

การรวบรวมและจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมที่เพาะเป็นการค้า ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

Collection and Classification of Commercial Strain of Shiitake Mushroom by Molecular Marker; RAPD

เรือนแก้ว ประพฤติ^{1/} และ ปรีชา รัตน์^{2/}
Rueankaew Praphruet^{1/} and Pricha Rattanang^{2/}

Abstract: Forty-three commercial strains of shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. collected from northern area in Chiang Mai, Chiang Rai, Lampang and Lamphun, were evaluated the genetic diversity and strain identification by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. Genomic DNA was extracted from fresh mushroom and RAPD analysis was performed using 27 decamer primers. 21 out of 27 primers produced 99 polymorphic bands. A total of 178 amplification products were scored of which 55.62% were polymorphic. Ten primers gave identical polymorphic band in a particular strain which could be used to distinguish that strain from the others. The identical bands were observed in four strains 'Royal project', 'Mit', 'Wilai' and 'Anuchit'. The genetic similarity index of these strains ranged from 0.311 to 0.963. A dendrogram generated by Unweighted Pair Group Method (UPGMA) analysis showed that the commercial strain of shiitake clustered into 6 groups. Molecular genetic markers obtained with the RAPD technique can be used to differentiate commercial strains of *L. edodes*.

Keywords: Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*), DNA fingerprinting, RAPD technique

^{1/}ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพและสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์

^{2/}ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

^{1/}Biotechnology Center and Institute of Product Quality and Standardization

^{2/}Department of Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

บทคัดย่อ: เห็ดหอมสายพันธุ์ที่เพาะเป็นการค้าจำนวน 43 ตัวอย่าง ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำปางและลำพูน ได้นำมาศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์และจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี โดยการนำตัวอย่างดอกเห็ดสดมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 27 ไพรเมอร์ พบว่ามี 21 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 178 เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 99 แถบ คิดเป็น 55.62 เปอร์เซ็นต์ มี 10 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในบางสายพันธุ์เท่านั้น สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกชนิดของสายพันธุ์เห็ดหอม 4 สายพันธุ์ออกจากตัวอย่างอื่นได้อย่างชัดเจน ได้แก่ สายพันธุ์ของโครงการหลวงหมอกจ๋าม สายพันธุ์ของผู้ใหญ่มิตร สายพันธุ์ของคุณวิไลวรรณและสายพันธุ์จากคุณอนุชิต การวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.311 – 0.963 เมื่อสร้างเป็นแผนภูมิแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA สามารถแยกสายพันธุ์เห็ดหอมได้เป็น 6 กลุ่ม

คำสำคัญ: เห็ดหอม สายพันธุ์ดีเอ็นเอ เทคนิคอาร์เอฟดี

คำนำ

เห็ดหอม (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) เป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญ มีการเพาะเชิงพาณิชย์มากในภาคเหนือโดยเฉพาะในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง แม่ฮ่องสอน เพราะมีสภาพอากาศค่อนข้างเย็น เหมาะต่อการเจริญของเห็ดชนิดนี้ ปัจจุบันปริมาณผลผลิตภายในประเทศยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดต้องนำเข้าจากต่างประเทศเช่น จีน เกาหลี และญี่ปุ่น ทั้งในรูปดอกเห็ดสดและแห้งนับเป็นมูลค่าหลายสิบล้านบาท เห็ดหอมแบ่งออกเป็น 5 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ฮานาคอนโก พันธุ์ดอนโก พันธุ์โคตชูบุตองโก พันธุ์โกโก และพันธุ์โกชิน (ปัญญา และ ศิริพงษ์, 2537) พันธุ์โกชินยังแบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยตามคุณภาพดอกเห็ดอีก 2 สายพันธุ์คือ ใจโกชิน และ นามิโกชิน เกณฑ์ที่ใช้แยกสายพันธุ์ในปัจจุบันคือลักษณะหมวกเห็ด ขนาด รูปทรง และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การใช้ฐานฐานวิทยาแยกชนิดสายพันธุ์ทำให้การระบุสายพันธุ์เกิดความคลาดเคลื่อนได้ง่าย และอาจได้รับอิทธิพลจากปัจจัยของสภาพแวดล้อมเช่น แหล่งอาหาร อุณหภูมิ ความชื้นและแสง ฯลฯ มีการนำเทคนิคทางชีวเคมีเช่น รูปแบบของไอโซไซม์ (Ohmasa and Furukawa, 1986; Royse et al., 1983) และเทคนิคทางเครื่องหมายดีเอ็นเอ เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos et

al., 1995; Terashima and Matsumoto, 2004) และ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Chiu et al., 1996; Kwan et al., 1992; Zhang and Molina, 1995) มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาด้านอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด การนำเทคนิคทางเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ร่วมกับฐานฐานวิทยาจะทำให้การจำแนกสายพันธุ์มีความถูกต้องชัดเจนมากกว่าการใช้ลักษณะทางฐานฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว จากการศึกษาของ Ito et al. (1998) พบการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มสามารถแยกเชื้อรา *Coprinus cinereus* จำนวน 5 strains ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ออกจากกันได้ Ramirez et al. (2001) รายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเออาร์เอฟดีในการศึกษาความสัมพันธ์เหมือนและต่างกันของสายพันธุ์เห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) พบว่ามีความเหมือนกันทางพันธุกรรมอยู่ในระดับค่อนข้างสูง งานวิจัยเกี่ยวกับการจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมยังมีรายงานไว้ไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงต้องการนำเทคนิคอาร์เอฟดีมาใช้เพื่อจำแนกสายพันธุ์และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดหอม

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างเห็ด

ตัวอย่างดอกเห็ดหอมสดจากฟาร์มในพื้นที่จังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง จำนวน 43 ตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอ

บดดอกเห็ดสดด้วยโกร่งไนไนโตรเจนเหลว นำผงบดละเอียดของดอกเห็ดประมาณ 100 มิลลิกรัม ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) ซึ่งมีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้

เติมสารละลาย 2X CTAB extraction buffer 700 ไมโครลิตร ลงไปในผงดอกเห็ดที่บดละเอียดแล้วในหลอดเขย่าเพื่อให้สารละลายผสมกันด้วยเครื่อง vortex mixer บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นสกัดด้วย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บสารละลายส่วนใส จากนั้นสกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) อีก 2 ครั้ง ดูดเก็บสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า และ 7.5M ammonium acetate ปริมาตร 0.3 เท่า ของปริมาตรสารละลายที่ดูดเก็บได้ บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 3 ครั้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอดให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA) pH 8.0 เติมเอนไซม์ RNase 2 ไมโครลิตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาเจือจางโดยเตรียม dilution 1 : 50 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางให้มี ความเข้มข้น 40 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ng/μl) จากนั้นนำมาเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์แบบคู่ ความเข้มข้นของสารเคมีแต่ละชนิดมีดังนี้ 1X PCR buffer

(Invitrogen), 1.9 mM Mg₂Cl (Invitrogen), 1 mM dNTPs (Promega), 10 pmole RAPD primer (Bio basic Inc.), 1 unit Taq DNA polymerase (Invitrogen), 120 ng DNA template ปรับให้มีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ด้วย deionized sterile water หยดน้ำมันแร่ลงในหลอดพีซีอาร์ 1 หยด จากนั้นนำหลอดไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสาร พันธุกรรม (MJ Research รุ่น PCT-200 Peltier Thermal Cycler) โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ pre-denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 45 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 1 นาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ post-extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณมาแยก แถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ใช้ agarose ความเข้มข้น 1.5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลา 90 นาที จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอในสารละลายเอทیدیئمโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอได้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง gel documentation

การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอ

บันทึกผลด้วยการให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบจากความเหมือน และความแตกต่างของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยสายพันธุ์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ จะให้ คะแนนเป็น 1 ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ ตำแหน่งเดียวกันให้คะแนนเป็น 0 นำข้อมูลการให้คะแนน มาวิเคราะห์หาค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธี Jaccard coefficient และแสดงในรูปแผนภูมิด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method (UPGMA) วิเคราะห์ ผลข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) เวอร์ชัน 2.0 (Rohlf, 1998)

ผลการทดลอง	
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี	ขนาดขึ้นดีเอ็นเอมีขนาดตั้งแต่ 2690 คู่เบสถึง 318 คู่เบส
จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 27 ไพรเมอร์ในการ	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 178 แถบ โดยมีแถบ
เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ดห้อมจำนวน 43 ตัวอย่าง พบว่ามี	ดีเอ็นเอที่แตกต่างจำนวน 99 แถบคิดเป็น 55.62%
21ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism)	ค่าเฉลี่ยของการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างเท่ากับ 4.95
	แถบต่อ 1 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 1)

Table 1 Primers name, amplified fragments, total of amplified bands, number of polymorphic bands and percentage of polymorphic bands.

Primers name	Sequence (5' --->3')	Amplified fragments (bp)	Total of amplified bands	Number of polymorphism bands	Percentage of polymorphism bands
R3	AATCGGGCTG	2482-358	11	6	54.54
R2	AGTCAGCCAC	2690 - 396	9	4	44.44
R5	GCGATCCCCA	1650 - 519	8	3	37.50
S21	CAGGCCCTTC	1584 - 531	7	5	71.43
S22	TGCCGAGCTG	1348 - 370	8	4	50.00
S82	GGCACTGAGG	2477 - 727	9	3	33.33
S83	GAGCCCTCCA	2122 - 403	9	7	77.78
S84	AGCGTGTCTG	1620 - 539	8	6	75.00
S85	CTGAGACGGA	1490 - 471	7	4	57.15
S86	GTGCCTAACC	1000 - 700	5	3	60.00
S87	GAACCTGCGG	2194 - 318	5	4	80.00
S89	CTGACGTCAC	1718 - 577	6	4	66.67
S90	AGGGCCGTCT	1271 - 386	10	4	40.00
S91	TGCCCCGTCT	1790 - 822	9	4	44.44
S92	CAGCTCACGA	1032 - 403	6	2	33.33
S93	CTCTCCGCCA	1650 - 525	5	2	40.00
S94	GGATGAGACC	2179 - 684	8	4	50.00
S96	AGCGTCCTCC	1727 - 481	10	7	70.00
S97	ACGACCGACA	2658 - 714	8	6	75.00
S98	GGCTCATGTG	1695 - 703	10	7	70.00
S99	GTCAGGGCAA	805 - 452	5	3	60.00

ไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในบางตัวอย่างเท่านั้นได้แก่ ไพรเมอร์ R3 และ S3 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 358 และ 403 คู่เบส ในตัวอย่างจากโครงการหลวงหมอกจ๋าม (Royal Project) เท่านั้น (ภาพที่ 1) ไพรเมอร์ S2, S12 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 727 และ 613 คู่เบส ที่พบเฉพาะในตัวอย่างของผู้ใหญ่มิตร (Mit) เท่านั้น (ภาพที่ 2) ไพรเมอร์ S4 และ S5 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 957 และ 598 คู่เบส พบเฉพาะในตัวอย่างของคุณวิไลวรรณ (Wilai) เท่านั้น (ภาพที่ 2) ไพรเมอร์ R5, S17, S5, S11, S12 และ S14 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 783, 2182, 724, 1112, 738 และ 993 คู่เบส ตามลำดับ ที่พบเฉพาะในตัวอย่างจากคุณอนุชิต (Anuchit-1 และ Anuchit-2) เท่านั้น (ภาพที่ 3)

ส่วนสายพันธุ์ที่เหลืออีก 39 สายพันธุ์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 27 ไพรเมอร์ ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากผลของอาร์เอพีดี

ผลจากการจัดจำแนกตัวอย่างเห็ดหอมจำนวน 29 ตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS version 2.01 พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.311 – 0.963 จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA และแสดงเป็น dendrogram สามารถแบ่งเห็ดหอมทั้ง 29 ตัวอย่างได้เป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ RAT-5, Jumput, Mit, LungAir-2, Kruban, Bouloung, Bouloung2, Prakorn-1, Prakorn-Golden, Malai และ LungAir-1 กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ Prakorn-2, Vichan-9, Top-15, Tanom-17, Winai และ Prakorn-26 กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ Dept.Agi, RAT-6, Hongkria และ Wilai กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ AG-7, AG-8, Vichan-10, Top-16 และ Jack-11 กลุ่มที่ 5 มีจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ Anuchit-1 และ Anuchit-2 และ กลุ่มที่ 6 มีจำนวน 1 ตัวอย่าง ได้แก่ Royal.Pro (ภาพที่ 4)

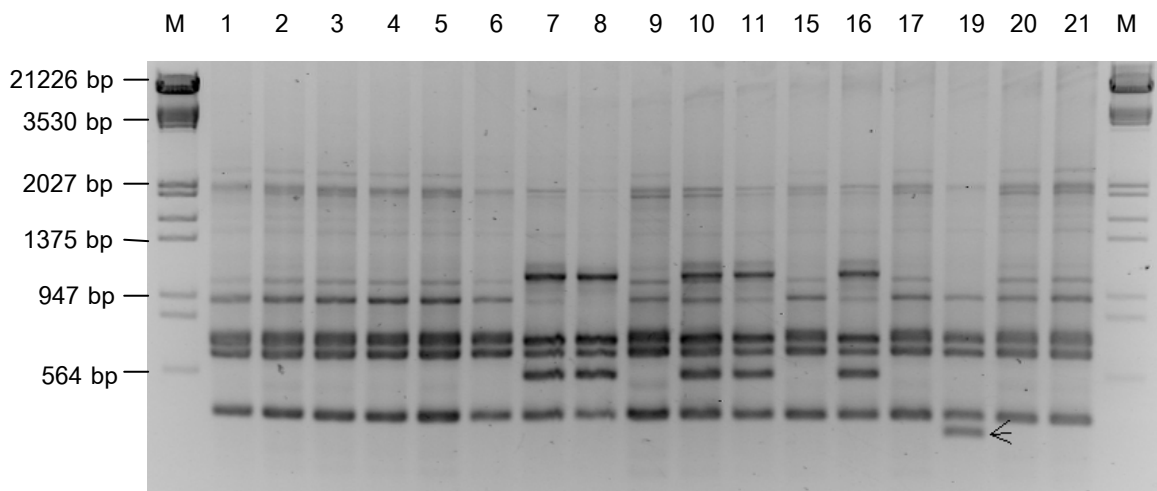


Figure 1 RAPD fingerprints of *Lentinus edodes* obtained from primer R3, M = molecular marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII, lane 1-21 = *L. edodes* strains, arrow indicated fragment size 358 bp.

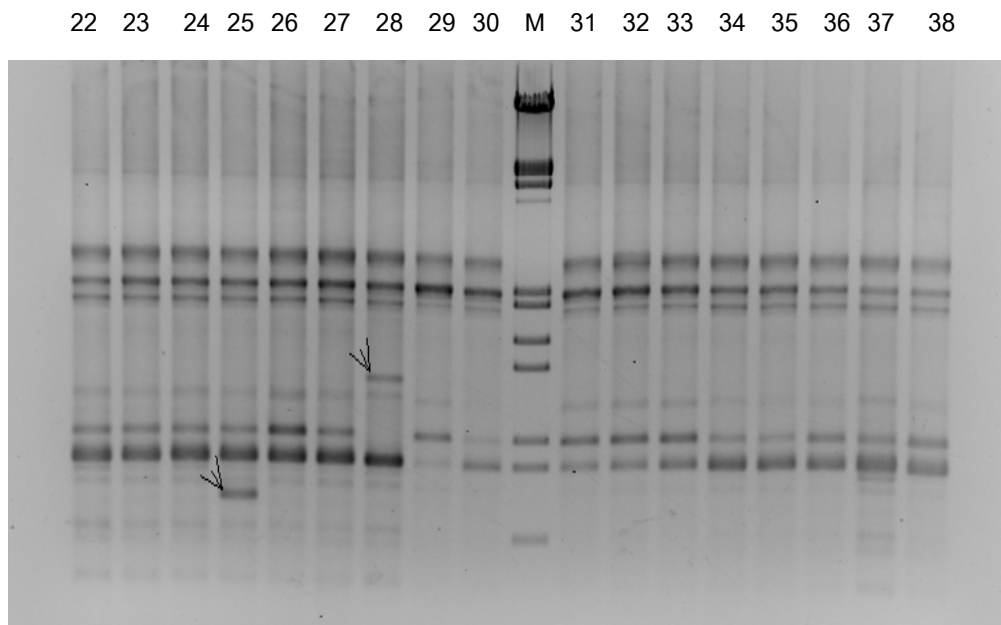


Figure 2 RAPD fingerprints of *Lentinus edodes* obtained from primer S82, M = molecular marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII , lane 22-38 = *L. edodes* strains, arrow indicated fragments size 727 and 1296 bp.

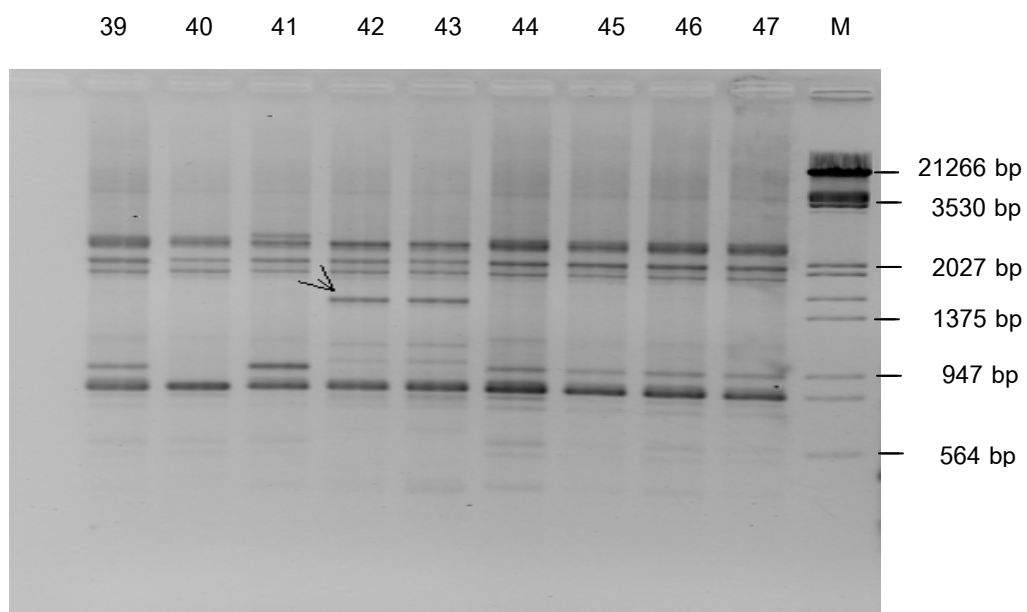


Figure 3 RAPD fingerprints of *Lentinus edodes* obtained from primer S82, M = molecular marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII , lane 39-47 = *L. edodes* strains, arrow indicated fragment size 1584 bp.

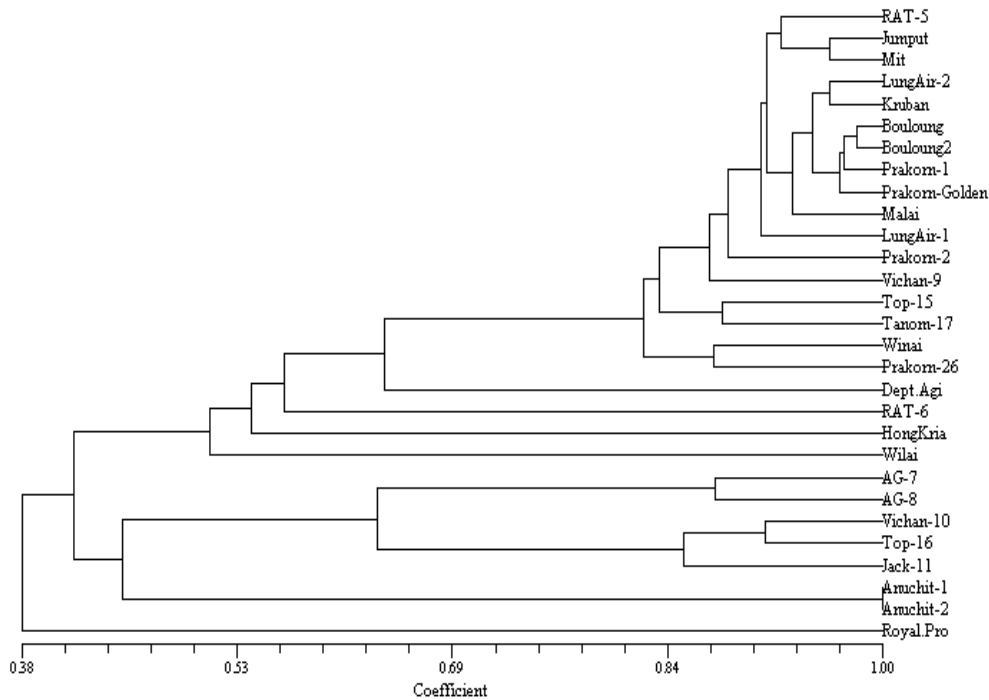


Figure 4 Dendrogram of genetic similarity between the commercial strains of *Lentinus edodes* generated by UPGMA analysis.

วิจารณ์

จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 27 ไพรเมอร์ เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ พบว่ามี 4 สายพันธุ์ที่ไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ สามารถระบุสายพันธุ์เห็ดหอมได้ ได้แก่ สายพันธุ์จากโครงการหลวงหมอกจ๋าม (Royal Project) ซึ่งเก็บตัวอย่างจากโครงการหลวงหมอกจ๋าม อำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงราย เทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมเพียง 38 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น สายพันธุ์นี้ได้จากการคัดแยกจากดอกเห็ดในป่าธรรมชาติ ทำให้สายพันธุ์นี้มีฐานพันธุกรรมต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ ค่อนข้างมาก สายพันธุ์ที่ 2 คือสายพันธุ์ของผู้ใหญ่มิตร (Mit) เก็บตัวอย่างจาก ผู้ใหญ่มิตรพุทธเมืองขึ้น อำเภอแม่ทะ จังหวัดลำปาง พิจารณาจากค่าความเหมือนทางพันธุกรรม

เปรียบเทียบกับตัวอย่าง Jumput, LungAir-1, LungAir-2, Malai, Kruban, Bouloung และ Bouloung-2 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งเดียวกัน พบว่า ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมสูงมากคืออยู่ระหว่าง 0.907-0.962 แต่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างหรือไม่พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 จากการสอบถามที่มาของสายพันธุ์ทราบว่าได้มาจากบ้านนาคด ในขณะที่สายพันธุ์อื่นส่วนใหญ่ได้สายพันธุ์มาจากบ้านปางมะโอ จากผลการศึกษาในเบื้องต้นคาดว่าเห็ดหอมที่เพาะในอำเภอแม่ทะน่าจะมีสายพันธุ์หลักอยู่ 2 สายพันธุ์คือสายพันธุ์จากบ้านปางมะโอและบ้านนาคด สายพันธุ์ของคุณวิไลวรรณ (Wilai) เก็บตัวอย่างจาก คุณวิไลวรรณ แปงใจ อำเภอแม่ทะ จังหวัดลำปาง ได้สายพันธุ์มาจากสวนเห็ดนงนุช จังหวัดลำพูน ถ้าพิจารณาจากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแล้วจะเห็นว่าไม่สอดคล้องกับแหล่งที่เก็บ

ตัวอย่าง สายพันธุ์ที่เก็บจากอำเภอแม่ทะทุกตัวอย่าง ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ยกเว้นสายพันธุ์วิไลวรรณ ทั้งนี้เพราะสายพันธุ์ดั้งเดิมนั้นได้มาจากจังหวัดลำพูน ซึ่งพันธุกรรมย่อมแตกต่างจากสายพันธุ์จากบ้านปางมะโอและบ้านนาคด สายพันธุ์ อนุชิต-1 (Anuchit-1) และ อนุชิต-2 (Anuchit-2) ลักษณะแถบตีเอ็นเอที่แตกต่างออกจากตัวอย่างอื่น ๆ ค่อนข้างชัดเจน ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 0.45 (45%) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ดอกมีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ท้องถิ่น ดอกมีลักษณะรอยแตกเป็นร่องลึกเห็นได้อย่างชัดเจน ผิวห่มวกเห็ดแตกเป็นลาย มีสีซีด เนื้อห่มวกหนา ก้านดอกสั้น สอบถามไปยังแหล่งที่มาของตัวอย่างพบว่า เป็นสายพันธุ์ที่มีการนำเข้าจากประเทศจีน แล้วนำมาแบ่งบรรจุจำหน่าย

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบแถบตีเอ็นเอของสายพันธุ์อนุชิต-1 และอนุชิต-2 จากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 21 ไพรเมอร์ พบว่าให้แถบตีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกประการ แต่เมื่อพิจารณาลักษณะดอกพบว่ามีความต่างกันอย่างชัดเจน อนุชิต-1 ห่มวกดอกมีรอยแตก เป็นร่องลึกเห็นชัดเจน ขณะที่อนุชิต-2 ดอกไม่ปรากฏรอยแตก ผิวห่มวกเรียบเสมอกัน เป็นการยืนยันได้อย่างชัดเจนว่าลักษณะสัณฐานวิทยาไม่สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้เสมอไป ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อม

พิจารณาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจาก dendrogram ซึ่งจัดแบ่งเห็ดหอมได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่นั้น มีความสอดคล้องกับแหล่งหรือพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง เช่น กลุ่มที่ 1 มีสายพันธุ์ที่มาจากอำเภอแม่ทะถึง 8 ตัวอย่างในจำนวนทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ในกลุ่มนี้มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมสูงถึง 95% กลุ่มที่ 2,3 และ 4 ซึ่งมี 13 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของกลุ่มนี้ค่อนข้างสูงประมาณ 85% จากการสอบถามถึงแหล่งที่มาของสายพันธุ์ ทุกฟาร์มบอกว่าได้มาจากที่เดียวกันคือฟาร์มของคุณประภรณ์ แต่ได้เปลี่ยนชื่อใหม่ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของสายพันธุ์เห็ดหอมในพื้นที่ผลิตทางภาคเหนือตอนบนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ แหล่งที่มาของหัวเชื้อมาจากการแลกเปลี่ยนกันในกลุ่มผู้เพาะเห็ดหอม คนรู้จักหรือใน

เครือข่ายโดยเฉพาะที่อยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกัน เกษตรกรยังไม่มีความมั่นใจที่จะนำสายพันธุ์ต่างถิ่นมาทดลองเพาะ เพราะเชื่อว่าสายพันธุ์ที่ใช้ในปัจจุบันมีความเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศในพื้นที่นั้น ๆ อยู่แล้ว การใช้สายพันธุ์เดิมอยู่ตลอดและต่อเนื่องกันนานขึ้น อาจทำให้ผลผลิตค่อย ๆ ลดลง การเปลี่ยนแปลงนี้อาจใช้ระยะเวลานานหลายเดือนหรือเป็นปี การลดลงของผลผลิตเป็นเรื่องที่ซับซ้อนและควบคุมไม่ได้ ดังนั้นการผลิตเห็ดหอมเชิงการค้าควรมีสายพันธุ์ที่หลากหลายเพื่อการผลิตที่มีเสถียรภาพ (Albert, 1993) การสร้างความหลากหลายของสายพันธุ์เห็ดหอมให้มากขึ้นนั้น ควรมีการนำมาปรับปรุงสายพันธุ์ให้ฐานพันธุกรรมของเห็ดชนิดนี้มีความหลากหลายมากขึ้น เช่น นำสายพันธุ์ไปมาปรับปรุงพันธุ์ร่วมกับสายพันธุ์ที่เพาะในปัจจุบัน เช่นสายพันธุ์จากโครงการหลวงหมอกจ๋าม สายพันธุ์จากฟาร์มอนุชิต สายพันธุ์ของคุณวิไลวรรณและของผู้ใหญ่มิตร สายพันธุ์เหล่านี้ควรได้รับการศึกษาถึงลักษณะดีเด่น นำมาปรับปรุงพันธุ์ร่วมกับสายพันธุ์เดิมที่มีอยู่แล้ว เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีรวมลักษณะที่ดีไว้ด้วยกัน

สรุป

การรวบรวมสายพันธุ์เห็ดหอมที่เพาะเป็นการค้าในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน จำนวน 43 ตัวอย่าง นำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มพบว่ามี 10 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบตีเอ็นเอที่พบเฉพาะในบางสายพันธุ์เท่านั้น แถบตีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมกุลในการแยกสายพันธุ์เห็ดหอม 4 สายพันธุ์ออกจากสายพันธุ์อื่นได้อย่างชัดเจน ได้แก่ สายพันธุ์จากโครงการหลวงหมอกจ๋าม สายพันธุ์ของผู้ใหญ่มิตร สายพันธุ์ของคุณวิไลวรรณ และสายพันธุ์จากคุณอนุชิต จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าสายพันธุ์เห็ดหอมที่เพาะเพื่อการค้าในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำสามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจาก
งบประมาณสนับสนุนการวิจัยผ่านคณะกรรมการการวิจัย
และสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัย
แม่โจ้ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณทุกท่านที่ได้ช่วย
ประสานงานเป็นอย่างดี ไว้ ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

- ปัญญา โพธิ์จูติรัตน์ และศิริพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2537.
เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. ภาควิชาเทคโนโลยีการ
ผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบัน
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
ลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 421 หน้า.
- Albert, H.E. 1993. Breeding for mushroom product in
Lentinus edodes. pp.111-122. In : S.T.
Chang, J.A. Buswell and P.G. Miles (eds.).
Genetics and Breeding of Edible
Mushroom. Gordon and Breach,
Philadelphia.
- Chiu, S.W., A.M. Ma, F.C. Lin and D. Moore. 1996.
Genetic homogeneity of cultivated strain of
shiitake (*Lentinus edodes*) used in China as
revealed by the polymerase chain reaction.
Mycol Res. 100: 1393-1399.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA
isolation procedure for small quantities of
fresh leaf tissue. Phytochemistry Bull. 19:
11-15.
- Ito, Y., T. Fushimi and O.Y. Sonoe. 1998.
Discrimination of species and strains of
basidiomycete genus *Coprinus* by random
amplified polymorphic DNA (RAPD)
analysis. Mycosci. 39: 361-365.
- Kwan, H.S., S.W. Chiu, K.M. Pang and S.C. Cheng.
1992. Strain typing in *Lentinula edodes* by
polymerase chain reaction. Exp. Mycol. 16:
163-166.
- Ohmasa, M. and H. Furukawa. 1986. Analysis of
esterase and malate dehydrogenase
isozymes of *Lentinula edodes* by isoelectric
focusing for the identification and
discrimination of stocks. Trans. Mycol.
Soc.Jap. 27: 79-90.
- Ramirez, L., V.Muez and M. Alfonso. 2001. Use of
Molecular Markers to Differentiate between
Commercial Strains of the Button Mushroom
Agaricus bisporus. FEMS Microbiol. Lett.
198: 45-48.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc Numerical taxonomic and
multivariate analysis system. Version 2.01.
Applied Biostatistics, Inc., New York. 78 p.
- Royse, D.J., M.C. Spear and B. May. 1983. Single
and joint segregation of marker loci in the
shiitake mushroom, *Lentinus edodes*. J.
Gen. Appl. Microbiol. 29: 217-222.
- Terashima, K. and T. Matsumoto. 2004. Strain typing
of shiitake (*Lentinus edodes*) cultivars by
AFLP analysis, focus on heated-dried
fruiting body. Mycosci. 45: 79-82.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de
Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J.
Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995.
AFLP : A new technique for DNA
fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-
4414.
- Zhang, Y. and F.I. Molina. 1995. Strain typing of
Lentinula edodes by random amplified
polymorphic DNA assay. FEMS Microbiol.
Lett. 131: 17-20.