การสร้าง protoplast cell ของเห็ดกระดุมและเห็ดตีนแรด โดยแปรผันสภาวะต่าง ๆ เพื่อให้ได้ protoplast cell ที่มีปริมาณสูงสุดพบว่าสำหรับเห็ดกระดุมเมื่อใช้เส้นใยอายุ 14 วัน และใช้สารละลาย Lyticase enzyme ย่อยผนังเซลล์ระยะเวลาที่เอนไซม์ใช้ย่อยผนังเซลล์ 3 วันจะได้ปริมาณ protoplast cell ในจำนวน $43.7x10^5$ cell/g W.W. และเห็ดตีนแรดเมื่อใช้เส้นใยอายุ 4 วัน และใช้สารละลาย Lysing enzyme ย่อยผนังเซลล์ระยะเวลาที่เอนไซม์ใช้ย่อยผนังเซลล์ 4 วัน จะได้ปริมาณ protoplast cell ในจำนวน $46.9x10^5$ cell/g W.W. ในการ regenerate ของ protoplast cell สำหรับเห็ดกระดุมมี % Regeneration frequency เท่ากับ 45% และเห็ดตีนแรดมี % Regeneration frequency เท่ากับ 79% และเส้นใยที่ได้จากการ regenerate ของ protoplast cell ของเห็ดทั้งสองชนิด จะนำไปใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ การสร้างลูกผสมด้วยวิธี fusion ด้วยสารละลาย PEG พบว่ามีลูกผสม 10 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร PDA คือเห็ดกระดุมลูกผสม (fusant) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ซึ่งเส้นใยสามารถเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงในเวลา 5 7 9 10 11 12 14 14 15 และ 17 วัน ตามลำดับ การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของ PCR product ของเห็ดกระดุมสายพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมรุ่นที่ 1 (*A. bisporus* F 1) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I ผลพบว่า PCR product ของเห็ดกระดุมลูกผสมรุ่นที่ 1 จะมีชิ้น DNA อยู่ 4 ขนาดคือ ขนาด 100 bp 90 bp 80 bp และ 70 bp ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดของชิ้น DNA ที่มีทั้งในเห็ดกระดุมและเห็ดตีนแรดสายพันธุ์พ่อแม่ จากการทดลองผลิตดอกเห็ดของเห็ดกระดุมสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าเห็ดกระดุมสายพันธุ์พ่อแม่สามารถดอกเห็ดจำนวน 5 รุ่น (flush) มีผลผลิตดอกเห็ด 7.8 กก./ตร.ม. และสำหรับเห็ดกระดุมสายพันธุ์ลูกผสมรุ่นที่ 1 2 3 และ 4 สามารถให้ดอกเห็ดจำนวน 5 4 4 และ 3 รุ่น ตามลำดับ และมีผลผลิตดอกเห็ด 4.7 3.2 3.0 และ 2.9 กก./ตร.ม. ตามลำดับ ในการศึกษา DNA ของลูกผสมทั้ง 4 รุ่น พบว่า PCR product ของเห็ดกระดุมลูกผสมรุ่นที่ 1 และรุ่นที่ 2 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I ได้ผลที่เหมือนกันคือจะมีชิ้น DNA อยู่ 4 ขนาดคือ ขนาด 100 bp 90 bp 80 bp และ 70 bp สำหรับ PCR product ของเห็ดกระดุมลูกผสมรุ่นที่ 3 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I จะได้ DNA อยู่ 3 ชิ้นคือ ขนาด 100 bp 90 bp และ 70 bp และ PCR product ของเห็ดกระดุมลูกผสมรุ่นที่ 4 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I จะได้ DNA อยู่ 3 ชิ้นคือ ขนาด 90 bp 80 bp และ 60 bp ซึ่งจะเห็นได้ว่าเห็ดกระดุมลูกผสมยังมีความแปรปรวนของ DNA อยู่

Protoplast cell productions of *Agaricus bisporus* and *Tricholoma crassum* mushroom were studied by varying different conditions to gained the highest protoplast cell. The result showed that using mycelia growth at 14 days of *Agaricus bisporus* and digesting cell wall by Lyticase enzyme for 3 days produced 43.7 x 10 cell/g W.W. and using mycelia growth at 4 days of *Tricholoma crassum* and digesting cell wall by Lytsing enzyme for 4 days produced 46.9 x 10 cee/g W.W. For regeneration frequency, *Agaricus bisporus* was 45% and *Tricholoma crassum* was 79%. Mycelia that produced from regeneration of protoplast cell of both strains were used as parent strian. Hybrids were produced by fusion method using PEG solution. The ten hybrids that significant growth on PDA medium were Fusant no. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 which fully growth of mycelia in Petri dish could be observed on 5, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 14, 15 and 17 days respectively. Comparisons between PCR product of parent strain and *Agaricus bisporus* F1 were performed by digesting with *Hinf* I. The results demonstrated that PCR products of *Agaricus bisporus* F1 contained four DNA size, 100 pb, 90bp, 80bp and 70bp, and the whole of DNA sizes were found in the both of parent strain. Studying on fruiting body production of mushroom revealed that parent strain could produce fruiting body for 5 flush in the yield of 7.8 kg/m^2 and *Agaricus bisporus* F1, F2, F3 and F4 produced fruiting body for 5, 4, 4 and 3 flush respectively. The yield was reached 4.7, 3.2, 3.0 and 2.9 kg/m^2 respectively. The results from DNA studying of four generations of hybrids showed that PCR products of *Agaricus bisporus* F1, and F2 digesting by *Hinf* I presented the same results, that were four sizes at 100 pb, 90bp, 80bp and 70bp. Furthermore, PCR product of *Agaricus bisporus* F3 that digested with *Hinf* I was detected. The three sizes of DNA at 100bp, 90bp and 70bp were observed . In addition, PCR product of *Agaricus bisporus* F4 by digesting with *Hinf* I was also detected , the result showed three sizes of DNA at 90bp, 80bp and 60bp. The results indicated that DNA variation was still found in hybrid.