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

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนเงินทุนจาก เงินงบประมาณของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ดีด้วยความช่วยเหลือจาก นายวิทยา เหล็กไหล นางสาววรรณภา สัตยาพิสุทธิ์ และนางสาวอภิญญา รัตนะจิตร คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

กันยายน 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.

สารบัญ

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ง
สารบัญเรื่อง	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	1
การตรวจสอบเอกสาร	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ระเบียบของการวิจัย	3
วัสดุอุปกรณ์	5
วิธีการทดลอง	7
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทองลอง	
- การผลิตเห็ด	13
- การวิเคราะห์ผล ITS4-5 RFLP	18
- การวิเคราะห์ผลของเห็ดหูหนูโดยไพรเมอร์ ITS4-5 RFLP	57
- การผลิตเห็ดตีนแรด	66
- การเก็บรักษาเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C และแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -70°C	71
- การผลิตเห็ดเข็มเงิน-เข็มทอง	73
สรุปผลการทดลอง	81
เอกสารอ้างอิง	83

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้าที่
1.	แสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ บนวุ้นหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I	18
2.	แสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ บนวุ้นหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Mbo* I	19
3.	แสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ บนวุ้นหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq* I	19
4.	แสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ บนวุ้นหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I	20
5.	การเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ระหว่างสาย พันธุ์ปกติและกลายพันธุ์เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์หลายชนิด	58
6.	การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะต่าง ๆ	66
7.	ผลของวัสดุเพาะต่อผลผลิตของเห็ด *Tricholoma crassum*	67
8.	ผลผลิตของเห็ดเข็มทองจากสูตรอาหารสูตรที่ 1 ขนาดก้อน 900 กรัม	73
9.	ผลผลิตของเห็ดเข็มทองจากสูตรอาหารสูตรที่ 1 ขนาดก้อน 600 กรัม	75
10.	ผลผลิตเห็ดเข็มทองจากสูตรอาหารสูตรที่ 2	77
11.	ผลผลิตเห็ดเข็มเงิน	78

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1.	อัตราการเจริญของเชื้อเห็ดแต่ละชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	13
2.	อัตราการเจริญของเชื้อเห็ดแต่ละชนิดในก้อนขี้เลื่อย	14
3.	ผลผลิตเฉลี่ยของเห็ดแต่ละชนิด	15
4.	แสดงภาพถ่ายของดอกเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่มีลักษณะปกติและไม่ปกติ ที่ได้จากการเก็บเกี่ยว (ก) ดอกเห็ดปกติ (ข) ดอกเห็ดที่ไม่ปกติ	17
5.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22	21
6.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22	22
7.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus cystidiosus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-15 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-15	23
8.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula squarrossula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21	24
9.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula polychrous* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21	25

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้าที่
10.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinus edodes* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20	26
11.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20	27
12.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Agrocybe cylindracea* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20	28
13.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20	29
14.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21	30
15.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-16 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-16	31

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้าที่
16.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus cystidiosus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20	32
17.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula squarrossula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22	33
18.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula polychrous* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22	34
19.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinus edodes* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21	35
20.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21	36
21.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Agrocybe cylindraceas* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23	37

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้าที่
22.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22	38
23.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23	39
24.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23	40
25.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus cystidiosus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22	41
26.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula squarrossula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21	42
27.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula polychrous* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23	43

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปภาพ **หน้าที่**

28. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinus edodes* ที่ได้ ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ I-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ I-20 — 44

29. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ที่ได้ ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 — 45

30. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Agrocybe cylindracea* ที่ได้ ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 — 46

31. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ที่ได้ ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 — 47

32. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* ที่ได้ ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ I-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 — 48

33. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่ได้ ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-18 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-18 — 49

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้าที่
34.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus cystidiosus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22	50
35.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula squarrossula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22	51
36.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula polychrou* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20	52
37.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinus edodes* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21	53
38.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-18 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-18	54
39.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Agrocybe cylindracea* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22	55

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้าที่
40.	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq I*; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-19 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-19	56
41.	ผลของชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricuaria auricula* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hnif I*; แถว M: 100 คู่เบส(GIBCO BRL) : แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-3 : แถวเลขคี่ : ผลของแบนดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-3 : แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ของสายพันธุ์	57
42.	การอ่านลำดับเบสผลของชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* โดยเปรียบเทียบระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 (ต้นแบบ) และการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 Hn 1 ITS4 เป็นลำดับเบสของสายพันธุ์ปกติในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ Hn 3 ITS4 เป็นลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์ที่ได้จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3	59
43.	การเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ซึ่งผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I : แถว M : 100 คู่เบส : แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ : แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ แถว 1, 3 : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากไมซีเลียมของเห็ดของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ตามลำดับ แถวที่ 5, 7; ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากดอกเห็ดของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ตามลำดับ	60
44.	การเปรียบเทียบผลของชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Mbo* I แถว M 100 คู่เบส : แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ : แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ แถว 1, 3 : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากไมซีเลียมของเห็ดของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ตามลำดับ แถวที่ 5, 7 ; ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากดอกเห็ดของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ตามลำดับ	61

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้าที่
45.	ผลของชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* และ *Pleurotus sajor-caju* ซึ่งผ่านการเพิ่มจำนวนโดย β-tubutin gene แถว M: 100 คู่เบส (GIBCOBRL); แถวที่ 1:การถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 (สายพันธุ์ปกติ) แถวที่ 2: ถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 (กลายพันธุ์) แถวที่ 3: เห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* จากฟาร์มเห็ดอรัญญิก แถวที่ 4: เห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ที่ผิดปกติ แถวที่ 5: ควบคุม แถวที่ 6: เห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่ผิดปกติ แถวที่ 7: ดอกเห็ดปกติของสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* และแถวที่ 8: ควบคุม	62
46.	ลักษณะดอกเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ; ซ้ายมือ : สายพันธุ์ปกติ ขวามือ : กลายพันธุ์	63
47.	ลักษณะปรากฏของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่มีความผิดปกติทางกายภาพที่เพาะเลี้ยงได้ที่ฟาร์ม มทส. ซ้ายมือ : สายพันธุ์ปกติ ขวามือ :กลายพันธุ์	63
48.	การเปรียบเทียบอัตราการเจริญของไมซีเลียมในก้อนขี้เลื่อยระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ; a) อัตราการเจริญการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 b) อัตราการเจริญการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1	64
49.	primordia ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ในวันแรก	69
50.	primordia ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ในวันที่ 4 และ 5	69
51.	ลักษณะของเห็ดตีนแรคที่เจริญเติบโตเต็มที่ในวันที่ 9 และ 10	70
52.	อัตราการเจริญของเห็ดแต่ละสายพันธุ์เมื่อเก็บที่ 4°C	71
53.	อัตราการเจริญของเห็ดแต่ละสายพันธุ์เมื่อเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส	72
54.	การบ่มเห็ดเข็มเงิน-เข็มทอง	78
55.	การเปิดดอกเห็ดเข็มเงินและเข็มทอง	79
56.	ลักษณะของเห็ดเข็มเงิน	80
57.	ลักษณะของเห็ดเข็มทอง	80

บทนำ

(Introduction)

จากผลงานวิจัยโครงการ "การใช้วัสดุเหลือใช้จากการเกษตรเพื่อการเพาะเห็ดชนิดต่าง ๆ" เป็นเวลา 2 ปี พบว่า ฟางข้าว ชานอ้อย กากมันสำปะหลัง เปลือกถั่วเขียว ขี้เลื่อย ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมาก สามารถนำมาเป็นวัสดุหลักเพื่อการเพาะเห็ดเศรษฐกิจ เช่น เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหลินจือ และเห็ดหอม ได้เป็นอย่างดี

การเพราะเห็ดในปัจจุบันนี้ส่วนใหญ่เป็นการเพาะในถุงพลาสติกขนาดเล็ก เพื่อการเพาะเห็ดตระกูลนางรม เห็ดหลินจือ เห็ดหอม สำหรับเห็ดฟางจะเป็นการเพาะแบบกองเตี้ย ประเภทเห็ดถุงนั้นเมื่อต้องการให้ออกดอกก็จะใช้โรงเรือนขนาดเล็กมีการให้น้ำเพื่อให้ความชื้น ไม่มีระบบควบคุมใด ๆ ทั้งสิ้น ดังนั้นสภาพของการออกดอกจึงขึ้นอยู่กับความแปรปรวนของสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิและความชื้น เชื้อพันธุ์เห็ดที่นำมาใช้ส่วนใหญ่เกษตรกรจะซื้อมาจากผู้ผลิตเชื้อเห็ด บางรายก็ผลิตขึ้นเองและมักมีปัญหาอยู่เสมอว่าเชื้อเห็ดมีลักษณะไม่คงที่ มีผลกระทบต่อผลผลิต การควบคุมคุณภาพไม่มีมาตราฐานที่แน่นอน ส่วนใหญ่ใช้ความชำนาญของผู้ผลิตเอง ถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมผู้ผลิตเชื้อจะไม่สามารถรู้ได้ทันทีเพราะไม่มีการใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่เข้ามาใช้ในการควบคุม เรื่องนี้สำคัญมากเพราะในระบบการผลิตเชิงพาณิชย์หัวเชื้อที่มีคุณภาพมีความสำคัญมาก

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เป้าหมายของงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อที่จะทำการพัฒนาการเพาะเห็ดในระบบอุตสาหกรรมเพื่อการค้าอย่างมีระบบและมีประสิทธิภาพเพื่อให้สามารถควบคุมการผลิตให้ได้ตามที่ต้องการโดยมีวัตถุประสงค์ย่อย ดังนี้

1. เพื่อให้ได้วิธีการตรวจสอบพันธุ์เห็ดที่ถูกต้องและแม่นยำ
2. เพื่อให้ได้วิธีการควบคุมคุณภาพของสายพันธุ์เห็ดที่ทำการเพาะในระบบอุตสาหกรรม
3. เพื่อให้ได้โรงเรือนที่มีระบบควบคุมสิ่งแวดล้อมเหมาะแก่การเพาะเห็ดและเครื่องเพาะที่เหมาะสม

การตรวจสอบเอกสาร

(Literature Review)

การจำแนกเห็ดที่มีการกระทำอยู่แล้ว ส่วนใหญ่ใช้วิธีการจำแนกโดยดูจากลักษณะภายนอก และลักษณะของ spore ซึ่งสามารถจำแนกได้ดีในระบบสกุล หรือ species แต่การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเพียงเล็กน้อยอาจไม่มีผลต่อลักษณะภายนอก แต่อาจมีผลต่อระบบสรีระของเห็ด ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิต ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบและจำแนกโดยตรงที่หน่วยพันธุกรรม คือ DNA ที่เรียกว่า DNA fringerprinting techniques และที่มีการใช้มากได้แก่ PCR-based ที่ใช้ arbitrarily-primed PCR (Williams et al., 1990; Kwan et al., 1992; Chiu et al., 1993) ปัจจุบันนี้ได้มีการใช้ DNA fringerprinting เพื่อควบคุมคุณภาพ *Agaricus bisporus* ในเชิงการค้า และการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โดยใช้ RAPD เทคนิค (Welsh and Mc Clelland, 1990; Kerrigan et al., 1993)

ในการเพาะเห็ดเชิงอุตสาหกรรม การจัดเตรียมวัสดุเพาะมีความสำคัญมากเพราะเกี่ยวข้องกับต้นทุนการผลิต โดยปกติแล้วการเพาะเห็ดจากขี้เลื่อยมักใช้ถุงขนาดเล็ก ซึ่งต้องใช้แรงงานในการบรรจุถุงมาก ซึ่งปัจจุบันนี้แรงงานมีราคาแพงมากจึงทำให้การผลิตโดยวิธีนี้มีกำไรน้อยลง ดังนั้นถ้าได้มีการออกแบบให้เครื่องเพาะมีขนาดใหญ่ขึ้นในรูปของ solid state bioreactor โดยสามารถ pasteurize วัสดุเพาะและทำการเพาะเชื้อเห็ดลงไปเลย และบ่มไว้ในห้องที่มีระบบควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และ CO_2 ก็จะสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ (Zadrazil, 1993) ระบบควบคุมในห้องผลิตดอกเห็ดนั้นมีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องคือ อุณหภูมิ ความชื้น อากาศและแสง ซึ่งเห็ดแต่ละชนิดต้องการปัจจัยเหล่านี้ไม่เหมือนกัน การปรับสภาพสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสมกับเห็ดชนิดที่ต้องการเพาะจะช่วยให้ได้ผลผลิตเห็ดที่สม่ำเสมอ (Wanf and Wang, 1993)

งานวิจัยครั้งนี้จึงเน้นการแก้ปัญหาการผลิตเห็ดเชิงการค้าทั้งระบบ โดยเน้นตั้งแต่คุณภาพของเชื้อ การควบคุมคุณภาพโดยใช้เทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและกระบวนการผลิตที่สามารถควบคุมคุณภาพโดยใช้เทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและกระบวนการผลิตที่สามารถควบคุมได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จะได้เทคโนโลยีใหม่ในการตรวจสอบสายพันธุ์เห็ดและวิธีการควบคุมคุณภาพเห็ดเพื่อใช้ในการผลิตเชื้อเห็ด จะได้เทคโนโลยีการผลิตเห็ดเชิงการค้าที่มีประสิทธิภาพสามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้

ระเบียบวิธีการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยจะเป็นขั้นตอนเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ดังนี้

วัตถุประสงค์ที่ 1 เพื่อให้ได้วิธีการตรวจสอบสายพันธุ์เห็ดที่ถูกต้องและแม่นยำ

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์นี้จะนำเอาเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีการใช้อยู่มาทำการจำแนกเชื้อเห็ดชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ทราบว่าเทคนิคใดจะเหมาะสมกับเห็ดได้มากที่สุด และเทคนิคที่จะนำมาใช้มีดังนี้

1. Emzyme marker

   จะทำการวิเคราะห์ allozymes โดยวิธี electrophoresis เพื่อหา pattern ของ enzymes ของแต่ละสายพันธุ์

2. DNA fringerprinting ได้แก่

   -Restrition Fragment length polymorphisms (RFLP)

   -AF-RFLP

   -PCR-based

   -RAPD

เทคนิคดังกล่าวนี้ได้มีการใช้กับพืชและเชื้อราร่วมทั้งเห็ดด้วยมาแล้วอย่างได้ผลแต่เนื่องจากเห็ดแต่ละอย่างอาจมีความแตกต่างกันจึงอาจมีเทคนิคบางอย่างเหมาะสมกับชนิดบางชนิด จึงต้องทำการทดลองกับเห็ดแต่ละชนิด เพื่อให้ได้เทคนิคที่เหมาะที่สุด

วัตถุประสงค์ที่ 2 เพื่อให้ได้วิธีการควบคุมคุณภาพสายพันธุ์เห็ดที่ทำการเพาะในระบบอุตสาหกรรม

เมื่อสามารถทราบเทคนิคในการตรวจสอบสายพันธุ์กับเห็ดชนิดต่าง ๆ แล้วนำเทคนิคดังกล่าวมาตรวจสอบหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดที่ผลิตเป็นหัวเชื้อและเชื้อแม่ (mother culture) เพราะเหตุว่าเห็ดบางชนิดมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมสูงมากเมื่อทำการถ่ายเชื้อหลายๆ ครั้ง จึงต้องหาวิธีการยืนยันการแปรปรวนดังกล่าว โดยจะนำเอาเทคนิคทางด้าน allozyme และ DNA fringerprinting มาทำการตรวจสอบการแปรปรวนและหา pattern ของ DNA ของแต่ละพันธุ์ที่จะสามารถบอกได้ว่าหัวเชื้อที่จะนำไปใช้ยังคงมีประสิทธิภาพดีอยู่

วัตถุประสงค์ที่ 3 เพื่อให้ได้โรงเรือนที่มีระบบควบคุมสิ่งแวดล้อมเหมาะแก่การเพาะเห็ดและเครื่องเพาะที่เหมาะสม

- จะทำการวิจัยหาปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ดังนี้

  -ความชื้นและการควบคุมความชื้นในระบบโรงเรือน

  -อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเห็ดแต่ละชนิด และระบบควบคุมอุณหภูมิ

  -การถ่ายเทอากาศ และระบบควบคุม

-ทำการพัฒนาอุปกรณ์การเพาะ

-ทำการบรรจุในถุง

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 วัสดุอุปกรณ์

ก. สายพันธุ์เห็ด

1. เห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus*
2. เห็ดนางฟ้า *P. sajor-caju*
3. เห็ดเป๋าฮื้อ *P. cystidiosus*
4. เห็ดหอม *Lentinus edodes*
5. เห็ดขอนขาว *Lentinula squarrossula*
6. เห็ดกระด้าง *L. polychrous*
7. เห็ดยานางิ *Agrocybe cylindracea*
8. เห็ดหูหนู *Auricularia auricula*
9. เห็ดตีนแรด *Tricholoma crassum*

ข. อุปกรณ์

1. เครื่องเพิ่มจำนวนชิ้น DNA (PCR Hybaid and Perkin-Elmer-ABI 9700 thermo cycler system (Perkin-Elmer, Singapore)
2. เครื่องเขย่า (Innova™, model 2300 Platform Shaker, New Brunswick Sciencitific, New Jersey, U.S.A.)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendorf, model: Centrifuge 5415C, Germany)
4. Water bath (Heto-Heten, model: maxi-Shaker, Denmark)
5. Vortex (Vortex-2Genic™, model: G-560E, Scientific Industry, U.S.A.)
6. หม้อนึ่งความดัน (HICLAVE™, model: HA-300D, Hirayama Manufacturing Cooperation, Japan)
7. Electrophoresis Chamber (Sub-Cell® GT, purchased from Bio-Rad)
   : Horizontal Electrophoresis Chamber
   : Vertical Electrophoresis Chamber
8. Gel Documentation (UVP ULTRA-Violet product; model: GDS > 50-Camera, U.S.A.)

ค. สารเคมี

1. สำหรับการเลี้ยงเชื้อ
   - PDA (Potato Dextose Agar): ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200g/L
     น้ำตาลเดกโตรส 20 g/L
     ผงวุ้น 19 g/L

- PDB (Potato Dextose Broth): ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 g/L
  น้ำตาลเดกโตรส 20 g/L

2. สำหรับการสกัด DNA

- Lysis buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)
  50 mM EDTA (pH 8.0) (w/v)
  3% SDS (w/v)
  1% 2-mercaptoethanol (v/v)
- Phenol: Chloroform: Iscomyl alcohol (25: 24: 1) (v/v/v)
- 3M NaOAc (pH 8.0) (w/v)
- Isopropanol
- 70% ethanol (v/v)
- TE buffer: 10 mM Tris-HCl (pH7.2)
  0.1 mM EDTA (pH8.0)
- TBE buffer: 0.089 M Tris-base
  2.5 mM Na_2 EDTA (pH8.0)
  0.088 M Boric acid
- RNase A solution 100 μg/ml
- DNA marker: 100 bp DNA

3. สำหรับการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA

- Taq DNA polymerase (GIBCO) 5 unit/μ
- 10x buffer (15mM $Mgcl_2$, 500 mMKCl, 100mM Tris-HCl (pH 8.3)
- dNtPC dATB, dTTP, dGTP, dCTP)
- ITS4 และ ITS5 primer
  ITS 4: 5′GGAAGTAA AGTCGTAACAAGG3′
  ITS 5: 5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC3′
- β-tubulin gene
  B36F: 5′CACCCACTCCCTCGGTGGTG3′
  B12R: 5′CATGAAGAAGTGAAGACGCGGGAA3′

4. สำหรับการทำ RFLP

- เอนไซม์ตัดจำเพาะ: *Alu*I, *Taq*I, *Mbo*I และ *Hinf*I
- 2% Agarose gel

- 10% Polyacrylamide gel:30% Acrylamide stock solution: acrylamide 29g, N, N′-methylene bisacrylamide 1 g, bisacrylamide 1g และน้ำกลั่น 100 ml

5. สำหรับหาลำดับเบส
   - 3′dye labeled dideoxynucleotide triphosphate (dye ferminators) fluorescent dyes
6. สำหรับวัสดุเพาะเชื้อเห็ด
   - ขี้เลื่อย
   - รำข้าว
   - น้ำตาล
   - ยิปซั่ม
   - ปูนขาว
   - น้ำ

1.2 วิธีการทดลอง

วัตถุประสงค์การทดลองข้อที่ 1 และ 2 ซึ่งจะตรวจสอบหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ด หลังจากการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่องจึงได้วางแผนการศึกษาไว้ดังนี้

1. ทำการตรวจสอบอัตราการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ, วัสดุที่ใช้เพาะและผลผลิตของเห็ดทุกชนิดในทุกครั้งที่มีการถ่ายเชื้อ
2. ทำการวิเคราะห์ผลการตัดชิ้น DNA โดยวิธี PCR-RFLP ในทุกครั้งที่มีการถ่ายเชื้อ
3. ทำการตรวจสอบลักษณะดอกเห็ดที่มีความผิดปกติโดยวิธีการ PCR-RFLP ซึ่งใช้ ITS4-5 และ β-tubulin gene เป็น primer

ก. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

สายพันธุ์เห็ดทั้ง 9 สายพันธุ์ถูกนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์จากเชื้อเริ่มต้น (original culture) และแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อภายในครีบดอกเห็ด (tissue culture) จากนั้นนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ และบ่มเชื้อภายใต้อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-15 วัน เมื่อไมซีเลียมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ ก็ทำการถ่ายเชื้อเห็ดลงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใหม่ต่อไป โดยตัดชิ้นวุ้นตรงขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดประมาณ 0.6-1.0 เซนติเมตร นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ขั้นตอนนี้ทำการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อเห็ดทุกชนิด โดยการวัดระยะทางการเดินของไมซีเลียมทุกวันและทำเช่นนี้ในทุกครั้งที่มีการถ่ายเชื้อเห็ดทั้ง 9 สายพันธุ์ จากนั้นทำการแบ่งเชื้อไมซีเลียมใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไว้เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตเห็ดต่อไป

ข. การเตรียม Spawn

ตัดชิ้นวุ้นไมซีเลียมขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อนำมาวางตรงกลางขวดแบนที่มีเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยสเตอริไลส์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-15 วัน

ค. การเลี้ยงเชื้อเห็ด

เมื่อไมซีเลียมเจริญเต็มขวดแบนที่บรรจุเมล็ดข้าวฟ่าง นำไมซีเลียมไปต่อเชื้อในวัสดุเพาะในถุงขี้เลื่อยในปริมาณ 20-30 เมล็ดต่อ 1 ถุงขี้เลื่อย จากนั้นนำไปบ่มก้อนที่อุณหภูมิห้องโดยใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือน เชื้อไมซีเลียมจะเจริญเต็มก้อนเชื้อ ขั้นตอนนี้ทำการวัดอัตราการเจริญของเชื้อเห็ดทุกชนิด โดยวัดผลทุก ๆ 5 วัน จากนั้นจึงนำก้อนเชื้อที่เจริญเต็มก้อนไปเปิดดอกภายในโรงเรือนและบันทึกผลผลิตเป็นน้ำหนักสด กรัม/1 ก้อน/3 เดือน

ง. การเก็บรักษาเชื้อเห็ด

เชื้อเริ่มต้น (pure culture) ถูกนำไปเก็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียส และใน glycerol 10% (v/v) โดยแช่แข็งที่ –70 องศาเซลเซียส ทำการตรวจเช็คเชื้อเห็ดทุก ๆ 2 สัปดาห์

จ. การผลิตก้อนวัสดุเพาะ

นำขี้เลื่อย 100 กิโลกรัม รำข้าว 5 กิโลกรัม ปูนขาว 1 กิโลกรัม ยิปซั่ม 0.5-1 กิโลกรัม น้ำตาล 0.2 กิโลกรัม และปรับความชื้นให้ได้ประมาณ 80% ด้วยน้ำ จากนั้นส่วนผสมทั้งหมดจะถูกผสมให้เข้ากัน และแบ่งบรรจุวัสดุเพาะลงในถุงพลาสติกถุงละประมาณ 800 กรัม จากนั้นนำถุงขี้เลื่อยไปผ่านการฆ่าเชื้อ โดยวิธีพลาสเจอร์ไรเซชั่นด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ฉ. การสกัด DNA

นำไมซีเลียมไปเลี้ยงในอาหารเหลว PDB โดยเขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 3-5 วันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการสกัด chromosomal DNA ของเห็ดตามวิธีของ Lee และ Talor (1990) ไว้ดังนี้ นำไมซีเลียมมาบดด้วยไนโตรเจนเหลว (-180 องศาเซลเซียส) ในโกร่งบดจากนั้นเติม lysis buffer 400-500 µl เขย่าให้เข้ากันบ่นที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม phenol: chloroform: isoamyl (25: 24: 1) ลงไป 400 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex (ในขั้นตอนนี้ให้ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 13,000 xg เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วแยกเอาเฉพาะสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่จากนั้นจึงเติม 3M NaOAc (pH 8.0) 40 µl และเติม isopropanol จำนวน 2 เท่าของปริมาตรสารละลายส่วนใสที่ได้ผสมทั้งหมดให้เข้ากันอย่างเบา ๆ นำตะกอนที่ได้สุดท้ายให้เติม R Nase 100 µg/ml ไป 1/10 ของสารละลาย TE buffer ตรวจวัดความเข้มข้นของ DNA template โดยการย้อมสีด้วย Ethidium bromide และเทียบกับความเข้มข้นของ DNA มาตรฐาน (ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว)

ช. การเพิ่มจำนวนชิ้น DNA

DNA template ที่ได้ถูกนำมาเพิ่มจำนวนด้วย primer ITS 4-5 ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ 1 reaction ประกอบด้วยน้ำกลั่น deionized 27.5 µl, 10x amplification buffer 10 µl (15 mM $Mgcl_2$, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), dNTP stock 10 µl (2 mM แต่ละ dNTP), primer stock 50 µM stock 1 µl, และ Taq DNA polymer (5 unit/µl) 0.25 µl

อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน DNA คือ

initial denature	3 นาที	ที่	95	องศาเซลเซียส
denature	30 วินาที	ที่	95	องศาเซลเซียส
annealing	30 วินาที	ที่	53	องศาเซลเซียส
extension	2 นาที	ที่	72	องศาเซลเซียส
final extension	10 นาที	ที่	72	องศาเซลเซียส

ทั้งหมด 35 รอบ

นอกจากนี้ DNA template นำมาเพิ่มจำนวนด้วย primer β-tubulin gene ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ 1 reaction ประกอบด้วย น้ำกลั่น deionized 25 µl, $MgCl_2$ 2.5 µl (2.0 mM stock $MgCl_2$), dNTP stock 5 µl (0.2 mM แต่ละ dNTP), primer 1 µl (0.5 mM primer stock) และ 1 unit *Taq* DNA polymerase

อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน DNA คือ

initial denature	1 นาที	ที่	94	องศาเซลเซียส
denature	30 วินาที	ที่	94	องศาเซลเซียส
annealing	30 วินาที	ที่	56	องศาเซลเซียส
extension	30 วินาที	ที่	72	องศาเซลเซียส
final extension	10 นาที	ที่	72	องศาเซลเซียส

ทั้งหมด 35 รอบ

ซ. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลองคือ *Alu*I, *Taq*I, *Mbo*I และ *Hinf*I และวิเคราะห์การตัดชิ้น DNA บน Agarose 2% ที่ 80 volt, 40 นาทีหรือ 10% polyacrylamide gel ที่ 80 volt, 1.30 ชั่วโมง ย้อมสีด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น < 0.5 mg/ml

ฌ. Sequencing (การหาลำดับเบส)

หาลำดับเบสโดยตรงจาก PCR product ทั้ง 600 bp. โดยเครื่องมือ Perkin Elmer's ABI PRISM™ 377 DNA sequence

ญ. การวิเคราะห์ผลการหาลำดับเบส

นำผลการหาลำดับเบสทั้ง 600 bp มาเปรียบเทียบความเหมือนหรือต่างระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และครั้งที่ 3 ในเห็ดหูหนู โดยใช้โปรแกรม *CLUSTAL X program* เพื่อพิสูจน์หาชุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิด

วัตถุประสงค์ข้อที่ 3 เพื่อให้ได้โรงเรือนที่มีระบบควบคุมสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมแก่การเพาะเห็ดและเครื่องเพาะเห็ดที่เหมาะสม

ก. โรงเรือน

ขนาดของโรงเรือน 8x5 เมตร ภายในโรงเรือนจะติดชุดควบคุมระบบหล่อเย็น Cooling Control : PCC-2 วัตถุประสงค์ก็เพื่อควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพันธ์ภายในโรงเรือน ภายในชุดควบคุมนี้ประกอบไปด้วย

-หัววัดอุณหภูมิ (Temperature Sensor)	1	ชุด
-หัววัดความชื้นสัมพันธ์ (Humidity Sensor)	1	ชุด
-ระบบควบคุมการปิด-เปิด พัดลม (Fan)	1	ชุด
-ระบบควบคุมการปิด-เปิด ระบบน้ำ (Cooling system)	1	ชุด
-ระบบเตือนอุณหภูมิสูง-ต่ำ	1	ชุด

ข. การผลิตเห็ด

ข.1 การผลิตเห็ดตีนแรด

1. การเลี้ยงเชื้อ

เชื้อเห็ดตีนแรดนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส และวัดอัตราการเจริญของไมซีเลียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันเป็นเวลา 20-25 วัน และถ่ายเชื้อลงสู่ขวดเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-20 วัน แล้วย้ายลงสู่ก้อนขี้เลื่อย และบ่มก้อนเชื้อภายในโรงเรือนเป็นเวลา 30-45 วัน

2. การเตรียมวัสดุเพาะ

การทดลองเพาะเห็ดตีนแรดได้วางแผนการทดลองแบบ Slip-split plot design ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วย 3 mainplots, 2 submain plots และ 3 subplots ซึ่ง main plots คือ (1) การคลุมวัสดุเพาะด้วยฟางข้าง (2) ด้วยแกลบ (3) ไม่มีการคลุม, submain plots คือ (1) ใช้เข่งพลาสติกเป็นภาชนะสำหรับเพาะ และ (2) ใช้กระถางดินเป็นภาชนะสำหรับเพาะ และ sub plots คือ (1) ใช้ดินร่วนอย่างเดียว, (2) ใช้เปลือกถั่วเหลืองอย่างเดียว และ (3) ผสมดินร่วนกับเปลือกถั่วเหลืองในอัตรา (1:1, *vol/vol*) เส้นผ่านศูนย์กลางของภาชนะเพาะอยู่ระหว่าง 40-47 เซนติเมตร ความสูงของภาชนะเพาะ 30-37 เซนติเมตร โดย

แต่ละกระถางจะบรรจุก้อนเชื้อ 4 ก้อน แต่ละก้อนวางห่างกันประมาณ 10 เซนติเมตร และเติมวัสดุเพาะให้เต็มภาชนะเพาะโดยต่ำกว่าขอบของภาชนะลงมา 10 เซนติเมตร ซึ่งผลผลิตของการทดลองนี้ถูกนำมาวิเคราะห์โดยโปรแกรม Split-Slit plot design

ข.2 การผลิตเห็ดเข็มเงิน-เข็มทอง

1. การเตรียมอาหารในก้อนขี้เลื่อย

สูตรที่ใช้ในการทดลองมีด้วยกัน 2 สูตร ดังต่อไปนี้คือ

สูตรที่ 1 ประกอบด้วย

ขี้เลื่อยไม้ยางพารา	75	กิโลกรัม
รำละเอียด	20	กิโลกรัม
ข้าวโพดบด	5	กิโลกรัม

ความชื้น 60-62% ไม่เกิน 65 %

สูตรที่ 2 ประกอบไปด้วย

ขี้เลื่อยไม้ยางพารา	100	กิโลกรัม
รำละเอียด	20	กิโลกรัม
น้ำตาลทรายแดงหรือกากน้ำตาล	1.5	กิโลกรัม
ดีเกลือ	0.2	กิโลกรัม
ปูนขาว	2	กิโลกรัม

ความชื้น 60-62% ไม่เกิน 65 %

การทำก้อนนำวัสดุทั้งหมดมาคลุกให้เข้ากันอย่างดี ให้มีความชื้น 60-65 % บรรจุในถุงพลาสติกร้อนขนาด 7x12 นิ้ว อัดให้แน่น ปริมาณอาหารถุงละ 600 กรัม ใส่คอพลาสติก ปิดจุกสำลีแล้วหุ้มกระดาษป้องกันสำลีเปียก จากนั้นนำถุงขี้เลื่อยไปนึ่งในหม้อนึ่งไม่อัดความดัน อุณหภูมิประมาณ 100^{o}C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

2. การเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อเห็ดเข็มเงินและเข็มทองมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 16-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงสู่ขวดเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 16-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แล้วย้ายลงสู่ก้อนขี้เลื่อย และบ่มก้อนขี้เลื่อยภายในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 20-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50-60 วัน

3. การเปิดดอก

ในระยะให้ผลผลิต เมื่อเส้นใยเข็มเงินและเข็มทองเจริญเต็มถุง ก็ทำการเปิดดอกที่ห้องบ่มได้เลย แต่ปรับอุณหภูมิห้องให้เป็น 13-15 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพันธ์ 80-85% เปิดจุกสำลีออก

เมื่อเกิดดอกเห็ดเล็ก ๆ ให้แสงและถอดคอพลาสติกออก ปล่อยให้ดอกสูงประมาณ 2-3 เซนติเมตร จึงลดการให้แสงลง ก้านดอกเห็ดจะชูหาแสงสว่าง ช่วงนี้ปรับอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็น 16-18 องศาเซลเซียส

4. การเก็บดอกเห็ด

ก้านดอกเห็ดยาวประมาณ 9-13 เซนติเมตร หมวกดอกจะมีขนาด 1-2 เซนติเมตร เก็บดอกโดยดึงกลุ่มดอกเห็ด

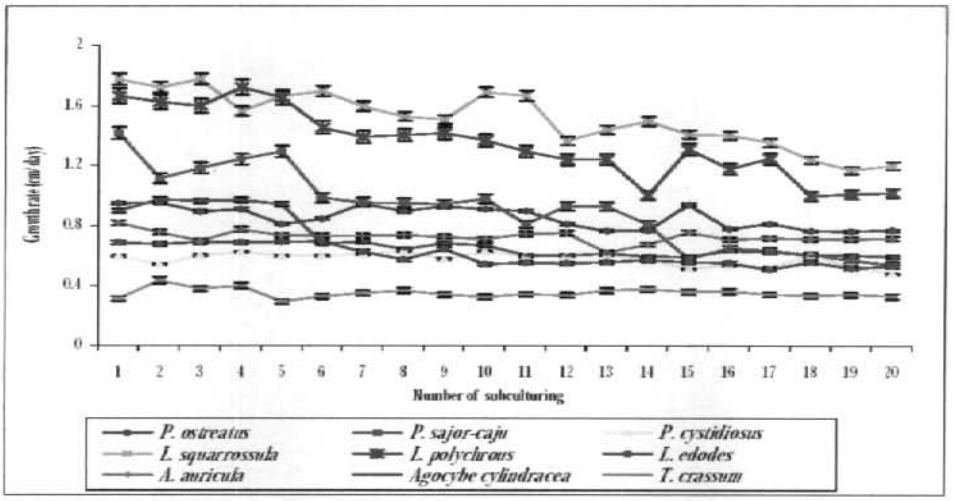
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การผลิตเห็ด

เพื่อศึกษาว่าการถ่ายเชื้อเห็ดมีผลกระทบต่อผลผลิต อัตราการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ spawning โดยทำการเปรียบเทียบผลผลิตในแต่ละครั้งของการถ่ายเชื้อ

1.1 อัตราการเจริญของเชื้อเห็ดแต่ละชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

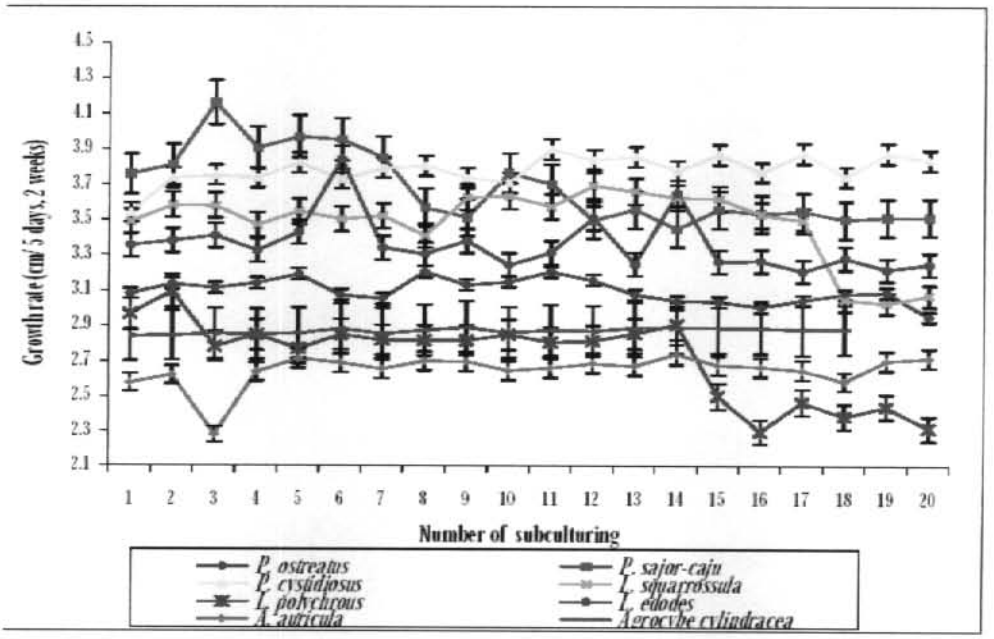
การเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) เป็นเวลา 10-15 วัน พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อเห็ดจะแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของสายพันธุ์และอัตราการเจริญของเห็ดมีลักษณะเชิงเส้นตรงหลังจากเปรียบเทียบกันทั้งหมด 20 ครั้งการถ่ายเชื้อ ซึ่งพบว่าอัตราการเจริญมีค่าคงที่ โดยเห็ดทุกชนิดจะให้อัตราการเจริญสูงสุดในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 เช่น เห็ดนางฟ้า 1.420 เซนติเมตร/วัน เห็ดกระด้าง 1.778 เซนติเมตร/วัน และเห็ดขอนขาว 1.670 เซนติเมตร/วัน (รูปที่ 1) นอกจากนี้อัตราการเจริญของเห็ดบางชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง เช่น เห็ดนางฟ้า เห็ดขอนขาว เห็ดกระด้างและเห็ดยานางิ ซึ่งอุณหภูมิอาจเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของเชื้อเห็ด เนื่องจากผลการศึกษาของ (Kinugawa และ Furakawa, 1965 อ้างอิงถึงใน Chang และ Heyes, 1978) พบว่าในเห็ด *Flammulina velutipes* อุณหภูมิเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการควบคุมการเจริญของไมซีเลียม ซึ่งอุณหภูมินี้เหมาะต่อเห็ดนี้คือระหว่าง 22-26 องศาเซลเซียส ถ้าหากอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเกิน 34 องศาเซลเซียส พบว่าไมซีเลียมจะเจริญเติบโตช้าลงหรืออาจมีการหยุดการเจริญของเชื้อไมซีเลียม ถ้าหากอุณหภูมิเพิ่มสูงกว่า 35 องศาเซลเซียสในเห็ดหอม (Tokimoto และ komatsu, 1975 อ้างอิงถึงใน Chang และ Heyes, 1878) ซึ่งในการทดลองต้องจำกัดอุณหภูมิการบ่มเชื้อไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส ทุก ๆ ชนิดเห็ด ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในเห็ดแต่ละชนิดอาจมีผลต่อการลดลงของอัตราการเจริญ



รูปที่ 1 อัตราการเจริญของเชื้อเห็ดแต่ละชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

1.2 อัตราการเจริญของเห็ดแต่ละชนิดในก้อนเพาะเห็ด

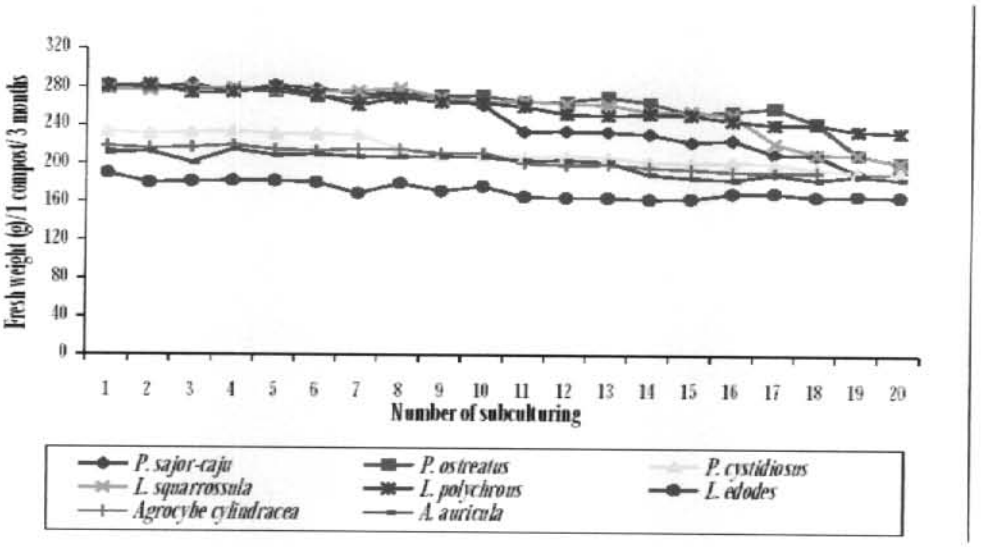
เชื้อไมซีเลียมจะเจริญเติบโตอยู่ในขวดเมล็ดข้างฟ่าง เรียกว่า "spawn run" เป็นเวลา 7-15 วันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจะถ่ายลงสู่ก้อนเพาะเชื้อในถุงขี้เลื่อยปริมาณ 20-30 เมล็ด/1 ถุงขี้เลื่อยและบ่มก้อนเชื้อภายในโรงบ่มก้อนเป็นเวลา 1-2 เดือน จนกว่าไมซีเลียมจะเจริญเต็มก้อนขี้เลื่อยแล้วจึงนำไปเปิดดอกต่อไป ผลการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อเห็ดในก้อนเพาะเชื้อเห็ดแต่ละชนิดมีอัตราการเจริญและใช้ระยะเวลาการเจริญของไมซีเลียมแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด เช่น เห็ดนางฟ้า มีอัตราการเจริญ 3.68±0.12 เซนติเมตร/5 วัน, เห็ดหอม 3.36±0.18 เซนติเมตร/2 สัปดาห์ และเห็ดหูหนู 2.65±0.14 เซนติเมตร/5 วันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากรูปที่ 2 พบว่าเชื้อเห็ดโดยส่วนใหญ่จะมีอัตราการเจริญค่อนข้างคงที่ แต่ในเห็ดขอนขาวและเห็ดกระด้างพบว่ามีอัตราการเจริญในก้อนขี้เลื่อยลดลง ภายหลังการถ่ายเชื้อไปอย่างต่อเนื่องโดยลดลงจากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 คิดเป็น 16.8% และ 25.3% ตามลำดับที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ผลจากส่วนนี้สามารถสรุปว่าเมื่อจำนวนครั้งของการถ่ายเชื้อมากขึ้นมีผลต่อการลดลงของอัตราการเจริญของเชื้อเห็ดในก้อนขี้เลื่อย แต่อัตราการเจริญลดลงจะแตกต่างกันไปในเห็ดแต่ละชนิด ดังเช่น เห็ดขอนขาวจะมีอัตราการเจริญค่อนข้างคงที่ในช่วงของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-15 คือ 3.76±0.10 เซนติเมตร/5 วัน แต่มีอัตราการเจริญลดลงเป็น 3.05±0.8 เซนติเมตร/5 วันในช่วงหลังจากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 17



รูปที่ 2 อัตราการเจริญของเชื้อเห็ดแต่ละชนิดในก้อนขี้เลื่อย

1.3 ผลผลิตของเห็ดแต่ละชนิด

เมื่อเชื้อไมซีเลียมเจริญจนเต็มก้อนแล้วจะนำไปเปิดดอกภายในโรงเปิดดอก ซึ่งลักษณะภายในของโรงเปิดดอกจะแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของเห็ด โดยที่ผลผลิตจะได้รับแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ดและสภาพแวดล้อมภายในโรงเรือน ผลการศึกษาพบว่าเห็ดทุกชนิดจะให้ผลผลิตสูงสุดในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 หลังจากนั้นผลผลิตจะเริ่มลดต่ำลงเมื่อจำนวนการถ่ายเชื้อเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ (Toonomura, 1978, อ้างถึงใน Chang และ Heyes, 1978) คือ ในเห็ดแชมปิญญอง *A. bisporus* จะให้ผลผลิตสูงสุดในครั้งแรกของการเริ่มเพาะ แต่ปริมาณดอกเห็ดที่ได้จะลดลงและคุณภาพของดอกเห็ดจะเล็กลงเมื่อทำการเพาะต่อไป ดังตัวอย่างของเห็ดที่ทดลองคือ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมและเห็นขอนขาวจะให้ผลผลิตสูงสุดประมาณ 282.5 กรัม, 279.4 กรัม และ 278.0 กรัม (น้ำหนักสุด/1 ก้อน/3 เดือน) ตามลำดับ หลังจากนั้นผลผลิตจะลดลงคิดเป็น 32.0%, 27.8% และ 27.8% ตามลำดับ ในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 20 ในขณะที่เห็ดชนิดอื่น ๆ ยังคงให้ผลผลิตโดยรวมค่อนข้างคงที่ ดังรูปที่ 3



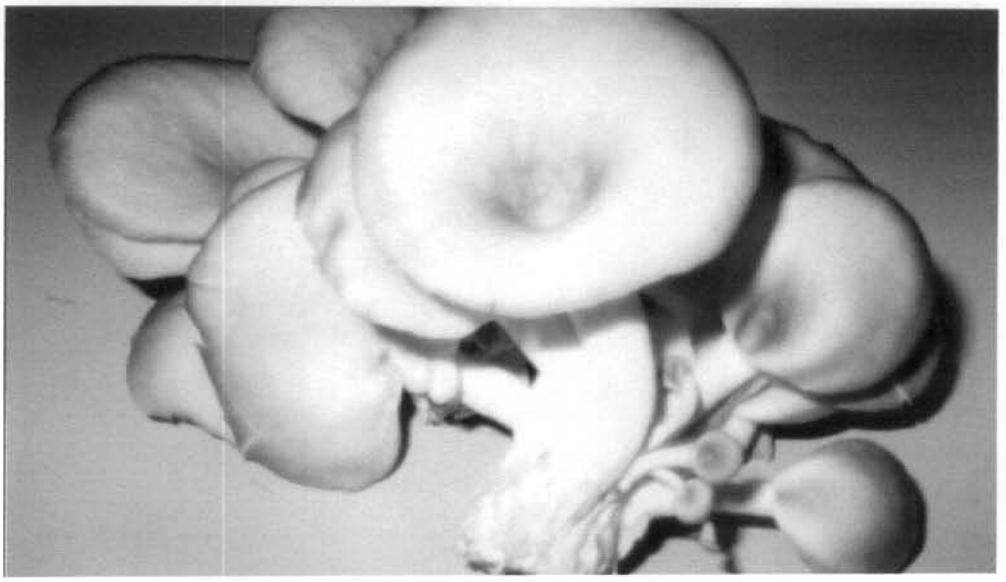
รูปที่ 3 ผลผลิตเฉลี่ยของเห็ดแต่ละชนิด

เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อกับผลผลิตพบว่ามีความสอดคล้องกัน คือ ในเห็ดขอนขาวให้ผลผลิตลดลงประมาณ 27.8% และอัตราการเจริญในก้อนขี้เลื่อยก็ลดลงตามด้วย ในขณะที่ผลผลิตของเห็ดกระด้างค่อนข้างคงที่ตลอดจนการถ่ายเชื้อครั้งที่ 20 แต่อัตราการเจริญในก้อนขี้เลื่อยกลับลดลงตั้งแต่การถ่ายเชื้อครั้งที่ 14 นอกจากนี้ในผลผลิตของเห็ดนางรมลดลงตั้งแต่ครั้งที่ 18 คือลดลง 13.1% จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ในขณะที่อัตราการเจริญในก้อนขี้เลื่อยค่อนข้างคงที่ตั้งแต่การถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากส่วนนี้สามารถสรุปได้ว่าผลผลิตรวม

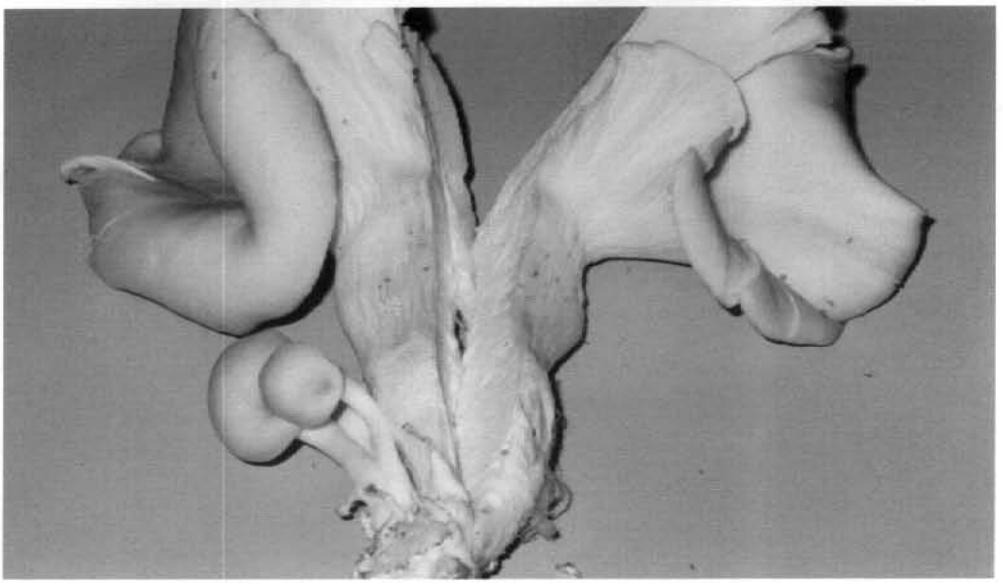
ของห็นจะลดลงต่ำลงเมื่อจำนวนครั้งของการถ่ายเชื้อมากขึ้น ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาในเห็ดแชมปิญอง *A. bisporus* ของ Jankowska (1970) อ้างถึงใน Chang และ Heyes, 1978 คือ ในเห็ดแชมปิญองไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างการเจริญของไมซีเลียมและผลผลิตเลย และยังมีรายงานเกี่ยวกับการลดลงของผลผลิตภายหลังการเก็บรักษาเชื้อ *A bisporus* หลังการเก็บไว้ 2 ปีมีการลดลงของผลผลิต, การเจริญของไมซีเลียมไม่ค่อยดีอีกด้วย (Fristiche 1972, 1974 อ้างถึงใน Chang และ Heyes, 1978) และพบว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อเห็ดมักจะให้ผลผลิตที่ต่ำกว่าเชื้อเริ่มต้นเสมอ ดังนั้นการที่ผลผลิตลดลงจะมาจากหลายปัจจัย ดังเช่น การเก็บรักษาเชื้อ, การติดเชื้อโดยการใช้เนื้อเยื่อและปัจจัยทางสภาพแวดล้อมในการเพาะเชื้อ

เมื่อทำการถ่ายเชื้อมากขึ้นลักษณะภายนอกของดอกเห็ดยังคงให้มีลักษณะที่ปกติดี แต่ในการทดลองนี้ยังพบลักษณะดอกเห็ดที่ผิดปกติของเห็ดนางรม ซึ่งความผิดปกตินี้ได้รับมาจากการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่องเพื่อการเพาะเห็ด แสดงว่าดอกเห็ดที่ผิดปกติอาจมาจากผลของการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่อง ดังแสดงในรูป (รูปที่ 4) ซึ่งเห็ดนางรมที่ผิดปกตินี้มีก้านดอกยาวประมาณ 8.0 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกประมาณ 6.0 เซนติเมตร และความยาวก้านดอกประมาณ 6.5 เซนติเมตร ซึ่งได้นำดอกเห็ดที่ผิดปกตินี้มาทดสอบทางเทคนิค DNA พบว่ายังคงให้ผลของชิ้น DNA เหมือนกับดอกเห็ดที่ปกติ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าความผิดปกตินี้อาจไม่ได้มาจากสาเหตุความบกพร่องของ DNA ซึ่งอาจเนื่องมาจากสภาวะแวดล้อมภายในโรงเรือนขณะทำการเปิดดอก เนื่องจากผลการศึกษาของ (Veder, 1975) พบว่าสภาพแวดล้อมและโรคของเห็ดมีผลต่อการเป็นสาเหตุของดอกเห็ดที่ผิดปกติ ซึ่งความผิดปกติของดอกเห็ดเป็นผลโดยตรงต่อคุณภาพของเห็ดซึ่งในการผลิตเห็ดควรต้องมีการจัดการควบคุมปัญหาหรือลดปัญหาเหล่านี้ได้อย่างดีเพียงพอ นอกจากนี้ Muller (1989) จะได้ศึกษาการพัฒนาดอกเห็ดของเห็ดนางรม พบว่าสภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลโดยตรงต่อการแสดงออกของ gene ที่ควบคุมลักษณะทางชีวเคมีของเห็ดด้วย เพราะอุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งการพัฒนาดอกเห็ดไม่สมบูรณ์ถ้าหากมีการเพิ่มอุณหภูมิเพราะการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

(ก)



(ข)



รูปที่ 4 แสดงภาพถ่ายของดอกเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่มีลักษณะปกติและไม่ปกติ ที่ได้จากการเก็บเกี่ยว (ก) ดอกเห็ดปกติ (ข) ดอกเห็ดที่ไม่ปกติ

2. การวิเคราะห์ผล ITS4-5 RFLP

เพื่อศึกษาถึงผลความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดภายหลังการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่อง โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล การเพิ่มจำนวน DNA ด้วยไพรเมอร์ ITS4-5 ที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 600-800 คู่เบส แตกต่างกันไปแต่ละชนิดของเห็ด และหลังจากการตัดชิ้น DNA เหล่านั้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 4 ชนิด คือ *Hinf*I, *Alu*I, *Mbo*I และ *Taq*I พบว่าหลังจากการตัดชิ้น DNA แล้วมีขนาดของชิ้น DNA ที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1-4

ตารางที่ 1 แสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ บนวุ้นหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I

Mushroom species	PCR product (bp)	PCR-RFLP product digested by *Alu* I (bp)
L. polychrous	700	390, 135
L. squarrossula	700	400, 100
P. ostreatus	700	600, 90
P. sajor-caju	700	600, 100
P. cystidiosus	750	400, 180
Tricholoma crassum	700	500
A. auricula	600	390, 123
Agrocybe cylindracea	750	520, 200
Lentinus edodes	800	500, 190, 100

ตารางที่ 2 แสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ บนวุ้นหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Mbo* I

Mushroom species	PCR product (bp)	PCR-RFLP product digested by *Mbo* I (bp)
L. polychrous	700	290, 190
L. squarrossula	700	290, 190
P. ostreatus	700	400, 190, 100
P. sajor-caju	700	400, 200, 100
P. cystidiosus	750	400, 300, 70
Tricholoma crassum	700	390, 130
A. auricula	600	400, 180
Agrocybe cylindracea	750	450, 280
Lentinus edodes	800	400, 190, 100, 90

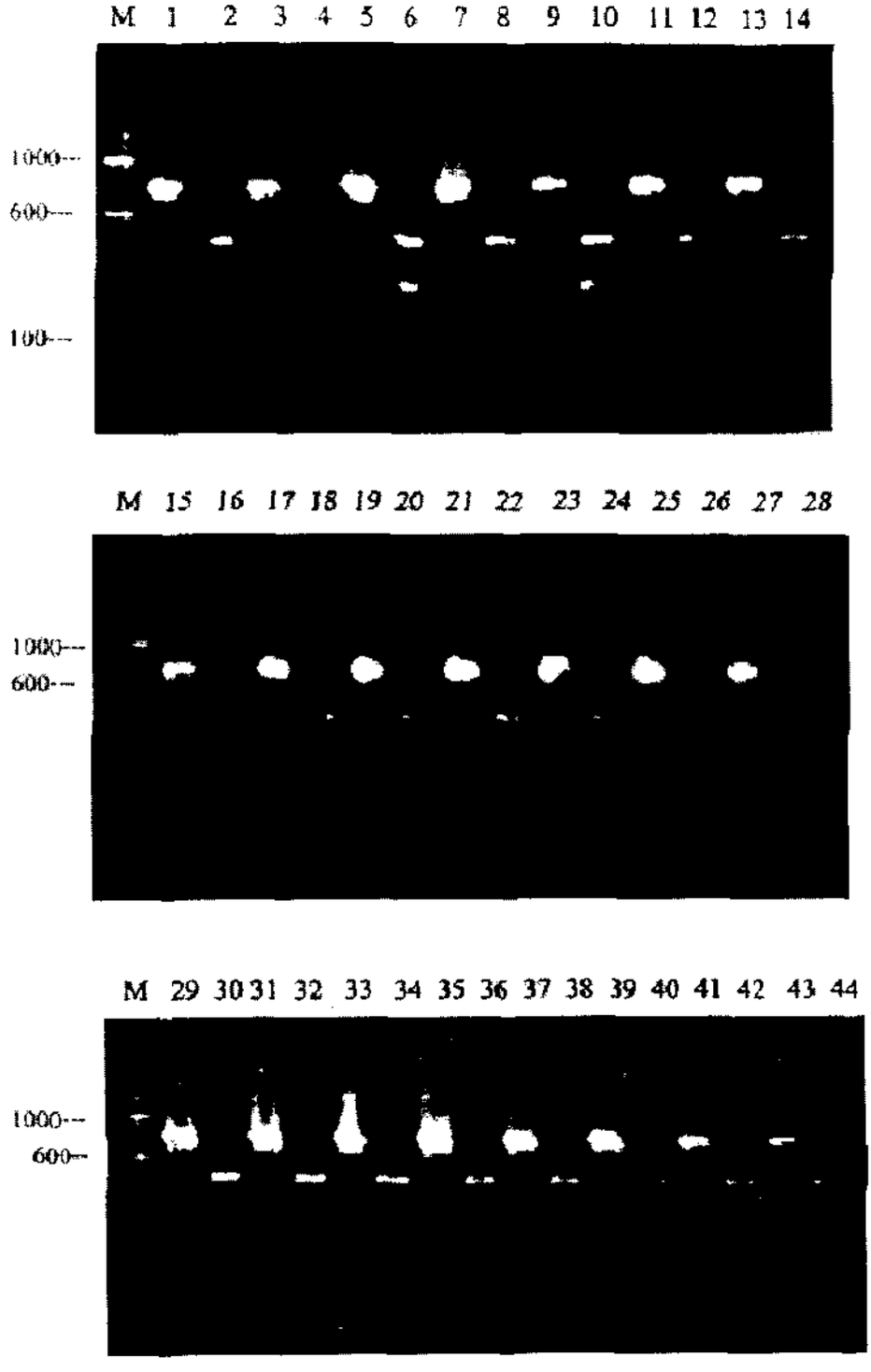
ตารางที่ 3 แสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ บนวุ้นหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq* I

Mushroom species	PCR product (bp)	PCR-RFLP product digested by *Taq* I (bp)
L. polychrous	700	150, 100, 90
L. squarrossula	700	300, 180, 100, 70
P. ostreatus	700	350
P. sajor-caju	700	350
P. cystidiosus	750	330
Tricholoma crassum	700	350, 190, 180
A. auricula	600	320, 200
Agrocybe cylindracea	750	350, 210, 120
Lentinus edodes	800	400, 320

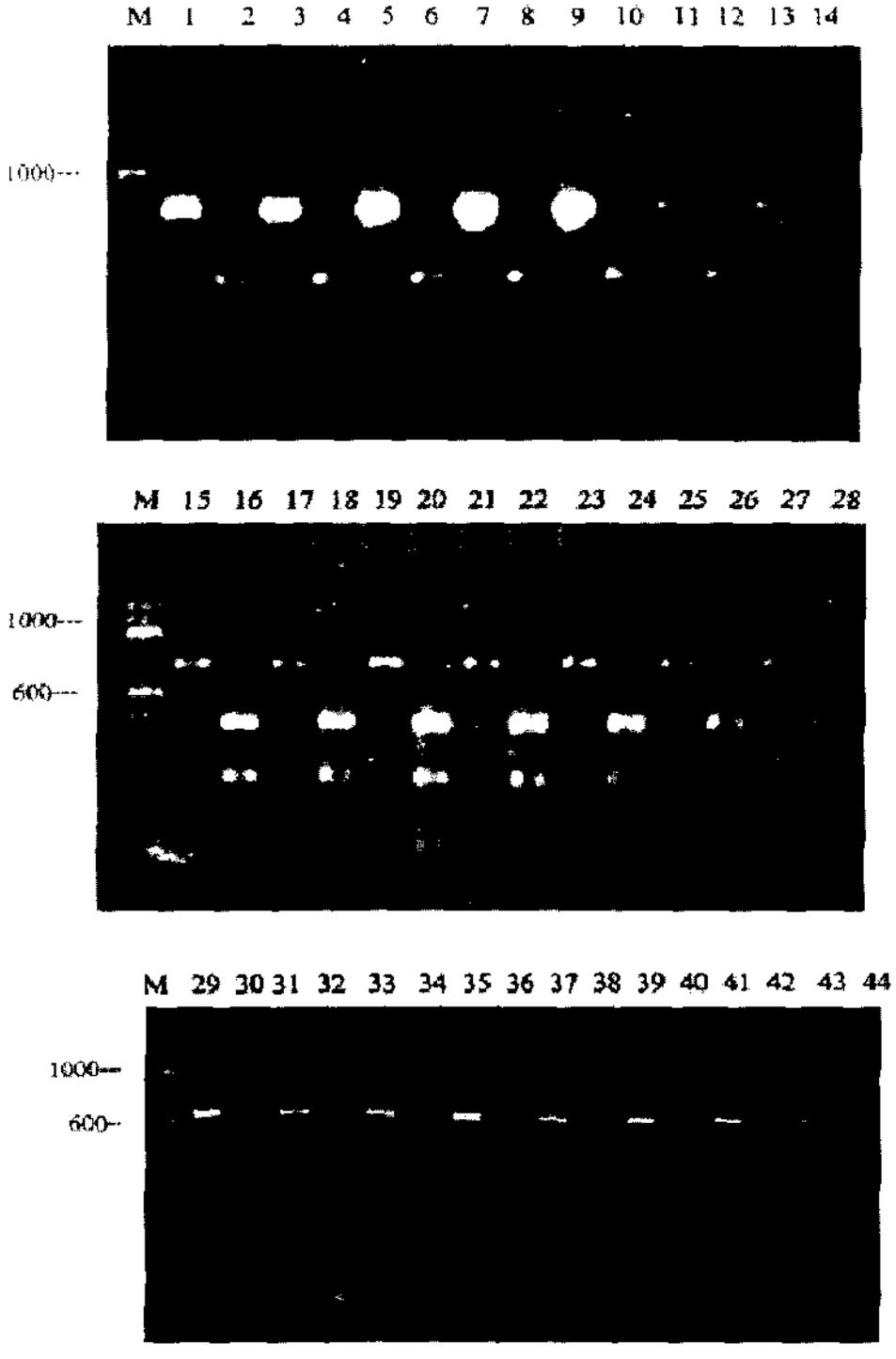
ตารางที่ 4 แสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ บนวุ้นหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hinf* I

Mushroom species	PCR product (bp)	PCR-RFLP product digested by *Hinf* I (bp)
L. polychrous	700	300, 200, 150
L. squarrossula	700	390, 380
P. ostreatus	700	390, 230, 110
P. sajor-caju	700	400, 230
P. cystidiosus	750	300, 250, 150
Tricholoma crassum	700	300, 200, 180
A. auricula	600	300
Agrocybe cylindracea	750	350, 210, 180
Lentinus edodes	800	500

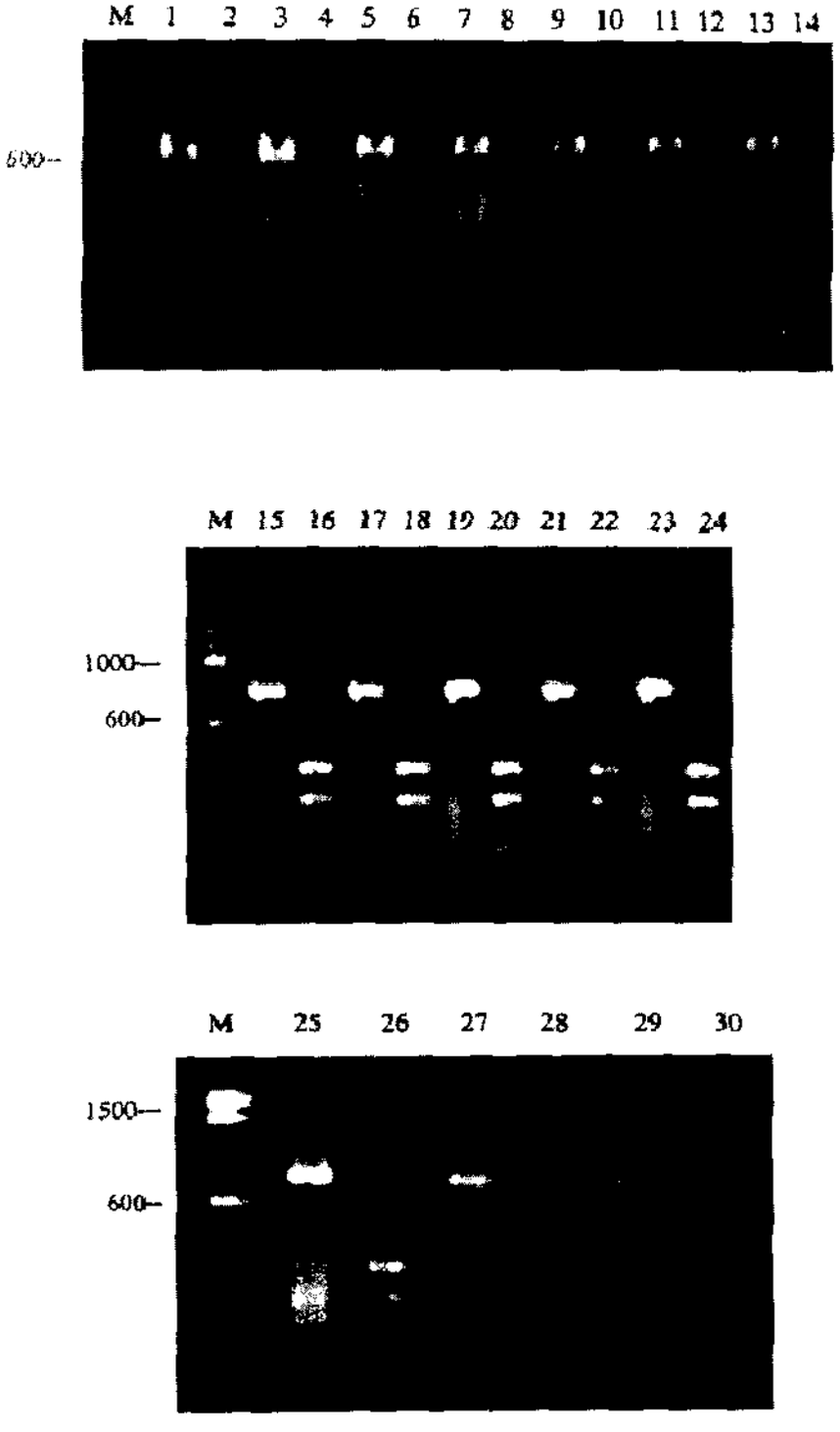
จากตารางที่ 1-4 และรูปที่ 5-40 แสดงถึงขนาดของชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดให้ขนาดชิ้น DNA ที่แตกต่างกันซึ่งลำดับเบส ITS มักจะถูกนำมาใช้ในการศึกษาแยกความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตจำพวกรา ดังเช่นในเห็ดตระกูล *Lentinus* (Fukada และ Tokimoto, 1994) และในเชื้อราแบนสูง โดยมี 18s, 5.8s และ 28s rRNA gene ที่มีส่วนที่มีลำเบสเหมือนกันมากที่สุดระหว่างเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งส่วนของเบส ITS สามารถเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ในช่วงของส่วนที่มีความแปรปรวนสูง ดังนั้นไพรเมอร์นี้จึงถูกเลือกมาใช้ศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดหลังจากการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่องได้ ผลการทดลองพบว่าขนาดของชิ้น DNA ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิดยังคงให้ขนาดเท่าเดิมเมื่อเปรียบเทียบขนาดชิ้น DNA ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ยกเว้นในเห็ดหูหนูของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ที่ให้ขนาดชิ้น DNA เปลี่ยนแปลงไปจากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่า TIS4-5 สามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในเห็ดหูหนูได้ ซึ่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดหูหนูอาจเกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญของเชื้อและผลผลิตได้ (รายละเอียดข้อ 3) แต่อย่างไรก็ตามไพเมอร์ชุดนี้ยังไม่สามารถใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดทุกชนิดได้ ดังนั้นการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดโดยไพรเมอร์เพียง 1 ชุดยังคงไม่เพียงพอ ควรที่จะมีการตรวจสอบที่ gene ใด gene หนึ่งซึ่งจำเพาะเจาะจงลงไปอีกถึงความบกพร่องของ gene ชุดนั้น ๆ อย่างเช่น gene ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมอัตราการเจริญของเชื้อ, การควบคุมการพัฒนาเจริญของดอกเห็ดและความสามารถของเชื้อในการย่อยสารประเภท lignin



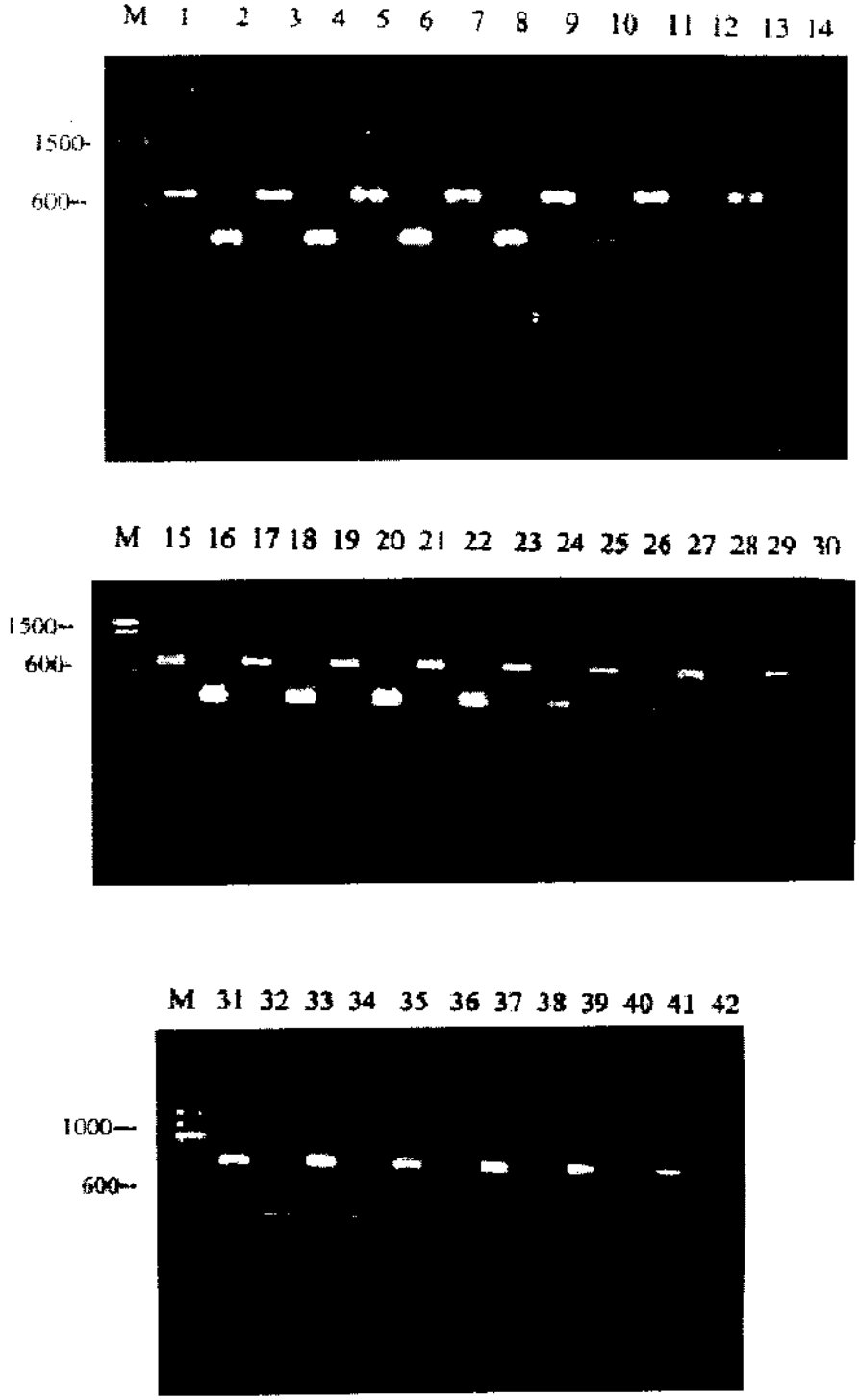
รูปที่ 5 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22



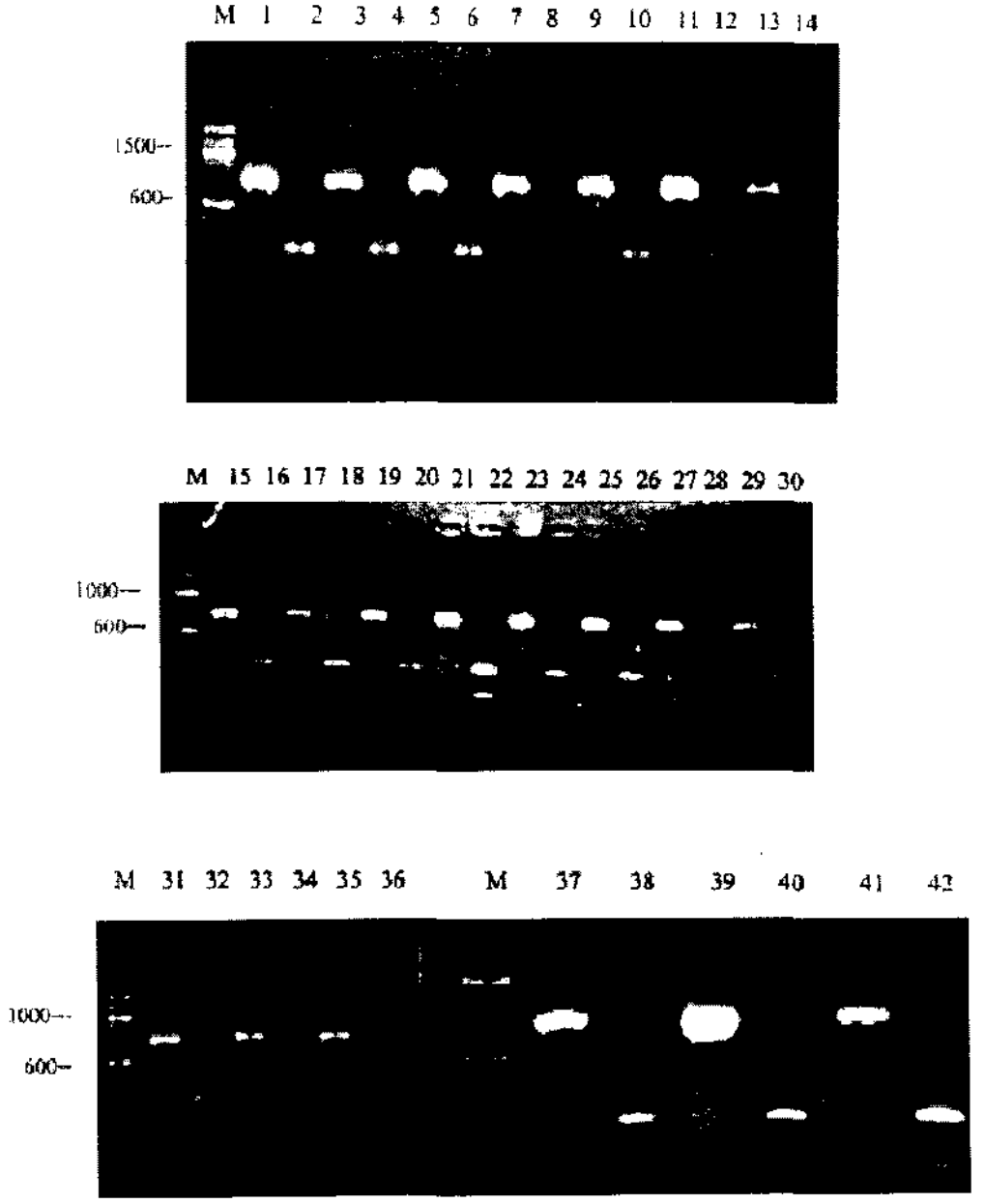
รูปที่ 6 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22



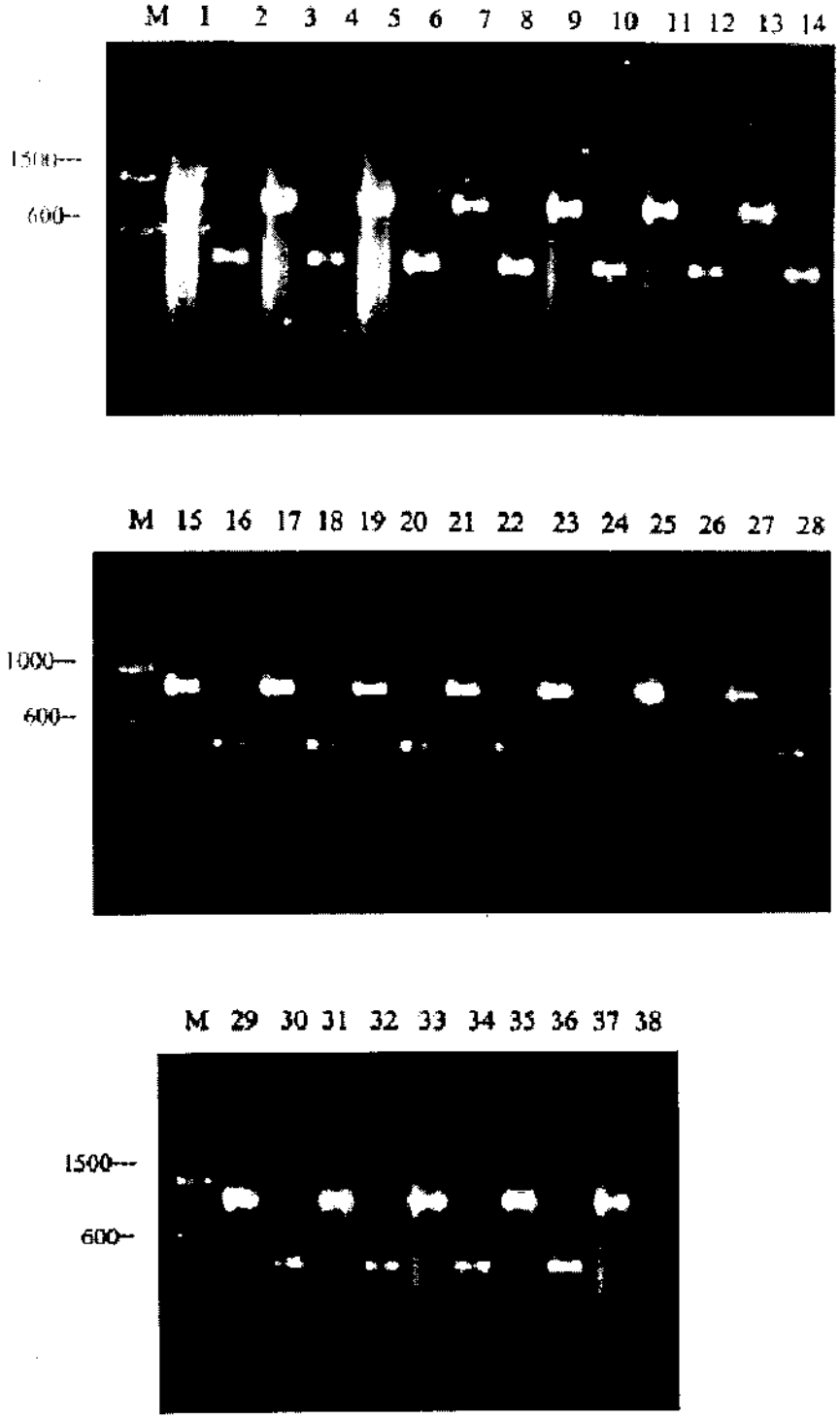
รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus cystidiosus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-15 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-15



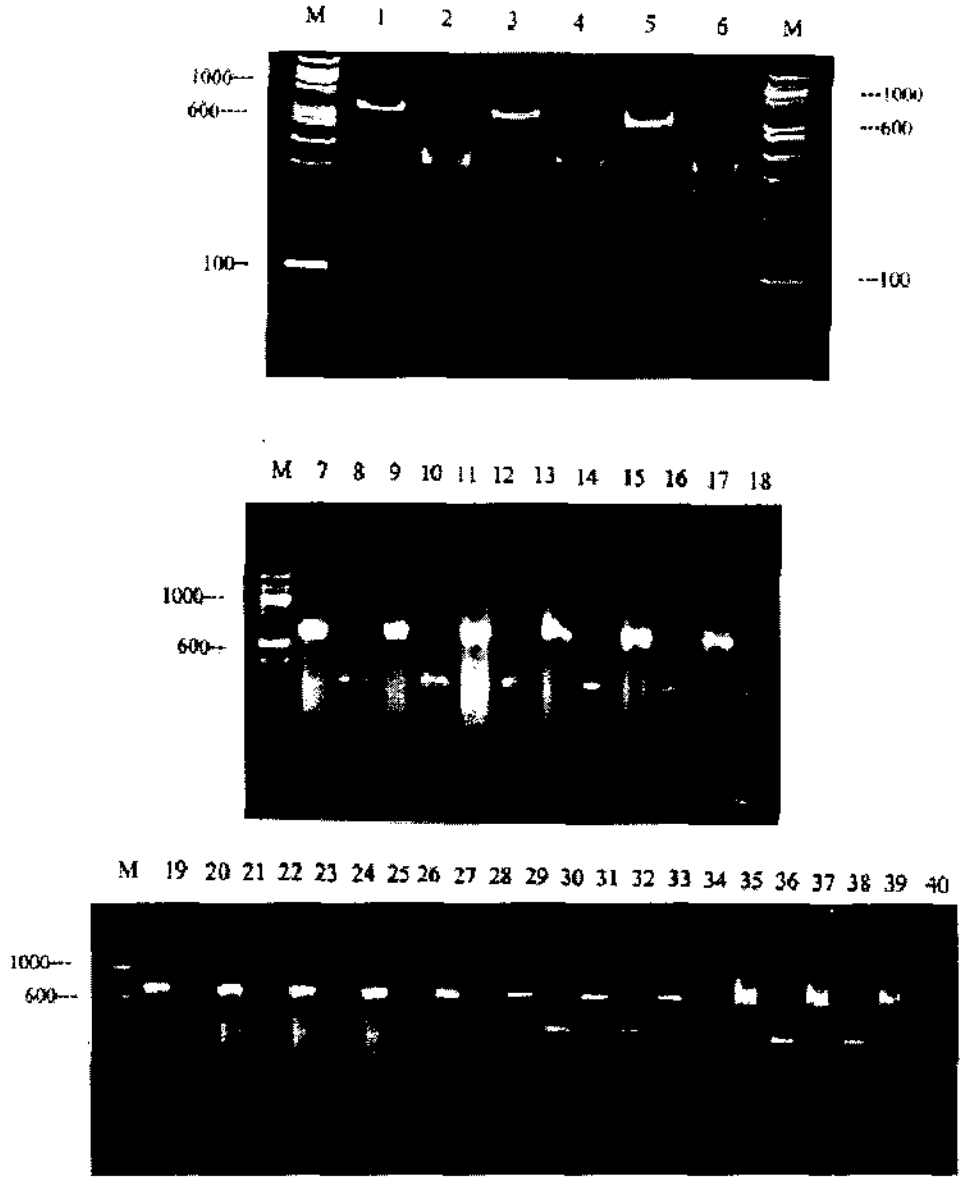
รูปที่ 8 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula squarrossula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21



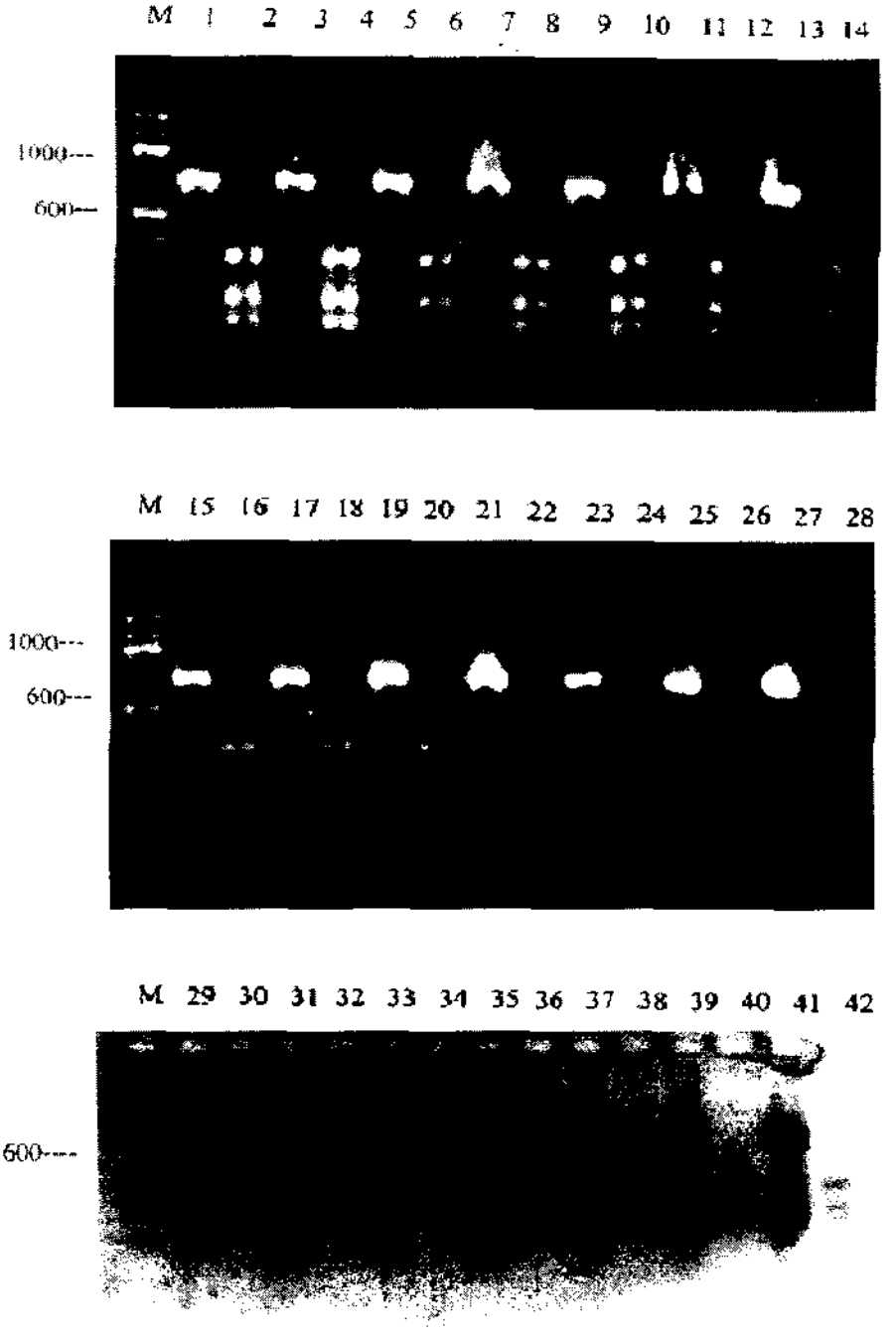
รูปที่ 9 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula polychrous* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21



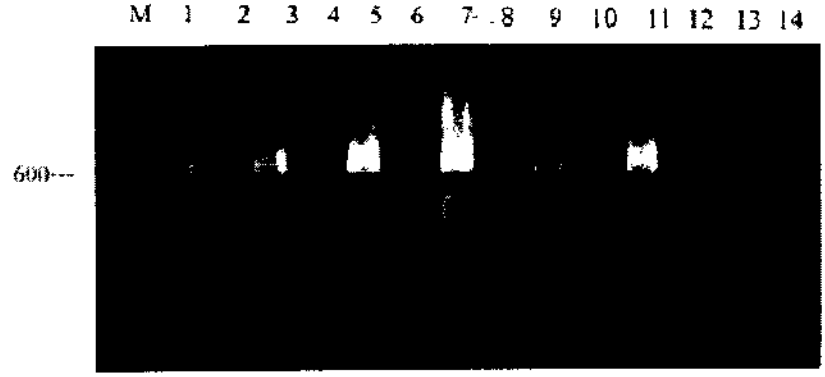
รูปที่ 10 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinus edodes* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20

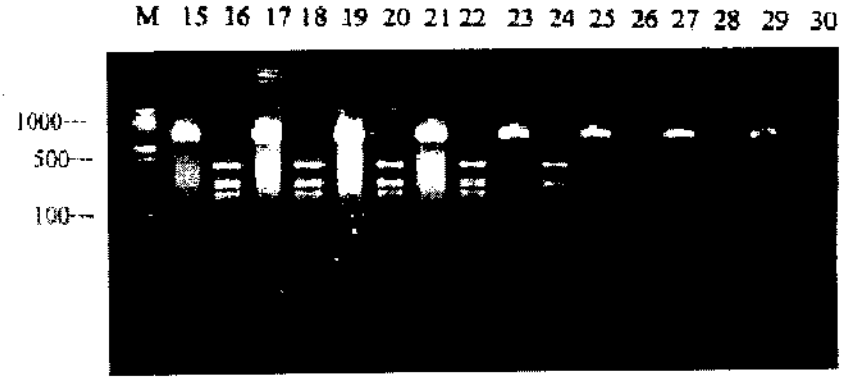


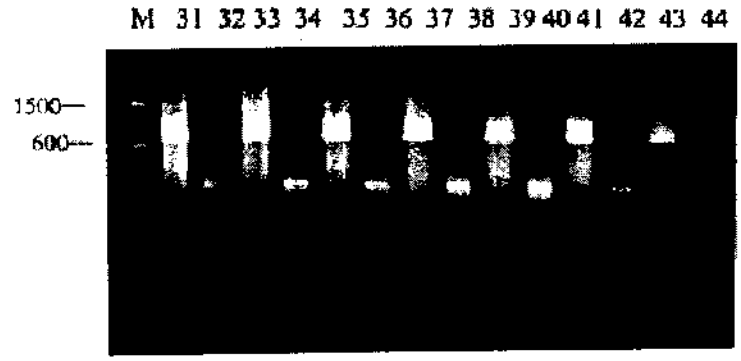
รูปที่ 11 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ :ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20



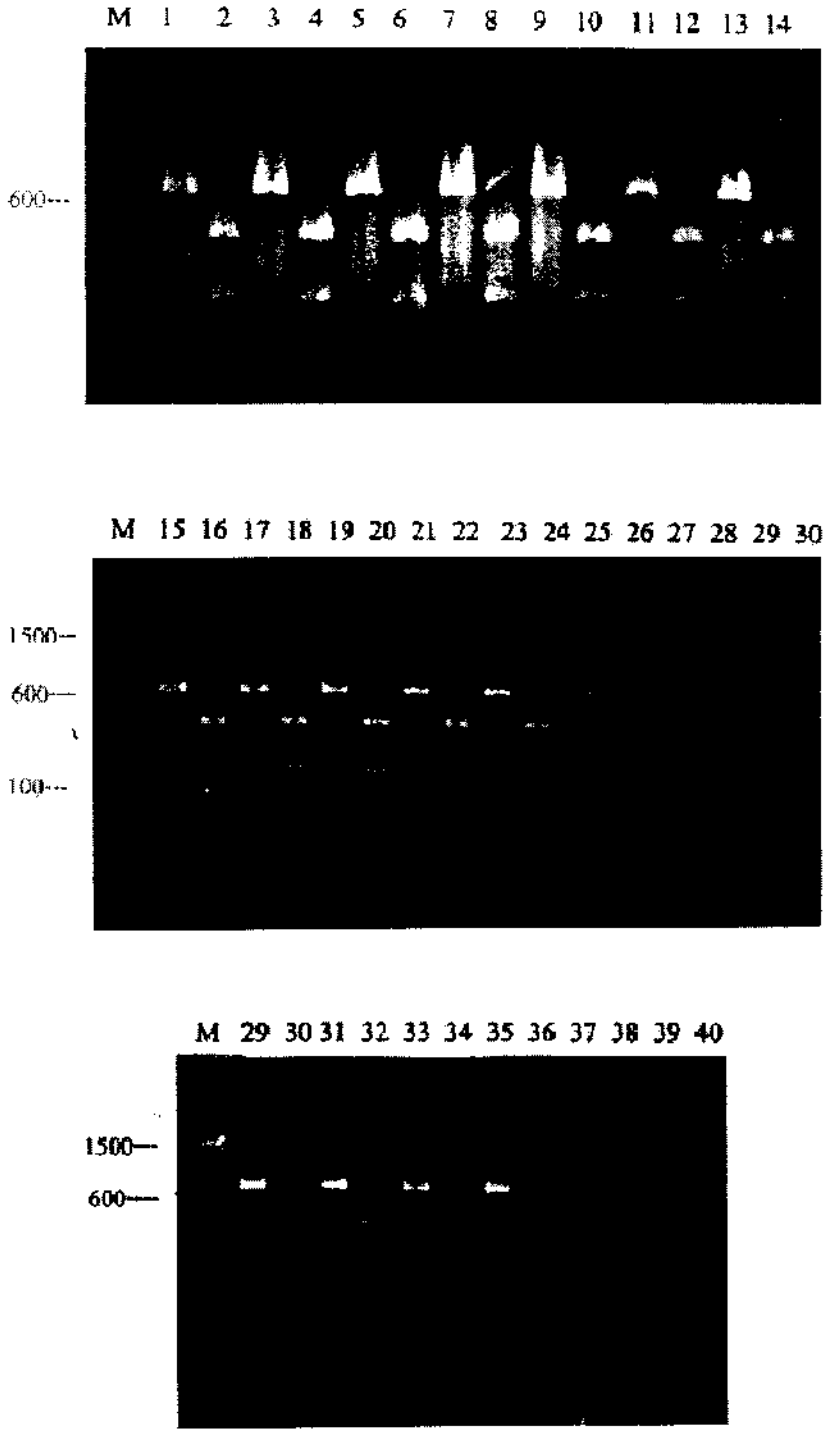
รูปที่ 12 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Agrocybe cylindracea* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20



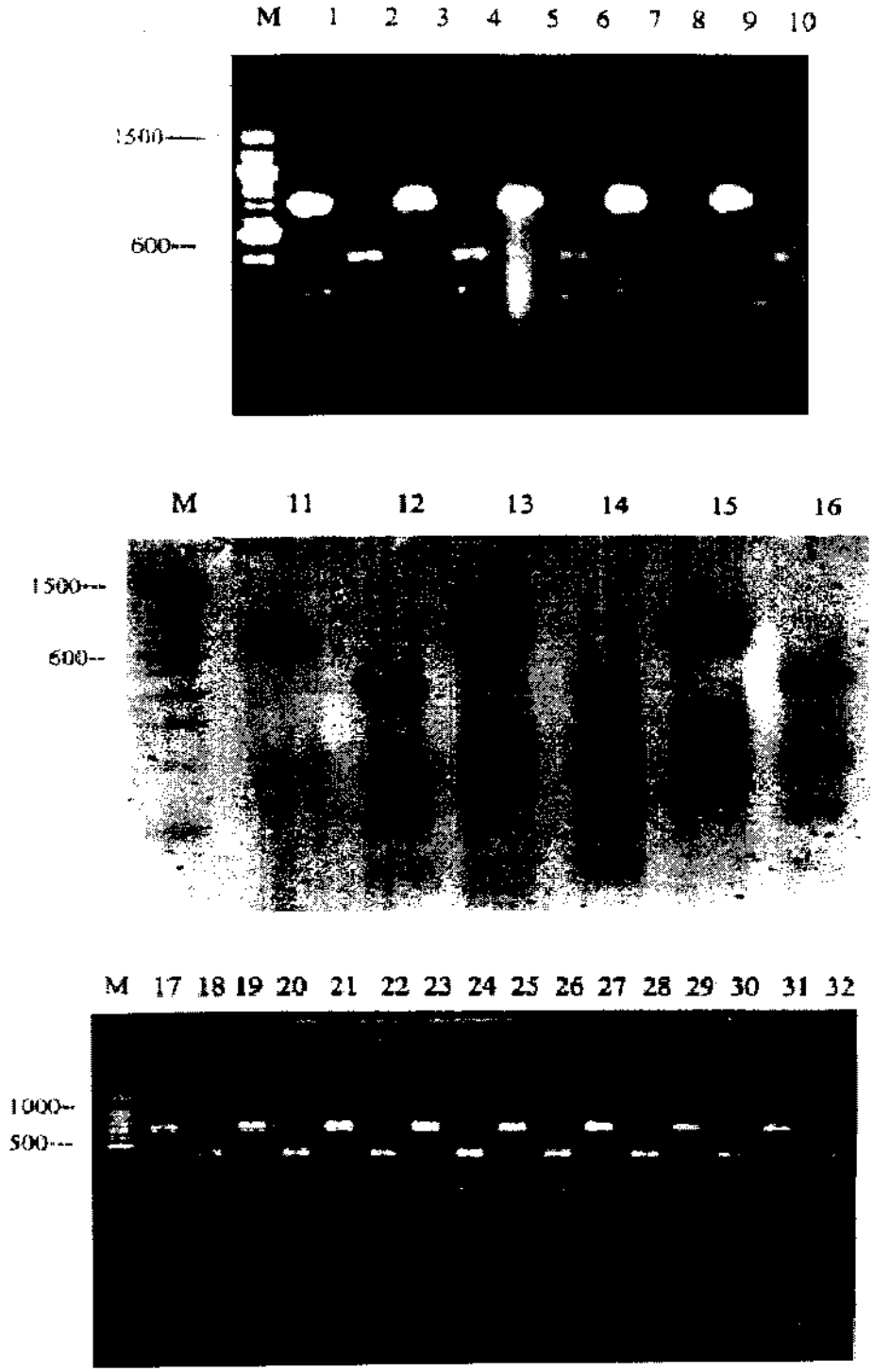




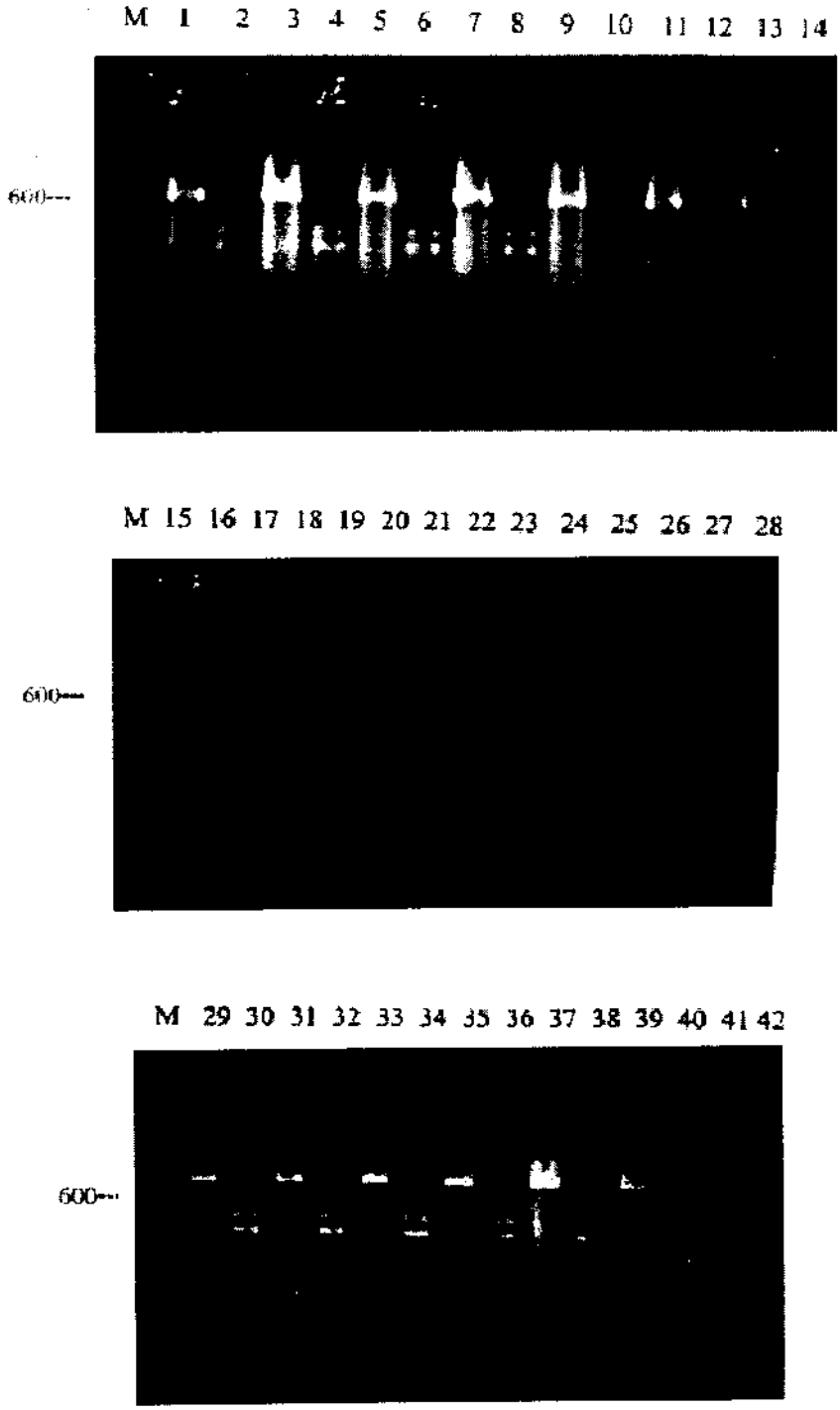
รูปที่ 13 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20



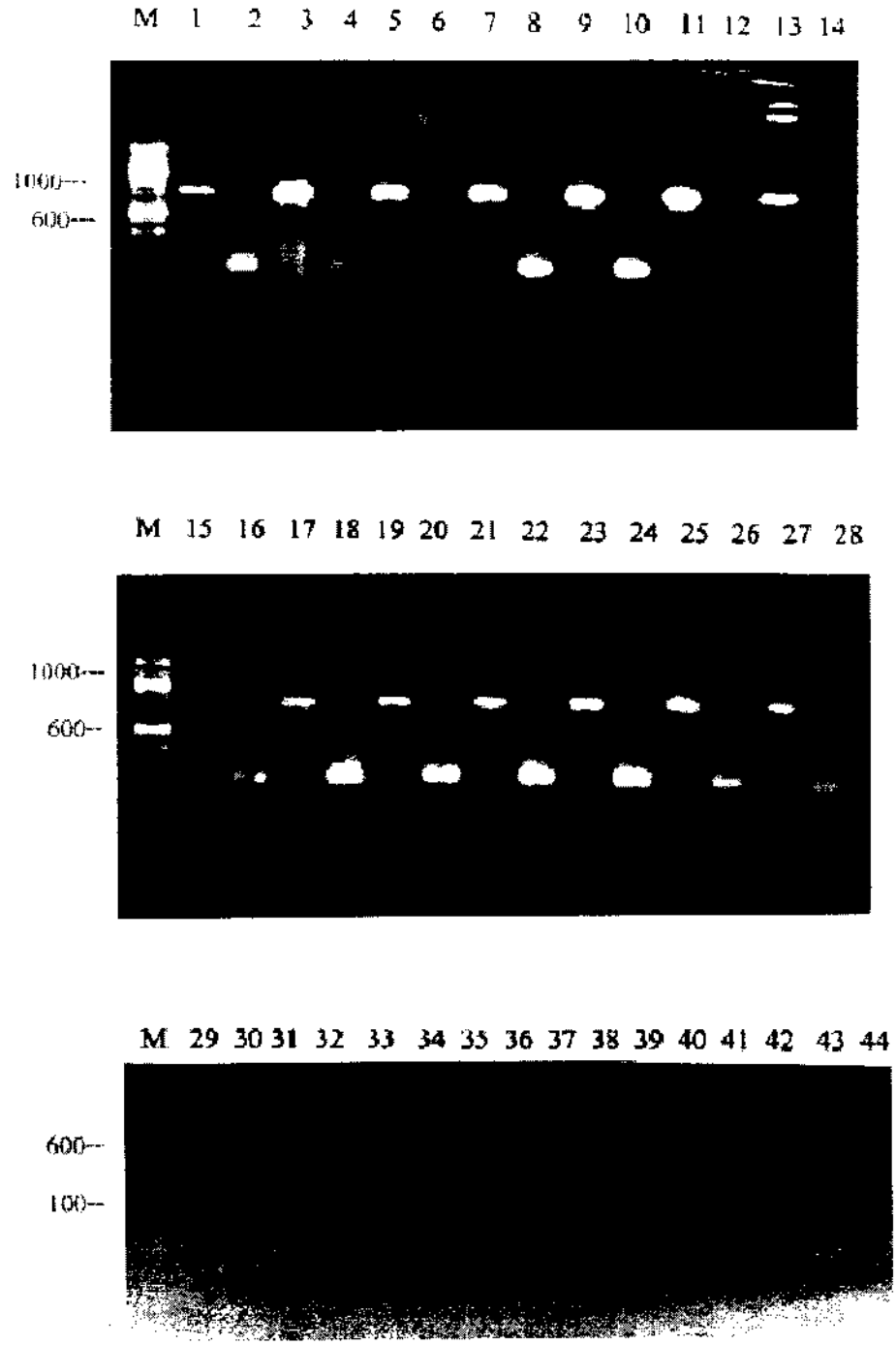
รูปที่ 14 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21



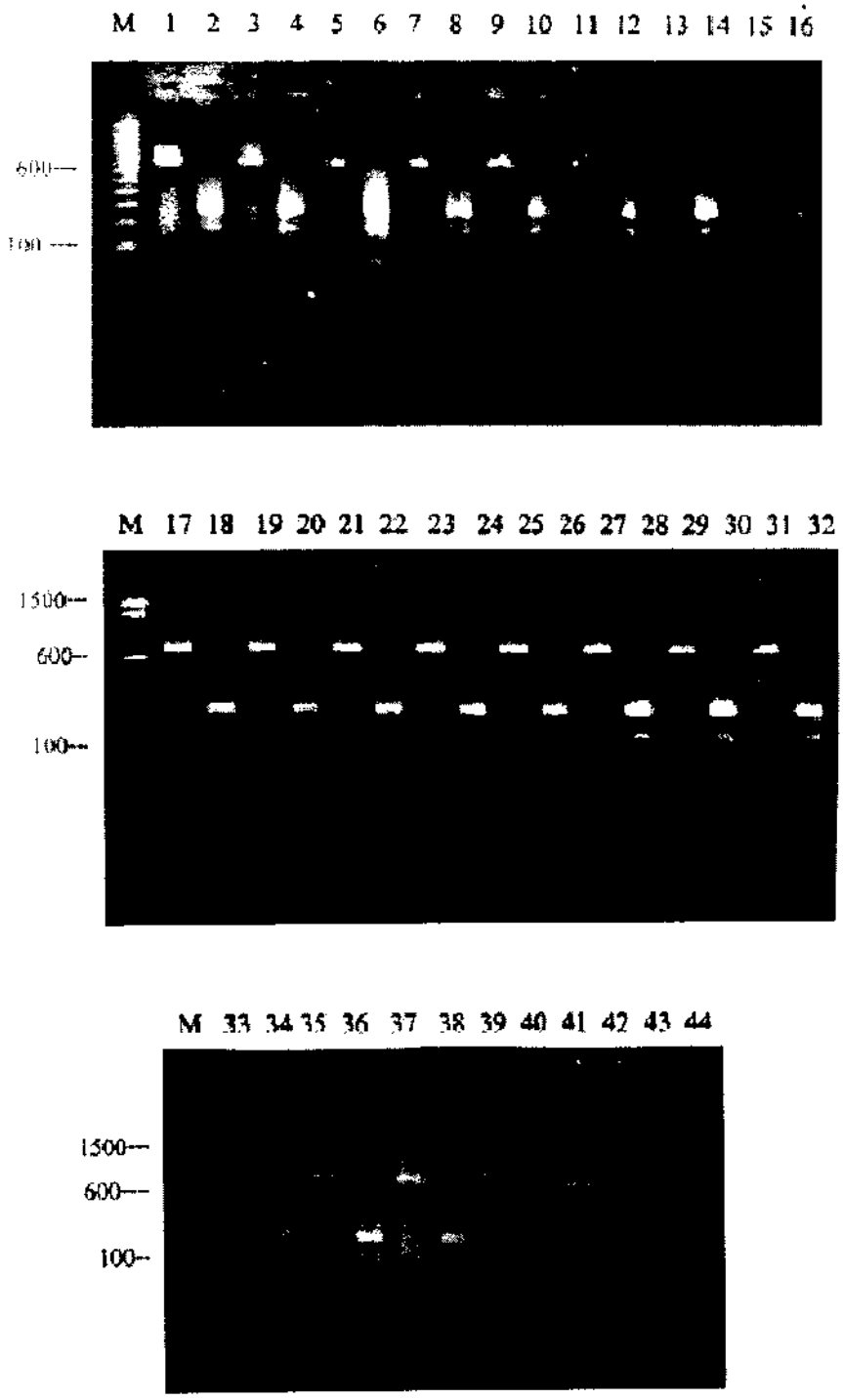
รูปที่ 15 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-16 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-16



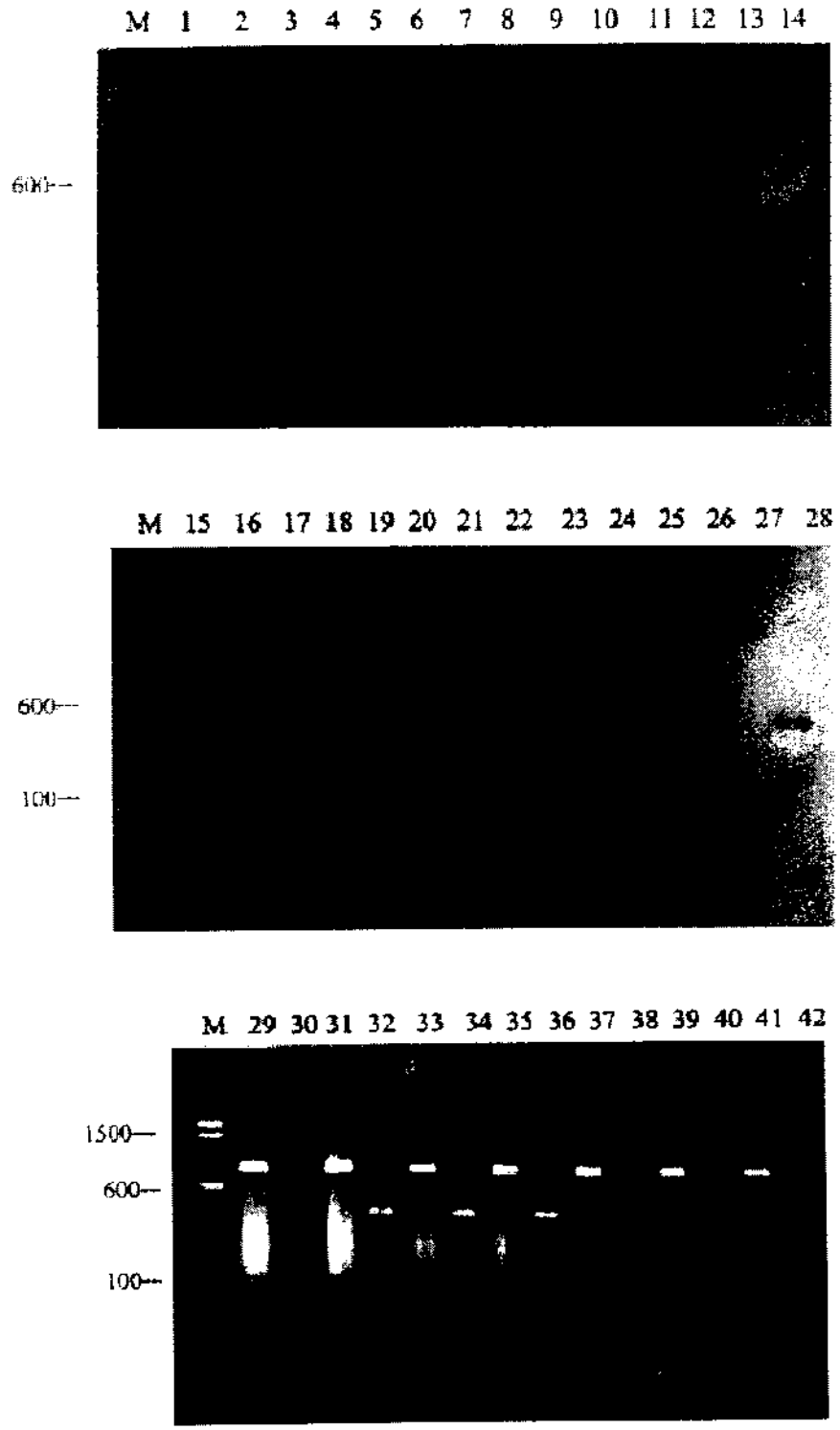
รูปที่ 16 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus cystidiosus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20



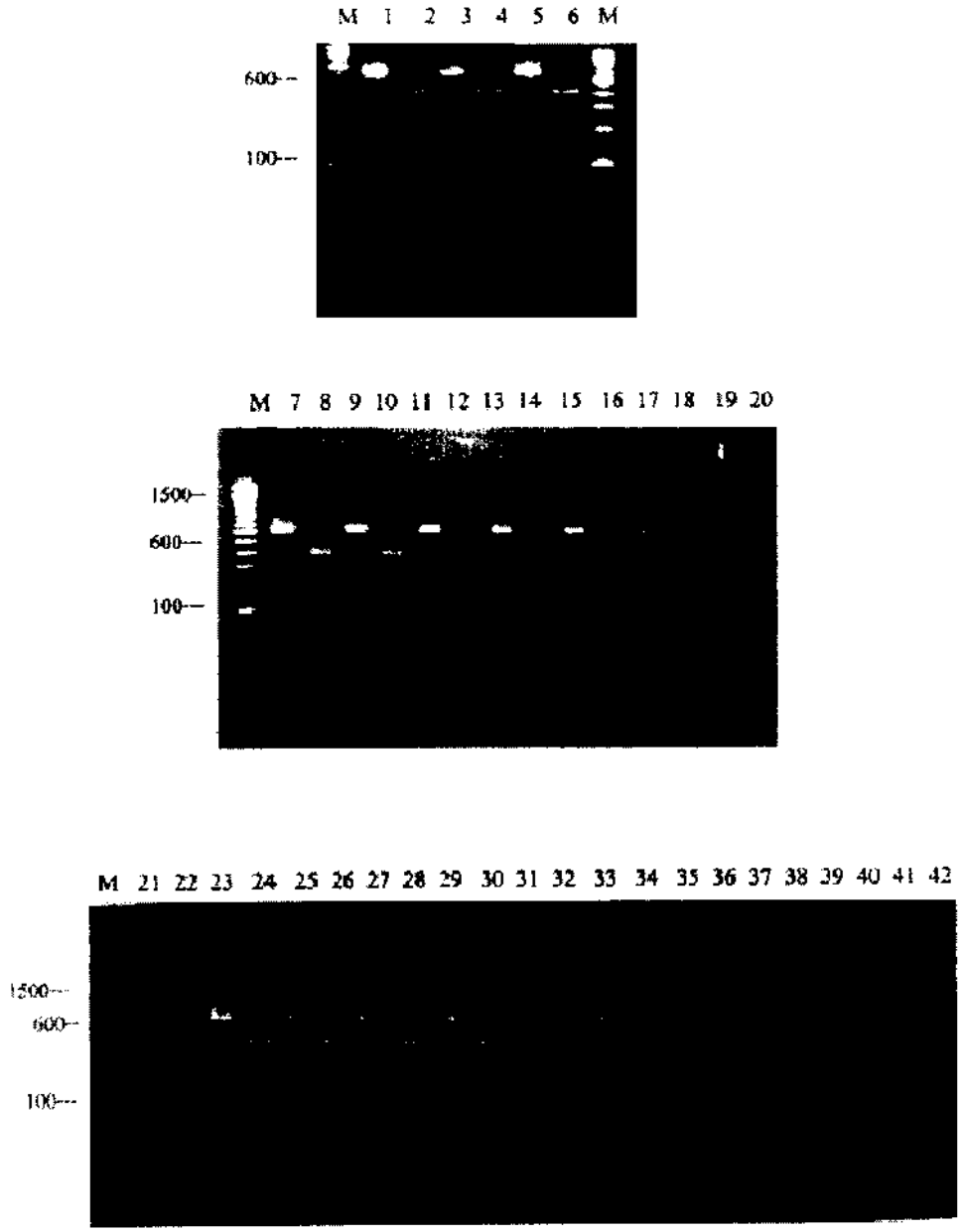
รูปที่ 17 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula squarrossula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22



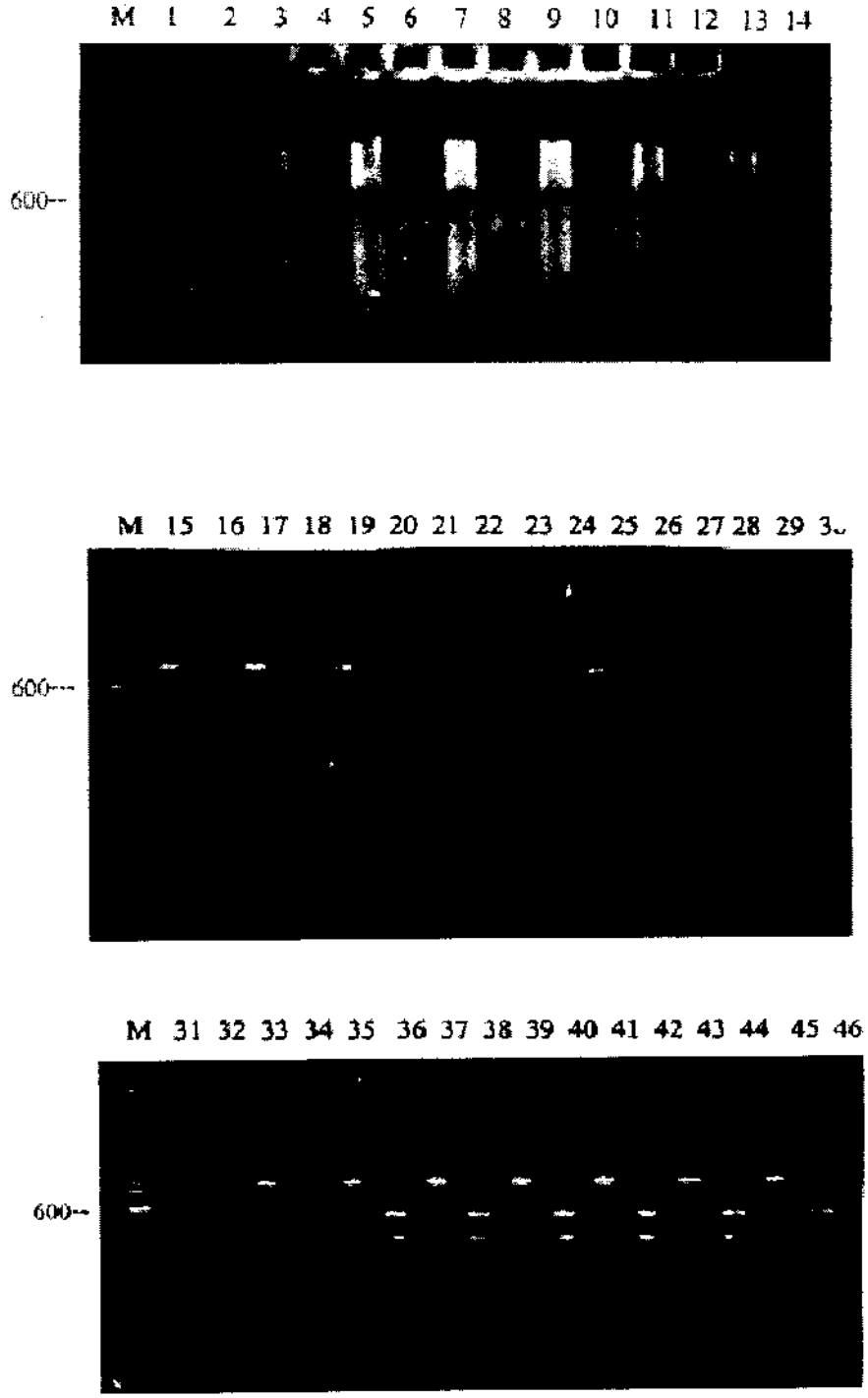
รูปที่ 18 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula polychrous* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของแบนดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22



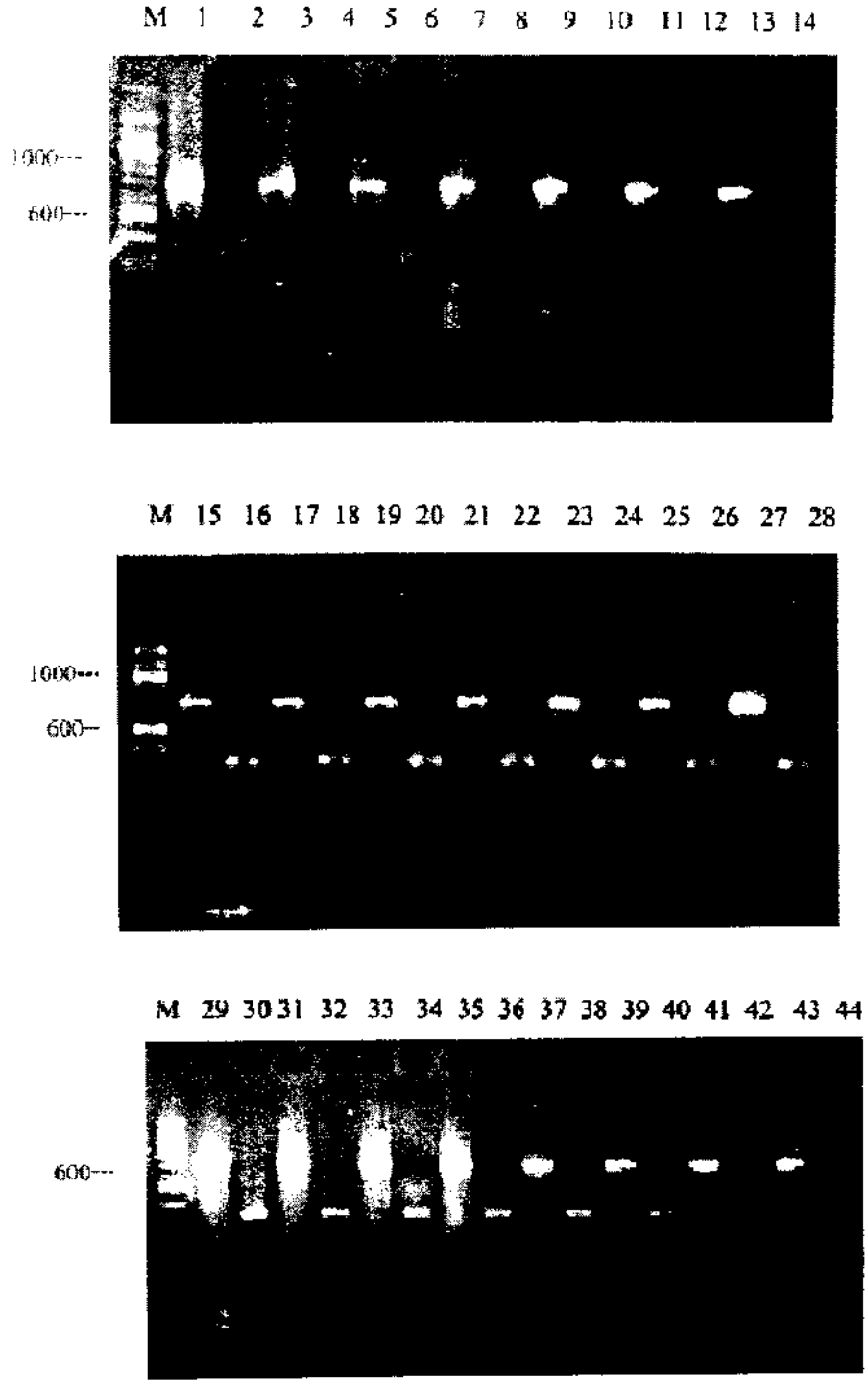
รูปที่ 19 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinus edodes* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21



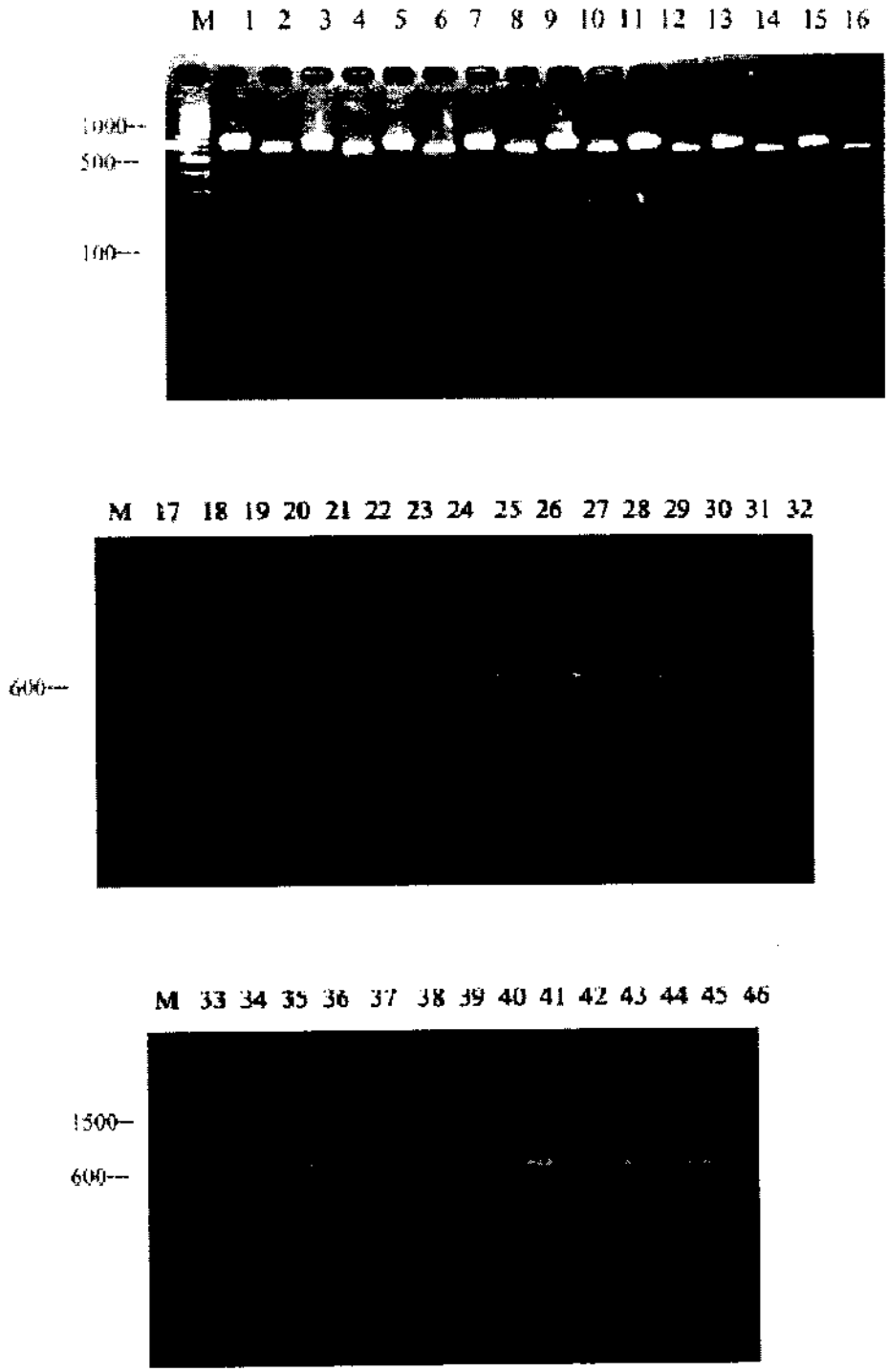
รูปที่ 20 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricla* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21



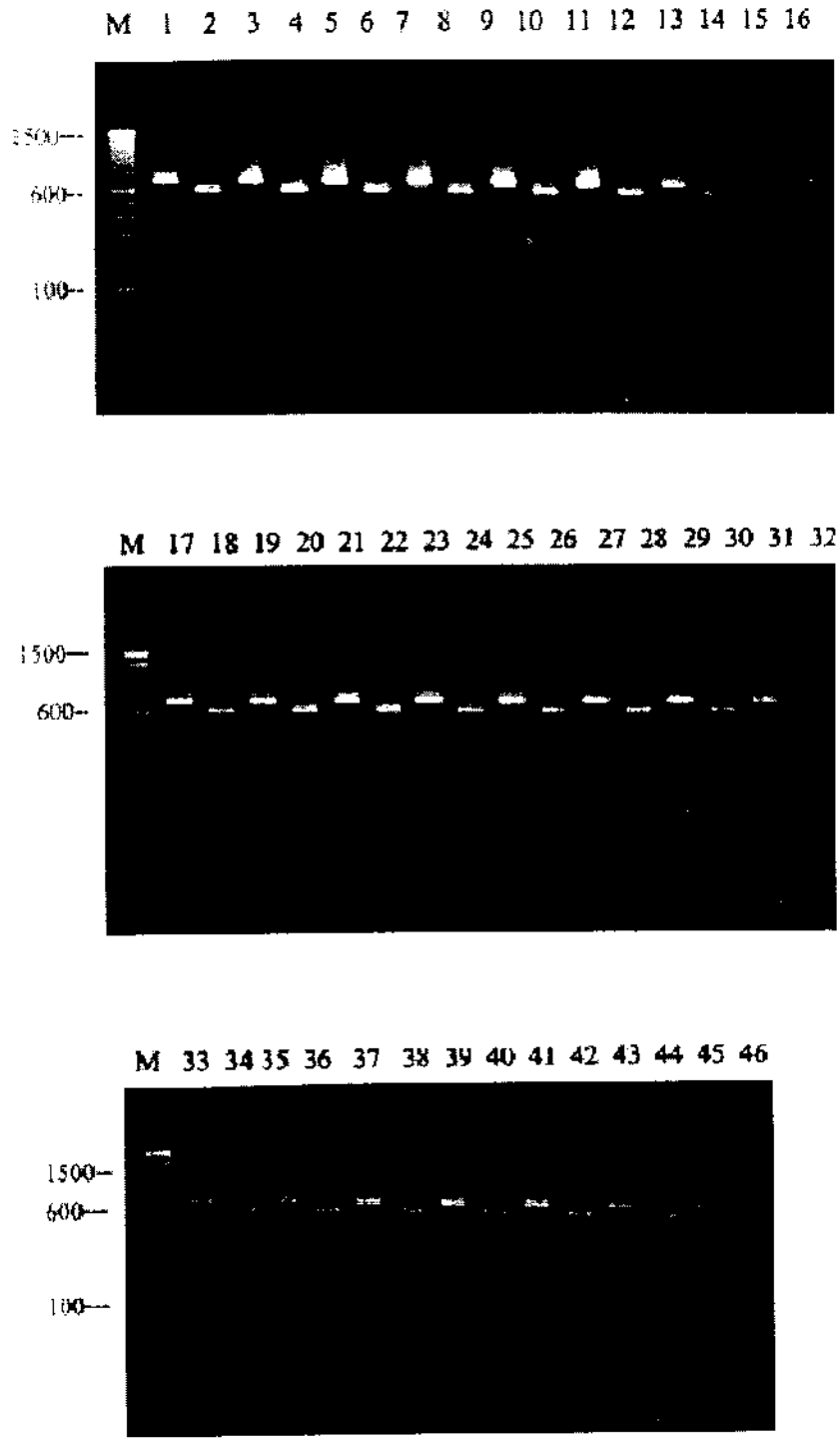
รูปที่ 21 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Agrocybe cylindraceas* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23



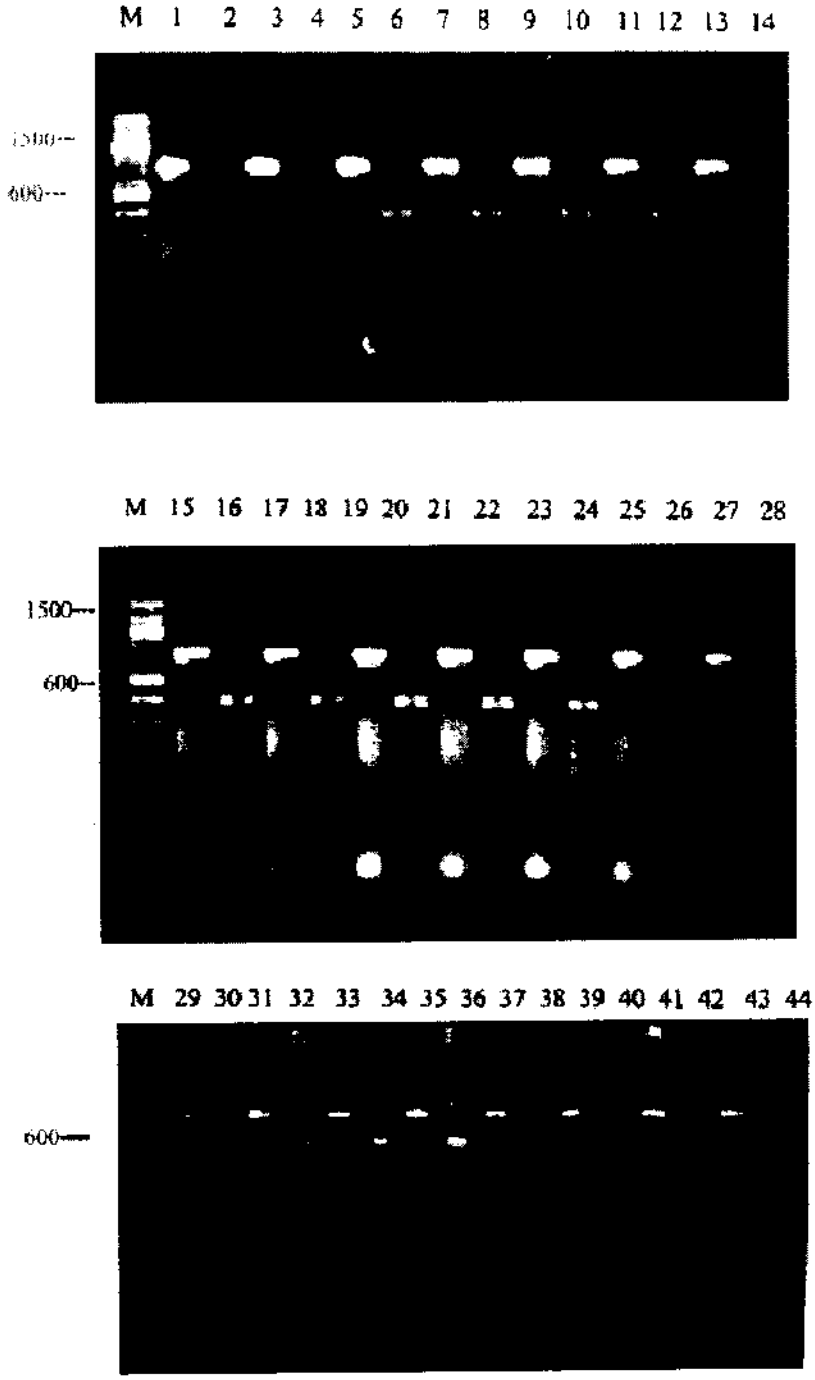
รูปที่ 22 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mbo* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22



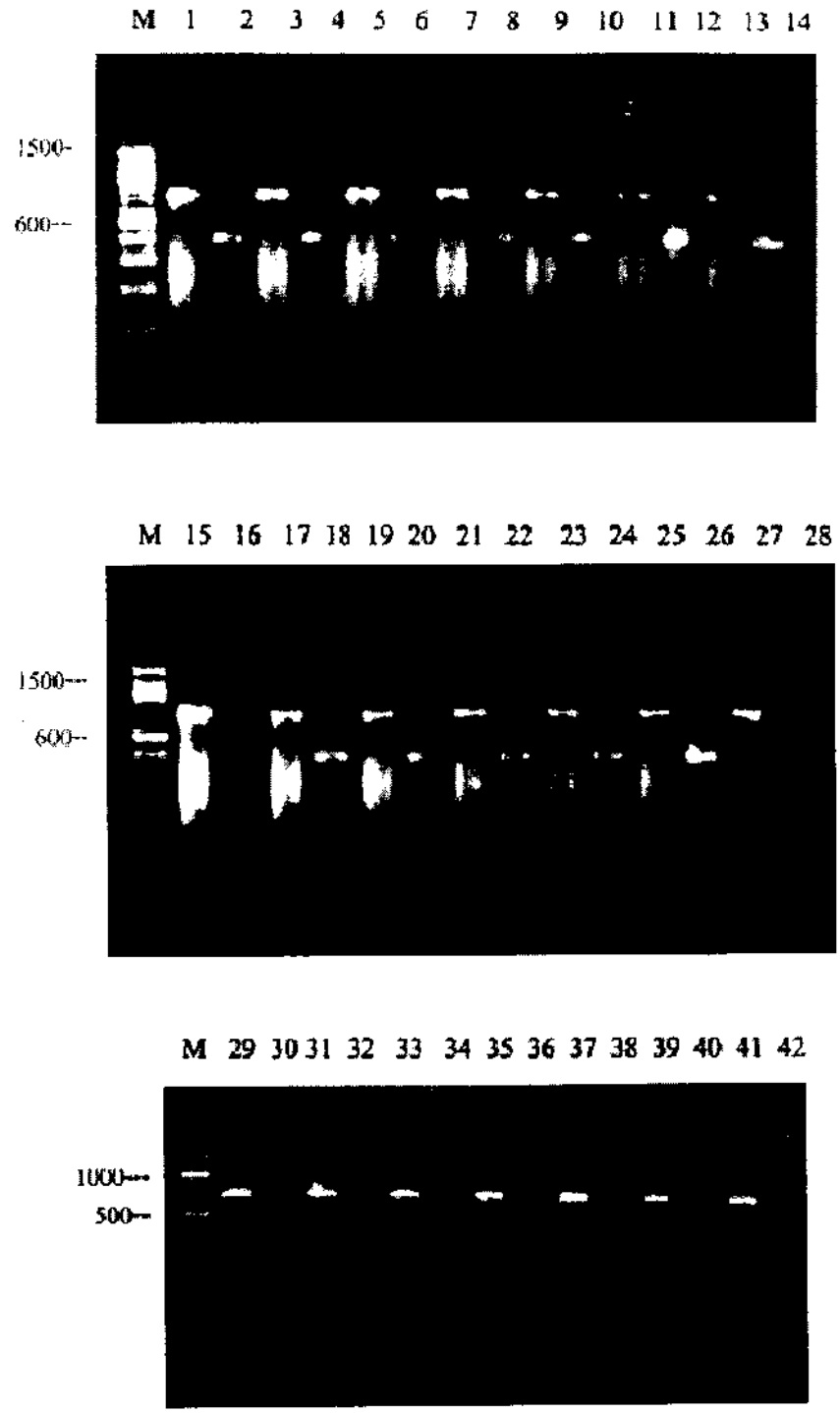
รูปที่ 23 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23



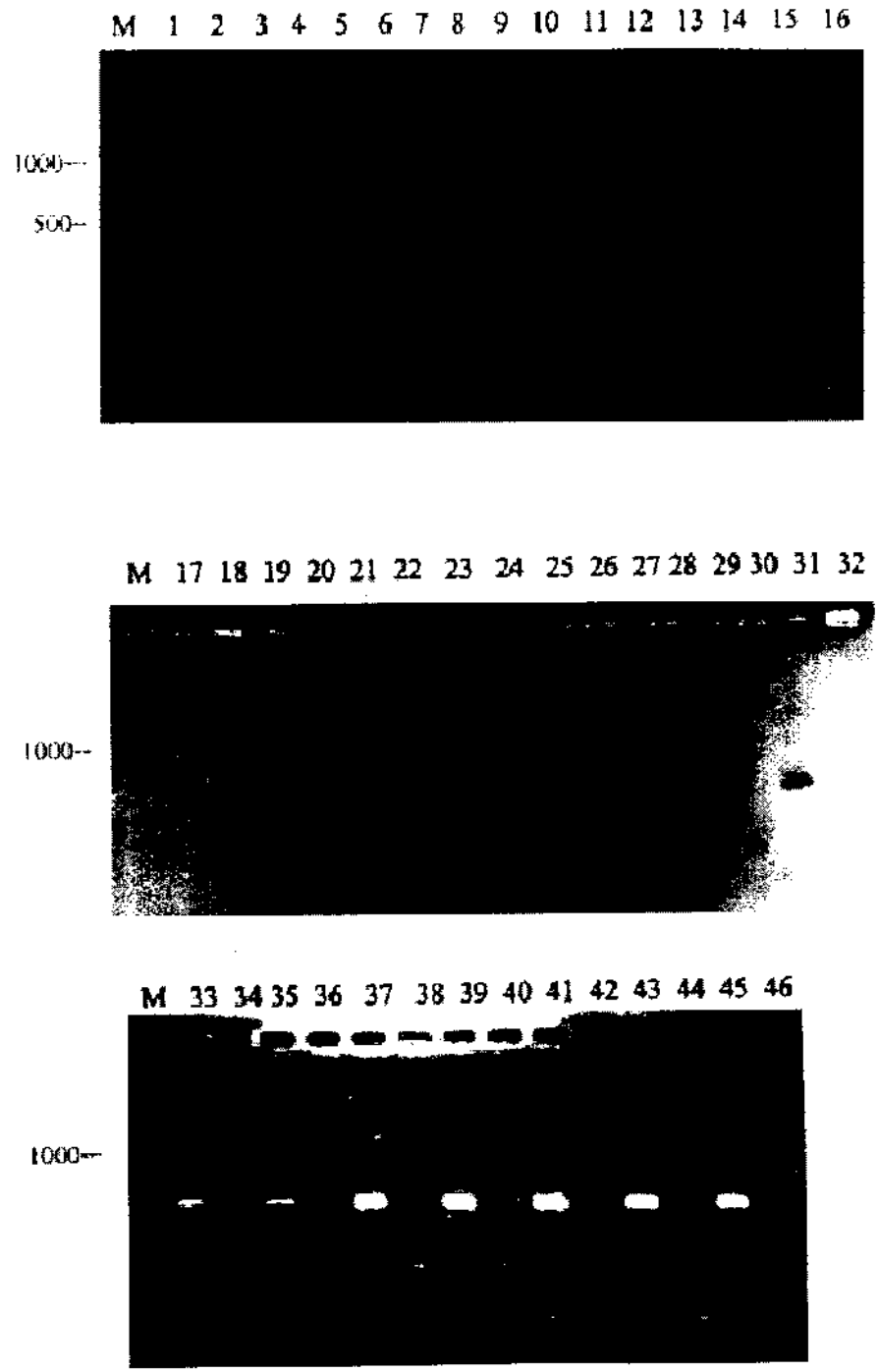
รูปที่ 24 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23



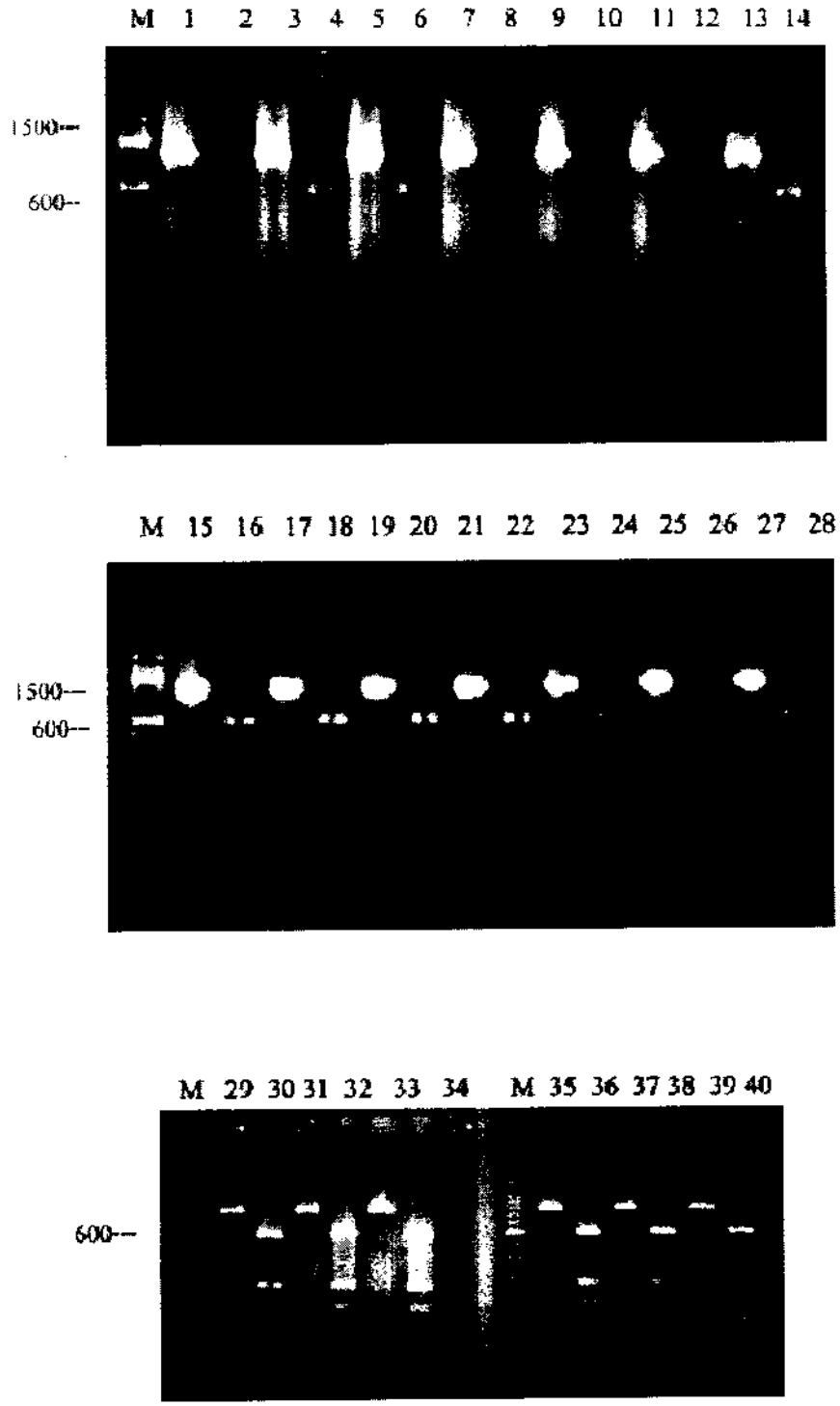
รูปที่ 25 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus cystidiosus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของแบนดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22



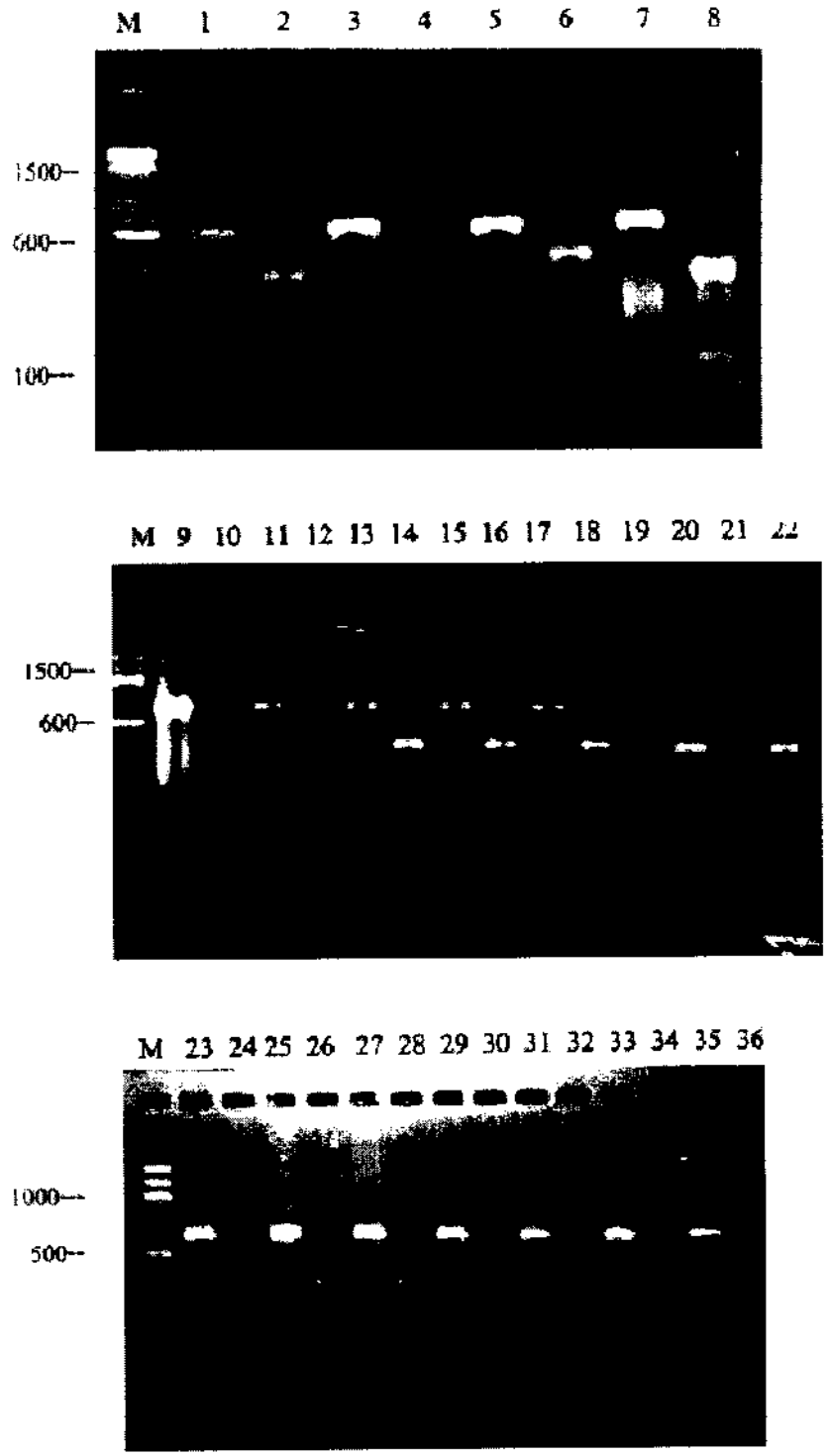
รูปที่ 26 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula squarrossula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของแบนดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21



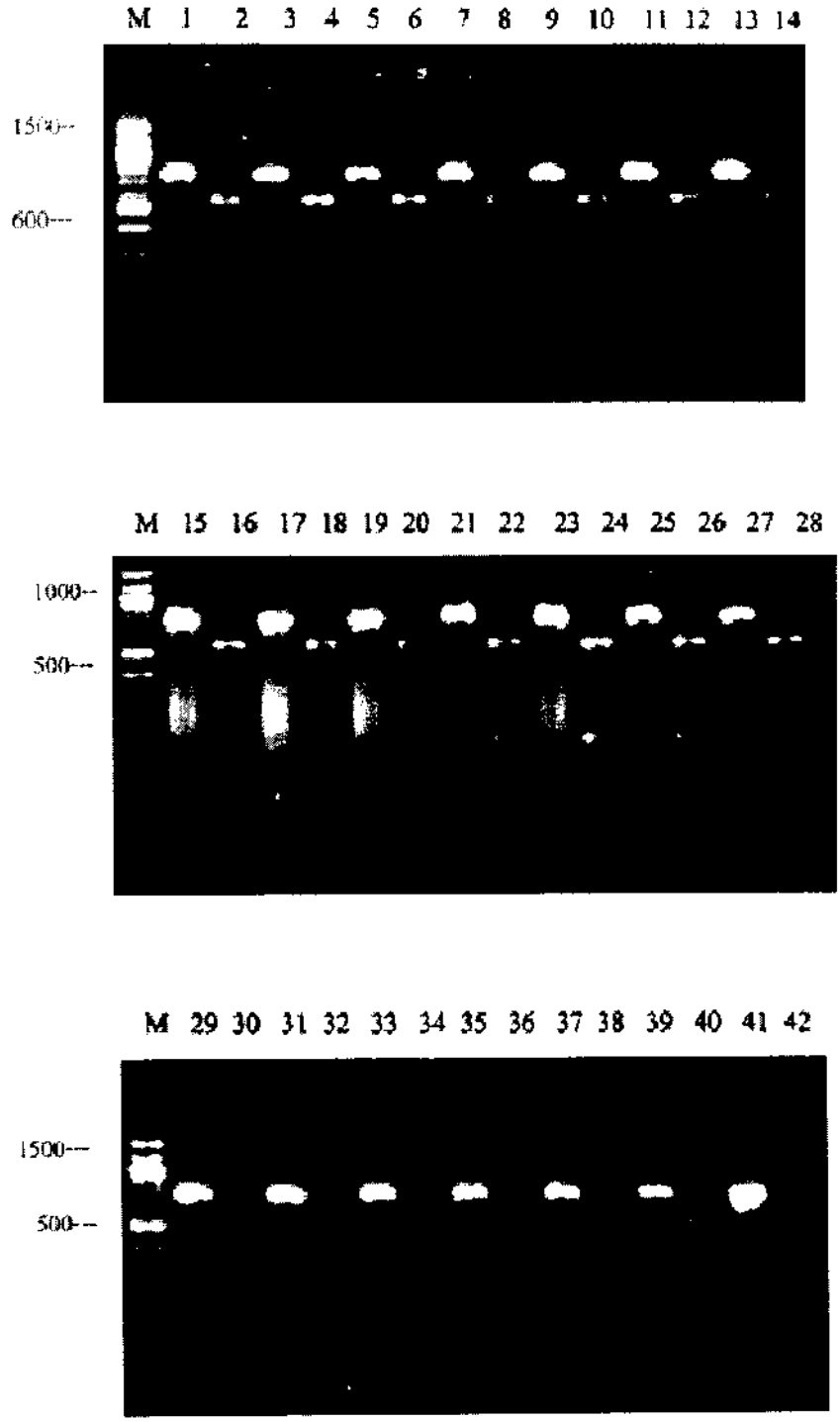
รูปที่ 27 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula polychrous* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-23



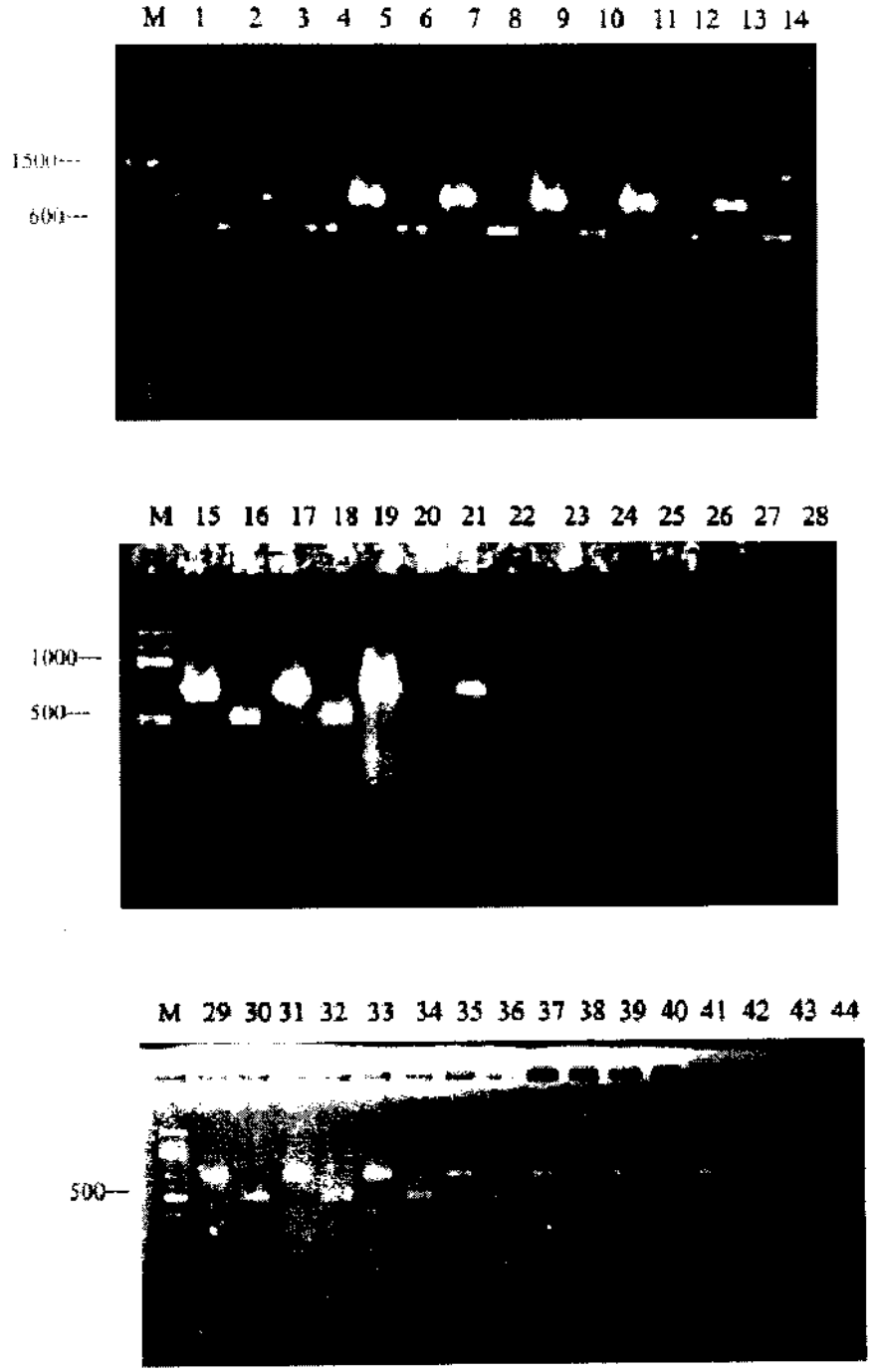
รูปที่ 28 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinus edodes* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20



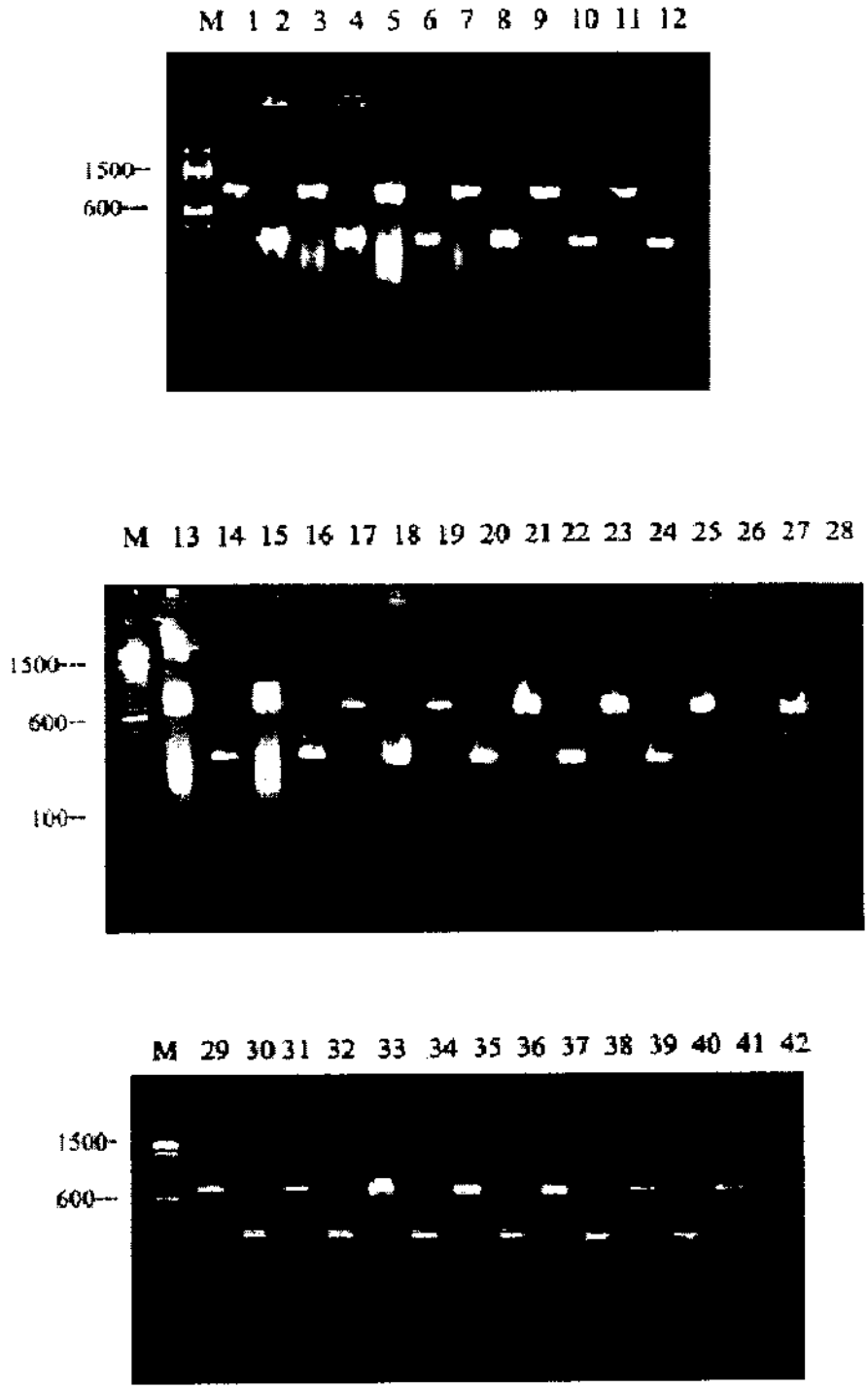
รูปที่ 29 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCOBRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20



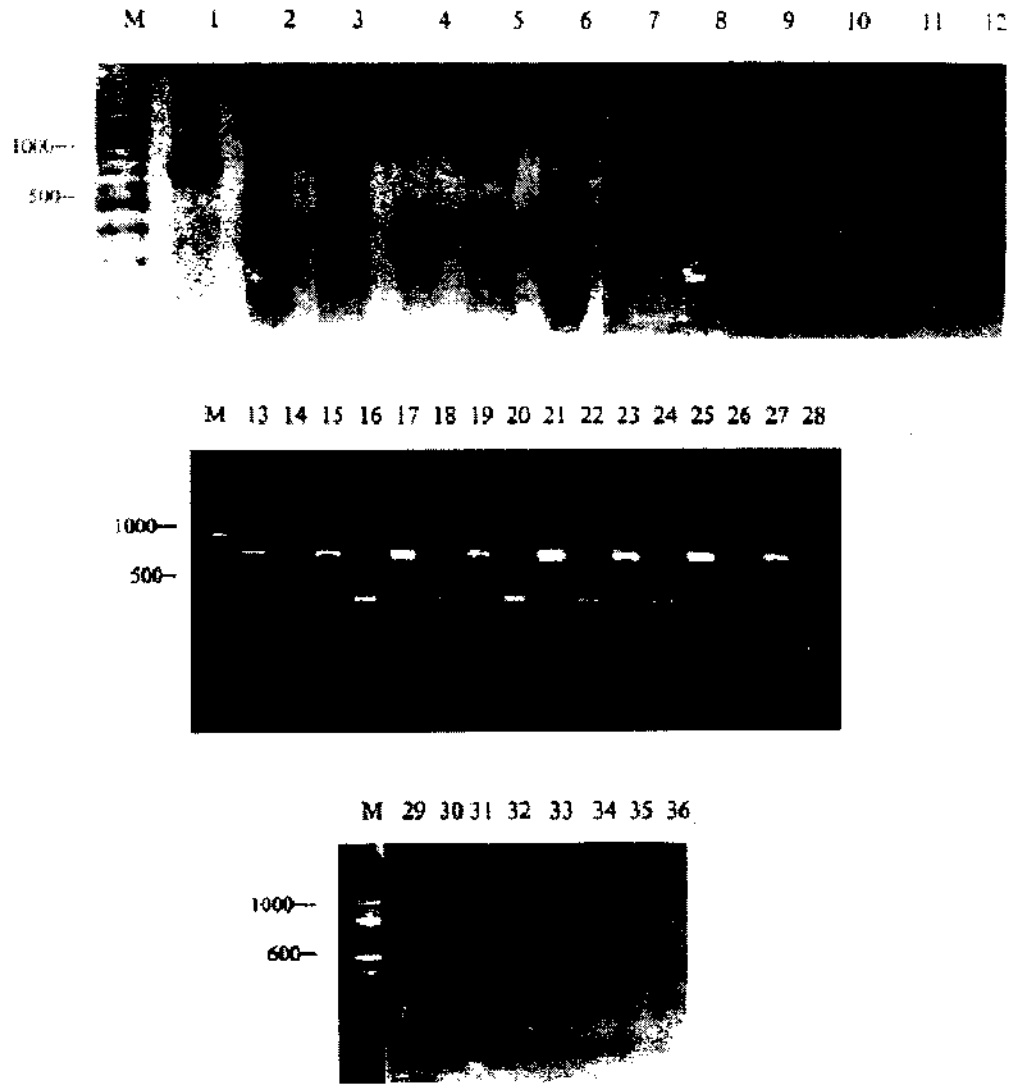
รูปที่ 30 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Agrocybe cylindracea* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21



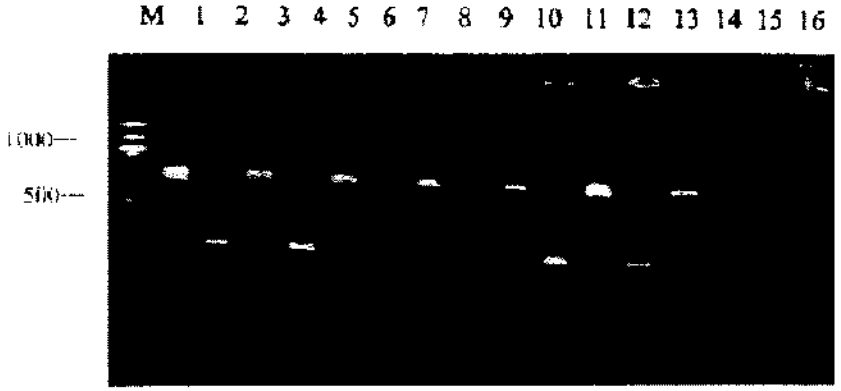
รูปที่ 31 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22

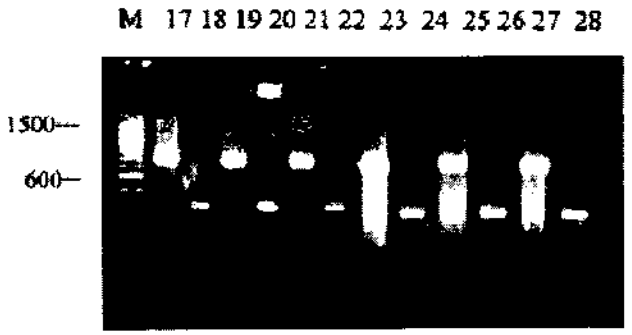


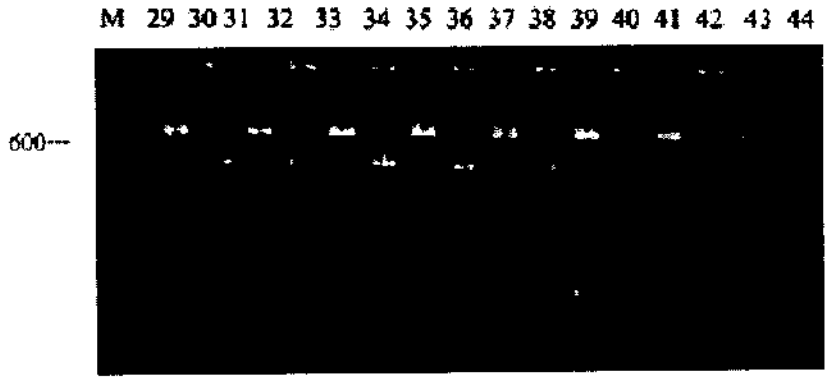
รูปที่ 32 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21



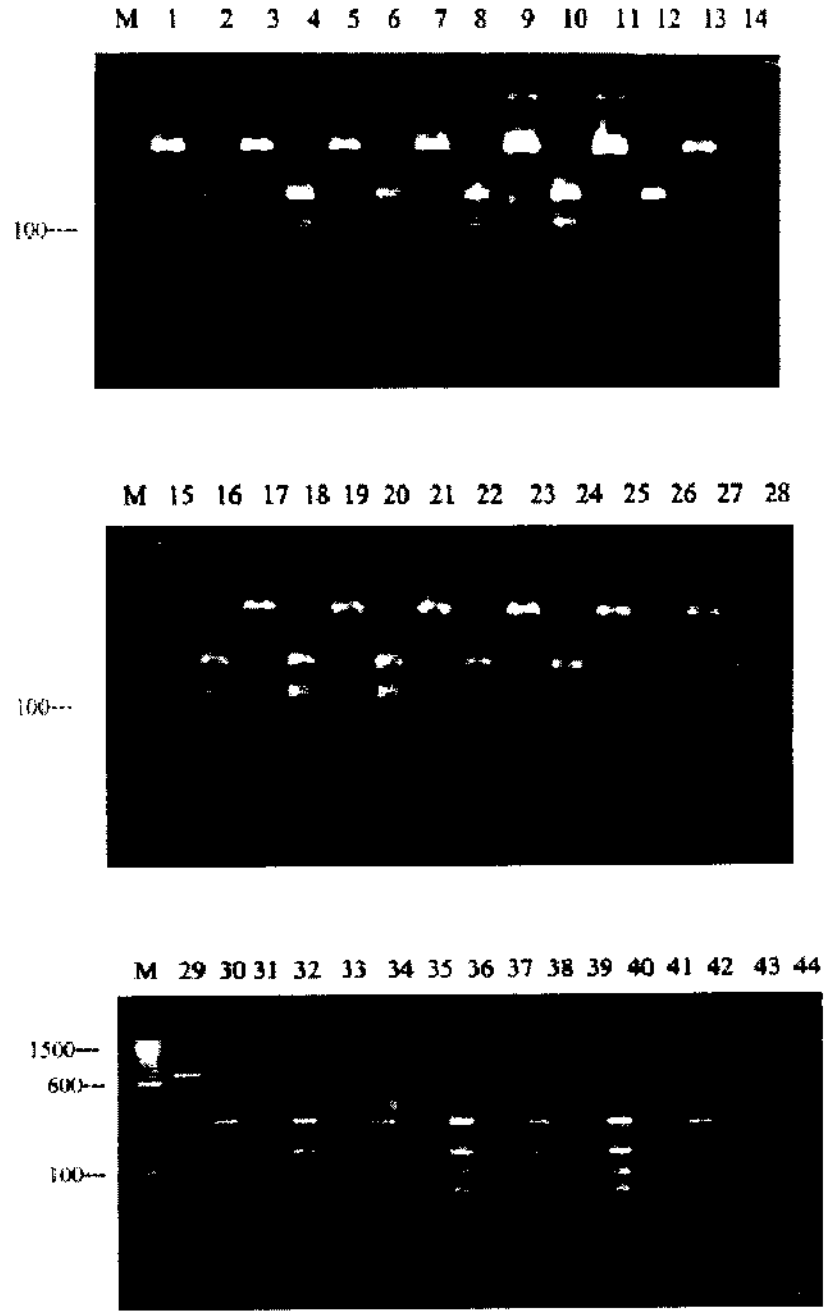
รูปที่ 33 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-18 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-18



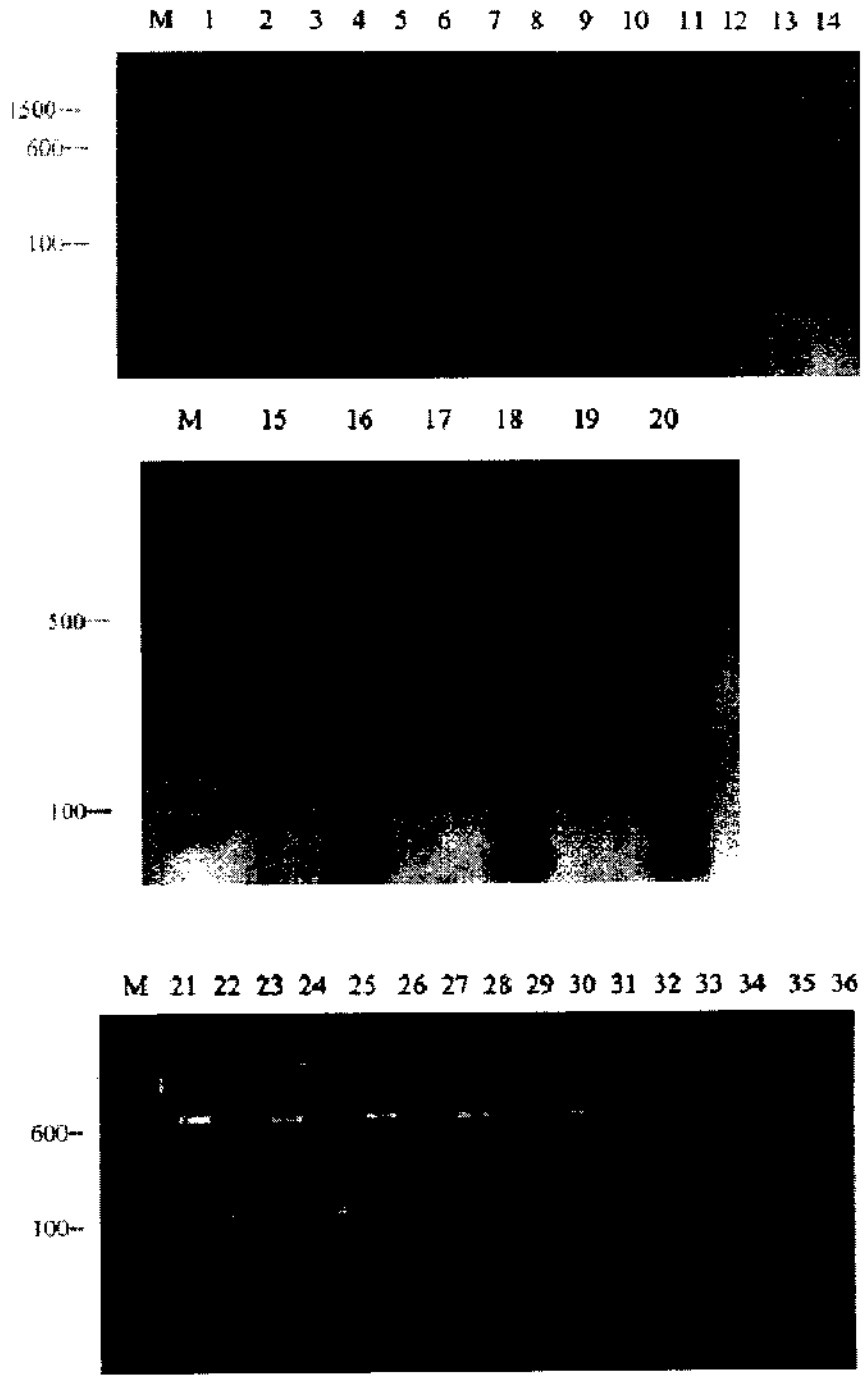




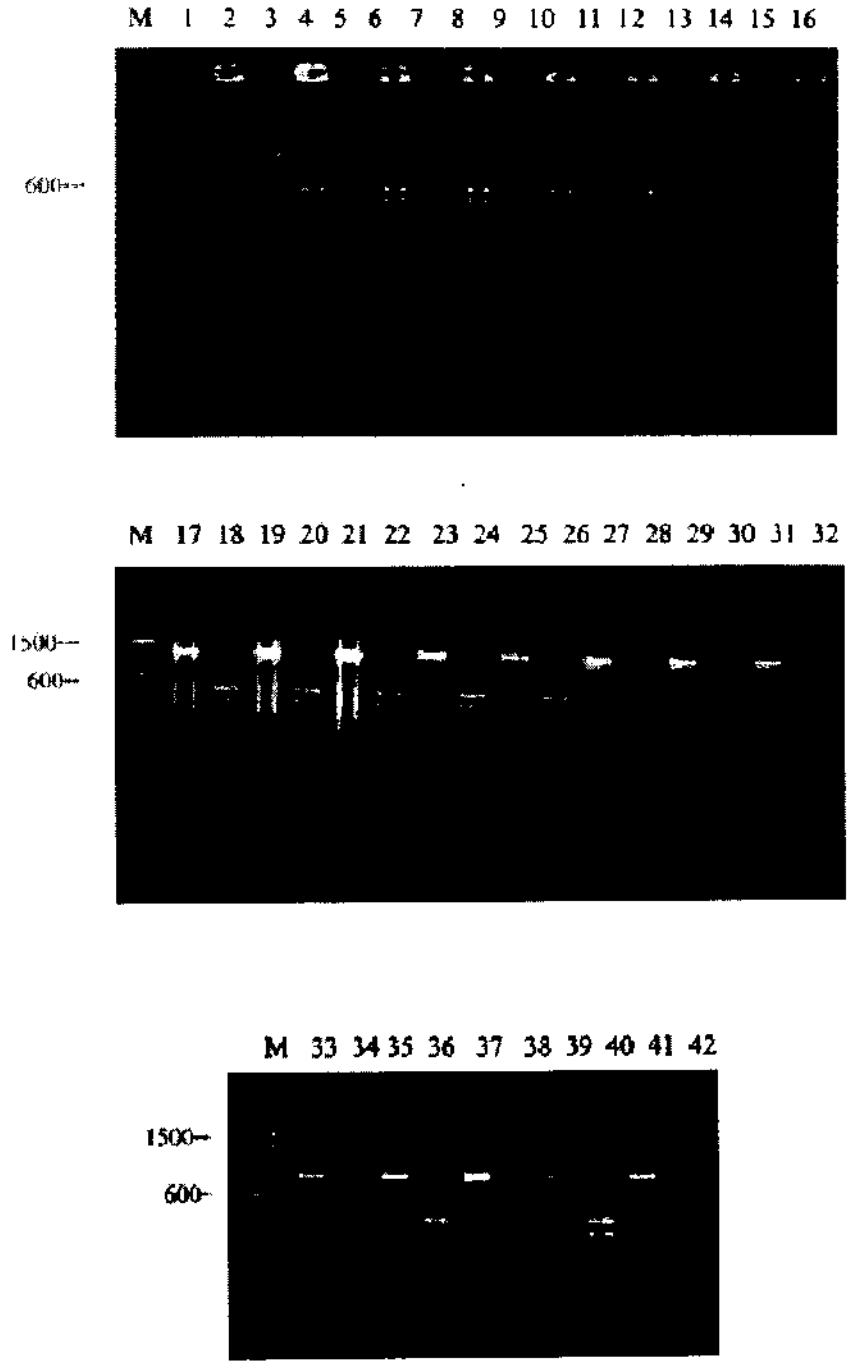
รูปที่ 34 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus cystidiosus* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCOBRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22



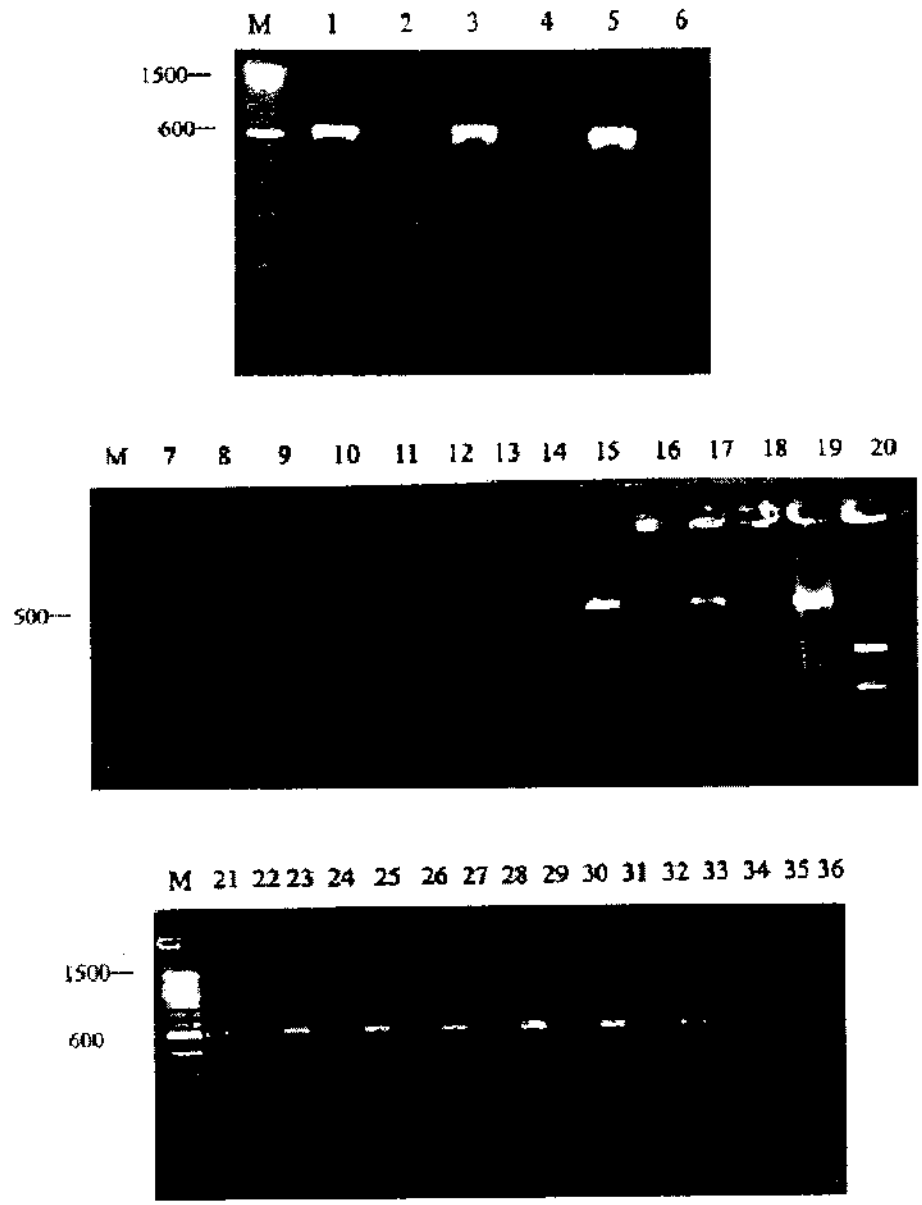
รูปที่ 35 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula squarrossula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22



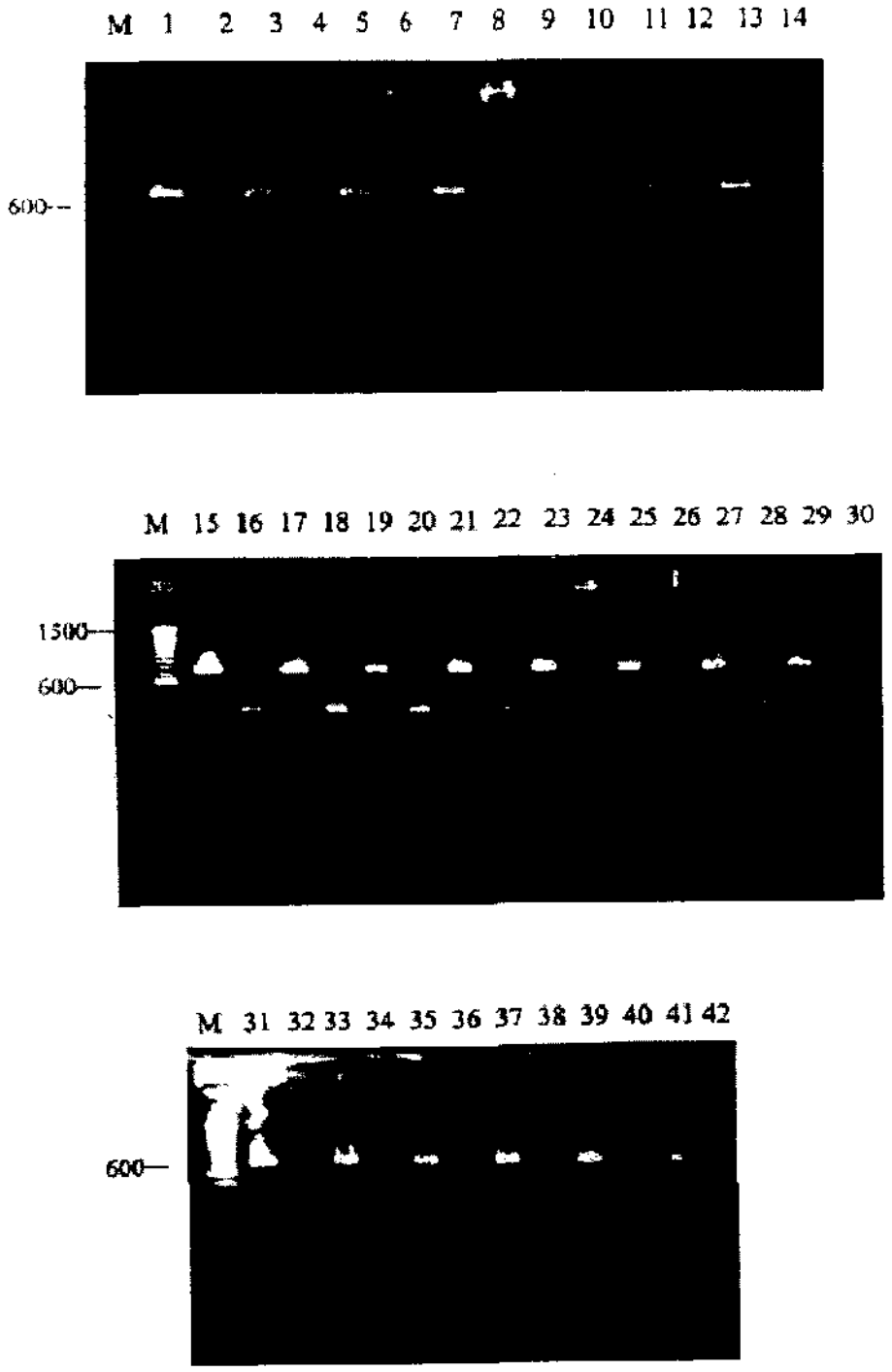
รูปที่ 36 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinula polychrou* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-20



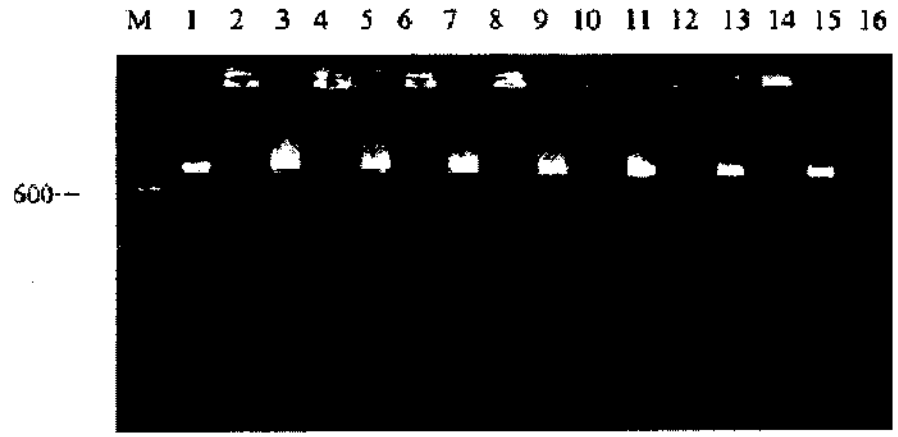
รูปที่ 37 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Lentinus edodes* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-21

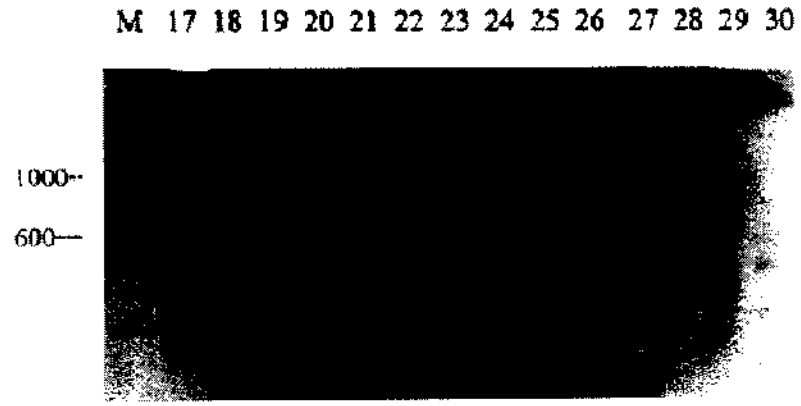


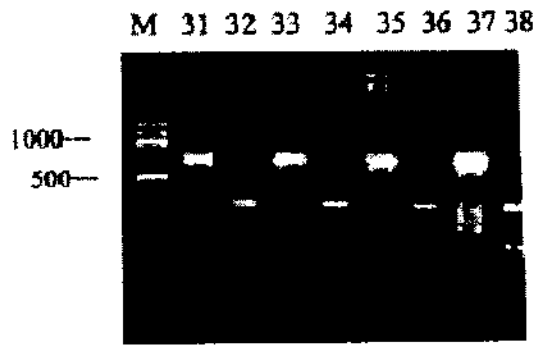
รูปที่ 38 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-18 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-18



รูปที่ 39 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Agrocybe cylindracea* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-22



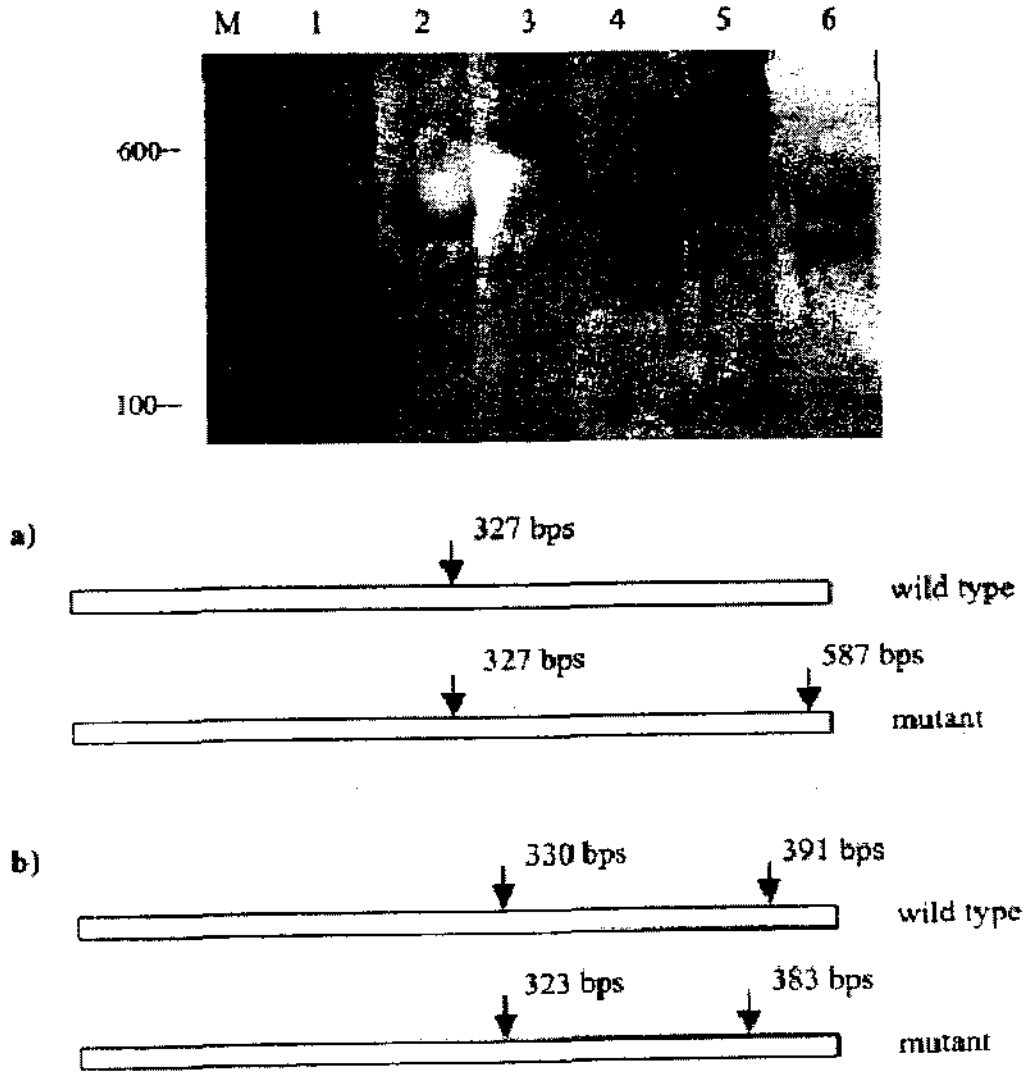




รูปที่ 40 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ที่ได้ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Taq* I; แถว M: 100 คู่เบส (GIBCO BRL); แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-19 แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-19

3. การวิเคราะห์ผลของเห็ดหูหนูโดยไพรเมอร์ ITS4-5 RFLP

การเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ในเห็ดหูหนูด้วยไพรเมอร์ ITS4-5 พบว่าได้ขนาดชิ้น DNA 600 คู่เบสและเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสทั้ง 600 คู่เบส ระหว่างเห็ดหูหนูครั้งที่ 1 และครั้งที่ 3 ด้วยโปรแกรม CLSTALX พบว่า %homology ของลำดับเบส ITS ไพรเมอร์ระหว่างครั้งที่ 1 และ 3 คือ 90% นอกจากนี้ยังพบว่าภายหลังการตัดชิ้น DNA ด้วยเอนไซม์ *Hinf* I มีขนาดชิ้น DNA ได้ขนาด 357 และ 263 คู่เบส (ครั้งที่ 3) ในขณะที่การถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ได้ขนาด 300 คู่เบสจำนวน 2 ชิ้น (ดังรูปที่ รูปที่ 41 ก, ข)



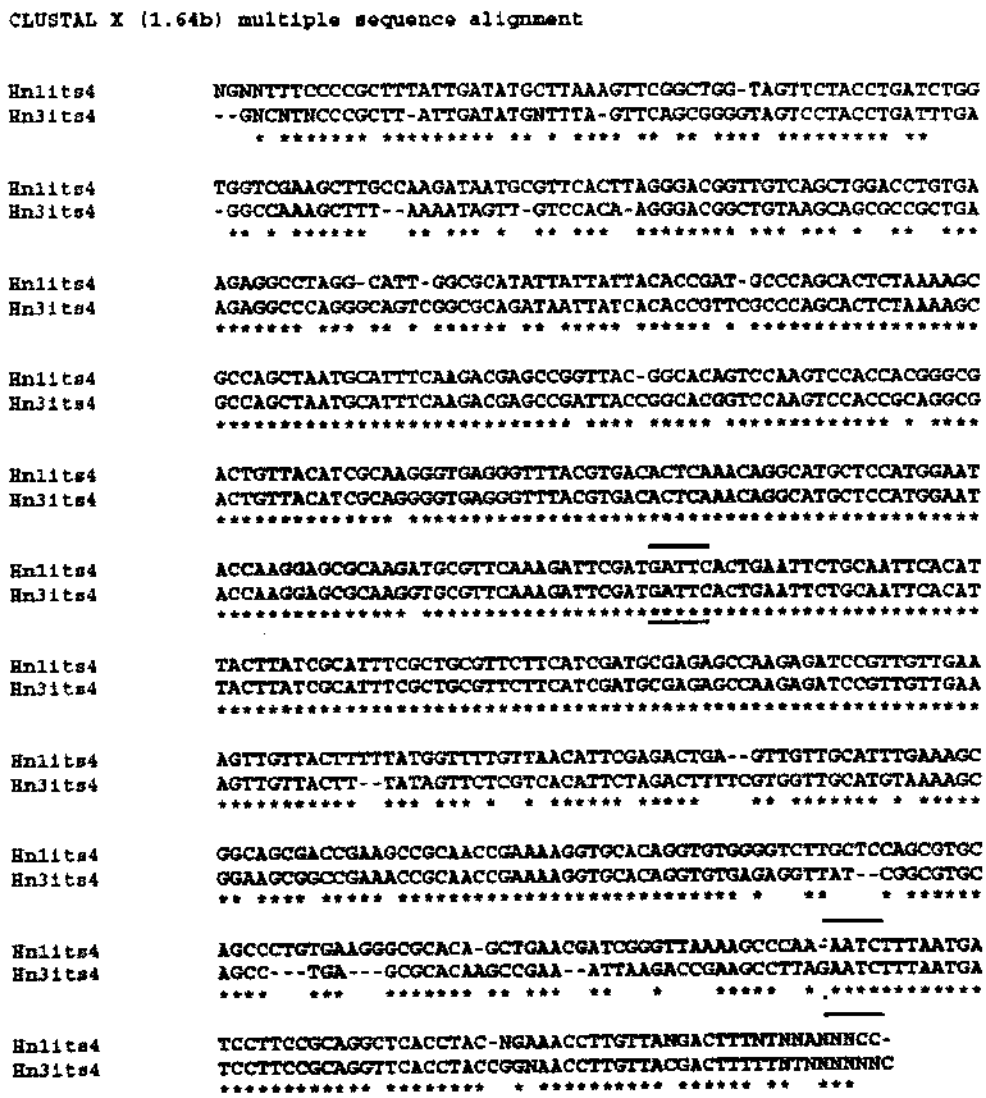
รูปที่ 41 ผลของชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricuaria auricula* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hnif* I; แถว M: 100 คู่เบส(GIBCO BRL) : แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-3 : แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1-3 : แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ของสายพันธุ์

จากรูปที่ 41 พบว่าภาพการตัดชิ้น DNA บน 10% polyacrylamide gel มีความสอดคล้องกับแผนที่การตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Hinf* I คือ ในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ของเห็ดหูหนู แผนที่การตัดจำเพาะพบเพียง 1 ตำแหน่งที่ตรงกลางระหว่าง 600 คู่เบส ดังนั้นจึงให้ขนาดชิ้น DNA ขนาด 300 คู่เบสเท่ากัน และในสภาพเจลจึงเห็นแถบ DNA เข้มมากกว่าในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ซึ่งตำแหน่งที่ 1 ในการตัดอยู่ที่ 327 คู่เบสและอีกตำแหน่งอยู่ที่ 587 คู่เบสเป็นผลให้ภาพเจลภายหลังการตัดชิ้น DNA บน 10% polyacrylamide gel จึงได้ชิ้น DNA ทั้งหมด 2 ส่วนมีขนาด 327 และ 260 คู่เบส จากส่วนนี้สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I สามารถใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในเห็ดหูหนูได้ในขณะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะอื่นไม่สามารถใช้ตรวจสอบได้ จากส่วนนี้อาจกล่าวได้ว่าลำดับเบสระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ในเห็ดหูหนูมีความแตกต่างกันในลำดับเบสที่ 587 คู่เบสจึงเป็นผลให้ตำแหน่งในการตัดจำเพาะของเห็ดหูหนูระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 กับ 3 จึงให้ขนาดชิ้น DNA ที่ไม่เหมือนกัน

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ระหว่างสายพันธุ์ปกติและกลายพันธุ์เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์หลายชนิด

Retriction enzymes	**PCR product in size of 600 bps**	
	Wild type (1st subculturing)	**Matant (3rd subcultuuring)**
Alu I	390, 120 bp	390, 120 bp
Hinf I	300, 300 bp	357, 263 bp
Mbo I	400, 190 bp	400, 190 bp
Taq I	316, 190 bp	316, 245 bp

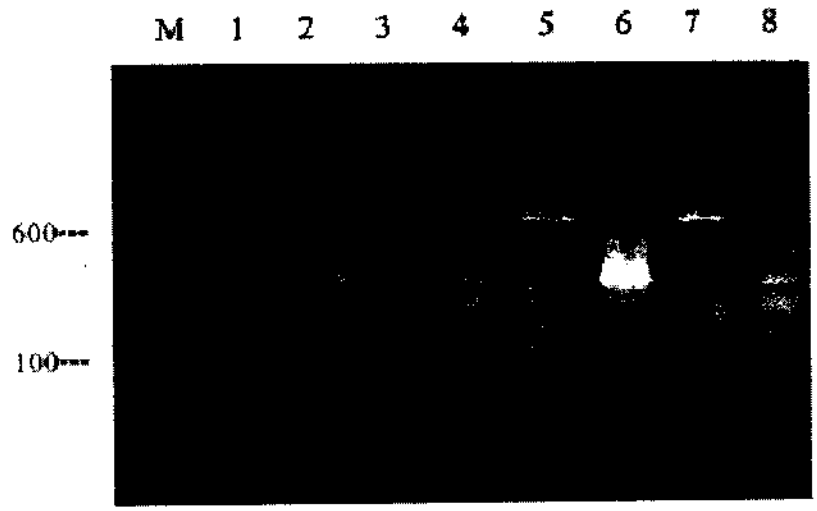
จากตารางที่ 5 สามารถกล่าวได้ว่าเห็ดหูหนูการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 นั้นหลังจากการตัดแบน DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่าให้ขนาดแบน DNA ที่แตกต่างกันจากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 (ดังรูป 15, 24, 33 และ 42) ซึ่งการให้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I และ *Taq*I สามารถให้ชิ้นส่วน DNA ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนดังผลสอดคล้องกับผลของชิ้น DNA ซึ่งผลการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 (wild type) กับครั้งที่ 3 (mutant) นั้นสามารถตรวจสอบได้จากการหาลำดับเบสจากการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ทั้ง 600 คู่เบส แล้วนำมาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม CLUSTAL X ดังรูปที่ (42)



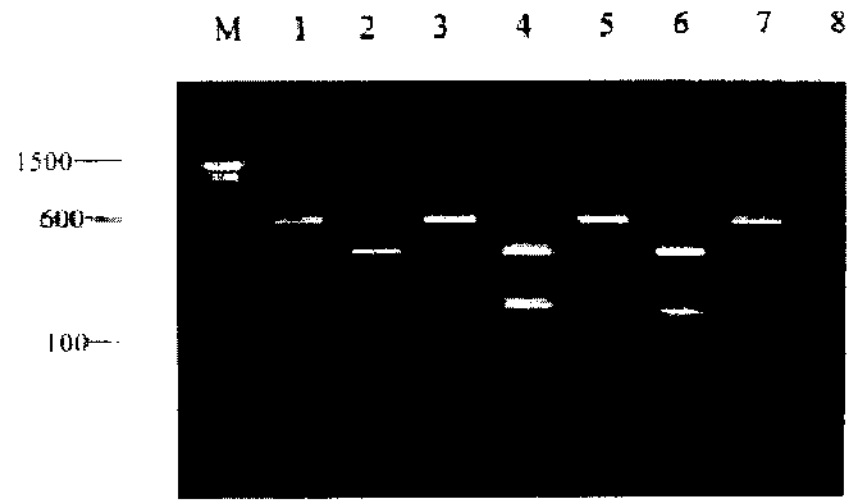
รูปที่ 42 การอ่านลำดับเบสผลของชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* โดยเปรียบเทียบระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 (ต้นแบบ) และการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 Hn 1 ITS4 เป็นลำดับเบสของสายพันธุ์ปกติในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ Hn 3 ITS4 เป็นลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์ที่ได้จากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3

3.1 การสกัด DNA จากดอกเห็ดหูหนูของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3

เมื่อสกัด DNA จากดอกเห็ดหูหนูนำมาเปรียบเทียบกับผลของชิ้น DNA ที่มาจากไมซีเลียม พบว่าภาพผลชิ้น DNA จากดอกและจากดอกเห็ดและไมซีเลียม คือ เห็ดหูหนูการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ยังคงให้ขนาดชิ้น DNA ภายหลังการตัดถ่ายเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I ได้ 2 ชิ้น DNA ขนาด 357 และ 263 คู่เบส ขณะที่การถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ให้ขนาด 300,300 คู่เบส สามารถสรุปได้ว่า ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดสามารถเกิดขึ้นได้จากการถ่ายเชื้อย่างต่อเนื่อง และตรวจสอบได้โดยเทคนิค TIS-RFLP และความแปรปรวนทางพันธุกรรมยังคงอยู่ในกระบวนการเกิดดอกเห็ด (รูปที่ 43, 44)



รูปที่ 43 การเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ซึ่งผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hnif* I : แถว M : 100 คู่เบส : แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ : แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ แถว 1, 3 : ผลของชั้นดีเอ็นเอที่ได้จากไมซีเลียมของเห็ดของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ตามลำดับ แถวที่ 5, 7 ; ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากดอกเห็ดของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ตามลำดับ



รูปที่ 44 การเปรียบเทียบผลของชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Mbo* I แถว M 100 คู่เบส : แถวเลขคู่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ : แถวเลขคี่ : ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอ็นไซม์ แถว 1, 3 : ผลของชั้นดีเอ็นเอที่ได้จากไมซีเลียมของเห็ดของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ตามลำดับ แถวที่ 5, 7 ; ผลของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากดอกเห็ดของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ตามลำดับ

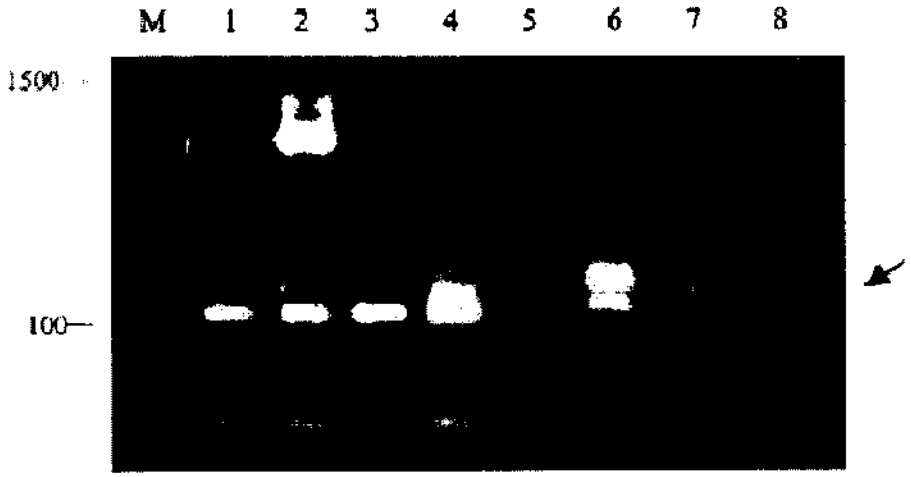
3.2 การวิเคราะห์ผลระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ของเห็ดหูหนูด้วย β-tubulin gene

จากแผนที่การตัดชิ้น DNA โดเอนไซม์ตัดจำเพาะในเห็ดหูหนูพบว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดเกิดขึ้นภายหลังจากการถ่ายเชื้อ ซึ่งตรวจสอบด้วย TIS4-5 PCR-RFLP นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบกับ gene ชุดอื่น ซึ่งคือ β-tubulin gene เนื่องจาก gene ชุดนี้ Balduaf และ Doolittle (1997) อ้างถึงใน Thon และ Rouse, 1999 ศึกษาพบว่า β-tubulin gene เป็น gene ที่สามารถใช้ศึกษาถึงวิวัฒนาการของเชื้อราได้ทุกระดับชั้น ซึ่งประกอบด้วย α, β, และ γ tubulins α และ β tubulin ทำหน้าที่สร้าง microtubules เป็นส่วนประกอบสำคัญของ cytoskeleton, mitotic spindles และ flagella ของเซลล์ยูคานิโอต ดังนั้น gene ชุดนี้อาจมีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างของดอกเห็ดจึงเลือกนำมาตรวจสอบกับดอกเห็ดหูหนูและดอกเห็ดนางฟ้าที่มีลักษณะผิดปกติ พบว่าเมื่อทำการเพิ่มจำนวน DNA ของเห็ดหูหนูระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ด้วย gene นี้ผลคือ (รูปที่ 45) ผลของของชิ้น DNA มีขนาด 100 คู่เบส (ครั้งที่ 1) แต่ในครั้งที่ 3 การถ่ายเชื้อได้ขนาด 400 และ 100 คู่เบส

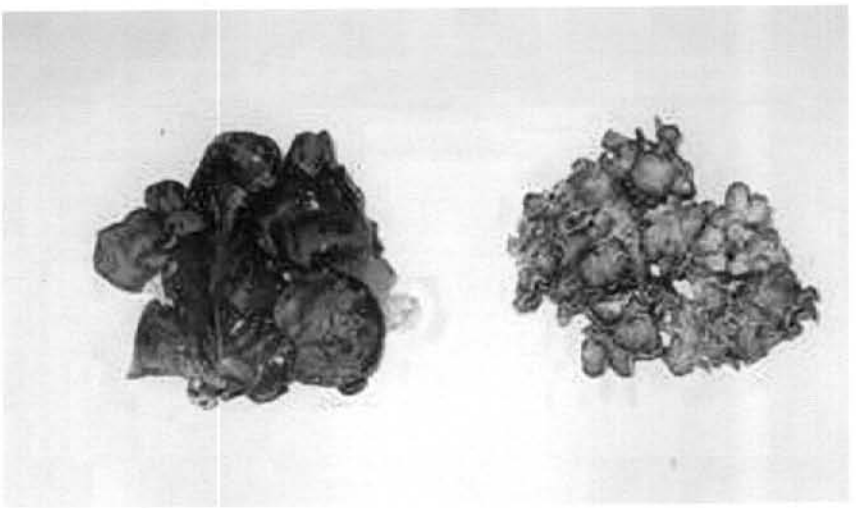
ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบขนาดและลักษณะของดอกเห็ดหูหนูพบว่าการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ให้ลักษณะดอกเห็ดขนาดเล็กกว่าปกติ สีน้ำตาล และลักษณะดอกเห็ดผิดรูปร่างไป (รูปที่ 46)

สามารถสรุปได้ว่า β-tubulin gene สามารถใช้แยกระหว่างดอกเห็ด wild type (ครั้งที่ 1) และ mutant (ครั้งที่ 3) ในเห็ดหูหนูได้ ซึ่งความผิดปกตินี้ยังมีผลต่อลักษณะปรากฏของดอกเห็ดด้วย และแสดงว่าไพรเมอร์ชุดนี้ยังสามารถใช้เป็นตัวตรวจสอบในขั้นตอนการผลิตเห็ดได้

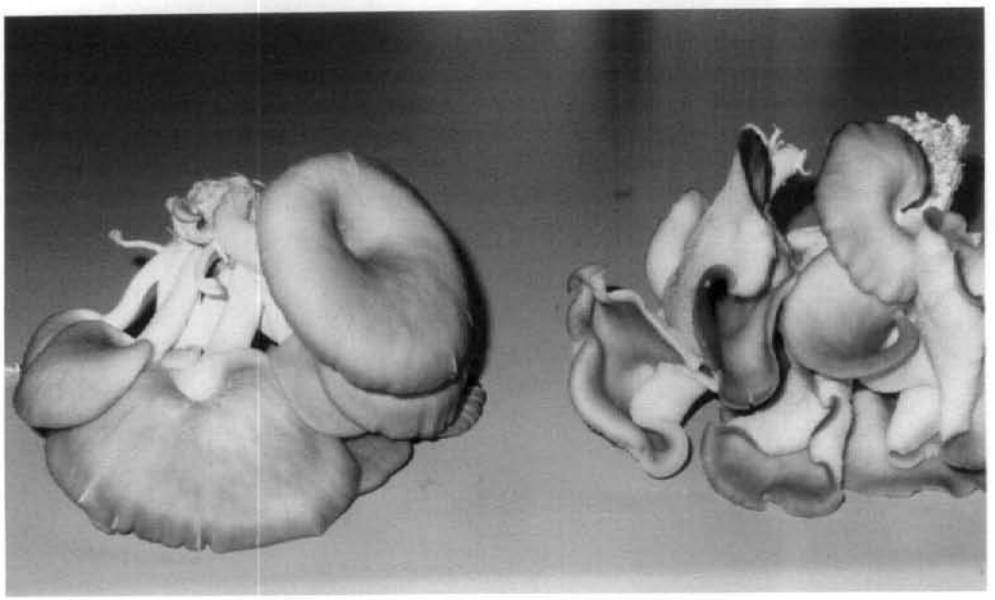
นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบกับเห็ดนางฟ้าที่มีดอกผิดปกติที่ได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัย ผลการตรวจสอบพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับดอกเห็ดนางฟ้าที่ปกติหลังจากเพิ่มจำนวน DNA มีขนาด 150 คู่เบสในขณะที่ดอกผิดปกติได้ขนาดชิ้น DNA คือ 150,100 และ 90 คู่เบส ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าถึงแม้ว่าอัตราการเจริญของเชื้อราเจริญปกติและมีการควบคุมสภาพแวดล้อมในการเพาะก็สามารถเกิดดอกเห็ดที่มีความผิดปกติได้ในระหว่างการเปิดดอก



รูปที่ 45 ผลของชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* และ *Pleurotus sajor-caju* ซึ่งผ่านการเพิ่มจำนวนโดย β-tubutin gene แถว M: 100 คู่เบส (GIBCOBRL); แถวที่ 1: การถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 (สายพันธุ์ปกติ) แถวที่ 2: ถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 (กลายพันธุ์) แถวที่ 3: เห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* จากฟาร์มเห็ดอรัญญิก แถวที่ 4: เห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ที่ผิดปกติ แถวที่ 5: ควบคุม แถวที่ 6: เห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่ผิดปกติ แถวที่ 7: ดอกเห็ดปกติของสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* และแถวที่ 8: ควบคุม



รูปที่ 46 ลักษณะดอกเห็ดสายพันธุ์ *Auricularia auricula* ; ซ้ายมือ : สายพันธุ์ปกติ ขวามือ : กลายพันธุ์



รูปที่ 47 ลักษณะปรากฏของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus sajor-caju* ที่มีความผิดปกติทางกายภาพที่เพาะเลี้ยงได้ที่ฟาร์ม มทส. ซ้ายมือ : สายพันธุ์ปกติ ขวามือ : กลายพันธุ์

3.3 อัตราการเจริญและผลผลิตของเห็ดหูหนูในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3

จากผลของชิ้น DNA และแผนที่การตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 พบว่ามีความแตกต่างไปจากผลของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ดังนั้นความผิดปกติของพันธุกรรมนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญในก้อนขี้เลื่อย จึงทำการศึกษาผลอัตราการเจริญในก้อนเชื้อและผลผลิต พบว่าอัตราการเจริญของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 มีอัตราลดลงแตกต่างกันอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 ณ วันที่ทำการวัดอัตราการเกิดเชื้อวันเดียวกัน ดังรูป 48

รูปที่ 48 การเปรียบเทียบอัตราการเจริญของไมซีเลียมในก้อนขี้เลื่อยระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และ 3 ; a) อัตราการเจริญการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 b) อัตราการเจริญการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1

ส่วนนี้สามารถสรุปได้ว่าความผิดปกติทางพันธุกรรมของเห็ดหูหนูในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 มีผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญในก้อนขี้เลื่อยและผลผลิตซึ่งสามารถสังเกตได้ในระหว่างกระบวนการผลิตเห็ด ที่มีการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่อง โดยอัตราการเจริญของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 ลดลงจากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 คิดเป็น 11.63% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่อัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงปกติ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการวัดอัตราการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ยังคงไม่เพียงพอต่อการควบคุมคุณภาพเชื้อ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์และเอื้อต่อการเจริญของเชื้อเห็ดมาก ในขณะที่ก้อนเชื้อในขี้เลื่อยยังประกอบไปด้วย cellulose เป็นองค์ประกอบหลัก ๆ ซึ่งเชื้อเห็ดจะต้องมีการผลิตสร้างเอนไซม์ขึ้นมา เพื่อที่จะทำการย่อย

สารประกอบเหล่านี้ก่อนแล้วจึงจะดูดซับสารอาหารไปใช้ได้ ซึ่งเอนไซม์ cellulase, cellohydrase (Zhao และ Kwan, 1999) ดังนั้นบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์จึงมีความสำคัญต่อการย่อยสารประกอบ cellulase นอกจากนี้ภายหลังการเก็บเชื้อไว้ยังมีผลถึงการลดลงของผลผลิตและอัตราการเจริญ ซึ่งการลดลงของผลผลิตสามารถบ่งชี้ถึงจุดที่สายพันธุ์อ่อนแอซึ่งทำให้การพัฒนาการสร้างดอกเห็ดเริ่มช้าและมีช่วงเวลาแต่ละช่วงของการผลิตดอกเห็ดเพิ่มมากขึ้น (flushing)

เมื่อทำการถ่ายเชื้อต่อไปถึงการถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 โดยใช้ไมซีเลียม พบว่าทั้งอัตราการเจริญและผลของชิ้น DNA กลับให้ผลเหมือนกับการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 (รูปที่ 11) แสดงว่าอาจเกิด reversible genetic ได้ ซึ่งผลมีความสอดคล้องกับ (Hartl, 1988) พบว่า gene ที่ปกติสามารถถูกเปลี่ยน gene ที่กลายพันธุ์ (mutant) ได้ เรียกว่าการเกิด reverse mutation ซึ่งมักพบได้ตามธรรมชาติเท่านั้น ซึ่งการเปลี่ยนย้อนกลับของ gene นี้อาจเกิดขึ้นเป็นการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 และจะเกิดขึ้นที่ตำแหน่งใดก็ได้ใน genome ดังนั้นการถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 ของเห็ดหูหนูนี้เป็น reversion ซึ่งเป็นผลให้อัตราการเจริญและผลของชิ้น DNA เปลี่ยนกลับเหมือนเดิมกับลักษณะดั้งเดิม (1^{st} subculture)

4. การผลิตเห็ดตีนแรด

เพื่อศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดตีนแรด โดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การทดลองนี้ออกแบบเป็นแบบ Split-Split ซึ่งผลผลิตตลอดระยะเวลาการศึกษา 4 เดือน ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Split-Split Plot Design (ตารางผลการวิเคราะห์ ตารางที่ 6, 7)

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ที่เพาะเลี้ยงภายได้สภาวะต่าง ๆ

Tratment (Sub-sub plot (S))	Main plot (H) Plastic Fresh weight (g)	Clay plot Fresh weight (g)	S-MEAN	DIFF
Non-covering				
Soil	220.00^{a}	575.00^{a}	397.50	-355.00**
Soybean husk	50.00^{a}	328.33^{b}	189.17	-278.33**
Soil+soybean husk	75.33^{a}	233.33^{b}	154.33	-158.00*
Rice husk-covering				
Soil	163.33^{ab}	241.63^{a}	202.50	-78.33^{ns}
Soybean husk	0.00^{ns}	73.33^{b}	36.67	-73.33^{ns}
Soil+soybean husk	253.33^{a}	0.00^{ns}	126.67	253.33**
Rice straw-covering				
Soil	30.00^{a}	270.00^{a}	150.00	-240.00**
Soybean husk	16.67^{a}	16.67^{b}	16.67	0.00^{ns}
Soil+soybean husk	0.00^{ns}	150.00^{ab}	75.00	-150.00^{ns}
H-MEAN	89.85	209.81	149.83	-119.96

**=significant at 1% level, * = significant at 5% level, ns = not significant

In a column under each M, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Comparision	S.E.D.	LSD(5%)	LSD(1%)
2-H means at each M*S	73.50	157.22	218.71
2.S means at each M*H	80.71	166.57	225.75

ตารางที่ 7 ผลของวัสดุเพาะต่อผลผลิตของเห็ด *Tricholoma crassum*

Casing material	Plastic Fresh weight (g)	Clay pot Fresh weight (g)	S-MEAN	DIFF
Soil	137.78[a]	362.22[a]	250.00	-224.44**
Soybean husk	22.22[a]	139.44[b]	80.83	-117.22**
Soil+soybean husk	109.56[ab]	127.78[b]	118.67	-18.22[ns]
Average	89.85	209.81	149.83	-119.96

** = significant at 1% level, * = signficant at 55 level, ns = not significant

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Comparison	S.E.D.	LSD (5%)	LSD (1%)
2-H means at each S	42.43	90.77	126.27
2-S means at each H	46.60	96.17	130.33

การวัดอัตราการเจริญของเห็ดตีนแรดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และในก้อนขี้เลื่อยคือ 0.35±0.07 ซม./วัน และ 4.05±0.30 ซม./2 วัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามลำดับ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 °C ซึ่งเมื่อไมซีเลียมเจริญเต็มก้อนเพาะเชื้อแล้วก็นำไปเปิดดอก โดยทำการเปิดดอกในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงตุลาคมเป็นเวลา 4 เดือน อุณหภูมิที่สามารถวัดได้ในวัสดุเพาะคือ 26-30 °C ซึ่งขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์อากาศ

หลังจาก 17 วัน จากวันเริ่มทำการเพาะเริ่มสังเกตพบไมซีเลียมที่บริเวณใต้ผิวดินลึกลงไปประมาณ 5.0 ซม. โดยเริ่มพบไมซีเลียมในวัสดุเพาะที่ใช้ดินอย่างเดียวก่อน ต่อมาจึงพบในวัสดุเพาะผสมดิน+เปลือกถั่วและเปลือกถั่วอย่างเดียว ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบในดินร่วนที่มีซากพืช ซากสัตว์ทับถมอยู่มาก (humus) มีผลดีต่อการเจริญของเชื้อเห็ด (Ogawa, 1964 อ้างถึงใน Chang และ Heyes, 1978) ดังนั้นไมซีเลียมจึงสามารถนำสารอาหารจากดินไปใช้ได้ดีกว่า (วสันต์, 1978) ในวัสดุเพาะชนิดอื่น

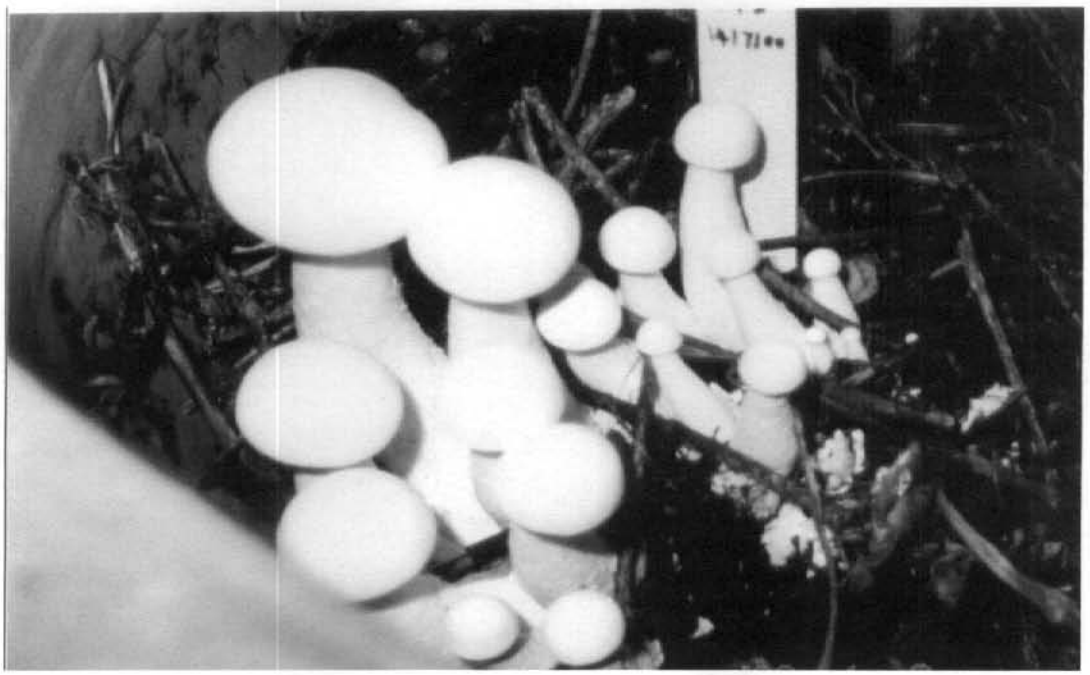
ในเดือนตุลาคมเริ่มทำการเก็บผลผลิต ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน พบว่าเริ่มปรากฏตุ่มดอกเห็ดขนาดเล็ก ๆ ตรงบริเวณขอบของภาชนะเพาะ หลังจากวันที่ 29 ของการเพาะ โดยหมวกดอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร ในวันที่ 1 ของการพบตุ่มดอกหลังจากการพัฒนาดอกจะใช้เวลาประมาณ 9-10 วัน จึงจะสามารถเก็บผลผลิตได้ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหมวกดอกประมาณ 8-11 เซนติเมตร และความยาวก้านดอกประมาณ 11-13 เซนติเมตร (ดังรูป 49, 50 และ 51) และยังสังเกตพบว่าดอกเห็ดมักจะเกิดตรงบริเวณขอบของภาชนะเพาะและเกิดกันเป็นกลุ่ม ๆ ซึ่ง

สอดคล้องกับผลการศึกษาใน *I. matsutake* ของ Tominage 1973 อ้างถึงใน Change และ Heyes, 1978) พบว่า ดอกเห็ดมักจะเจริญอยู่รอบ ๆ โคนต้นไม้และเจริญในลักษณะเป็นวงแหวนต่อไป

จากตารางที่ 6, 7 แสดงถึง mainplots ระหว่างการไม่คลุมวัสดุเพาะกับการคลุมวัสดุเพาะ พบว่าไม้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงว่าการคลุมหรือไม่คลุมวัสดุเพาะไม่มีผลต่อผลผลิตของเห็ดตีนแรด และจากตารางสามารถกล่าวได้ว่า subplot คือ plastic และ clay plot นั้น กระถางดิน (clay plot) สามารถให้ผลผลิต (209.81 g/1 ภาชนะเพาะ) สูงกว่าเข่งพลาสติก (89.85 g/1 ภาชนะเพาะ) ในทุก ๆ การทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 99% แสดงว่ากระถางดินนั้นมีความเหมาะสมที่จะเป็นภาชนะเพาะ ในวัสดุเพาะก็เช่นเดียวกัน พบว่าดินอย่างเดียวเป็นวัสดุเพาะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดตีนแรด คือ สามารถให้ผลผลิตสูงที่สุดในทุก ๆ main plot และ sub plot ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% รองลงมาคือ ดินผสมเปลือกถั่วและเปลือกถั่วอย่างเดียว ตามลำดับ โดยวัสดุเพาะดินอย่างเดียวและไม่มีการคลุมวัสดุเพาะซึ่งใช้กระถางดินเป็นภาชนะเพาะให้ผลผลิตสูงคือ (575 g/1 ภาชนะเพาะ) ซึ่งสูงกว่าในเข่งพลาสติก คือ (220 g/1 ภาชนะเพาะ) สำหรับการคลุมด้วยแกลบในกระถางดินให้ผลผลิตสูงกว่าในเข่งพลาสติกอย่างไม่มีนัยสำคัญ และการคลุมด้วยฟางข้าวในกระถางดินโดยมีดินอย่างเดียวเป็นวัสดุเพาะพบว่ายังคงให้ผลผลิตสูงกว่า (270 g/1 ภาชนะเพาะ) ในดินผสมเปลือกถั่ว (150/1 ภาชนะเพาะ) และเปลือกถั่วอย่างเดียว (16.67 g/1 ภาชนะเพาะ) ตามลำดับ

จากส่วนนี้สรุปได้ว่าดินอย่างเดียวเป็นวัสดุเพาะที่เหมาะสมและกระถางดินเป็นภาชนะที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดตีนแรด อาจเนื่องมาจากกระถางดินสามารถช่วยเก็บรักษาความชื้นได้ดีกว่าในเข่งพลาสติกซึ่งมีรูอยู่รอบ ๆ กระถาง และอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเพาะคือ 30 องศาเซลเซียสนอกจากนี้ วสันต์, 2521 ยังพบว่าในช่วงฤดูฝน การพัฒนาสร้างดอกเห็ดของเห็ดตีนแรดจะดีกว่าในช่วงฤดูอื่นๆ เนื่องจากในฤดูฝนมีความชื้นค่อนข้างสูง ดังนั้นความชื้นและอุณหภูมิจึงมีบทบาทต่อการพัฒนาสร้างดอกเห็ดตีนแรด

รูปที่ 49 primordia ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ในวันแรก

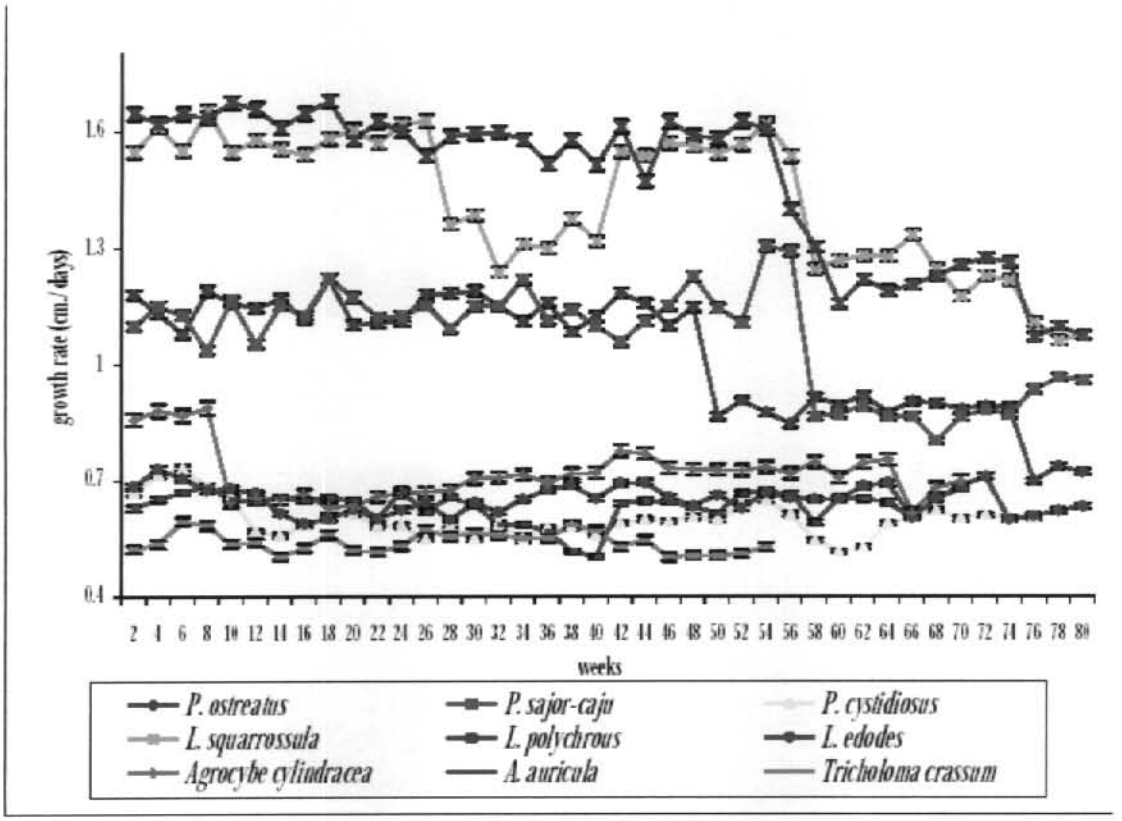


รูปที่ 50 primordia ของเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* ในวันที่ 4 และ 5

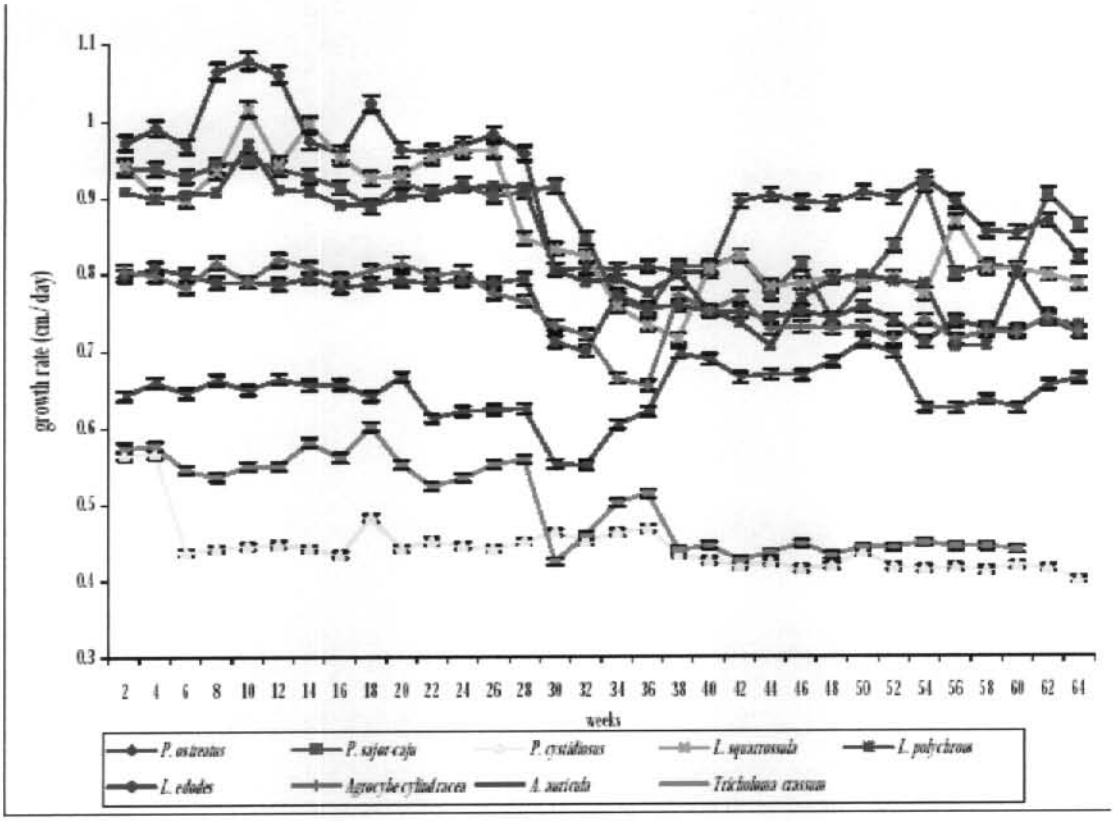
รูปที่ 51 ลักษณะของเห็ดตีนแรดที่เจริญเติบโตเต็มที่ในวันที่ 9 และ 10

5. การเก็บรักษาเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C และแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ –70 °C

การทดลองนี้ได้ทำการเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และ –70 °C โดยใช้ 10%-glycerol เป็น cryoprotectant โดยวัดอัตราการเจริญทุก ๆ 2 สัปดาห์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าเห็ดทุกชนิดให้อัตราการเจริญที่แตกต่างกันและยังคงมีอัตราการเจริญค่อนข้างคงที่ตลอดจนการเก็บรักษาไว้ที่ 80 สัปดาห์ ซึ่ง Smith และ Onions (1994) รายงานไว้ว่าการเก็บรักษาเชื้อราโดยเก็บที่ cold storage สามารถช่วยลดอัตราของ metabolism จึงช่วยเพิ่มอายุการเก็บเชื้อระหว่างการถ่ายเชื้อได้มากขึ้น โดยที่เชื้อราสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานานโดยอัตราการเจริญไม่เปลี่ยน และการเก็บรักษาเชื้อที่ –70 °C โดยมี 10% glycerol เป็น cryoprotectant นั้นยังคงมีอัตราการเจริญไม่เปลี่ยนแปลงตลอดอายุการเก็บ 80 สัปดาห์ นอกจากนี้การเก็บโดยการ cold storage, freezing และ liquid nitrogen เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการเก็บเชื้อรา โดยวิธีทั้ง freeze-drying และ liquid nitrogens เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่พบว่าสามารถคงรักษาพันธุกรรมของเชื้อไว้ได้ดีที่สุด (Prescott และ Kerndemp, 1971) ในการเก็บรักษาเชื้อที่พบว่าสามารถคงรักษาพันธุกรรมที่ดีนั้นมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมคุณภาพในการผลิตเห็ด อย่างไรก็ตามวัตถุประสงค์หลักของการเก็บรักษาเชื้อไว้ก็คือช่วยลด metabolism ในภาชนะการเก็บเป็นเวลานาน โดยปราศจากการปนเปื้อน (contamination)



รูปที่ 52 อัตราการเจริญของเห็ดแต่ละสายพันธุ์เมื่อเก็บที่ 4°C



รูปที่ 53 อัตราการเจริญของเห็ดแต่ละสายพันธุ์เมื่อเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

6. การผลิตเห็ดเข็มเงิน-เข็มทอง

จากการทดลองเขี่ยเชื้อเห็ดทั้งสองชนิด ในสูตรอาหาร 2 สูตร มีการเปิดดอกและให้ผลผลิตดังนี้

ตารางที่ 8 ผลผลิตของเห็ดเข็มทองจากสูตรอาหารสูตรที่ 1 ขนาดก้อน 900 กรัม

วัน /เดือน /ปี	น้ำหนักเห็ดสด (กรัม)			
	1 (30ก้อน)	2 (30 ก้อน)	3 (30 ก้อน)	4 (30 ก้อน)
17/8/45	610	410	675	625
18/8/45	275	500	175	225
19/8/45	205	540	350	385
20/8/45	100	50	75	50
21/8/45	445	100	100	100
22/8/45	-	110	-	60
26/8/45	145	55	100	80
27/8/45	40	-	-	45
28/8/45	75	50	70	-
29/8/45	90	62.5	62.5	85
31/8/45	75	60	100	70
2/9/45	100	200	200	160
3/9/45	100	50	50	50
4/9/45	125	120	-	75
5/9/45	65	30	75	70
6/9/45	-	100	-	-
7/9/45	75	-	55	50
8/9/45	80	125	50	70
9/9/45	0	60	50	60
10/9/45	75	-	55	50
11/9/45	-	70	60	80
12/9/45	50	30	-	40

ตารางที่ 8 (ต่อ)

วัน /เดือน /ปี	น้ำหนักเห็ดสด (กรัม)			
	1 (30 ก้อน)	2 (30 ก้อน)	3 (30ก้อน)	4 (30 ก้อน)
13/9/45	60	-	50	-
14/9/45	80	70	50	60
15/9/45	50	30	40	30
16/9/45	40	90	70	100
17/9/45	35	-	40	30
18/9/45	-	40	30	-
19/9/45	50	65	60	-
20/9/45	40	50	30	25
21/9/45	100	80	90	110
22/9/45	50	60	150	100
23/9/45	70	80	75	65
24/9/45	100	85	90	70
น้ำหนักรวมทั้งหมด	3,405	3,372	3,077	3,090
นน. เฉลี่ยต่อก้อน	113.50	112.42	102.58	103.00

ตางรางที่ 9 ผลผลิตเห็ดเข็มทองจากอาหารสูตรที่ 1 ขนาดก้อน 600 กรัม

วัน /เดือน /ปี	น้ำหนักเห็ดสด (กรัม)			
	1 (30 ก้อน)	2 (30 ก้อน)	3 (30 ก้อน)	4 (30 ก้อน)
19/8/45	50	65	75	50
20/8/45	320	375	225	340
21/8/45	125	450	400	180
22/8/45	85	205	130	420
23/8/45	80	45	50	125
26/8/45	50	45	60	135
27/8/45	45	65	55	-
28/8/45	100	-	-	50
29/8/45	50	50	60	-
31/8/45	50	300	100	75
2/9/45	125	110	200	125
3/9/45	30	45	75	-
4/9/45	50	-	75	-
5/9/45	-	50	50	35
6/9/45	100	45	55	80
7/9/45	-	50	-	65
8/9/45	75	80	90	70
9/9/45	50	45	40	60
10/9/45	-	55	60	-
11/9/45	75	-	50	50
12/9/45	-	70	-	40
13/9/45	50	-	40	-
14/9/45	35	70	40	80
15/9/45	30	40	45	35
16/9/45	55	45	40	60
17/9/45	35	50	60	35
18/9/45	40	-	30	502

ตารางที่ 9 (ต่อ)

วัน /เดือน /ปี	น้ำหนักเห็ดสด (กรัม)			
	1 (30 ก้อน)	2 (30 ก้อน)	3 (30 ก้อน)	4 (30 ก้อน)
19/9/45	45	70	50	-
20/9/45	70	90	125	50
21/9/45	45	30	40	80
22/9/45	50	120	60	50
23/9/45	120	100	70	90
24/9/45	50	75	50	45
น้ำหนักรวมทั้งหมด	2085	2685.16	2510	2475
นน. เฉลี่ยต่อก้อน	**69.50**	**89.51**	**83.67**	**82.50**

จากผลการทดลองในตารางที่ 8 กับ 9 ที่ดูว่าขนาดของก้อนเห็ดมีผลต่อการให้ผลผลิตมากน้อยเพียงใด พบว่า ก้อนขี้เลื่อยก้อนเล็กจะให้ผลผลิตน้อยกว่าขี้เลื่อยก้อนใหญ่เพียง 26 กรัมต่อก้อนเท่านั้น ซึ่งจะเห็นว่าไม่ค่อยแตกต่างกันมากนัก เพราะฉะนั้นในการผลิตควรทำก้อนขี้เลื่อยก้อนเล็กจะดีกว่า ซึ่งจะทำให้ประหยัดวัสดุในการทำ ทำให้ได้จำนวนก้อนเพิ่มขึ้น ผลผลิตเห็ดที่ได้ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย และที่สำคัญช่วยหย่นระยะเวลาในการบ่มก้อนเห็ดที่พร้อมจะนำมาเปิดดอกได้ด้วย ไม่ต่ำกว่า 15 วัน

ตารางที่ 10 ผลผลิตเห็ดเข็มทองจากสูตรอาหารสูตรที่ 2

วัน /เดือน / ปี	น้ำหนักเห็ดสด (กรัม)				
	1 (88 ก้อน)	2 (88 ก้อน)	3 (88 ก้อน)	4 (88 ก้อน)	5 (44 ก้อน)
22/10/45	540	580	900	3400	320
24/10/45	1400	-	-	-	-
29/10/45	1600	1800	1500	2200	1000
30/10/45	1000	980	825	1400	400
31/10/45	1400	1200	1500	1100	-
1/11/45	900	1000	850	750	1600
2/11/45	400	300	500	800	780
3/11/45	200	400	300	500	-
4/11/45	500	600	450	-	-
5/11/45	500	400	400	-	550
6/11/45	1000	900	500	800	450
7/11/45	700	400	500	-	300
8/11/45	500	600	500	600	400
9/11/45	1000	900	800	700	500
11/11/45	500	400	500	400	350
12/11/45	700	600	800	600	400
14/11/45	900	500	400	500	300
15/11/45	400	300	500	600	350
17/11/45	-	-	-	450	-
18/11/45	300	200	400	500	600
20/11/45	500	400	700	-	300
น้ำหนักรวมทั้งหมด	14,940	12,460	12,825	15,300	8,300
นน. เฉลี่ยต่อก้อน	169.77	141.59	145.74	173.86	188.64

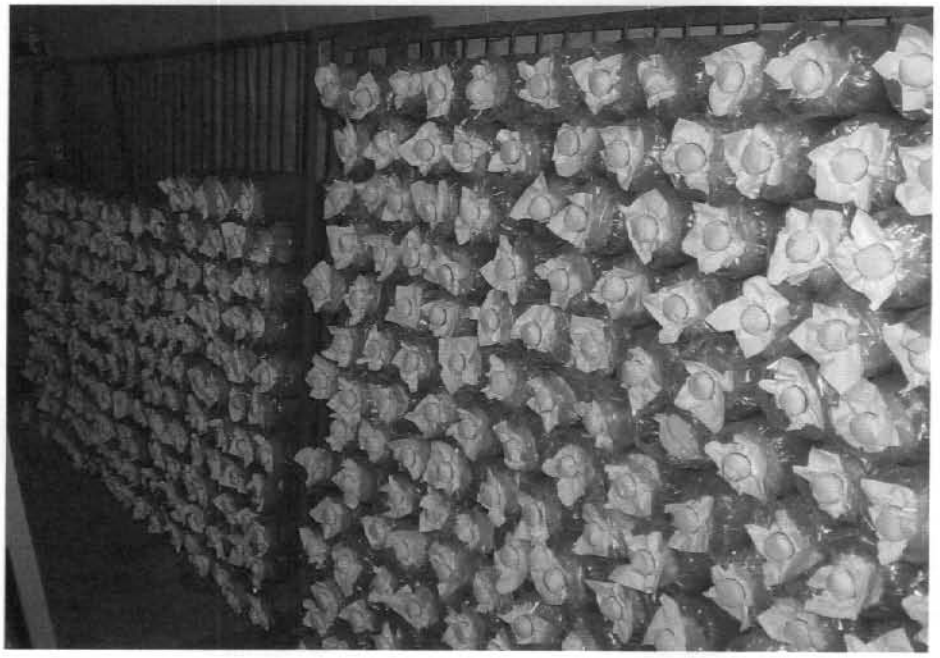
จากการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตเห็ดเข็มทอง ในตารางที่ 9 และ 10 ซึ่งมีขนาดก้อนเท่ากันด้วย พบว่า อาหารสูตรที่ 2 ที่มีขี้เลื่อยไม้ยางพารา รำละเอียด น้ำตาลทราย แดงหรือกากน้ำตาล ดีเกลือและปูนขาวเป็นส่วนประกอบ จะให้ผลผลิตต่อก้อนเฉลี่ยมากกว่า

อาหารสูตรที่ 1 ที่มีขี้เลื่อยไม้ยางพารา รำละเอียด ข้าวโพดบด ถึง 82.62 กรัมต่อก้อน ในการเลือกสูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตจึงควรเลือกสูตรที่ 2

ตารางที่ 11 ผลผลิตเห็ดเข็มเงิน

วัน /เดือน /ปี	น้ำหนักเห็ดสด (กรัม)				
	1 (44 ก้อน)	2 (44 ก้อน)	3 (44 ก้อน)	4 (44 ก้อน)	5 (44 ก้อน)
27/10/45	1500	700	1100	-	-
28/10/45	650	800	900	-	-
น้ำหนักรวมทั้งหมด	2,150	1,500	2,000	0	0
นน. เฉลี่ยต่อก้อน	48.86	34.09	45.45	0	0

จากตางรางที่ 11 พบว่า เห็ดเข็มเงินที่ได้ในการผลิตจะน้อยกว่าเห็ดเข็มทอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อเห็ดเข็มเงินที่นำมาทำการทดลองไม่แข็งแรงพอ ทำให้เส้นใยที่ได้เดินไม่ได้เต็มที่เท่ากับเห็ดเข็มทองที่ทำพร้อม ๆ กัน



รูปที่ 54 การบ่มเห็ดเข็มเงิน-เข็มทอง

รูปที่ 55 การเปิดดอกเห็ดเข็มเงินและเข็มทอง

รูปที่ 56 ลักษณะของเข็มเงิน

รูปที่ 57 ลักษณะของดอกเห็ดเข็มทอง

สรุปผลการทดลอง

การผลิตเห็ดในปัจจุบันมักได้รับความสนใจมากขึ้นในเกษตรกรไทย เนื่องจากเห็ดสามารถใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหารได้อย่างดี ประกอบกับประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกที่ดีอย่างหนึ่งที่เกษตรกรจะนำวัสดุเหล่านั้นมาใช้ให้เกิดมูลค่าและประโยชน์ต่อไป นอกจากนี้กำลังการผลิตเห็ดเพื่อจำหน่ายขนาดใหญ่ภาคอุตสาหกรรมมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการควบคุมคุณภาพอย่างดีพอและถูกต้อง เนื่องจากการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่องในการเพาะเห็ดจะมีผลต่อการผลผลิตที่ลดลงและดอกเห็ดที่มีลักษณะผิดปกติอีกด้วย ดังนั้นการควบคุมคุณภาพจึงมีความสำคัญต่อการผลิตเห็ดในเชิงทางการค้า ซึ่งการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาหาวิธีการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ด โดยใชเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อช่วยตรวจสอบคุณภาพเชื้อเห็ดก่อนนำไปใช้ในภาคการผลิตต่อไป และสามารถสรุปได้ว่า ITS 4- primer สามรถใช้ตรวจสอบความแตกต่างของผลชิ้น DNA โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งสามารถแยกความแปรปรวนของชิ้นส่วน ITS ระหว่างการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 และครั้งที่ 3 ของเห็ดหูหนูได้ ในขณะที่เห็ดชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างของชิ้น DNA ภายหลังการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่องเลย นอกจากนี้ความผิดปกติทางพันธุกรรมสามารถตรวจสอบด้วยการหาลำดับเบสจากชิ้น DNA ขนาด 600 คู่เบส โดยบ่งชี้ว่าการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนกับการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 จากแผนที่การตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I ซึ่งพบว่าการถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 พบตำแหน่งเพียง 1 ตำแหน่งในการตัดคือที่ 300 คู่เบสแต่ในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 พบตำแหน่งในการตัดเพิ่มขึ้นเป็น 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งแรกที่ 327 คู่เบส และตำแหน่งที่ 587 คู่เบส จึงกล่าวได้ว่า ITS 4-5 primer และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I สามารถใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมเห็ดได้และความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในเห็ดหูหนูยังสามารถเกิด reversible genetic ดังเช่นในการถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 ของเห็ดหูหนู

นอกจากนี้ยังได้นำมาตรวจสอบด้วย β-tubulin gene พบว่า β-tubulin gene สามารถใช้ตรวจสอบความผิดปกติของลักษณะดอกเห็ดได้ ดังเช่นในเห็ดหูหนูของการถ่ายเชื้อครั้งที่ 3 และเห็ดนางฟ้า ผลการศึกษาแนวโน้มของอัตราการเจริญและผลผลิตในเห็ดทั้ง 3 ชนิดพบว่าผลผลิตมีแนวโน้มลดลงและเชื้อเห็ดใช้ระยะเวลานานมากขึ้นในการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และในก้อนขี้เลื่อย ภายหลังการถ่ายเชื้ออย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะเห็ดขอนขาว, เห็ดกระด้างและเห็ดนางฟ้า อย่างไรก็ตามสภาวะแวดล้อมภายในโรงเรือนก็มีผลต่อดอกเห็ดด้วย อาจเกิดดอกเห็ดที่มีลักษณะผิดปกติได้ ดังเช่นพบในเห็ดนางฟ้า ดังนั้นการควบคุมคุณภาพในทุกขั้นตอนของการผลิตเห็ดจึงมีบทบาทสำคัญต่อลักษณะปรากฏของดอกเห็ด

การผลิตเห็ดตีนแรดโดยวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร สามารถสรุปได้ว่าดินอย่างเดียวเป็นวัสดุเพาะที่ดีที่สุดและภาชนะเพาะที่ดีที่สุดคือกระถางดิน โดยดินอย่างเดียวสามารถให้ผลผลิตสูงสุดคือ (575 น้ำหนักสด (g)/1 ภาชนะเพาะ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ในทุก ๆ main plot และ sub plot และการคลุมวัสดุเพาะด้วยฟางข้าวกับแกลบและไม่คลุมวัสดุเพาะ พบว่าไม่มีผลต่อผลผลิต นอกจากนี้ยังเห็นได้ว่าการผลิตเห็ดเชิงการค้าในประเทศไทยยังขาดการควบคุมคุณภาพเชื้อและการจัดการที่ดีในการดูแลสภาวะแวดล้อมภายในโรงเรือน ซึ่งส่วนใหญ่จะอาศัยสภาพแวดล้อมในธรรมชาติเป็นตัวควบคุมสภาวะในโรงเรือน ดังนั้นผลผลิตและคุณภาพของดอกเห็ดบางครั้งจึงไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการวิจัยนี้อาจสามารถช่วยแก้ปัญหาการควบคุมคุณภาพเชื้อเห็ดได้

งานวิจัยในอนาคตควบมุ่งศึกษาด้านความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดให้มากขึ้น โดยเฉพาะควรมุ่งศึกษาเฉพาะถึงกลุ่ม gene อื่น ๆ ด้วย เนื่องจากกระบวนการพัฒนาดอกเห็ดตั้งแต่ตุ่มดอกขนาดเล็กจนกระทั่งเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์มี gene ชุดอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้องมากมาย

การผลิตเห็ดในโรงเรือนที่ควบคุมอุณหภูมิเห็ดที่นำมาศึกษาทดลองปลูก คือ เห็ดเข็มเงินและเห็ดเข็มทองผลผลิตที่ได้จะเห็นว่านอกจากอุณหภูมิที่มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเห็ดแล้ว สูตรอาหารของเห็ดกับขนาดของก้อนเห็ดก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของเห็ดด้วย ในการทดลองผลิตเห็ดทั้งสอง พบว่า เห็ดเข็มทองจะให้ผลผลิตที่สูงกว่าเห็ดเข็มเงิน เฉลี่ย 100 กรัมต่อก้อน ขนาดของก้อนเห็ดถึงแม้ว่าเห็ดก้อนใหญ่จะให้ผลผลิตที่มากกว่า แต่ก็มากกว่าแค่ 26 กรัมต่อก้อนเท่านั้น ซึ่งถือว่าไม่แตกต่างกันมากนัก ถ้าในการทำเป็นอุตสาหกรรมจึงจริงสมควรที่จะทำก้อนเล็กมากกว่าเพราะจะช่วยประหยัดวัตถุดิบ และเพิ่มจำนวนก้อนในการเปิดเพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอีกด้วย ส่วนสูตรอาหารจะพบว่าสูตรที่เหมาะสมกับการเพาะเห็ดเข็มเงิน-เข็มทอง คือ สูตรที่ใช้ขี้เลื่อยยางพารา รำละเอียด น้ำตาลทรายแดง ดีเกลือและปูนขาว

เอกสารอ้างอิง

(References)

วสันต์ เพชรรัตน์. 2522. การเพาะเห็ดตีนแรด. อ้างถึงใน ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง : รั้วเขียว.

Baldauf and Dolittle. 1997. Origin and evolution of the slime molds Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 12007-12012. Quoted in Thon, M.R. and Royese, D.J. 1999. Partial β-tubulin gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina. Mycologia. 91(3): 468-474.

Chang, S.T. and W.A. Hayes, 1978. The Biology and Cultivation of Edible Mushroom. New York: Academic Press.

Chiu, S.W., H.S. Kwan and S.C. Cheng. 1993. Application of arbitarity-primed polymerase chain reaction in molecular studies of mushroom species with emphasis on *Lentinula edodes*. In: Culture Collection and Breeding of Edible Fungi, pp 265-284. Edited by Chang, S.T., J.A. Buswell and P.G. Miles, Philadelphia:Gordon and Breach Pub., Inc.

Fritche, G. 1972. Example of the effectiveness of monospore culture selection as a breeding method in mushroom cultivation. Theor. Appl. Genet. 42: 62-64. Quoted in Chang, S.T. and W.A. Hayes, 1978. The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. New York: Academic Press.

Fritche, G. 1974. Gegevens over het thans verkrijgbare ras Horst B 30. Champignon culture. 18: 317-319. Quoted in Chang, S.T. and W.A. Hayes, 1978. The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. New York: Academic Press.

Harlt, D. 1988. Genetics. (3rd ed.). New York: Jonesand Bartlett Publishers.

Jonkowska, J. 1970. Analyse der Wechselbeziehungen zwischen der Myzelwa chstumsdy namik Und dem Ertragsvermogen von Champinons, Beilage Champignon bau 22 in Deutche Gartner post, Berlin. Quoted in Chang, S.T. and W.A. Hayes, 1978. The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. New York: Academic Press.

Kerrigan, R.W., J.C. Royer, L.M. Baller, Y. Kohli, P.A. Horgen J.B. Anderson. 1993. Meiotic behaviour and linkage relationships in the secondarily homothalic fungus, *Agaricus bisporus*. Genetics. 133:225-236.

Kinugawa, K. and H. Furakawa, 1965. The fruit-body formation in collybia velutipes induced by the lower temperature treatment of one short duration Bot. Mag. 78: 240-244. Quoted in Chang, S.T. and Hayes, W.A. 1978. The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. New York: Academic Press.

Kwan, H.S., S.W. Chiu, K.M. Pang and S.C. Cheng 1992. Strain typing in *Lentinula edodes* by polymerase chain reaction. Experimentel Mycology. 16: 163-166.

Muller, J. 1989. Enzymatic regulation of temperature dependent fruit body morhogenesis in *Pleurotus ostreatus*. Mushroom Science XII (part I): 139-149. Quoted in Putraporn and Wichain. 1997. Improvement of Gray Oyster Mushroom by Means of Hybridization. Agriculture J. 13(1): 9-18.

Ogawa, M. 1964. Preliminary report on the nutrition of *Tricholoma matsutake* Singer and the Mycorrhizal relationship between the fungus and *Pinus densiflora*: 101-114. Quoted in Chang, S.T. and W.A. Hayes, 1978. The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. New York: Academic Press.

Prescott, J.M. and M.F. Kernkamp, 1971. Pl. Dis. Reptr. (55): 695-696.

Smith, D. and A.H.S. Onions, 1994. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. (2^{nd} ed.). UK: Cab International.

Thon, M.R. and D.J. Royse, 1999. Partial β-tubulin gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina. Mycologia. 91(3): 468-474.

Tokimoto, K. and M. Komatsu, 1975. Nutritional aspects on fruit body development in replacement culture of *Lentinus edodes* in Japan. Rep. Tottori Mycol. Inst. 10: 371-376. Quoted in Chang, S.T. and W.A. Hayes, 1978. The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. New York: Academic Press.

Tonomura, T. 1978. Experimental control of fruit body formation in *A. bisporus*. Growth-Differ. 11: 164-177. Quoted in Chang, S.T. and Hayes, W.A. 1978. The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. New York: Academic Press.

Vedder, P.J.C. 1975. Our experience with growing *A. bitorquis*. J. Mushroom. 32: 262-269.

Wang, Z.S. and H.C. Wang. 1993. Progress of cultivation technique of *Aguricus bisporus* in China. In: Mushroom Biology and Mushroom Products. pp. 133-139. Edited by Chang, S., Buswell, J.A. and S.W. Chiu. The Chiness University Press, Hongkong.

Welsh, H. and M. McClelland. 1990. Fringerprinting genomes using PCR with arbitary primers. Nucleic Acid Research 18: 7213-7218.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Ratalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitary primer are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research. 18: 6531-6535.

Zadrazil, F. 1993. Conversion of lignocellosics into animal feed with white-rot fungi. In: Mushroom Biology and Mushroom Products. Pp. 151-160. Edited by Chang, S., Buswell, I.A. and S.W. Chiu. The Chinese University Press, Hongkong.

Zhao, J. and H.S. Kwan, 1999. Characterization molecular cloning and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. Appl. Environ. Microboil. 65: 4908-4913.