รายงานการวิจัย

การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อการเพาะเห็ดระบบอุตสาหกรรม

Development of technology for industrial mushroom production

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปี งบประมาณ พ.ศ. 2542 - พ.ศ. 2544

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2546

บทคัดย่อ

การผลิตเห็ดในระบบอุตสาหกรรมความคงที่ของเชื้อพันธุ์เห็ดมีความสำคัญมากจึงต้องมีวิธีการที่สามารถตรวจสอบการแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ด การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดด้วยวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมีประสิทธิภาพสูงและรวดเร็ว จึงมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ตรวจสอบเชื้อเห็ดก่อนที่จะนำไปใช้เพื่อการผลิตต่อไป การดำเนินงานได้กระทำโดยศึกษาการเจริญของเชื้อเห็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาณผลผลิตควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR-RFLP ในครั้งสุดท้ายของการถ่ายเชื้อ ซึ่งเห็ดที่ใช้ในการศึกษาคือ เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-cajo*) เห็ดเป๋าฮื้อ (*P. cystidiosus*) เห็ดกระด้าง(*Lentinula polychrous*) เห็ดขอนขาว (*L. squarrossula*) เห็ดหอม (*Lentinus edodes*) เห็ดยานางิ *(Agrocybe cylinracea*) เห็ดหูหนู (*Auricularia auricular*) และเห็ดตีนแรด (*Tricholoma crassum*) ผลการทดลองพบว่าอัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตของเห็ดแต่ละชนิดเป็นไปตามลักษณะของเห็ดนั้น ๆ การเจริญและปริมาณผลผลิตที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดภายหลังการถ่ายเชื้อครั้งแรกในเห็ดขอนขาว เห็ดกระด้างและเห็ดนางฟ้า นอกจากนี้ยังพบว่าเห็ดดังกล่าวใช้ระยะเวลาในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อนานมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการถ่ายเชื้อครั้งแรก ส่วนการวิเคราะห์ผล PCR-RFLP ของเห็ดทั้ง 9 ชนิด พบว่า เห็ดทุกชนิดหลังจากใช้ ITS4 และ 5 primers เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ได้ขนาดตั้งแต่ 600-800 คู่เบส และภายหลังการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิด พบว่าเห็ดแต่ละชนิดให้ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ขณะที่จำนวนการถ่ายเชื้อมากขึ้นเห็ดทุกชนิดยังคงให้ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่เหมือนเดิม ยกเว้นเห็ดหูหนู ในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 พบว่ามีผลของชิ้นดีเอ็นเอที่เปลี่ยนไปจากเชื้อเริ่มต้น เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I ถึง 2 ตำแหน่ง ผลคือภายหลังการตัดดีเอ็นเอให้ขนาด 357 และ 263 คู่เบส แต่ในขณะที่เชื้อเริ่มต้นพบตำแหน่งการตัดจำเพาะเพียง 1 ตำแหน่งที่ 300 คู่เบส ทำให้ภายหลังการตัดดีเอ็นเอให้ขนาด 300 คู่เบส 2 ชุด ดังนั้นจึงทำการอ่านลำดับคู่เบสของเห็ดหูหนูนี้ เพื่อตรวจสอบหาตำแหน่งที่ *Hinf* I สามารถตัดได้ พบว่าตำแหน่งการตัดมีความสอดคล้องกับผลของชิ้นดีเอ็นเอ จากนั้นได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสทั้ง 600 คู่เบส พบว่าความเหมือนของลำดับเบสระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 มีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาถึงลักษณะของดอกเห็ด พบว่า เชื้อเห็ดจากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ให้ลักษณะดอกที่ผิดปกติไปจากเชื้อเห็ดเริ่มต้นปกติ เมื่อทำการตรวจสอบด้วย β-tubulin gene พบว่าสามารถตรวจสอบความผิดปกติของเห็ดได้เช่นเดียวกับที่ใช้การตัดด้วยเอนไซม์

ส่วนการทดลองหาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดตีนแรด จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรพบว่าวัสดุที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดตีนแรด คือการใช้ดินเป็นวัสดุโดยใช้กระถางดินเป็นภาชนะสำหรับเพาะ ซึ่งสามารถให้ผลผลิตสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

99 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.01$) แตกต่างจากการใช้ดินผสมเปลือกถั่วและเปลือกถั่วอย่างเดียวเป็นวัสดุเพาะตามลำดับ และการคลุมวัสดุเพาะด้วยฟางข้าวและแกลบกับการไม่คลุมวัสดุเพาะ นั้นพบว่ามีผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ

การวิจัยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของโรงเรือนสำหรับเพาะเห็ด พบว่า อุณหภูมิและความชื้นในโรงเรือนเป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะต้องมีการควบคุมให้เหมาะกับเห็ดแต่ละชนิด และปัจจัยดังกล่าวสามารถควบคุมได้โดยการใช้เครื่องมือควบคุม การทดสอบประสิทธิภาพของโรงเรือนได้ใช้เห็ดเข็มเงินและเห็ดเข็มทอง *(Flammulina velutipes)* พบว่า ในสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิ 15°C และความชื้น 80% เห็ดเข็มทองให้ผลผลิตสูงกว่าเห็ดเข็มเงิน

Abstract

To produce mushroom commercially the stability of mushroom spawn is very important, which reguires the accuracy technique to detect the variation. The DNA techniques were used for investigation because it is considered to be high efficiency to detect spawn variation prior to applying to large scale production. The growth rate on the PDA medium, average of total yield and detection by using PCR-RFLP technique, were employed. Mushrooms used in this study were *Pleurotus ostreatus, P. sajor-caju, P.cystidiosus, Lentinula polychous, L. squrrossula, 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. sqarrossula, L. polychrous and P. sajor-caju* when compared with the first subculturing. It was also found that 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 differences in size about 600-800 bp depend on each of species. The results suggested that individual of species still gave different DNA-fingerprint pattern after digested with the 4 restriction enzymes. The DNA patterns were different individual among species depending on each species and most of species still gave the same DNA pattern when serial transfering of mycelium were conducted except in *A. auricula* (Ear mushroom). The third subculture of *A. auricula* gave the different fragment sizes with *Hinf* I when compared with the first subculture. The third subculture of *A. auricula* gave changing in fragment sizes when digesting with *Hinf* I up to 2 recognition sites resulted in obtaining fragment sizes of 357 and 263 bp. While the first subculture had only one recognition site gave in size of 300 and 300 bp. Therefore, the DNA sequences were further investigated. From the sequences data were aligned between the first and third subcultures and showed that recognition site had corresponded with DNA-fingerprint and homology found among 90%. In addition, another gene which related to fruit body development. By using β-tubulin gene to detect the variation it was found a similar results as using restriction enzymes.

For *Tricholoma crassum* production, the appropriate technology was developed on the basis of agricultural wastes utilization. In comparison of total yield, found that when using soil as material substrate and clay plot as containers the highest yield (575 fresh weight g/l container) was obtained at significant higher ($P<0.01$). While using soil mixed with soybean husk (1:1) and

soybean husk gave lower yield. In addition, when casing with rice-straw, rice husk and non-covering it was found that these were no significantly differences ($P<0.05$) in yield enhancement.

Investigation the suitability of using controlled environment for production of mushroom was achieved and found that moisture and temperature were important factors for controlling the mycelium growth and mushroom production. These factors could be controlled by using electronic equipment. The mushroom used for testing the controlled house were *Flammulina velutipes* (Curt. Ex. Fr.). Under a set environment of15°C and 80% moisture the golden mushroom gave higher yield than white mushroom.