LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY
30 JAN 1991

STUDIES ON FORMATION AND REGENERATION OF *Agaricus bitorquis* PROTOPLAST

UPATHAM PENGPARA

อภินันทนาการ
จาก
ปัตตานีวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(ENVIRONMENTAL BIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1990

Copyright by Mahidol University

16497

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาการเกิดโปรโตพลาส และการกลับเป็นเส้นใยของเห็ดกระดุม สายพันธุ์ทนร้อน (Agaricus bitorquis)

ผู้วิจัย อุปถัมภ์ เพ็งภารา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยาสภาวะแวดล้อม)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ปรีชา กลิ่นเกษร Ph.D.

สัญชัย ตันตยาภรณ์ Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 21 มีนาคม พ.ศ. 2533

บทคัดย่อ

เทคนิค protoplast fusion เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์เห็ด งานวิจัยนี้ ได้ศึกษาถึงปัจจัยบางประการ ที่มีผลต่อ การเกิด protoplast ของเส้นใยเห็ดกระดุมสายพันธุ์ทนร้อน (Agaricus bitorquis) KB629 ตลอดถึงการ regenerate กลับเป็นเส้นใยอีกครั้ง ซึ่งสภาวะการเกิด protoplast นั้นเป็นสิ่งสำคัญที่มีผลต่อการกลับเป็นเส้นใย จากการศึกษาพบว่า 0.6 M mannitol pH 6.8 เป็นตัวปรับ osmotic ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเกิด protoplast เปรียบเทียบกับการใช้ 0.2M sodium phosphate buffer pH 6.8(SPB 6.8)และการใช้ SPB 6.8 ร่วมกับ 0.2,0.6,และ 1.0 M NaCl และ KCl การเลี้ยงเส้นใยเห็ดกระดุมในอาหาร malt extract liquid medium (MELM) บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10-20 วัน จะสามารถ ให้ปริมาณ protoplast ได้มากที่สุด ชนิดและ ปริมาณเอนไซม์ ที่เหมาะสมแก่การผลิตโปรโตพลาสนั้น พบว่าการใช้ 1.5% w/v Novozym™ 234 + 0.5% w/v β -Glucuronidase เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ การผลิต protoplast เมื่อ เปรียบเทียบกับการใช้ แบบเดี่ยว และการใช้ร่วมกัน ของเอนไซม์ cellulase, hemicellulase, chitinase, novozym™ 234 และ β -Glucuronidase การกลับเป็นเส้นใยของ protoplast เห็ดกระดุมนี้ เกิดเฉพาะในliquid regeneration medium(LRM) ที่ 35° C ก่อนย้ายสู่ อาหาร malt extract liquid medium (MELM) ในเวลาต่อมา

Copyright by Mahidol University

Thesis Title STUDIES ON FORMATION AND REGENERATION OF *Agaricus bitorquis* PROTOPLAST

Name Upatham Pengpara

Degree Master of Science (Environmental biology)

Thesis Supervisory Commitee

Preecha Klingasorn, Ph.D.

Sanchai Tantyaporn, Ph.D.

Date of Graduation 21 March B.E.2533 (1990)

ABSTRACT

The protoplast fusion technique is one of the several ways of musbroom strain improvement. This research deals with the formation and regeneration of *A. bitorquis* protoplasts. Some factors affecting the libration of *Agaricus bitorquis* (KB 629) mycelium were investigated to maximize the protoplast yield. The condition of protoplast formation are important in determining the regenerative potential. The 0.6 M mannitol pH 6.8 (Man 6.8) was the best osmotic stabilizer for the formation of them compared with 0.2 M sodium phosphate buffer pH 6.8 (SPB 6.8) and SPB 6.8 containing 0.2, 0.6, 1.0 M NaCl and KCl. The 10-20 days old cultured mycelium in Malt extract liquid medium (MELM) on shaker gave the highest yield of protoplasts. The combination of 1.5% w/v Novozym™ 234 and 0.5% w/v β-Glucuronidase at 2-6 hrs

Copyright by Mahidol University

incubations time was the suitable condition for the protoplast formation in comparison to various concentration of single or combination of enzyme such as CELLULASE, HEMICELLULASE, CHITINASE, NOVOZYM^{TM} 234 and β-GLUCURONIDASE . Regeneration of protoplast was shown to be influenced by the status of media, only in liquid regeneration medium (LRM) at 35° C and in malt extract liquid medium (MELM) later.

Copyright by Mahidol University