เลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อประมาณ 7 วัน เมื่อเส้นใยเดินเต็ม บนอาหาร PDA นำเชื้อเห็ดที่ได้เข้าไปในขวดเมล็ดข้าวฟ่าง

3.3.2 ขั้นตอนการเตรียมเมล็ดข้าวฟ่างแช่เมล็ดข้าวฟ่างในน้ำประมาณ 10-12 ชั่วโมงต้ม หรือนึ่งให้สุกพอเมล็ดแตกผึ่งให้แห้งบรรจุใส่ขวดแบนประมาณหนึ่งส่วนสองของขวด ปิดจุกสำลี แล้วหุ้มด้วยกระดาษนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาทีทิ้งไว้ให้เย็น แล้ว

3.3.3 การเลี้ยงเชื้อเห็ดจากเมล็ดข้าวฟ่างหลังจากเชื้อเจริญจนเต็มบนอาหาร PDA แล้วจึงตัด ชิ้นเชื้อบนอาหาร PDA ขนาด 1x1 เซนติเมตรวางบนเมล็ดข้าวฟ่างที่เตรียมไว้ เลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อประมาณ 14-21 วันหรือรอเส้นใยเดินเต็ม พร้อมทั้งจะนำไปแช่ลงบนก้อนเห็ด

3.3.4 ขั้นตอนการเตรียมก้อนเชื้อ

วัสดุผลิตก้อนเชื้อเห็ด

ขี้เลื่อย	100 กิโลกรัม
ดีเกลือ	0.1 กิโลกรัม
ปูนขาว	1 กิโลกรัม

3.3.4.1 นำวัสดุทั้งหมดคลุกเคล้าให้เข้ากัน โดยพรมน้ำให้มีความชื้นพอเหมาะ วิธีตรวจสอบความชื้นว่าพอเหมาะหรือไม่โดยใช้มือกำวัสดุที่ผสมเข้ากันดีแล้ว หยิบหนึ่งกำมือให้แน่น จะไม่มีน้ำไหลออกมาโดยที่ยังเป็นก้อน หากระหว่างบีบมีน้ำไหลออกมาแสดงว่าแฉะเกินไป

3.3.4.2 บรรจุใส่ถุงพลาสติกที่เพาะเห็ดให้แน่น ซึ่งควรบรรจุให้หมดภายในวันเดียว ถุงก้อนเชื้อมีน้ำหนักประมาณ 800 กรัม เมื่ออัดก้อนเชื้อแน่นดีแล้ว ใส่คอขวดพลาสติก รัดยางให้แน่น อุดด้วยสำลีและปิดด้วยกระดาษ

3.3.4.3 นำก้อนเชื้อที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อทันที เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง นับตั้งแต่น้ำเดือด

3.3.4.4 นำก้อนเห็ดที่หนึ่งแล้วออกจากถังหนึ่ง ทิ้งไว้ให้เย็น ทำการเขียนเชื้อเห็ดที่ทำการเลี้ยงไว้ในเมล็ดข้าวฟ่าง ประมาณ 10-20 เมล็ด อาจทำในโรงบ่มก้อนเชื้อในเวลาเย็น ลมไม่แรง

3.3.4.5 นำก้อนเชื้อที่ถ่ายก้อนเชื้อเห็ดเรียบร้อยแล้วบ่มในโรงบ่มก้อนเชื้อต่อไป

3.4 การบ่มก้อนเชื้อเห็ด(ดีพร้อม, 2551)

หลังจากใส่เชื้อเห็ดลงในถุงก้อนเชื้อแล้ว นำไปบ่มเชื้อในโรงบ่มที่อากาศถ่ายเทได้สะดวก มีอุณหภูมิประมาณ 29-32 องศาเซลเซียส เพื่อให้เส้นใยเจริญในก้อนเชื้อ และต้องหมั่นตรวจแมลง เช่น มด แมลงสาบ ปลวก ไรต่าง ๆ หอยทาก หากพบให้รีบนำก้อนเชื้อไปกำจัดทันที หรืออาจพ่นด้วยสารสกัดสมุนไพร เช่น ตะไคร้หอม ยาสูบ รอบ ๆ โรงบ่ม มีการใช้ปูนขาวโรยรอบ ๆ โรงบ่ม เพื่อป้องกันหอยทาก

เมื่อก้อนเชื้อเห็ดมีการทำลายจากมด แมลงสาบ ปลวก ไรต่าง ๆ หรือหอยทาก ทำให้ก้อนเชื้อมีเชื้ออื่นขึ้นปะปน มีการทำลายก้อนเชื้อเห็ดไม่มากนัก สามารถนำก้อนเชื้อนี้ไปต่ีก้อนเชื้อใหม่ได้ โดยนำไปหนึ่งฆ่าเชื้อก่อนที่จะสามารถนำไปเพาะเชื้อเห็ดชนิดอื่นต่อไปได้เช่น นางฟ้าหรือเห็ดฟางในโรงบ่มเชื้อเห็ดนั้น จะไม่มีการรดน้ำ ไม่ต้องการแสง ดังนั้นในโรงบ่มจึงควรมีเพียงแสงสลัว ๆ ก็พอ เพราะถ้าหากแสงมากเกินไป เส้นใยเห็ดจะเจริญเข้าการบ่มก้อนเชื้อเห็ด จะใช้เวลาประมาณ 60 วัน เชื้อจะเดินเต็มถุงเป็นเส้นใยสีขาว ๆ แล้วจึงจะนำไปเปิดปากถุง

3.5 วิธีการเปิดปากถุง(สรานนท์, 2537)

3.5.1 เอาเฉพาะลำโถงวิธีการเปิดแบบนี้เหมาะสำหรับเห็ดนางฟ้าภูฐาน ซึ่งจะทำให้ได้ดอกเห็ดที่มีขนาดสมบูรณ์ ก้านยาว ตรงแต่อาจจะเก็บดอกได้ยากเนื่องจากติดคอขวดทำให้ด้านข้างเวลาถึงและจะต้องทำการแกะเศษที่ขาดนั้นออกจากก้อนเชื้อให้หมดเพราะจะทำให้เป็นแหล่งอาหารของแมลงและเชื้อราได้ และทำให้ก้อนเชื้อเสีย

3.5.2 เอาลำโถงและคอขวดออกและพับปากถุงให้เหมือนเดิมกับตอนที่มัดคอขวด วิธีนี้เหมาะสำหรับเห็ดนางฟ้าซึ่งคล้ายกับวิธีแรก แต่วิธีนี้จะทำให้เก็บดอกเห็ดได้ง่ายกว่าด้านไม่ขาดเวลาถึง แต่อาจจะทำให้มีน้ำเข้าไปข้างในก้อนเชื้อเห็ดได้จึงควรมีการกรีดด้านล่างถุงเชื้อเห็ดเพื่อป้องกันการข้างของน้ำ

3.5.3 การกรีดข้างถุงหรือการเจาะรูก้อนเชื้อเห็ดโดยการใช้มีดกรีดข้างถุงเห็ด และทำเป็นกากบาทประมาณ 4-7 แห่งเพื่อให้ดอกเห็ดออก วิธีนี้จะไม่มีน้ำข้างในก้อนเชื้อไม่มีโรคและแมลงมารบกวน สามารถวางก้อนเชื้อเห็ดได้หลายวิธี ทั้งแนวดิ่งแนวนอน หรือจะแขวนไว้ก็ได้

3.5.4 การตัดปากถุงพลาสติกออกจนถึงก่อนเชื้อเห็ดวิธีนี้เหมาะสำหรับ เห็ดขอนซึ่งเป็นเห็ดที่มีดอกเล็กและออกกระจายทั่วทั้งก้อนจึงจำเป็นต้องเปิดหน้าก้อนเชื้อเห็ดออกทั้งหมดเพื่อให้สะดวกต่อการออกดอกและง่ายต่อการเก็บดอกอีกด้วย

3.5.5 การเอาพลาสติกออกทั้งหมดเหลือแต่ตัวก้อนเชื้อเห็ดวิธีนี้จะทำให้เห็ดสามารถออกดอกได้ทุกทิศทาง แต่ก้อนเชื้อเห็ดจะแห้งไวจึงควรมีการรดน้ำก้อนเชื้อเห็ดบ่อยๆ หรือมีการนำฟางหรือวัสดุอื่นมาช่วยรักษาความชุ่มชื้นแต่วิธีนี้จะทำให้อายุของก้อนเชื้อเห็ดสั้นลง

3.6 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ลูกผสมเห็ดสกุล *Pleurotus* sp.

3.6.1 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ลูกผสม มีวิธีการ ดังนี้ เชื้อเส้นใยลูกผสมตรงกลางจานอาหาร PDA อายุ 30 วัน วางบนจานอาหาร PDA ใหม่ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 21 วัน เชื้อเส้นใยลูกผสมวางบนอาหาร PDA ใน vial บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 21 วัน ติด label บันทึก ชนิดเชื้อเห็ดลูกผสมบริสุทธิ์ วันเวลาที่เก็บเชื้อ

3.6.2 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์พ่อแม่ เชื้อเส้นใยบริสุทธิ์พ่อแม่วางบนอาหาร PDA ใน vial บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 21 วัน ติด label บันทึก ชนิดเชื้อเห็ดพ่อแม่ บริสุทธิ์ วันเวลาที่เก็บเชื้อ



บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus* sp. แบบ Mono-Mono Crossing

จากการศึกษาการผสมเห็ดในสกุล *Pleurotus* sp. ได้แก่ เห็ดนางรม(*Pleurotus ostreatus*) จำนวน 2 สายพันธุ์ได้แก่ นางรม A และนางรม B และเห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus sajor-caju*) 2 สายพันธุ์ได้แก่ นางฟ้าภูฐาน A นางฟ้าภูฐาน B แบบโมโน-โมโน (Mono-Mono Crossing) ได้ลูกผสมทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่

- | | | | |
|-----------|---|--------------|------|
| 1. นางรมA | + | นางฟ้าภูฐานA | = C3 |
| 2. นางรมA | + | นางฟ้าภูฐานB | = C4 |
| 3. นางรมB | + | นางฟ้าภูฐานA | = C5 |
| 4. นางรมB | + | นางฟ้าภูฐานB | = C6 |

เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสมที่ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสมมีความแตกต่างจากพ่อแม่ ดังตารางที่ 3 - 5 ดังนี้

1. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสม C1 และ C2 มีลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนพ่อแม่
2. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสม C3 มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างจากพ่อแม่ ดังนี้ ขอบหมวกเห็ดหยัก ผิวของหมวกเห็ดมีขนละเอียดสีขาวปกคลุมคล้ายขนกำมะหยี่ เนื้อหมวกมีสีน้ำตาลขอบขาว ขอบของครีบริบไม่เรียบ จำนวนการออกดอกเห็ดต่อครั้งเป็นกระจุก 3-6 ดอก
3. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสม C4 มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างจากพ่อแม่ ดังนี้ขอบหมวกเห็ดหยัก เนื้อหมวกมีสีน้ำตาลขอบขาวผิวของหมวกเห็ดมีขนละเอียดสีขาวปกคลุมคล้ายขนกำมะหยี่ ขอบของครีบริบไม่เรียบ จำนวนการออกดอกเห็ดต่อครั้งเป็นกระจุก 2-4 ดอก
4. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสม C5 มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างจากพ่อแม่ ดังนี้ขอบหมวกเห็ดเรียบ เนื้อหมวกมีสีน้ำตาลขอบขาว กลีบเป็นมัน ขอบของครีบริบเรียบ จำนวนการออกดอกเห็ดต่อครั้งเป็นกระจุก 2-4 ดอก
5. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสม C6 มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างจากพ่อแม่ ดังนี้ขอบหมวกเห็ดหยักผิวของหมวกเห็ดมีขนละเอียดสีขาวปกคลุมคล้ายขนกำมะหยี่ เนื้อหมวกมีสีน้ำตาลขอบขาวขอบของครีบริบเรียบ จำนวนการออกดอกเห็ดต่อครั้งเป็นกระจุก 2-4 ดอก





จากลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสมทั้ง 4 สายพันธุ์พบว่าลูกผสมสายพันธุ์ C3 จัดเป็นลูกผสมที่ดีที่สุด เนื่องจากสามารถออกดอกเห็ดได้นานที่สุดและมีลักษณะสัณฐานวิทยาของ

ขนาดดอกเห็ด เนื้อหวมก และก้านดอกเห็ด มีลักษณะเป็นที่ต้องการของท้องตลาด รองลงมา ได้แก่ ลูกผสมสายพันธุ์ C5 สายพันธุ์ C6 และสายพันธุ์ C4 ตามลำดับ ดังตารางที่ 2-5 ภาพที่ 5-8

ตารางที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ ขนาดของหวมกดอก ขนาดของก้านดอก น้ำหนักดอกต่อการเก็บหนึ่งครั้ง ของสายพันธุ์พ่อ-แม่ และลูกผสม

สายพันธุ์	ขนาดของหวมกดอก	ขนาดของก้านดอก	น้ำหนักดอก
นางรมA	3-5 เซนติเมตร	1-2 เซนติเมตร	45 กรัม
ภูฐานA	4-6 เซนติเมตร	0.5-1.5 เซนติเมตร	48 กรัม
นางรมB	3-5 เซนติเมตร	1-2 เซนติเมตร	43 กรัม
ภูฐานB	4-6 เซนติเมตร	0.5-1.5 เซนติเมตร	47 กรัม
C1	3-5 เซนติเมตร	1-2 เซนติเมตร	45 กรัม
C2	4-6 เซนติเมตร	0.5-1.5 เซนติเมตร	43 กรัม
C3	3-5 เซนติเมตร	0.5-1.5 เซนติเมตร	50 กรัม
C4	4-6 เซนติเมตร	1-2 เซนติเมตร	40 กรัม
C5	3-5 เซนติเมตร	1-2 เซนติเมตร	46 กรัม
C6	4-5 เซนติเมตร	0.5-1.5 เซนติเมตร	44 กรัม

ตารางที่ 3 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของสายพันธุ์พ่อแม่และแม่ ได้แก่ นางรม A, ภูฐาน A, นางรม B และภูฐาน B

ลักษณะพื้นฐาน/ชนิดของลูกผสม	นางรม A	ภูฐาน A	นางรม B	ภูฐาน B
1. รูปเห็ด				
2. ขอบของหมวกเห็ด				
- รูปร่างแบบผ่าแบ่งครึ่ง	แบบยกขึ้น	แบบยกขึ้น	แบบยกขึ้น	แบบยกขึ้น
- รูปร่างของขอบหมวก	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ
- ผิวของขอบหมวก	รอยขีดบนผิว	รอยขีดบนผิว	รอยขีดบนผิว	รอยขีดบนผิว
3. ผิวของหมวก	เกลี้ยงเป็นมัน	เกลี้ยงเป็นมัน	เกลี้ยงเป็นมัน	เกลี้ยงเป็นมัน
4. เนื้อหมวก	สีครีม	สีน้ำตาล	สีครีม	สีน้ำตาล
5. ลักษณะของครีบ				
- การติดกันของก้านกับครีบ	เรียวยาวลงไปติดก้าน	เรียวยาวลงไปติดก้าน	เรียวยาวลงไปติดก้าน	เรียวยาวลงไปติดก้าน
- ขอบของครีบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ
- ระยะห่างระหว่างครีบ	ใกล้ชิดกัน	ใกล้ชิดกัน	ใกล้ชิดกัน	ใกล้ชิดกัน



ตารางที่ 3 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของสายพันธุ์พ่อแม่ ได้แก่ นางรม A, ภูฐาน A, นางรม B และภูฐาน B(ต่อ)

6. ลักษณะของก้าน				
- การติดของก้านกับหมวก	ติดตรงกลาง	ติดตรงกลาง	ติดตรงกลาง	ติดตรงกลาง
- รูปร่างของก้าน	เรียวจากปลายถึงโคน	เรียวจากปลายถึงโคน	เรียวจากปลายถึงโคน	เรียวจากปลายถึงโคน
- ผิวของก้าน	เส้นตามยาว	เส้นตามยาว	เส้นตามยาว	เส้นตามยาว
- เนื้อในก้าน	ตัน	ตัน	ตัน	ตัน
- เชื้อหุ้มกรีบ	-	-	-	-
- รูปร่างและตำแหน่งของวง แหวน	วงแหวนตอนล่าง	วงแหวนตอนล่าง	วงแหวนตอนล่าง	วงแหวนตอนล่าง
- เปลือกหุ้มดอกอ่อน	-	-	-	-
7. ลักษณะการติดของดอกเห็ด	มีก้านตรงกลาง	มีก้านตรงกลาง	มีก้านตรงกลาง	มีก้านตรงกลาง
8. ลักษณะการเจริญของดอกเห็ด	ขึ้นเป็นกระจุก2-4ดอก	ขึ้นเป็นกระจุก2-4ดอก	ขึ้นเป็นกระจุก2-4ดอก	ขึ้นเป็นกระจุก2-4ดอก

ตารางที่ 4 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของสายพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ C1, C2 และ C3 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ แบบ Mono-Mono Crossing

ลักษณะพื้นฐาน/ชนิดของลูกผสม	นางรมA + นางรมB รหัส C1	ภูฐานA + ภูฐานB รหัส C2	นางรมA + ภูฐานA รหัส C3
1. รูปเห็ด			
2. ขอบของหมวกเห็ด			
- รูปร่างแบบผ่าแบ่งครึ่ง	แบบยกขึ้น	แบบยกขึ้น	แบบยกขึ้น
- รูปร่างของขอบหมวก	เรียบ	เรียบ	หยัก
- ผิวของขอบหมวก	รอยขีดบนผิว	รอยขีดบนผิว	รอยขีดบนผิว
3. ผิวของหมวก	เกลี้ยงเป็นมัน	เกลี้ยงเป็นมัน	มีขนละเอียดสีขาวปกคลุม* คล้ายขนกำมะหยี่
4. เนื้อหมวก	สีขาว	สีน้ำตาลครีม	สีน้ำตาลขอบขาว*
5. ลักษณะของครีป			
- การติดกันของก้านกับครีป	เรียวยาวลงไปติดก้าน	เรียวยาวลงไปติดก้าน	เรียวยาวลงไปติดก้าน

ตารางที่ 4 ลักษณะฐานวิทยาของสายพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ C1, C2 และ C3 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ แบบ Mono-Mono Crossing(ต่อ)

- ขอบของครีบ	เรียบ	ไม่เรียบ	ไม่เรียบ
- ระยะห่างระหว่างครีบ	ใกล้เคียงกัน	ใกล้เคียงกัน	ใกล้เคียงกัน
6. ลักษณะของก้าน			
- การติดของก้านกับหมวก	ติดตรงกลาง	ติดตรงกลาง	ติดตรงกลาง
- รูปร่างของก้าน	เรียวจากปลายถึงโคน	เรียวจากปลายถึงโคน	เรียวจากปลายถึงโคน
- ผิวของก้าน	เส้นตามยาว	เส้นตามยาว	เส้นตามยาว
- เนื้อในก้าน	ตัน	ตัน	ตัน
- เชื้อหุ้มครีบ	-	-	-
- รูปร่างและตำแหน่งของวงแหวน	วงแหวนตอนล่าง	วงแหวนตอนล่าง	วงแหวนตอนล่าง
- เปลือกหุ้มดอกอ่อน	-	-	-
7. ลักษณะการติดของดอกเห็ด	มีก้านตรงกลาง	มีก้านตรงกลาง	มีก้านตรงกลาง
8. ลักษณะการเจริญของดอกเห็ด	ขึ้นเป็นกระจุก 2-4 ดอก	ขึ้นเป็นกระจุก 2-4 ดอก	ขึ้นเป็นกระจุก 3-6 ดอก*

หมายเหตุ * ลักษณะฐานวิทยาที่แตกต่างจากพ่อ-แม่

ตารางที่ 5 ลักษณะพื้นฐานวิทยาศาสตร์ลูกผสม ได้แก่ C4, C5 และ C6 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ แบบ Mono-Mono Crossing

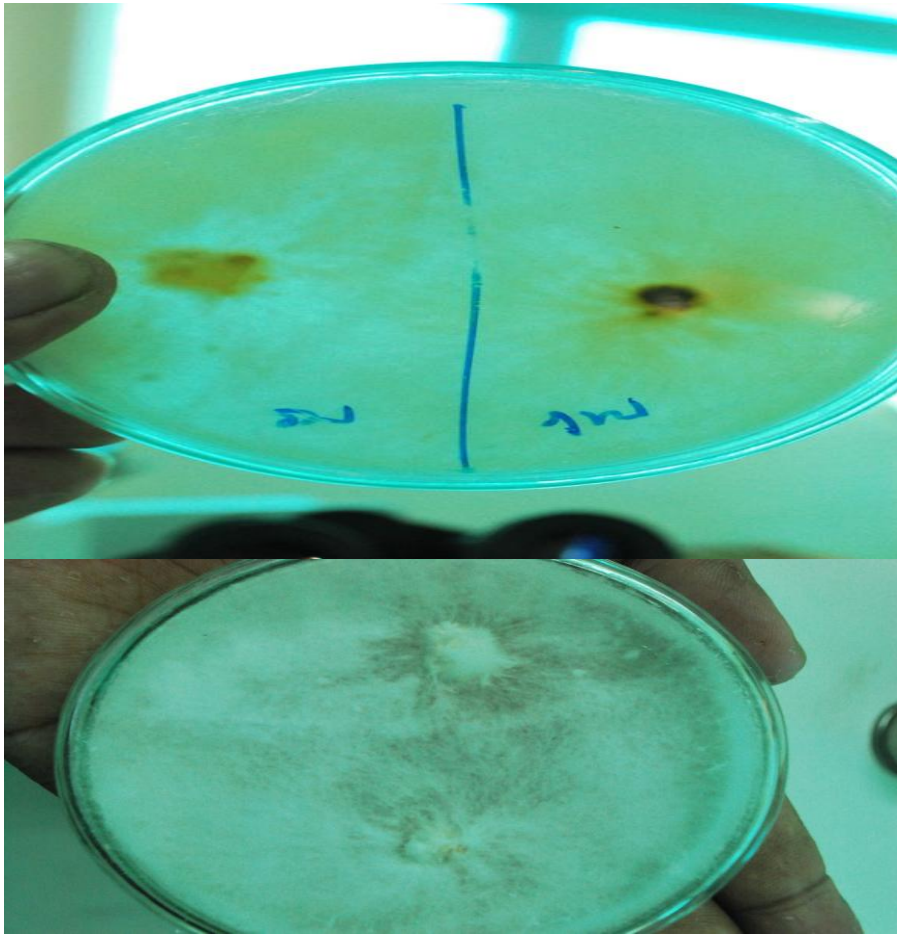
ลักษณะพื้นฐาน/ชนิดของลูกผสม	นางรมA + ภูฐานB รหัส C4	นางรมB + ภูฐานA รหัส C5	นางรมB + ภูฐานB รหัส C6
1. รูปเห็ด			
2. ขอบของหมวกเห็ด			
- รูปร่างแบบผ่าแบ่งครึ่ง	แบบยกขึ้น	แบบยกขึ้น	แบบยกขึ้น
- รูปร่างของขอบหมวก	หยัก	เรียบ	เรียบ
- ผิวของขอบหมวก	รอยขีดบนผิว	รอยขีดบนผิว	รอยขีดบนผิว
3. ผิวของหมวก	มีขนละเอียดสีขาวปกคลุม* คล้ายขนกำมะหยี่	เกลี้ยงเป็นมัน	มีขนละเอียดสีขาวปกคลุม* คล้ายขนกำมะหยี่
4. เนื้อหมวก	สีน้ำตาลขอบขาว*	สีน้ำตาลขอบขาว*	สีน้ำตาลขอบขาว*



ตารางที่ 5 ลักษณะพื้นฐานวิทยาศาสตร์ถูกผสม ได้แก่ C4, C5 และ C6 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ แบบ Mono-Mono Crossing(ต่อ)

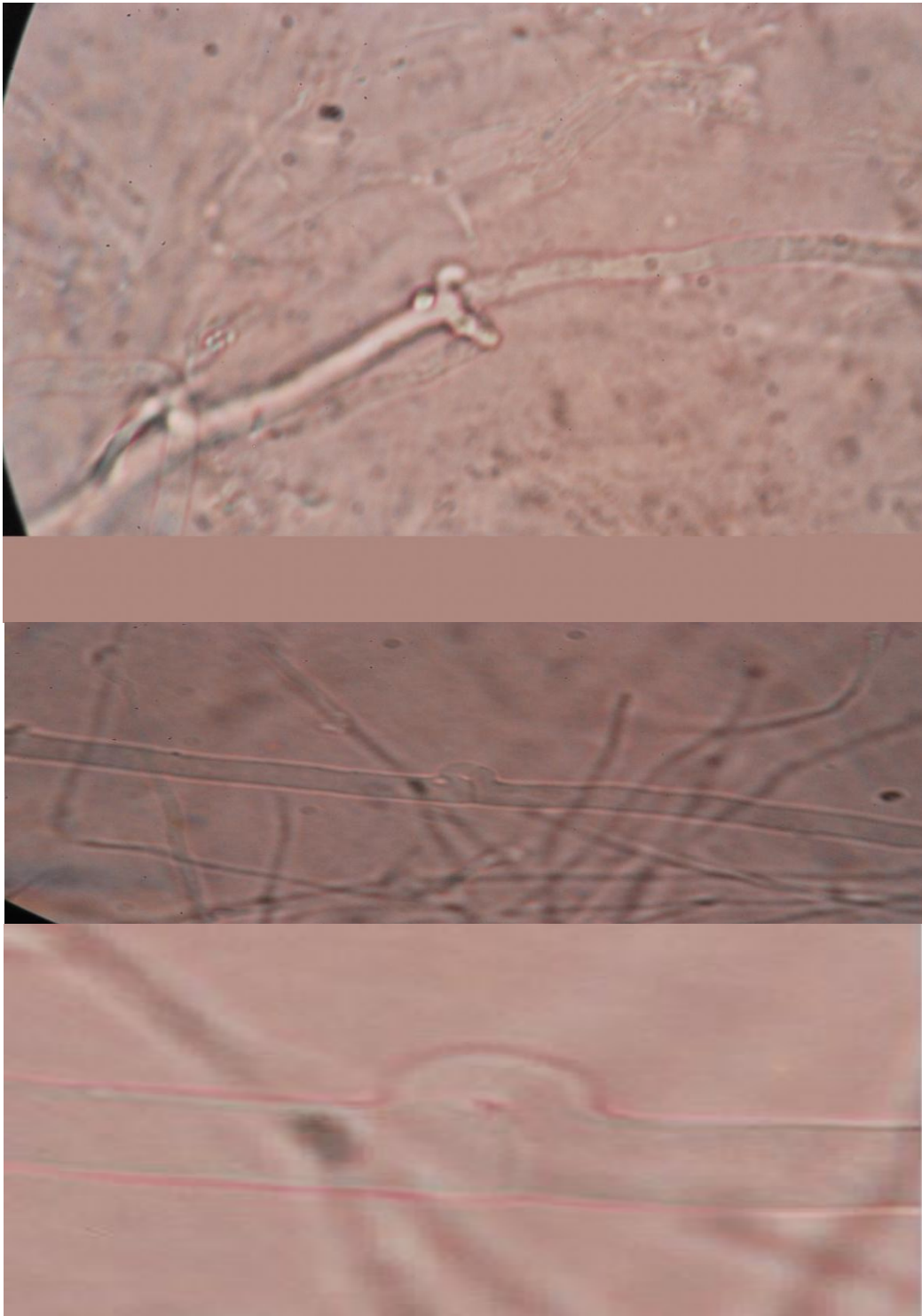
5. ลักษณะของครีป			
- การติดกันของก้านกับครีป	เรียวยาวลงไปติดก้าน	เรียวยาวลงไปติดก้าน	เรียวยาวลงไปติดก้าน
- ขอบของครีป	ไม่เรียบ	เรียบ	เรียบ
- ระยะห่างระหว่างครีป	ใกล้ชิดกัน	ใกล้ชิดกัน	ใกล้ชิดกัน
6. ลักษณะของก้าน			
- การติดของก้านกับหมวก	ติดตรงกลาง	ติดตรงกลาง	ติดตรงกลาง
- รูปร่างของก้าน	เรียวยาวปลายถึงโคน	เรียวยาวปลายถึงโคน	เรียวยาวปลายถึงโคน
- ผิวของก้าน	เส้นตามยาว	เส้นตามยาว	เส้นตามยาว
- เนื้อในก้าน	ตัน	ตัน	ตัน
- เชื้อหุ้มครีป	-	-	-
- รูปร่างและตำแหน่งของวงแหวน	วงแหวนตอนล่าง	วงแหวนตอนล่าง	วงแหวนตอนล่าง
- เปลือกหุ้มดอกอ่อน	-	-	-
7. ลักษณะการติดของดอกเห็ด	มีก้านตรงกลาง	มีก้านตรงกลาง	มีก้านตรงกลาง
8. ลักษณะการเจริญของดอกเห็ด	ขึ้นเป็นกระจุก 2-4 ดอก	ขึ้นเป็นกระจุก 2-4 ดอก	ขึ้นเป็นกระจุก 2-4 ดอก

หมายเหตุ * ลักษณะพื้นฐานวิทยาศาสตร์ที่แตกต่างจากพ่อ-แม่



ภาพที่ 5 ลักษณะเส้นใยลูกผสม C3 บนอาหาร PDA อายุ 21-28 วัน



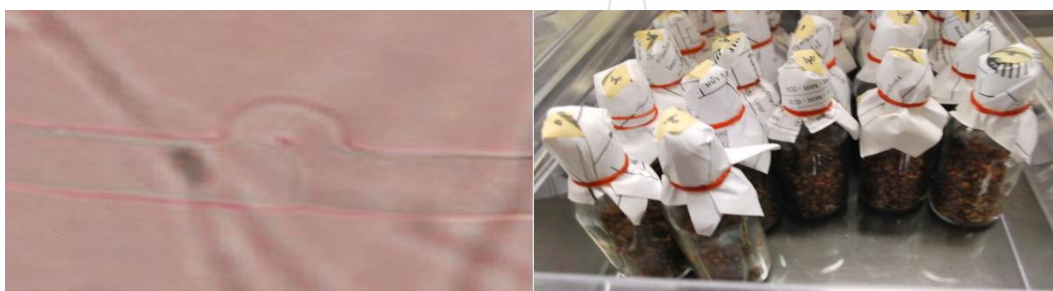


ภาพที่ 6 ลักษณะ Clamp connection ลูกผสม C3



ก.

ข.



ค.

ง.



จ.

ฉ.

ภาพที่ 7 ขั้นตอนการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus* sp. แบบ โมโน-โมโน (Mono-Mono Crossing)

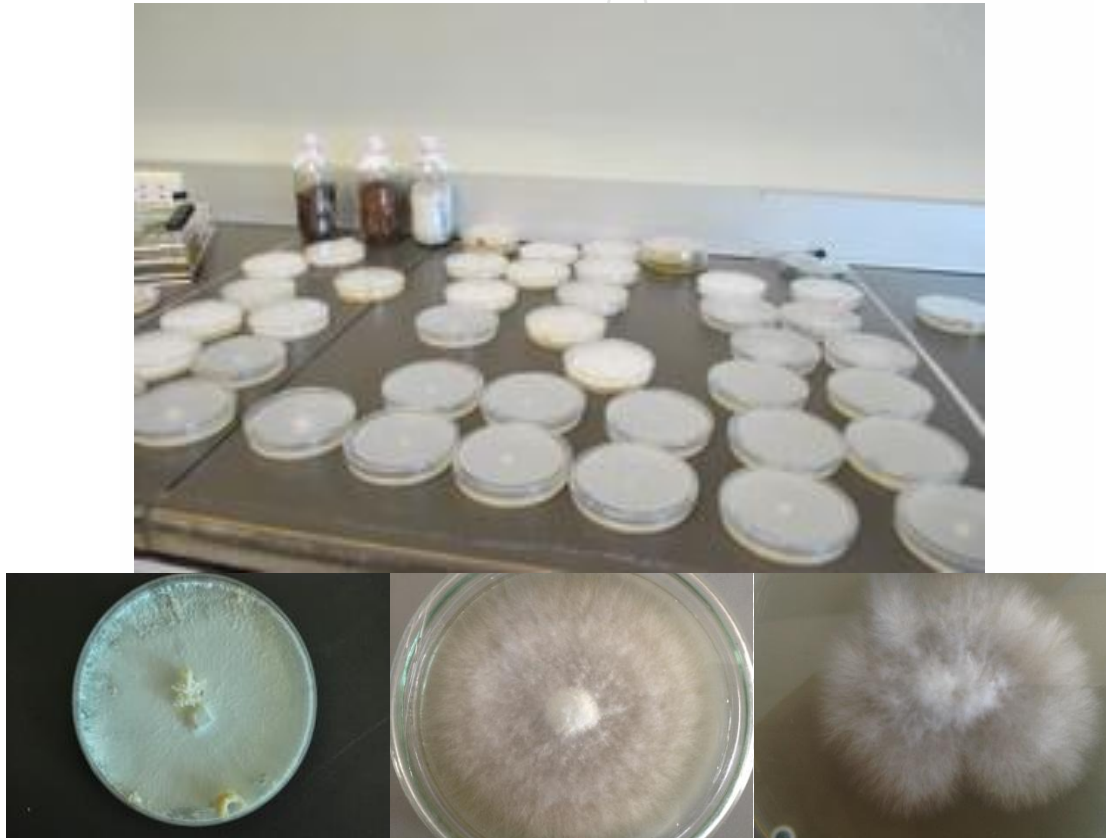
- ก. การเตรียมเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (Monokaryon)
- ข. การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้ได้นิวเคลียสคู่ (Dikaryon)
- ค. การตรวจสอบ Clamp connection ลูกผสม
- ง. การเก็บเชื้อบนข้าวฟ่าง
- จ. การเพาะเห็ดลูกผสมในถุงซีลีย่อย
- ฉ. การเกิดดอกของลูกผสม



ภาพที่ 8 ลักษณะสัณฐานวิทยาดอกเห็ดลูกผสม C3 ที่เกิดจากการผสมระหว่าง นางรม A และนางฟ้าภูฐาน A

4.2 การเก็บรักษาเชื้อเห็ดบริสุทธิ์

จากการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ลูกผสมเชื้อเห็ดสกุล *Pleurotus* sp. สามารถเก็บรักษาเชื้อเห็ดลูกผสมบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ C3 สายพันธุ์ C4 สายพันธุ์ C5 และสายพันธุ์ C6 ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 เชื้อเห็ดบริสุทธิ์บนอาหาร PDA

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดสกุล *Pleurotus* sp.

จากการศึกษาเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์ โดยผสมแบบ โมโน-โมโน (Mono-Mono Crossing) สายพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการทดลองมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่และแม่ในส่วนรูปร่างขอบหมวก, ผิวของหมวก, เนื้อหมวก, ขอบของครีบและ ลักษณะการเจริญของดอกเห็ดมีรายละเอียดดังนี้

1. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสม C1 และ C2 มีสัณฐานวิทยาเหมือนพ่อแม่
2. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสม C3 มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาแตกต่างจากพ่อแม่ ดังนี้ ขอบหมวกเห็ดหยัก ผิวของหมวกเห็ดมีขนละเอียดสีขาวปกคลุมคล้ายขนกำมะหยี่ เนื้อหมวกมีสีน้ำตาลขอบขาว ขอบของครีบไม่เรียบ จำนวนดอกเห็ดต่อครั้งเป็นกระจุก 3-6 ดอก
3. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสม C4 มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาแตกต่างจากพ่อแม่ ดังนี้ขอบหมวกเห็ดหยัก เนื้อหมวกมีสีน้ำตาลขอบขาวผิวของหมวกเห็ดมีขนละเอียดสีขาวปกคลุมคล้ายขนกำมะหยี่ ขอบของครีบไม่เรียบ จำนวนดอกเห็ดต่อครั้งเป็นกระจุก 2-4 ดอก
4. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสม C5 มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาแตกต่างจากพ่อแม่ ดังนี้ขอบหมวกเห็ดเรียบ เนื้อหมวกมีสีน้ำตาลขอบขาว กลีบเป็นมัน ขอบของครีบเรียบ จำนวนดอกเห็ดต่อครั้งเป็นกระจุก 2-4 ดอก
5. ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกผสม C6 มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาแตกต่างจากพ่อแม่ ดังนี้ขอบหมวกเห็ดหยักผิวของหมวกเห็ดมีขนละเอียดสีขาวปกคลุมคล้ายขนกำมะหยี่ เนื้อหมวกมีสีน้ำตาลขอบขาวขอบของครีบเรียบ จำนวนดอกเห็ดต่อครั้งเป็นกระจุก 2-4 ดอก

จากการเปรียบเทียบขนาดของดอกเห็ด ขนาดของก้านดอกและ น้ำหนักดอกต่อการเก็บหนึ่งครั้ง พบว่าสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตดีที่สุดคือสายพันธุ์ลูกผสม C3 ที่ผสมกันระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่และแม่นางรม A และสายพันธุ์พ่อแม่และแม่ภูฐาน A โดยให้น้ำหนักดอก 50 กรัม จัดเป็นลูกผสมที่ดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ ลูกผสมสายพันธุ์ C5 สายพันธุ์ C6 และสายพันธุ์ C4 ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาลูกผสมเห็ดสกุล *Pleurotus* sp. โดยผสมแบบ โมโน-โมโน (Mono-Mono Crossing) ทำให้ได้สายพันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ดี เป็นที่ต้องการในท้องตลาดคือ สายพันธุ์ C3 ซึ่งให้น้ำหนักดอกเห็ดสดดีที่สุด ดังนั้นควรนำไปศึกษาวิจัยต่อยอดเพื่อปรับปรุงพันธุ์ เห็ดลูกผสม *Pleurotus* sp. ให้สามารถออกดอกเห็ดได้ดีในฤดูร้อนจำนวนมากๆ เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ สำหรับการใช้ในการพัฒนากระบวนการเพาะเห็ดสกุล *Pleurotus* sp.



เอกสารอ้างอิง

- จรัสรัส มั่นถาวร. 2544. การสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอม(*Lentinula edodes*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) โดยการรวมโปรโตพลาสต์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2551. ที่ระลึกงานพระราชทานเพลิงศพอาจารย์ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. อักษรสยามการพิมพ์. ภาษีเจริญ, กรุงเทพมหานคร. 102 หน้า.
- ภัทราภรณ์ อิศระทะ. 2540. การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมสีเทาโดยการผสมพันธุ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์(สาขาพืชสวน).
- มังกร เทวสิงห์. 2540. การแยกแผลฟารวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม. วิทยาศาสตร์นิพนธ์เกษตรศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- สมศักดิ์ วรรณศิริ และคณะ. 2529. เพาะเห็ดนางรมนางฟ้า. กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์มิตรสยาม.
- ศรานนท์ เจริญสุข. 2537. คู่มือการเพาะเห็ด. เพชรกะรัต, กรุงเทพมหานคร. 80 หน้า.
- Cohen, Et. Al. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushroom of the genus *Pleurotus*. :**Appl.Microb. Biotech.**
- Zadrazil, F. 1974. The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus eryngi*. Mushroom Science ix(part 1)
- “วงจรชีวิตของเห็ดแบบ heterothallic”, [ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก : http://klarod.blogspot.com/2010_07_01_archive.html [สืบค้นเมื่อ 23 ตุลาคม 2554].
- “ส่วนประกอบของดอกเห็ด”, [ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก : <http://www.siamsouth.com/smf/index.php?topic=17428.0> [สืบค้นเมื่อ 23 ตุลาคม 2554].
- อนันท์ กล้ารอด. 2552. , [ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก : <http://klarod.blogspot.com> [สืบค้นเมื่อ 23 ตุลาคม 2554].

ประวัติผู้ดำเนินการทดลอง

ชื่อ	นาย ชานุกิจ วงศ์เผ่าสกุล
ที่อยู่ปัจจุบัน	ที่อยู่ 12 หมู่ 17 แขวงบางระมาด เขตตลิ่งชัน กรุงเทพมหานคร 10170
เบอร์โทรศัพท์	084 - 0230805
E-mail address	Nongbankza@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายปี 2549 โรงเรียนโพธิสารพิทยากร จังหวัดกรุงเทพมหานคร

