วรรณภา สัตยาพิสุทธิ์ : ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดอันเนื่องมาจากการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่องเพื่อการเพาะเห็ด (GENETIC INSTABILITY OF MUSHROOMS AS AFFECTED BY CONTINUOUS SUBCULTURING FOR PRODUCTION)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ศ. ดร. นันทกร บุญเกิด, 101 หน้า ISBN 974-7359-93-6

การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดด้วยวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมีความสำคัญคือ มีประสิทธิภาพสูง และ รวดเร็ว จึงมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ตรวจสอบเชื้อเห็ดก่อนที่จะนำไปใช้เพื่อการผลิตต่อไป การดำเนินงานได้กระทำโดย ศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาณผลผลิตควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR-RFLP ในทุกครั้งของการถ่ายเชื้อ ซึ่งเห็ดที่ใช้ในการศึกษา คือเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดกระด้าง เห็ดขอนขาว เห็ดหอม เห็ดยานางิ เห็ดหูหนู และเห็ดตีนแรด จากการศึกษาพบว่าเห็ดบางชนิดมีแนวโน้มของการเจริญ และปริมาณผลผลิตที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดภายหลังการถ่ายเชื้อหลายครั้ง เช่น เห็ดขอนขาว เห็ดกระด้าง และ เห็ดนางฟ้า นอกจากนี้เห็ดดังกล่าวใช้ระยะเวลาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนานมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการถ่ายเชื้อครั้งแรก ส่วนการวิเคราะห์ผล PCR-RFLP ของเห็ดทั้ง 9 ชนิด พบว่าเห็ดทุกชนิดหลังจากการใช้ ITS 4 และ 5 primers เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ได้ขนาดตั้งแต่ 600-800 คู่เบส และภายหลังการตัดดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิด พบว่าเห็ดแต่ละชนิดให้ผลของชิ้นดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ในขณะที่จำนวนการถ่ายเชื้อมากขึ้นเห็ดทุกชนิดยังคงให้ผลของชิ้นดีเอ็นเอ ที่เหมือนเดิม ยกเว้น เห็ดหูหนู ในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 พบว่ามีผลของชิ้นดีเอ็นเอ ที่เปลี่ยนไปจากเชื้อเริ่มต้น เมื่อตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I กล่าวคือในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 พบตำแหน่งที่ตัดจำเพาะของ *Hinf* I ถึง 2 ตำแหน่ง ผลคือภายหลังการตัดดีเอ็นเอ ให้ขนาด 357 และ 263 คู่เบส แต่ในขณะที่เชื้อเริ่มต้นพบตำแหน่งการตัดจำเพาะเพียง 1 ตำแหน่งที่ 300 คู่เบส ทำให้ภายหลังการตัดดีเอ็นเอ ให้ขนาด 300 คู่เบส 2 ชุด ดังนั้นจึงทำการอ่านลำดับเบสของเห็ดหูหนูนี้ เพื่อตรวจสอบหาตำแหน่งที่ *Hinf* I สามารถตัดได้ พบว่าตำแหน่งในการตัดมีความสอดคล้องกับผลของชิ้นดีเอ็นเอ จากนั้นได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสทั้ง 600 คู่เบส พบว่าความเหมือนของลำดับเบสระหว่าง การถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 มีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาถึงลักษณะของดอกเห็ด พบว่า เชื้อเห็ดจากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ให้ลักษณะดอกเห็ดที่ผิดปกติไปจากเชื้อเห็ดเริ่มต้น นอกจากนี้จึงได้ศึกษาถึงยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาดอกเห็ด คือ β-tubulin gene พบว่าเชื้อเห็ดที่มาจากการถ่ายเชื้อครั้งที่สามนั้น มีผลของชิ้นดีเอ็นเอ ที่แตกต่างไปจากเชื้อเห็ดเริ่มต้นปกติ

ส่วนการทดลองหาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดตีนแรด จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรพบว่าวัสดุที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดตีนแรด คือการใช้ดินเป็นวัสดุเพาะโดยใช้กระถางดินเป็นภาชนะสำหรับเพาะ ซึ่งสามารถให้ผลผลิตสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ($P< 0.01$) แตกต่างจากการใช้ดินผสมเปลือกถั่วและ เปลือกถั่วอย่างเดียวเป็นวัสดุเพาะ ตามลำดับ และการคลุมวัสดุเพาะด้วยฟางข้าวและแกลบกับการไม่คลุมวัสดุเพาะ นั้นพบว่ามีผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนัก

ศึกษา……

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่

ปรึกษา……..……..

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ร่วม…….

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ร่วม……..…

WANNAPA SATTAYAPHISUT : GENETIC INSTABILITY OF MUSHROOMS AS AFFECTED BY CONTINUOUS SUBCULTURING FOR PRODUCTION

THESIS ADVISOR: PROF. NANTAKORN BOONKERD, Ph.D.101PP. ISBN 974-7359-93-6

This study aimed to investigate the genetic instability of mushroom as affected by continuous subculturing. The DNA techniques were used for investigation since due to high efficiency to detect prior apply to large scale production. The growth rate on PDA medium, average of total yield and detection by using PCR-RFLP techniques were employed. Mushrooms used in this study were *Pleurotus ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. cystidiosus*, *Lentinula polychrous*, *L. squarrossula*, *Lentinus edodes*, *Agrocybe cylindracea*, *Auricularia auricula* and *Tricholoma crassum*. The results found that the growth rate and yield of individual species gave different patterns correspond to individual species. Some species had decreased in growth rate and yield such as *L. squarrossula, L. polychrous* and *P. sajor-caju* when compared with first subculturing. These species had prolonged the growth on PDA medium. For PCR-RFLP analysis, the DNA templates were amplified with ITS 4 and 5 primers. There were different in size about 600-800 bp depend on each of species. The results suggested that individual of species gave different DNA-fingerprint pattern after digested with the 4 restriction enzymes. The DNA patterns were differ individual of species depending on each species and the most of species still gave the same DNA pattern when serial transfers of mycelium were conducted except in *A. auricula* (Ear mushroom). The third subculture of *A. auricula* gave the different fragment size with *Hinf* I when compared with the first subculture. The third subculture of *A. auricula* was digested with *Hinf* I found that 2 recognition sites to digested then fragment gave in size of 357 and 263 bp. While the first subculture found that only one recognition site then fragment gave in size of 300 and 300 bp. Therefore, the DNA sequences were observed further investigated. From the sequences data were aligned between the first and third subcultures showed that recognition site had corresponded with DNA-fingerprint and homology found among 90%. In addition, another gene which related to fruit body development. β- tubulin gene was chosen. The results showed that DNA-fingerprint the third subculture gave different from the first subculture.

For *Tricholoma crassum* production, the appropriate technology was developed on the basis of agricultural wastes utility. The comparison of total yield, found that when using soil as material substrate and clay plot as container able to promote highest yield (575 fresh weight (g)/ 1 container) at significant higher ($P< 0.01$). While using soil mixed with soybean husk (1:1) and soybean husk gave lower yield. In addition, the covering casing with rice-straw, rice husk and non-covering found that were not significantly different ($P< 0.05$) in yield enhancement.

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนัก

ศึกษา……

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่

ปรึกษา……..……..

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ร่วม…….

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ร่วม……..…