

บทคัดย่อ

จากการศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์เห็ดโคนน้อยหรือเห็ดถั่ว (*Coprinus* spp.) ที่รวบรวมได้จากตลาดชุมชนในเขตภาคเหนือตอนบนในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แพร่ และน่าน รวมทั้งสิ้นจำนวน 49 ตัวอย่าง ซึ่งการจัดแบ่งกลุ่มสายพันธุ์เป็นไปตามลักษณะสัณฐานวิทยา ที่จัดกลุ่มเป็น 6 สายพันธุ์ คือ 2A , 2B, Prao, B5 , K3 และ K3.16 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (High annealing temperature–Random amplification polymorphic DNA ; HAT–RAPD) โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเห็ดโคนน้อยและนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) จำนวน 72 ไพรเมอร์ พบว่า มีไพรเมอร์ทั้งหมด 31 ไพรเมอร์ ที่สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นได้ในทุกตัวอย่าง และมีไพรเมอร์จำนวน 27 ไพรเมอร์ ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพิมพ์ดีเอ็นเอ (polymorphic band) ของเห็ดโคนน้อยในตัวอย่างต่างชนิดกัน โดยมีไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบ polymorphic จำนวน 5 แถบขึ้นไปทั้งหมด 7 ไพรเมอร์ คือ OPAA–03, OPAA–10, OPAJ–05, OPL–07, OPAO–18, OPAH–10 และ OPU–05 โดยไพรเมอร์ OPAO–18 แสดงเปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมากที่สุดคือ 8.8% polymorphism ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอถูกไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการใช้ Cluster analysis โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA ซึ่งเป็นวิธีประยุกต์จาก Garcia–Vallveet *al.*, 1999 เพื่อคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่าค่าดัชนีความเหมือน (similarity matrix) และแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.217–1.000 และมีค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.99 ซึ่งสอดคล้องกันทั้ง 7 ไพรเมอร์ เมื่อพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 0.55 ขึ้นไป พบว่าสามารถแบ่งเห็ดโคนน้อยออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่ม 1 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A และ กลุ่มที่ 4 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B

คำสำคัญ: เห็ดโคนน้อย, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, HAT–RAPD

Abstract

Strains classification of Hed Khone Noi mushroom, *Coprinus* spp., selected from 49 samples which collected from the community markets in northern area in Chiang Mai, Lamphun, Lampang, Prae and Nan, were based on morphological characteristics and classified into 6 strains ; 2A ,2B, Prao, B5 , K3 and K3.16. The genetic diversity were evaluated by using HAT-RAPD (High annealing temperature-Random amplification polymorphic DNA) technique. Genomic DNA was extracted from mycelia of mushroom and RAPD analysis was performed using 72 random primers. It was found that 27 out of 31 primers produced polymorphic bands. Only 7 primers: OPAA-03, OPAA-10, OPAJ-05, OPL-07, OPAO-18, OPAH-10 and OPU-05 gave identical polymorphic band. Moreover, the primer OPAO-18 was presented the highest percentage of polymorphism (8.8 %).The genetic relationship and cluster analysis was generated by Unweighted Pair Group Method (UPGMA) which modified from Garcia-Vallve *et al.*, 1999. The result showed that the values of similarity coefficient were ranged from 0.217-1.000, cophenetic correlation ($r = 0.99$) and the fingerprint from all primers that useful for distinguishing the strain of Hed Khone Noi clustered into 4 groups: group1 = strain K3 and K 3.16; group 2 = strain Prao and strain B5; group 3 = stain 2A ; group 4 = strain 2B at the genetic similarity index of these strains range from ≥ 0.55 .

Keywords: Coprinus Mushroom or Hed Khone Noi, DNA fingerprinting,

HAT-RAPD

บทนำ

ประเทศไทยนับว่าเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดหลากหลายชนิด การเพาะเห็ดเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางเพราะได้ผลผลิตเร็วและมีตลาดรองรับ ด้วยเหตุนี้การเพาะเห็ดจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการประกอบอาชีพที่ไม่ต้องใช้เงินลงทุนสูงนักแต่สร้างรายได้ให้เป็นที่น่าพอใจ สามารถทำเป็นอาชีพหลักหรืออาชีพรองได้ ปัจจุบันมีการเพาะเห็ดกันอย่างกว้างขวางและมีการผลิตเห็ดชนิดใหม่ๆออกมามากจนมีศักยภาพในการเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญเช่นเดียวกับเห็ดที่นิยมบริโภคโดยทั่วไปอยู่แล้ว เช่น เห็ดหอม เห็ดฟางและเห็ดในตระกูลนางรม ได้แก่ เห็ดนางรม เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรมทอง นอกจากนี้ยังมีเห็ดชนิดใหม่ๆเริ่มเข้าสู่ตลาดและเริ่มเป็นที่ยอมรับแก่ผู้บริโภคเช่น เห็ดลม เห็ดขอนขาว และเห็ดถั่ว หรือเห็ดโคนน้อย เป็นต้น เห็ดถั่วแต่เดิมสามารถขึ้นเองตามสภาพธรรมชาติ โดยมักขึ้นอยู่บนอินทรีย์วัตถุ เช่น กองเปลือกถั่วเหลืองหลังเก็บเกี่ยว จึงเป็นที่มาของชื่อเห็ดถั่ว หรือทางเหนือเรียกว่าเห็ดถั่วเน่า ต่อมาจึงมีผู้พัฒนาสายพันธุ์แล้วนำมาเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการคล้ายกับการเพาะเห็ดฟาง แล้วตั้งชื่อเป็นจุดขายหรือสร้างความน่าสนใจว่าเห็ดโคนน้อย หรือเห็ดโคนเพาะ สำหรับการเพาะเห็ดถั่วหรือเห็ดโคนน้อยนี้มีรายงานว่านายไพโรจน์ พิสุทธิเป็นผู้บุกเบิกในการทดลองเพาะและนำมาเผยแพร่ครั้งแรกให้แก่ประชาชนทั่วไป ที่บ้านเลขที่ 83 หมู่ 18 ตำบลหนองปรือ อำเภอนบพิตำ จังหวัดกาญจนบุรี ร่วมกับศูนย์บริการศึกษานอกโรงเรียนอำเภอนบพิตำ จัดอบรมหลักสูตรการเพาะเห็ดขึ้น (อานนท์, 2518) ต่อมาก็มีผู้นำไปเพาะขยายตามที่ต่างๆแต่ยังคงเป็นที่รู้จักกันในวงแคบ เมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดเศรษฐกิจชนิดอื่นๆเช่น เห็ดฟาง เป็นต้น เนื่องจากปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเพาะเห็ดถั่วคือการสลายตัวของดอกเห็ด จึงมีระยะเวลาในการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยวค่อนข้างสั้น นอกจากจะทำการลวกให้สุกเสียก่อนก็พอที่จะสามารถเก็บได้นานขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเห็ดมีการเจริญเติบโตเร็ว ส่วนของครีบจะสลายกลายเป็นของเหลวสีดำคล้ายหมึกเป็นผลมาจากการย่อยตัวเอง (autolysis) (Cooke and Whipps, 1993) ของเหลวจากการสลายตัวนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เช่นทำน้ำหมักเพื่อทำต้นฉบับเอกสารพิเศษเพื่อป้องกันการปลอมแปลง (อานนท์, 2541) จากการศึกษาของ นิยมล (2543) พบว่าดอกเห็ดที่โตเต็มที่ จะสลายตัวภายใน 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเร็วกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส ที่สลายตัวใช้เวลา 18 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 °C) ซึ่งใช้เวลา 20 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าอิทธิพลของแสงก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสลายตัวของดอกเห็ดเช่นกัน กล่าวคือการเพาะเห็ดโคนน้อยในที่มืด เส้นใยจะเจริญได้ดีที่สุดแต่จะไม่สร้างดอกเห็ด หากมีการให้แสงตลอดเวลาพบว่าสามารถชะลอการสลายตัวของดอกเห็ดและแสงสีน้ำเงินมีประสิทธิภาพในการสร้างดอกเห็ด

และชะลอการสลายตัวของดอกเห็ดได้ดีที่สุด เห็ดในจีนัส *Coprinus* มีการเจริญเติบโตที่เร็วมาก สามารถเจริญเต็มจานอาหารเพาะเชื้อภายใน 5-10 วัน (Casselto, 1995) ลักษณะของสายพันธุ์ของเห็ดโคนน้อย ที่เกษตรกรนำมาเพาะตามแหล่งต่างๆ นั้นมีทั้งที่ได้มาจากการคัดเลือกดอกเห็ดจากสภาพธรรมชาติ เพื่อนำมาขยายพันธุ์เป็นหัวเชื้อและจากผู้ผลิตหัวเชื้อเห็ดโดยตรง โดยสายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมเพาะในแหล่งต่างๆ พบว่า ยังมีความหลากหลายของสายพันธุ์ที่พบว่ามีลักษณะของดอกเห็ดที่แตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ โดยแต่เดิมนั้นเป็นเห็ดที่ปล่อยให้ขึ้นตามากากต้นถั่วเหลืองหลังเก็บเกี่ยว ยังไม่มีการคัดสายพันธุ์ให้บริสุทธิ์ เนื่องจากเห็ดในตระกูลนี้มีลักษณะใกล้เคียงกันหลายชนิด บางครั้งอาจเจอเห็ดที่เรียกว่าเห็ดหิ่งห้อย หรือ เห็ดชี่ควาย (*Coprinus atramentaris* (Bull.) Fr.) ขึ้นในกองวัสดุเพาะ หากนำไปบริโภคก็อาจทำให้เกิดอาการเป็นพิษคลื่นไส้อาเจียน ลักษณะคล้ายอาการเมาค้าง ยิ่งถ้าหากรับประทานเห็ดชนิดนี้ร่วมกับเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ก็จะมีอาการปรากฏชัดเจน (สวลักษณ์, 2541 ; Benjamin, 1995)

อย่างไรก็ตามเห็ดถั่วที่นำมาเพาะเป็นการค้าในปัจจุบัน ได้ผ่านการคัดเลือกว่าเป็นเชื้อเห็ดที่มีความปลอดภัยและขยายต่อกันมา โดยตั้งชื่อเป็นที่ยอมรับกันในวงการเพาะเห็ดว่าเห็ดโคนน้อย แต่การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูจากลักษณะที่แสดงออกภายนอกในการแยกชนิดสายพันธุ์ของเห็ดโคนน้อยอาจไม่เพียงพอและเกิดความสับสนได้ เพราะกลุ่มของเห็ดถั่วมีลักษณะคล้ายกันและมีลักษณะเพียงไม่กี่อย่างที่สามารถสังเกตได้ และสาเหตุสำคัญที่ทำให้การระบุสายพันธุ์เกิดความผิดพลาดได้ง่าย คือลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกหรือลักษณะทางฟิโนไทป์ อาจได้รับอิทธิพลจากปัจจัยของสภาวะแวดล้อมที่ทำให้ลักษณะของดอกเห็ดแตกต่างกันได้ จึงทำให้เกิดความสับสน ไม่ชัดเจน บางทีสายพันธุ์ที่มีแหล่งมาจากที่เดียวกันแต่อาจมีชื่อเรียกต่างกัน หรือเมื่อนำสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมมาผสมกัน อาจได้สายพันธุ์ที่ไม่ค่อยแตกต่างจากเดิมมากนัก หรือหากนำสายพันธุ์จากคนละแหล่งมาผสมกันโดยเข้าใจว่าเป็นคนละสายพันธุ์ แต่แท้จริงเป็นสายพันธุ์เดียวกันก็ได้ ดังนั้นงานวิจัยลำดับแรกที่มีความสำคัญได้แก่ งานด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งไม่ว่าจะเป็นเห็ดโคนน้อย หรือเห็ดชนิดอื่นๆ ต่างก็มีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ขนาด ลักษณะรูปร่างของเห็ด และสีของเห็ด เป็นต้น ซึ่งบางครั้งพบว่ามีทั้งความเหมือนและความแตกต่างกันทางพันธุกรรม จึงทำให้เกิดความสับสนทางสายพันธุ์ขึ้นได้ การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นงานเกี่ยวกับการสำรวจและเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของเห็ดโคนน้อยในพื้นที่ของบางจังหวัดในเขตภาคเหนือตอนบนซึ่งมีการเพาะเห็ดโคนน้อยกันมาก เพื่อนำมาจัดกลุ่มและจำแนกสายพันธุ์ รวมทั้งการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับขยายเป็นการค้าให้กับผู้สนใจเพาะเห็ดชนิดนี้ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการใช้เทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุล

ได้แก่ การวิเคราะห์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งจะสามารถบ่งชี้และยืนยันผลความชัดเจนด้านความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เห็ดโคนน้อยจากแหล่งต่างๆ ได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ ด้วยเหตุนี้การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบและเก็บเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมของเห็ด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต ซึ่งการวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาและสำรวจเห็ดโคนน้อยจากตลาดชุมชนในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน เพื่อตรวจหาความหลากหลายทางด้านสายพันธุ์ของเห็ดชนิดนี้ซึ่งจะทำให้สามารถเพิ่มโอกาสในการเผยแพร่เชื้อพันธุ์ของเห็ดชนิดนี้ให้แก่ผู้ที่สนใจในการเพาะเห็ดได้ในวงกว้างมากขึ้น และทำให้ผู้บริโภคมีความมั่นใจในการบริโภคเห็ดชนิดนี้ที่ไม่มีการสร้างสารพิษ อันจะเป็นผลทำให้เห็ดโคนน้อยมีศักยภาพสูงในการยกระดับให้เป็นเห็ดที่มีความสำคัญในระดับเศรษฐกิจได้อีกชนิดหนึ่ง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เห็ดถั่ว หรือ เห็ดโคนน้อย หรือ เห็ดโคนเพาะ เป็นคนละชนิดกับเห็ดโคนปลวก (*Termitomyces* spp.) ซึ่งยังไม่สามารถเพาะได้โดยเกิดขึ้นเองในสภาพธรรมชาติ ในต่างประเทศ เห็ดในกลุ่มเห็ดถั่วนี้ก็มีการเพาะเลี้ยงเช่นกัน มีชื่อสกุลว่า *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigelow จัดเป็นราชั้นสูงที่อยู่ในตระกูลเห็ด (Basidiomycetes) เนื่องจากมีการกระจายพันธุ์ทั่วทุกภาคของประเทศไทย จึงมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละจังหวัด เช่น เห็ดถั่วทอง จะเป็นชื่อที่เรียกกันในจังหวัดกาญจนบุรี เห็ดโคนน้อยจะเป็นชื่อเรียกกันในจังหวัดน่าน แพร่ เชียงราย และประเทศลาว เห็ดโคนน่านหรือเห็ดโคนขาว เป็นชื่อที่เรียกกันในจังหวัดลำปาง แม่ฮ่องสอน เห็ดครามเป็นชื่อที่เรียกกันในจังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม เป็นต้น หรือมีชื่อเรียกตามวัสดุเพาะเช่น เห็ดถั่ว เห็ดถั่วเหลืองหรือ เห็ดถั่วเน่า นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอื่นๆเช่น เห็ดโคนบ้าน เห็ดโคนขาว(ภาคเหนือ) เห็ดคราม เห็ดปลวกน้อย (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) เห็ดโคนเพาะ เห็ดหมึก (ภาคกลาง) (บรรณ,2547) ซึ่งเห็ดโคนน้อยที่พบในประเทศไทย มีผู้จำแนกชนิดว่าเป็น *Coprinus comatus* (หรือ *Coprinus comatus* var. *ovatus* (Schaeff.exFr.)) (นิฤมล, 2543) ซึ่งมีลักษณะดอกเห็ดค่อนข้างใหญ่ และ *Coprinus cinereus* (หรือ *Coprinus fimetarius* var. *cinereus* (Schaeff.exFr.) S.F.Gray) (วรพล, 2545) ที่มีขนาดของดอกเห็ดเล็กกว่า ซึ่งเห็ดโคนน้อย หรือ เห็ดถั่ว นี้มีการเพาะและนำมาบริโภคในครัวเรือนมานานแล้ว และมีความหลากหลายในสายพันธุ์ค่อนข้างสูงเนื่องจากในกลุ่มจีนัส *Coprinus* พบมากกว่า 130 species

ปัญหาของผู้ผลิตหัวเชื้อเห็ดถั่วในปัจจุบันคือ ยังไม่สามารถระบุหรือชี้ชัดลงไปได้ว่าแต่ละสายพันธุ์นั้นเป็นชนิดอะไร เนื่องจากเห็ดชนิดนี้มีความแตกต่างของสปีชีส์ (species) ภายในจีนัส (genus) *Coprinus* หลากหลายชนิด เพียงแต่สามารถบอกความแตกต่างในเรื่องของลักษณะดอกเห็ด ขนาดและสี นอกจากนี้ยังไม่ทราบประวัติทางพันธุกรรมหรือที่มาของสายพันธุ์ที่ใช้เพาะ เนื่องจากผ่านการคัดเลือกกันเองตามลักษณะดอกเห็ดที่มีลักษณะดี แต่เนื่องจากเห็ดถั่วนี้มีความหลากหลายในกลุ่ม รวมทั้งมีชนิดที่สร้างสารพิษ coprine ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค สารพิษในกลุ่มนี้มีผลต่อระบบประสาท หากรับประทานดอกเห็ดที่มีสารนี้ร่วมกับเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ โดยสารพิษกลุ่มนี้ พบในกลุ่มใกล้เคียงกับเห็ดถั่ว ตัวอย่างเช่น *Coprinus atramentaris* (Bull.) Fr. ชื่อพื้นเมือง คือ เห็ดหิ่งห้อย หรือเห็ดขี้ควาย ซึ่งมีสารพิษปริมาณสูงกว่าเห็ดถั่วชนิดอื่นๆ มักมีการเข้าใจผิดเก็บมาบริโภคดั่งนั้นเพื่อความปลอดภัยห้ามดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์หลังรับประทานเห็ดถั่ว เพราะสารพิษทำให้มีเมามาจนหมดสติได้ แต่จะหายเป็นปกติภายในเวลา 3-4 ชั่วโมง เพราะสาร coprine รวมตัวกับแอลกอฮอล์แล้วเกิดพิษ ผู้ที่ดื่มสุราพร้อมกับรับประทานเห็ดชนิดนี้ จะมีอาการใจสั่น หายใจหอบ หายใจลำบาก แขนหน้าอก คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ จากการ ศึกษาวิจัยพบว่าเห็ดโคนน้อยสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง sarcoma 180 และ เซลล์มะเร็ง Ehrlich carcinoma ได้สูง 90 และ 100% ตามลำดับ และยังพบว่ามีส่วนประกอบของ สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Ying,1987) แต่เดิมนั้นยังไม่มีการเพาะอย่างแพร่หลาย ในภาคเหนือ ชาวบ้านจะเก็บได้จากเห็ดที่ขึ้นเองตามธรรมชาติเช่นตามกองเศษซากของต้นถั่ว ที่หมักเอาไว้ เรียกกันว่าเห็ดถั่วหรือเห็ดถั่วเนา แต่เนื่องจากลักษณะของเห็ดกลุ่มนี้มีอยู่หลายชนิดดังที่กล่าวมาแล้ว บางครั้งอาจไปเก็บเห็ดที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน ที่ชาวบ้านเรียกว่าเห็ดขี้ควาย ซึ่งมีสารพิษ Coprine ซึ่งสารชนิดนี้มีอยู่ในเห็ดจีนัส *Coprinus* หลายสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกับเห็ดที่เก็บรับประทานกันเช่นพบใน *C. atramentarius*, *C. disseminatus*, *C. fuscescens*, *C. insignis*, *C. micaceus*, *C. quadrifidus*, *C. variegatus*, *C. silvaticus* (เกษม,2537 และ Benjamin,1995) หากรับประทานเข้าไปจะทำให้เกิดอาการที่เรียกว่า *Coprinus syndrome* (Bresinsky and Besel,1990) เนื่องมาจากสารพิษ coprine ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทอัตโนมัติ สารพิษนี้มีฤทธิ์เสริมกับเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (Allen and Piessel,1993 ; Meyer, et al., 1971) ไม่ว่าจะบริโภคก่อนหรือหลังรับประทานเห็ด จะมีอาการเมาค้าง หายใจหอบ หน้าแดงเนื่องจากหลอดเลือดขยาย ใจสั่น ชีพจรเต้นเร็ว เจ็บหน้าอก ปวดศีรษะ มึนงง สับสนหรือประสาทหลอนและความดันโลหิตต่ำ อาการจะปรากฏอยู่ไม่นานและดีขึ้นภายใน 5 วัน การรักษาเนื่องจากพิษ โดยปกติจะหายได้เอง แต่ถ้าอาการคงอยู่นาน ต้องทำ

ให้อาเจียนล้างกระเพาะลำไส้ ถ้าความดันต่ำมากต้องไปพบแพทย์เพื่อรับการรักษาทันที (Coldwell, et al., 1969)

เห็ดถั่วหรือเห็ดโคนน้อย จัดเป็นเห็ดที่เพาะง่ายและให้ผลผลิตที่สูง มีวิธีการเพาะเลี้ยงคล้ายกับวิธีการเพาะเห็ดฟางโดยใช้ ฟางข้าว เป็นวัสดุเพาะ นอกจากนี้ ยังสามารถใช้วัสดุเพาะอื่น ๆ เพาะได้อีกมากไม่ว่าจะเป็นต้นและใบกล้วยต่าง ๆ ต้นข้าวโพด ทะลายปาล์ม น้ำมัน ผักตบชวา ต้นและใบกล้วย ซึ่งสามารถที่จะนำมาเป็นวัสดุเพาะได้ทั้งสิ้น ล้วนแล้วแต่เป็นวัสดุเพาะที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเพาะเห็ดถั่วคือการสลายตัวของดอกเห็ด เนื่องจากเป็นเห็ดที่มีวงจรชีวิตสั้นมาก ไม่เกิน 36 ชั่วโมง แต่ส่วนใหญ่ที่พบคือประมาณ 24 ชั่วโมงเท่านั้น โดยตอนเช้าจะมีขนาดเล็กและจะโตขึ้นในช่วงบ่าย ซึ่งจะต้องรีบเก็บหากปล่อยทิ้งไว้ ดอกเห็ดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและสูงชะลูดขึ้น หมวกดอกจะบางและเปลี่ยนเป็นสีดำและสลายตัว เป็นที่มาของชื่อเห็ดหมึกซึ่งไม่สามารถนำมาบริโภค จึงมีระยะเวลาในการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยวค่อนข้างสั้น นอกจากจะทำการลวกให้สุกเสียก่อน ก็พอที่จะสามารถเก็บได้นานขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเห็ดโคนน้อยมีการเจริญเติบโตเร็ว ส่วนของครีบกจะสลายกลายเป็นของเหลวสีดำคล้ายหมึกเป็นผลมาจากการย่อยตัวเอง (autolysis) อย่างไรก็ตามในต่างประเทศ ได้มีการนำของเหลวจากการสลายตัวนี้มาใช้ประโยชน์ได้ เช่น ผลิตเป็นน้ำหมึกเพื่อทำต้นฉบับเอกสารพิเศษเพื่อป้องกันการปลอมแปลง ในส่วนของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดนั้น การเก็บและวิเคราะห์ข้อมูลเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะต่างๆภายนอกยังไม่เพียงพอ ปัจจุบันได้มีการนำงานวิจัยทางด้านเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เพื่อยืนยันความถูกต้อง เทคนิคที่นำมาใช้จึงมีทั้งด้านเอนไซม์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเฉพาะงานจำแนกชนิดเห็ดในปัจจุบันได้นำเทคนิคด้านดีเอ็นเอ เข้ามาช่วยมากขึ้นทำให้สามารถระบุชนิดได้ถูกต้องชัดเจนมากยิ่งขึ้นกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างเช่น รายงานของ Muruke et al. (2002) ที่ใช้เทคนิคด้านดีเอ็นเอ ในการจำแนกชนิดเห็ดในจีนัส *Oudemansiella* *Coprinus* และ *Pleurotus* โดยวิธีการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะมีความแม่นยำสูงได้แก่ เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD ; Random Amplified Polymorphic DNA) เอเอฟแอลพี (AFLP ; Amplified Fragment Length Polymorphism) เอสเอสอาร์ (SSR ; Simple Sequence Repeats) เทคนิคเหล่านี้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายมานานแล้ว และปัจจุบันเทคนิคใหม่ที่กำลังได้รับความนิยมใช้ในการศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมคือ เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR; Inter-Simple Sequence Repeats) ซึ่งแต่ละเทคนิคก็มีรายงานการวิจัยต่าง ๆ มากมาย เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) ในประเทศไทยจำนวน 120 ไอโซเลตโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค

ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis และ RAPD (random amplified polymorphic DNA)พบว่า มีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยในส่วนของสายพิมพ์ดีเอ็นเอถึงแม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะมีความแตกต่างกัน (Heebkaew *et al.*, 2004) และยังมีการใช้เทคนิค RAPD ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเห็ดในสกุลเห็ดฟาง (*Volvariella* spp.) 30 สายพันธุ์ โดย 28 สายพันธุ์มาจากแหล่งต่างๆในประเทศไทยและอีก 2 สายพันธุ์คือ *V. volvacea* , *V-14* จากฮ่องกงและ *V. bombycina* (ATCC 62448) จากอเมริกาพบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์กันของเห็ดฟาง (*Volvariella* spp.) ได้ถึง 4 กลุ่ม (Payapanon and Hiranpradit, 2004) ขณะที่การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในสกุล *Pleurotus* จำนวน 8 ชนิด รวม 12 สายพันธุ์พบว่า เห็ดทุกชนิดมีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อยด้านรูปร่างและสีดอก ขนาดเส้นใยและสปอร์ เมื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR/RFLP ในบริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอในช่วง ITS และ IGS โดยใช้ไพรเมอร์ คือ ITS1 กับ ITS4 และ O-1 กับ LR12R ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI*, *HinfI*, *HaeIII* , *EcoRI*, *DdeI*และ *HindIII* เมื่อวิเคราะห์ผลพบว่า สามารถแบ่งเห็ดออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเห็ดนางรมทองและเห็ดนางรมขาว กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดนางรม เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางรมหลวง นางฟ้า 3 สายพันธุ์ และเห็ดนางฟ้าภูฐาน 3 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับด้านสัณฐานวิทยา (จิราพร, 2546) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดในกลุ่ม *Russula*และ *Boletus* โดยใช้การวิเคราะห์ยีนในบริเวณที่เรียกว่า Internal Transcribed Spacer (ITS) ด้วยไพรเมอร์ ITS-4 ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด พบว่า เห็ดในกลุ่มจันัส *Russula* มีความแตกต่างกัน 23 แบบจาก 24 ตัวอย่าง ในขณะที่ กลุ่มจันัส *Boletus* มีความแตกต่างกัน 16 แบบจาก 17 ตัวอย่าง โดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสีของดอกเห็ดกับลักษณะของ ITS-RFLP สำหรับงานวิจัยเห็ดชนิดต่างๆที่เกี่ยวกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์ ยังไม่มีรายงานการวิจัย เพราะเป็นเทคนิคใหม่ยังใช้กันไม่แพร่หลาย อย่างไรก็ตามจากรายงานการวิจัยต่างๆเหล่านี้การที่จะเลือกใช้เทคนิคใดก็ตามล้วนขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงานวิจัย งบประมาณและความพร้อมของหน่วยงานที่จะทำการวิจัย

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

วิธีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นใช้ครั้งแรกโดย Jeffregs *et al.* ในปี ค.ศ. 1985 เพื่อใช้บ่งบอกลักษณะจำเพาะของแต่ละบุคคลด้วยดีเอ็นเอและพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละบุคคลไม่มีโอกาสที่บุคคลใดหรือสิ่งมีชีวิตคู่ใดจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) หรือพืชที่เกิด

จากการสืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ ในปัจจุบันนี้ได้มีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืชและสัตว์หลายชนิด และเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากดีเอ็นเอที่ปรากฏในลายพิมพ์นั้นมีการถ่ายทอดตามกฎของเมนเดล (สุรินทร์, 2539; ยงยศ, 2545)

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อได้เปรียบกว่าการตรวจสอบในระดับอื่นๆ เช่น การตรวจสอบโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพหรือฟีโนไทป์ของพันธุ์นั้นอาจมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องทำให้การจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวทำได้ยาก และอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ ส่วนการตรวจสอบสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีอื่นๆได้แก่ การใช้อิเล็กโทรโฟรีซิส ของไอโซไซม์ (Bassiri, 1976; Stegemann, 1984;) อิเล็กโทรโฟเรซิส ของโปรตีนที่สะสมในเมล็ดพืช (Ladizingky and Hymowitz, 1979) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของโปรตีนในเมล็ด (Burnouf and Bietz, 1987) เทคนิคเหล่านี้จะมีข้อจำกัดตรงที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันทางจีโนไทป์ (genotype) ได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอแล้วจะสามารถวิเคราะห์จากส่วนใดของพืชก็ได้ โดยจะไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโตและสภาพแวดล้อม และสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน โดยการตรวจสอบดีเอ็นเอนี้อาศัยหลักการที่ว่าโมเลกุลดีเอ็นเอสามารถจำลองตัวเองได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงสภาพที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งเนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เองทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแต่ละตัวภายในสายดีเอ็นเอ หรือเปลี่ยนแปลงชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ หรือเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีบางส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมา (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือจากต่างโครโมโซม (transposition) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สุรินทร์, 2539)

ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคต่างๆในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ ได้แก่ restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) การใช้ RFLP marker ประสบผลสำเร็จสำหรับตรวจพิสูจน์พันธุ์ของพืชหลายชนิด (Bowers *et al.* 1993; Hubbard *et al.*, 1992) แต่ยังเป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายสูง เครื่องมือและอุปกรณ์ในการปฏิบัติงานต้องมีเพียงพอ (พรพันธุ์, 2538) สำหรับ RAPD markers มีรายงานครั้งแรกว่าเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดย Williams *et al.* (1990) และ Welsh and McClelland (1990) เทคนิคนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่น

ได้อีก คือ AC-PCR หรือ arbitrary primed polymerase chain reaction (Welsh and McClelland, 1990) DAF หรือ DNA amplification fingerprinting (Caetano-Anolles *et al.*, 1991) และ MAAP หรือ multiple arbitrary amplicon profiling แต่ละเทคนิคที่เรียกนี้มีข้อแตกต่างกันบ้างในด้านขนาดของ Primer ที่ใช้แต่โดยหลักการไม่แตกต่างกันคือใช้ primer ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวใน polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม (สุรินทร์, 2540) และเมื่อนำเทคนิค RFLP มาเปรียบเทียบกับเทคนิค RAPD พบว่าเครื่องมือที่จำเป็นต้องใช้ในเทคนิค RAPD มีราคาไม่แพงไม่มีการใช้ radioisotopes ปริมาณของดีเอ็นเอที่นำมาใช้น้อยกว่า (Weeden, 1991) และมีความเหมาะสมในการศึกษาตัวอย่างที่มีจำนวนมาก (Thormann and Osborn, 1992) ด้วยเหตุนี้การวิเคราะห์ RAPD จึงนำมาใช้ในการพิสูจน์พันธุ์พืชและจุลินทรีย์กันอย่างกว้างขวาง (ยงยศ, 2545)

RAPD (Rapid Amplified Polymorphic DNA) วิธีนี้ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลทางพันธุกรรมมาก่อน ไพรมเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันนั้นจะเป็นชนิดที่มีขนาดสั้นประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม (random amplification)8 จากนั้นจึงแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ผ่านอะกาโรสเจล (agarose gel) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะปรากฏเป็นแถบ ศึกษาตำแหน่งและจำนวนแถบเพื่อดูความแตกต่างในพืชแต่ละชนิดได้ ข้อควรระวังของ RAPD คือ แถบดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR product bands) ที่เกิดขึ้นดูเหมือนมีขนาดเท่ากันแต่ความจริงแล้ว ถึงแม้ขนาดเท่ากันจริงแต่เป็นชิ้นดีเอ็นเอคนละชนิดกันเลย ทำให้แปลผลคลาดเคลื่อนได้ วิธีแก้ปัญหาคือเพิ่มจำนวนไพรมเมอร์ให้มากขึ้นเพื่อยืนยันผลการทดลอง หรือบางครั้ง PCR products ที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อยมากจนแถบดีเอ็นเอไม่ปรากฏให้เห็นหรือเห็นได้ลางๆ ทำให้ผู้ทดลองคิดว่าไม่มี PCR products เกิดขึ้น แก้ปัญหาโดยการปรับเปลี่ยนสภาพหรือความเข้มข้นของสารต่างๆ ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันวิธีอาร์เอฟดี (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์แบบหนึ่ง โดยที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรมเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง (arbitrary primer) และมีขนาดสั้นๆ 10 – 20 นิวคลีโอไทด์ จึงเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสและตรวจสอบโดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ในทางปฏิบัติต้องทดลองใช้ไพรมเมอร์หลายๆ ชนิด เพื่อดูว่าไพรมเมอร์ใดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการที่ไพรมเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน (5' --> 3') จะสามารถเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันในทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายแต่ทิศทางแยกจากกัน จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้

- พรพันธุ์ (2538) ได้รายงานประโยชน์ของการใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพันธุ์พืชไว้ ดังนี้
1. สะดวก รวดเร็ว โดยสามารถสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืช การตรวจสอบสามารถทราบผลได้ทันที ในขณะที่การใช้วิธีการปลูกทดสอบในแปลงปลูกอาจจะต้องรอจนกว่าพืชนั้นๆ เจริญเติบโตเต็มที่เสียก่อน
 2. สภาพแวดล้อม ไม่มีอิทธิพลต่อดีเอ็นเอของพืช ในขณะที่การใช้เอนไซม์ หรือโปรตีน ตรวจสอบ สภาพแวดล้อมจะมีอิทธิพลอย่างมาก
 3. วิธีการตรวจสอบไม่ยุ่งยากซับซ้อน การวิเคราะห์ผลอาจพิจารณาจากการปรากฏ หรือ ไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และสามารถทำการตรวจสอบได้อย่างไม่จำกัด เพียงแค่เปลี่ยนไพรเมอร์โดยที่ส่วนประกอบหรือสภาพแวดล้อมอื่นๆ ของการทดลองจะไม่มีเปลี่ยนแปลงเลย
 4. ใช้ตัวอย่างพืชที่จะนำมาตรวจสอบปริมาณน้อยมากโดยเฉพาะพืชผสมตัวเอง ถ้าพืชนั้นมีความสม่ำเสมออยู่แล้ว ใช้ใบอ่อนเพียง 2-3 ใบ ก็เพียงพอที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอ ส่วนพืชผสมข้ามการสุ่มตัวอย่างและความสม่ำเสมอของประชากร เป็นปัจจัยสำคัญในการตรวจสอบ ควรสุ่มตัวอย่างให้มากพอที่จะเป็นตัวแทนของประชากรทั้งหมด

เทคนิค RAPD ได้ถูกนำมาใช้จัดจำแนกพันธุ์พืชชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวางทั้งไม้ล้มลุก และไม้ยืนต้น (ยงยศ, 2545) ดังตัวอย่างงานวิจัยเหล่านี้

Kresovich *et al.* (1992) ได้ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมและหาความสัมพันธ์ในพืชตระกูลกะหล่ำ (*Brassica oleracea* L.) โดยใช้ไพรเมอร์ ขนาด 10 เมอร์ จำนวน 25 ชนิด ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอได้ 143 แถบ และพบว่าดัชนีที่ใช้บ่งบอกความเหมือนกันอยู่ในช่วง 0.65-0.94 และในปี 1994 Maier *et al.* ได้จำแนก rapeseed (*Brassica napus* L.) จำนวน 23 พันธุ์ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 100 ชนิด ซึ่งมีขนาด 10 เบส ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอจำนวน 70 แถบและแสดง polymorphism 22 ไพรเมอร์ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA cluster analysis พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือนภายในชนิดอยู่ในช่วง 0.47-0.97

Wilkie *et al.* (1992) ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกหัวหอม (*Allium cepa*) และ *Allium* ชนิดอื่นๆ โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 20 ชนิด ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 91 แถบ พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 7 ชนิด ที่ทำให้เกิด polymorphism ระหว่างพันธุ์ โดยมีดัชนีเหมือนภายในชนิดอยู่ในช่วง 0.41-0.77 และในปี 1999 Al-Zahim *et al.* ได้นำการวิเคราะห์ RAPD มาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพันธุ์ของกระเทียม (*Allium sativum* L.) ที่มีการเรียกชื่อของพันธุ์แตกต่างกันและตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ปลูกหลายๆชนิด กับ

พันธุ์ *A. longincuspis* ซึ่งเป็นพันธุ์ป่า (wild progenitor) โดยนำกระเทียม 27 พันธุ์ มาวิเคราะห์ โดยใช้ไพรเมอร์ 26 ชนิด พบว่าให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 292 แถบ ซึ่งแสดง polymorphic 63 แถบคิดเป็น 21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการวิเคราะห์ cluster สามารถแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนทางสัณฐานได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีรูปแบบเป็น blotting กับกลุ่มที่เป็น non-blotting และพบว่า *A. Longincuspis* อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *A. Sativum* var. *Ophios corodon* แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันในทางอนุกรมวิธานที่ใกล้ชิดกันมาก

Sharma *et al.* (1995) ใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างลินิน (Lens) พันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่า โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 24 ชนิด สามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิด polymorphism จำนวน 88 แถบ มีดัชนีความเหมือนระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 0.54–0.90

Ku และ Henry (1996) ได้จำแนกดอกไม้ป่าของออสเตรเลียคือ *Ozothamnusdis omifolium* (Vent.) ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 19 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 16 ชนิดที่ทำให้เกิด polymorphism ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 166 แถบ

สำหรับงานวิจัยที่นำเทคนิค RAPD มาใช้ตรวจสอบพันธุ์ไม้ยืนต้นมีอยู่หลายงานวิจัยเช่น

Shah *et al.* (1994) ได้ตรวจหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 20 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 9 ชนิด สามารถแสดง polymorphism ในช่วง 0.2–2.3 kb และมีค่าดัชนีความเหมือนภายในชนิดอยู่ในช่วง 0.16–0.44

ในปี 1996 Lu และคณะ ได้ตรวจพิสูจน์ต้นตอห่อ 18 พันธุ์ด้วย RAPD markers โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดของนิวคลีโอไทด์ 10 เมอร์ (mer) ผลปรากฏว่าจากไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 80 ชนิด มี 20 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 40 แถบและมี 6 ชนิด ที่สามารถใช้ตรวจพิสูจน์ต้นตอห่อทั้ง 18 พันธุ์ได้ และเมื่อทำการวิเคราะห์ cluster จากแถบดีเอ็นเอดังกล่าว สามารถสร้าง Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทางพันธุกรรม ได้สอดคล้องกับพันธุ์ประวัติ ซึ่งแยกต้นตอของห่อออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะของความต้านทาน และอ่อนแอ ต่อไส้เดือนฝอยรากปม

ในปี 1997 Lo'pez-Valenzuela และคณะ ทำการตรวจพิสูจน์มะม่วง (*Mangifera indica* L.) 15 พันธุ์ จากต้นอ่อน (embryo type) โดยใช้ RAPD markers ที่ได้จากการใช้ arbitrary primer ที่มีขนาด 10 mer พบว่าไพรเมอร์ ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 40 ชนิด มี 13 ชนิด ที่สามารถ amplified กับส่วนของดีเอ็นเอ ได้ 19 แถบและนำมาเป็นเครื่องหมายแสดงความจำเพาะต่อมะม่วงบางพันธุ์ และเมื่อทำการวิเคราะห์ cluster จาก RAPD markers เพื่อสร้าง Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วง 15 พันธุ์ พบว่า 'Manila' และ

‘Carabao’ มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับประวัติพันธุ์ และสามารถแยกจีโนไทป์ของมะม่วงออกเป็น 4 กลุ่ม ตามภูมิศาสตร์ที่เป็นแหล่งกำเนิด

Kolleret *et al.* (1993) ทำการจัดจำแนกพันธุ์แอปเปิล (*Pyrus malus*) จำนวน 11 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าทั้ง 11 พันธุ์มีความแตกต่างกัน และพบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะมีผลต่อความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เทคนิคนี้ยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของพืช (*Prunus persica* (L.) Batsch) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้พันธุ์ปลูกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 60 ไพรเมอร์ ปรากฏว่ามีไพรเมอร์ 35 ชนิดทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอได้ แต่มีไพรเมอร์เพียง 10 ชนิดเท่านั้นที่ให้ความแตกต่างระหว่างพืชที่มาจาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากการศึกษาเพื่อการตรวจพิสูจน์และแสดงความแตกต่างระหว่างพืชทั้งในระดับชนิดพันธุ์หรือสายต้น และปัจจุบันยังมีการนำเทคนิค RAPD โดยทั่วไป เทคนิคอาร์เอพีดีใช้อุณหภูมิขั้นตอนการจับของไพรเมอร์ (annealing) 35–42 องศาเซลเซียส มีการประยุกต์เทคนิคดังกล่าว โดย ได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์เป็น 46–62 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนมากขึ้นและมีประสิทธิภาพในการทำซ้ำสูงขึ้น เรียกเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT– RAPD, high annealing temperature–randomly amplified polymorphic DNA) (Anantalabhochai *et al.*, 2000) ซึ่งวิธี HAT–RAPD ดังกล่าวถูกนำมาใช้บ่งบอกความแตกต่างในพืชชนิด เช่น สหรัยเตา (พีระวุฒิ และคณะ, 2556) กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (นฤมล และคณะ, 2557) มะพร้าว (นภาพร และอนุชिरา, 2555) และกล้วยไม้สกุลเข็มปีเดียม (Sharma *et al.*, 2013) นอกจากนี้ปัจจุบันยังมีการใช้เทคนิค RAPD ในการจัดจำแนกกลุ่มเห็ดราเช่น *Agaricus* (Khush *et al.* 1992; Calvo–Badoetal. 2000), *Coprinus* (Ito *et al.* 1998), *Lentinula* (Chiu *et al.* 1996) และ *Volvariella* (Chiu *et al.* 1995)

การจัดจำแนกเห็ดหลายชนิดส่วนใหญ่ยังยึดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะรูปร่าง และสีของสปอร์ เหล่านี้เป็นต้น ซึ่งการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์อาจไม่มีความละเอียดเพียงพอเพราะลักษณะรูปร่าง สี ขนาดของดอกหรือลักษณะอื่นๆอาจได้รับอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมที่เห็ดเจริญอยู่ ซึ่งอาจส่งผลต่อลักษณะที่ปรากฏได้ดังนั้นเพื่อให้การจำแนกชนิดของเห็ดมีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลที่กล่าวมาข้างต้น มาปรับใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกชนิดหรือระบุสายพันธุ์ให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น.

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเก็บและรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนน้อยหรือเห็ดถั่วจากพื้นที่ภาคเหนือตอนบน
2. เพื่อจัดกลุ่มและจำแนกสายพันธุ์เห็ดโคนน้อยโดยวิเคราะห์จากการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ขอบเขตของการวิจัย

เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดโคนน้อยโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

สถานที่ทำการวิจัย ทดลองหรือเก็บข้อมูล ระยะเวลาทำการวิจัย

ศูนย์วิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โครงการจัดตั้งศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยพะเยา ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยพะเยา ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา

ระยะเวลาทำการวิจัย

ระยะที่ทำการวิจัย : 1 ปี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดโคนน้อยหรือเห็ดถั่วที่สามารถบอกความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนน้อยที่สำรวจพบในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน
2. เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการรวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมและเก็บเป็นตัวอย่างเพื่อตรวจสอบโดยเป็นข้อมูลพื้นฐานการหาและจำแนกชนิดของเห็ดต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างดอกเห็ดจากแหล่งต่างๆ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในห้องปฏิบัติการ

1.1 บันทึกลักษณะทั่วไป ได้แก่ ขนาดและรูปร่างของดอกเห็ด และส่วนประกอบต่างๆ ของดอกเห็ด ด้วยตาเปล่า แว่นขยายและกล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound microscope และ Stereomicroscope

1.2 รวบรวมลักษณะต่างๆ และข้อมูลจากการตรวจสอบขั้นต้นมาเทียบกับรูปวิธานที่เสนอไว้ในหนังสือของ Ainsworth *et al.* (1973) Moser (1978) และ Arora (1986)

1.3 การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดอกเห็ดโคนน้อย

เลือกดอกเห็ดในระยะตูมมีความสมบูรณ์ ไม่มีร่องรอยของโรคหรือแมลงทำลาย และดอกเห็ดไม่เปียกน้ำ นำมาทำความสะอาดโดยฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70% ใช้มีดผ่าตัดปราศจากเชื้อ กรีดดอกเห็ดเป็นสองส่วน ใช้เข็มเย็บปราศจากเชื้อตัดเนื้อเยื่อภายในดอกเห็ดโดยจิกให้ติดปลายเข็มเย็บเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 – 2 มิลลิเมตร วางลงบนจานอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 5 วัน จนเส้นใยเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อ ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยตัดเส้นใยมาเปลี่ยนถ่ายบนจานอาหาร PDA ใหม่ 2- 3 ครั้ง และเก็บเส้นใยที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ (DNA preparation) วิธีการสกัดดีเอ็นเอเห็ดโดยดัดแปลงวิธีการของ Doyle & Doyle (1990)

2.1 นำเส้นใยของตัวอย่างเห็ดมาเลี้ยงด้วยอาหาร PDA อายุประมาณ 7 วัน มาชุดโดย loop โดยสุ่มเป็นตัวแทนของตัวอย่างเห็ดที่สำรวจพบในภาคเหนือ นำตัวอย่างเส้นใยเห็ดประมาณ 0.1 กรัม นำมาบดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ใน Eppendorf Tube ขนาด 1.5 มล. ที่มี Extraction buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 700 มล. ผสมกันโดยใช้ Vortex Mix

2.2 นำไป Incubate ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 1 ชั่วโมง พลิกทุกๆ 10 นาที

2.3 เติมน้ำ Phenol saturated ปริมาตร 700 มล. ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนใสด้านบน (Supernatant) ใส่ Eppendorf Tube ใหม่

2.4 เติมน้ำ Chloroform : Isoamyl Alcohol (24:1) ปริมาตร 700 มล. ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนใสด้านบน (Supernatant) ใส่ Eppendorf Tube ใหม่

- 2.5 เติม Isopropanol 0.7 เท่า ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปแช่ตู้เย็น -20°C ทิ้งไว้ 1 คืน
- 2.6 นำไปปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°C จากนั้นเท Supernatant ที่ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้ง จากนั้นผึ่งตะกอน (Air dry) ดีเอ็นเอไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- 2.7 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Deionized Water หรือ TE Buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆจนตะกอนละลายหมด
- 2.8 ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis หรือวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

3. วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 72 ไพรเมอร์

นำดีเอ็นเอที่ได้มาศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพื่อจัดกลุ่มและจำแนกด้วยโปรแกรมโดยเริ่มจากออกแบบไพรเมอร์ความยาว 10 bases จากบริษัท Operon Technologies, USA จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบมาทดสอบความสามารถในการแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์โดยการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ (DNA preparation) วิธีการสกัดดีเอ็นเอพืชโดยดัดแปลงวิธีการของ Doyle and Doyle (1990) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งซ้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 10–20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งองค์ประกอบของปฏิกิริยาที่ใช้จะประกอบด้วย Taq master mix 5 ไมโครลิตร, ddH₂O 2.5 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (primer) (10 พิกกะโมล/ไมโครลิตร) 0.25–0.50 ไมโครลิตร, DNA template (10–20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตรเติมน้ำเพื่อสำหรับปริมาตรให้องค์ประกอบของปฏิกิริยาทั้งหมด 20–25 ไมโครลิตร โดยมีเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ดังต่อไปนี้

Step	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time
Warm up	94	5 min
3 step cycling (30 cycles)		
Denaturation	94	30 sec
Annealing	48–60	30 sec
Extension	72	45 sec
Final extension	72	10 min

ซึ่งอุณหภูมิในการ Annealing จะขึ้นกับลำดับเบสของ primer หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากขบวนการ PCR ไปตรวจสอบด้วย Agarose electrophoresis

4. ทำการตรวจความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis

- 4.1 เตรียม Agarose ความเข้มข้น 0.8% หรือ 1% โดยชั่ง Agarose ผสมลงใน 1X TBE buffer จากนั้นนำไปต้มให้ละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนเจลอุ่นประมาณ 60°
- 4.2 ทำความสะอาดถาดเจลและหวีเสียบ (comb) ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำถาดเจลประกอบเข้ากับบล็อก
- 4.3 วางหวีเสียบลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ สำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่สนใจ
- 4.4 เท Agarose ลงบนถาดที่เตรียมไว้โดยให้มีความหนาประมาณ 3–5 มม. ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
- 4.5 นำถาด agarose gel ออกจากบล็อก จากนั้นวางถาดลงในอ่าง electrophoresis โดยให้ด้านที่มีหวีเสียบอยู่ทางซ้ายลบ แล้วเท 1X TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น Agarose gel โดยให้ระดับ 1X TBE buffer อยู่เหนือผิวเจลประมาณ 1–3 มม. ดึงหวีเสียบ (comb) ออก
- 4.6 ผสม 6X loading dry เข้ากับตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแล้วค่อยๆ หยดลงในช่องที่เกิดจากหวีเสียบ
- 4.7 ปิดฝาอ่าง electrophoresis แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากซ้ายลบไปยังขวบวก ใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 60 – 100 นาที หรือเมื่อแถบสีด้านล่างของ 6X loading dry เคลื่อนที่ไปอยู่อีกปลายด้านหนึ่งของเจล โดยห่างจากด้านล่างของถาดประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- 4.8 ทำการย้อมดีเอ็นเอโดยนำแผ่น Agarose gel ไปแช่ใน Ethidium bromide นาน 10 นาที จากนั้นย้ายไปแช่น้ำสะอาดอีก 5 นาที เพื่อล้าง Ethidium bromide ส่วนเกินออก
- 4.9 นำแผ่น Agarose gel ไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่อง UV transilluminator พร้อมบันทึกภาพ(รายละเอียดในภาคผนวก)

5. การทดสอบการพัฒนเป็นดอกเห็ดของเชื้อเห็ดโคนน้อยในโรงเรือนเพาะเห็ด

นำเชื้อเห็ดที่คัดเลือกไว้สายพันธุ์ต่างๆที่ได้มาจากการเก็บตัวอย่างจากตลาดชุมชนในเขตภาคเหนือตอนบน มาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ (ตามวิธีการในข้อ 1) เพื่อนำมาขยายลงบนเมล็ด

ข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปเตรียมเป็นก้อนเชื้อ (spawn) เพื่อนำมาทดลองเพาะเลี้ยงในโรงเรือนฟาร์มเพาะเห็ดโคนน้อยตามขั้นตอนที่แสดงไว้ในภาพที่ 1 เพื่อบันทึกผล การพัฒนาของดอกเห็ดที่เกิดขึ้น (การเพาะเห็ดโคนน้อยในโรงเรือนแสดงไว้ในภาคผนวก)



ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดอกเห็ด ลงในอาหารเพาะเชื้อเพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อเห็ด และก้อนเชื้อสำหรับเพาะในวัสดุเพาะเพื่อทดสอบพัฒนาการของดอกเห็ดในโรงเรือนเพาะเห็ด

ผลการวิจัย

1.การรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนน้อยและการจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ได้เก็บรวบรวมเห็ดโคนน้อยจากตลาดชุมชนจากแหล่งต่างๆในพื้นที่จังหวัดภาคเหนือตอนบน ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2556 ถึงเดือนกรกฎาคม 2557 ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง ลำพูน แพร่ และน่าน รวม 49 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด สามารถจัดจำแนกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆคือ ดอกเห็ดขนาดใหญ่ส่วนของหมวกเห็ดยาว ดอกเห็ดขนาดใหญ่ส่วนของหมวกเห็ดรูปไข่ และดอกเห็ดขนาดเล็ก ซึ่งกลุ่มดอกเห็ดขนาดใหญ่ทั้ง สองลักษณะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอก (ดอกตูม) เฉลี่ยตั้งแต่ 10 – 15 มม. ความยาวก้านดอกเฉลี่ยตั้งแต่ 40–65 มม. และดอกเห็ดขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอก (ดอกตูม) เฉลี่ยตั้งแต่ 7–10 มม. ความยาวก้านดอกเฉลี่ยตั้งแต่ 20–35 มม. โดยแต่ละภายในกลุ่มมีลักษณะของผิวและสีของดอกเห็ดแตกต่างกันเล็กน้อยคือมีขนปกคลุมเป็นเกล็ดเล็กและหลุดออกได้ง่ายโดยมีสีตั้งแต่สีขาว จนถึง สีขาว เทาและน้ำตาลปนเทา (ภาพที่ 2) นำดอกเห็ดมาแยกเชื้อ เพาะเลี้ยงเส้นใยบนอาหารเพาะเชื้อ PDA จากนั้นคัดเลือกดอกเห็ดเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเชื้อ โดยจัดกลุ่มได้เป็น 6 สายพันธุ์ ดังนี้ คือ สายพันธุ์ 2A ,2B, Prao, B5 , K3 ,และ K3.16 ซึ่งการจัดแบ่งกลุ่มสายพันธุ์เป็นไปตามลักษณะสัณฐานวิทยาได้แก่ ลักษณะดอก ขนาด สี และลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหารเพาะเชื้อ PDA เป็น 6 กลุ่ม (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างและสายพันธุ์ของเห็ดโคนน้อยจากแหล่งต่างๆ

แหล่งที่เก็บ (ตลาดชุมชน)	จำนวนตัวอย่าง	การจัดแบ่งกลุ่มสายพันธุ์ตามลักษณะสัณฐานวิทยา
จ.เชียงใหม่	22	สายพันธุ์ Prao จำนวน 4 ตัวอย่าง
		สายพันธุ์ K3 จำนวน 6 ตัวอย่าง
		สายพันธุ์ K3.16 จำนวน 3 ตัวอย่าง
		สายพันธุ์ 2B จำนวน 9 ตัวอย่าง
จ.ลำปาง	15	สายพันธุ์ 2B จำนวน 13 ตัวอย่าง
		สายพันธุ์ B5 จำนวน 2 ตัวอย่าง
จ.ลำพูน	9	สายพันธุ์ 2B จำนวน 9 ตัวอย่าง
จ.แพร่	2	สายพันธุ์ 2B จำนวน 2 ตัวอย่าง
จ.น่าน	1	สายพันธุ์ 2A จำนวน 1 ตัวอย่าง



ภาพที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของเห็ดโคนน้อย

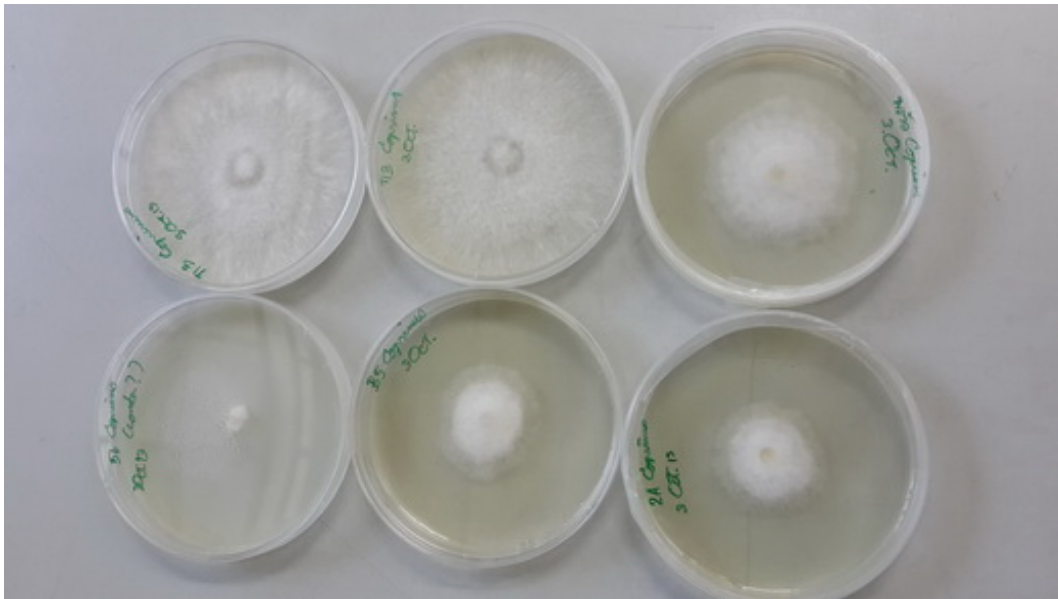
ภาพบน : กลุ่มดอกเห็ดขนาดใหญ่

ภาพล่าง : กลุ่มดอกเห็ดขนาดเล็ก

ตารางที่ 2 การจัดกลุ่มสายพันธุ์ของเห็ดโคนน้อยจากแหล่งต่างๆ

กลุ่ม	เส้นผ่านศูนย์กลางดอก	ความยาวก้านดอก	สีของดอก	ลักษณะการเจริญบน PDA
Prao	เกินกว่า 10 มม.	เกินกว่า 40 มม.	ขาว - ขาวปนเทา	เส้นใยสีขาว เส้นใยเจริญช้า
2A	เกินกว่า 10 มม. (ขนาดของดอกเฉลี่ย 15 มม.)	เกินกว่า 40 มม.	เทา	เส้นใยสีขาวหม่นปนเทา เส้นใยเจริญปานกลาง
2B	เกินกว่า 10 มม.	เกินกว่า 40 มม.	น้ำตาลปนเทา	เส้นใยสีขาวปนเทา เส้นใยเจริญปานกลาง
B5	เกินกว่า 10 มม.	เกินกว่า 40 มม.	น้ำตาลปนเทา	เส้นใยสีขาว เส้นใยเจริญช้า
K3	ต่ำกว่า 10 มม.	ต่ำกว่า 40 มม.	ขาวปนเทา	เส้นใยสีขาวหม่นปนเทา เส้นใยเจริญเร็ว
K3.16	ต่ำกว่า 10 มม.	ต่ำกว่า 40 มม.	ขาว	เส้นใยสีขาว เส้นใยเจริญเร็ว

ลักษณะของเห็ดโคนน้อยที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งต่างๆของจังหวัดภาคเหนือตอนบนพบว่า ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มลักษณะดอกใหญ่ มีหมวกเห็ดลักษณะเป็นรูปไข่ หรือยาวรีเกือบเป็นรูปทรงกระบอกกลมผิวของหมวกเห็ดมีสีขาวและมีขนสีขาวปนเทา หรือสีน้ำตาลปนเทาปกคลุมเป็นเกล็ดเล็กๆ ซึ่งหลุดออกได้ง่าย จะเหลือเฉพาะส่วนกลางหมวก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณตั้งแต่ 10 มม. ขึ้นไปโดยเฉลี่ย มีรอยหยักเป็นรัศมีตามขอบหมวกเมื่อดอกเห็ดบานเต็มที่จะบางมาก ก้านดอกสีขาวยาวประมาณ 40 มม.ขึ้นไป บริเวณโคนใหญ่กว่าปลายก้านเล็กน้อย ปกคลุมด้วยเกล็ดเล็กๆที่หลุดออกง่ายได้เช่นเดียวกับหมวกเห็ด ครีบไม่ยึดติดกับก้าน และอีกกลุ่มเป็นดอกเห็ดที่มีขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางดอกเห็ดมีขนาดไม่เกิน 15 มม. ก้านดอกยาวไม่เกิน 35 มม. หมวกเห็ดมีสีขาวปนเทา ซึ่งสามารถจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เป็น 6 กลุ่ม จากนั้นนำกลุ่มสายพันธุ์ทั้ง 6 กลุ่มมาทำการคัดเลือกตัวแทนกลุ่มที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันมาทำการเพาะเลี้ยงโดยแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อเก็บเส้นใยที่เจริญบนอาหารเพาะเชื้อสำหรับนำมาจำแนกด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลต่อไป (ภาพที่ 3)

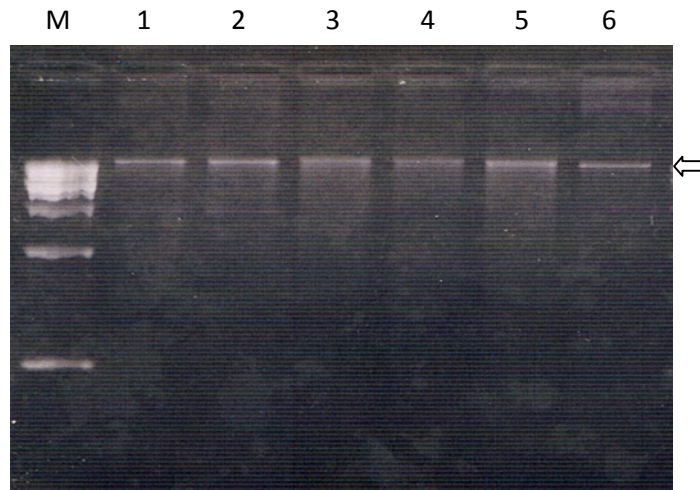


ภาพที่ 3 ลักษณะของเส้นใยที่แยกจากดอกเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ต่างๆจำนวน 6 สายพันธุ์บนอาหารเพาะเชื้อ PDA

2. การวิเคราะห์ผลในห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยาระดับโมเลกุล

ผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัดดังกล่าวได้ดีเอ็นเอของเห็ดตัวอย่างที่มีคุณภาพดี โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนปรากฏดังภาพที่ 4

ผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัดดังกล่าวได้ดีเอ็นเอของเห็ดตัวอย่างที่มีคุณภาพดี โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนปรากฏดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ลักษณะดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ด เมื่อ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb) และ 1 ถึง 6 คือ ดีเอ็นเอตัวอย่าง ลูกศรแสดงแถบดีเอ็นเอ

3. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

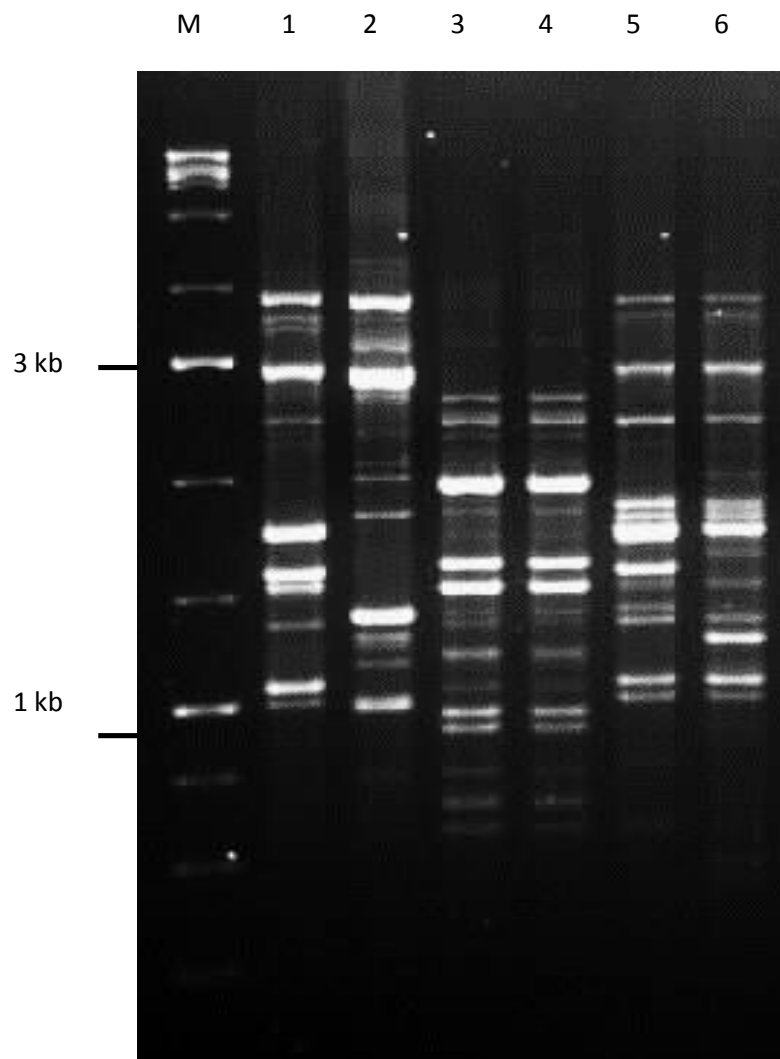
(Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD)

จากการตรวจสอบดีเอ็นเอของเห็ดโคนน้อยโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) ที่สร้างขึ้นโดยอาศัยเทคนิค HAT-RAPD (High annealing temperature-Random amplification polymorphic DNA) และใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer) จากไพรเมอร์ทั้งหมด 72 ไพรเมอร์พบว่า มีไพรเมอร์ทั้งหมด 31 ไพรเมอร์ ที่สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นได้ในทุกตัวอย่าง และมีไพรเมอร์จำนวน 27 ไพรเมอร์ ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (polymorphic band) ของเห็ดโคนน้อยในตัวอย่างต่างชนิดกัน โดยมีไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบ polymorphic จำนวน 5 แถบขึ้นไปจำนวน 7 ไพรเมอร์ คือ OPAA-03, OPAA-10, OPAJ-05, OPL-07, OPA-O18, OPAH-10 และ OPU-05 ดังแสดงในตารางที่ 3

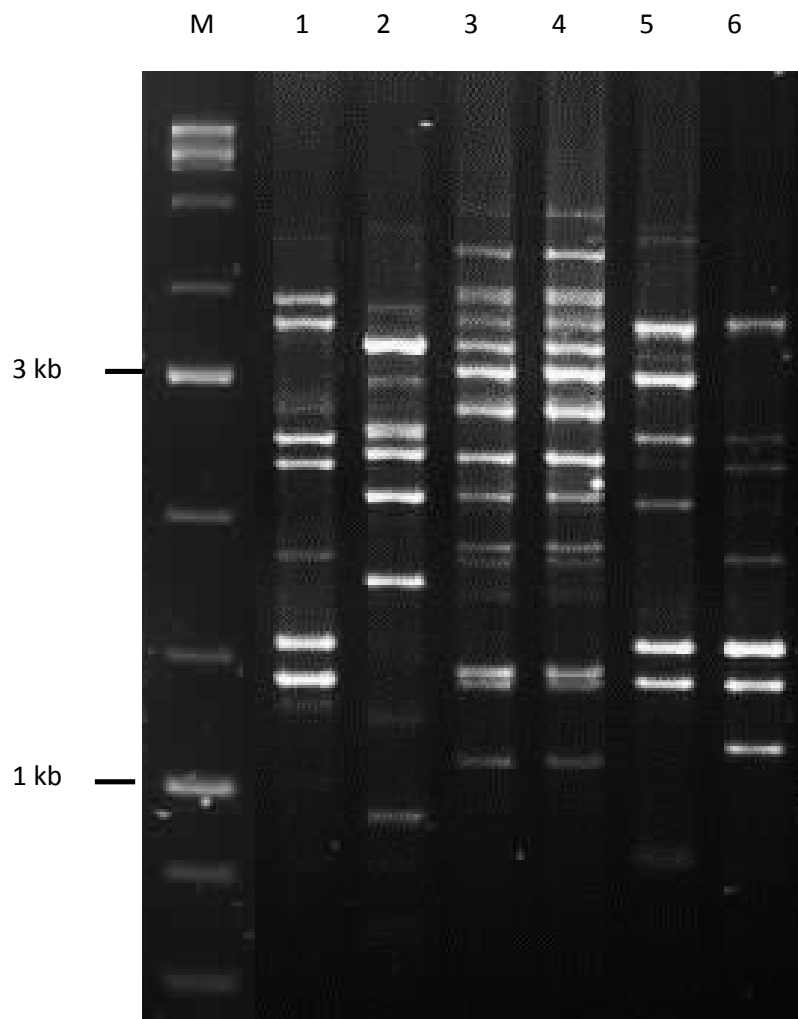
ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Primers	Sequence	Total Band	No.of Polymorphic bands	% Polymorphism
OPAA-03	TTAGCGCCCC	78	5	6.4
OPAA-10	TGGTCGGGTG	58	5	8.6
OPAJ-05	CAGCGTTGCC	68	5	7.4
OPL-07	AGGCGGGAAC	85	5	5.9
OPAO-18	GGGAGCGCTT	91	8	8.8
OPAH-10	GGGATGACCA	91	5	5.5
OPU-05	TTGGCGGCCT	73	5	6.8

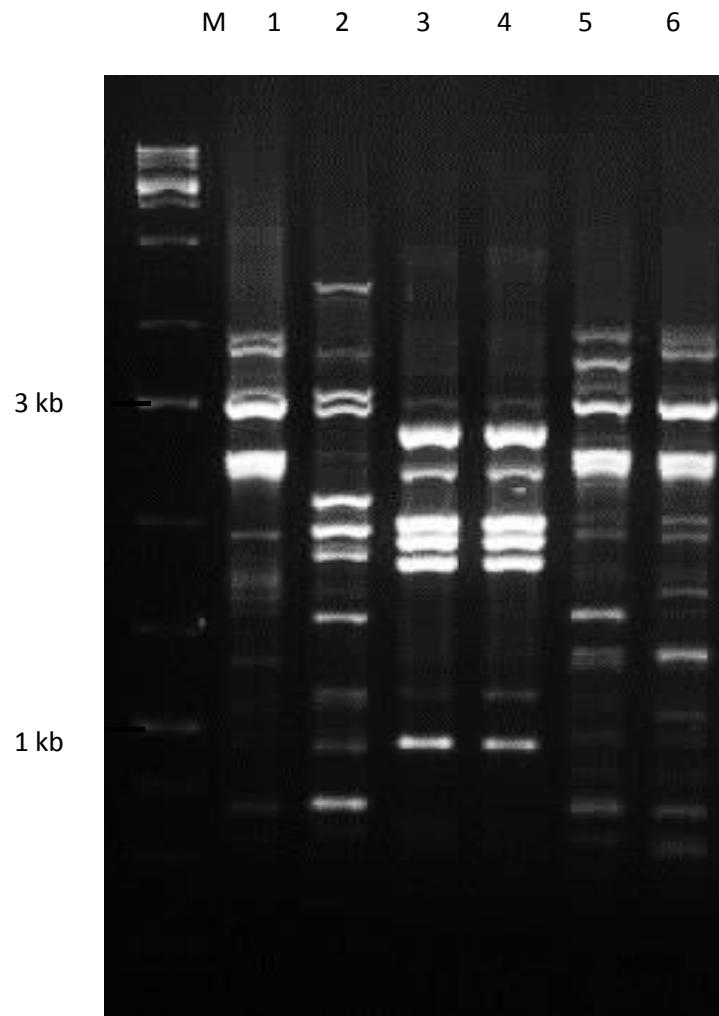
ซึ่งผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2B, K3, K3.16, Prao และ B5 พบว่าทั้ง 7 ไพรเมอร์ สามารถทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของสายพันธุ์ 2A , 2B ,Prao,B5 และK3 ,K3.16 แต่ไม่สามารถแยกให้เห็นความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ K3 และK3.16 ดังภาพที่ 5 ส่วนอีกจำนวน 20 ไพรเมอร์ คือ OPAA-17, OPC-16, OPH-014, OPH-019, OPH-010, OPAH-011, OPD-016, OPD-019, OPAD-014, OPAD-015, OPAD-020, OPAH-012, OPAH-015, OPAH-017, OPAI-08, OPAI-014, OPAH-011, OPJ-010, OPJ-04และ OPAJ-07ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์โดยเฉลี่ยมากกว่า 5 แถบ (ภาพที่ 5 – ภาพที่ 31)



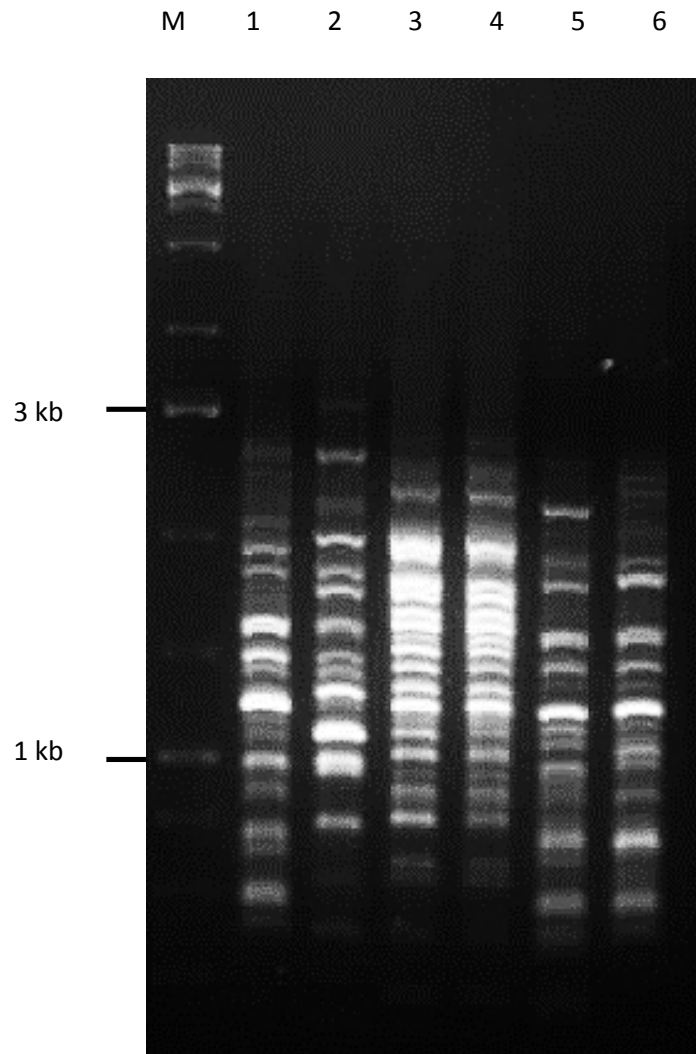
ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAA-03 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



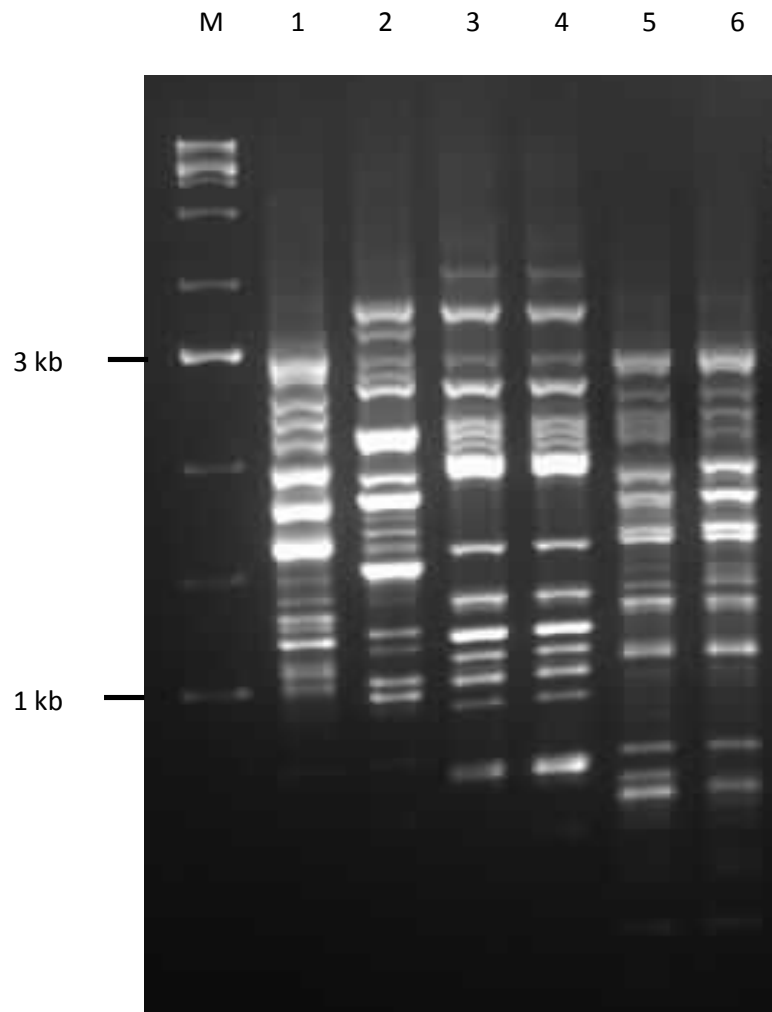
ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAA-10 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



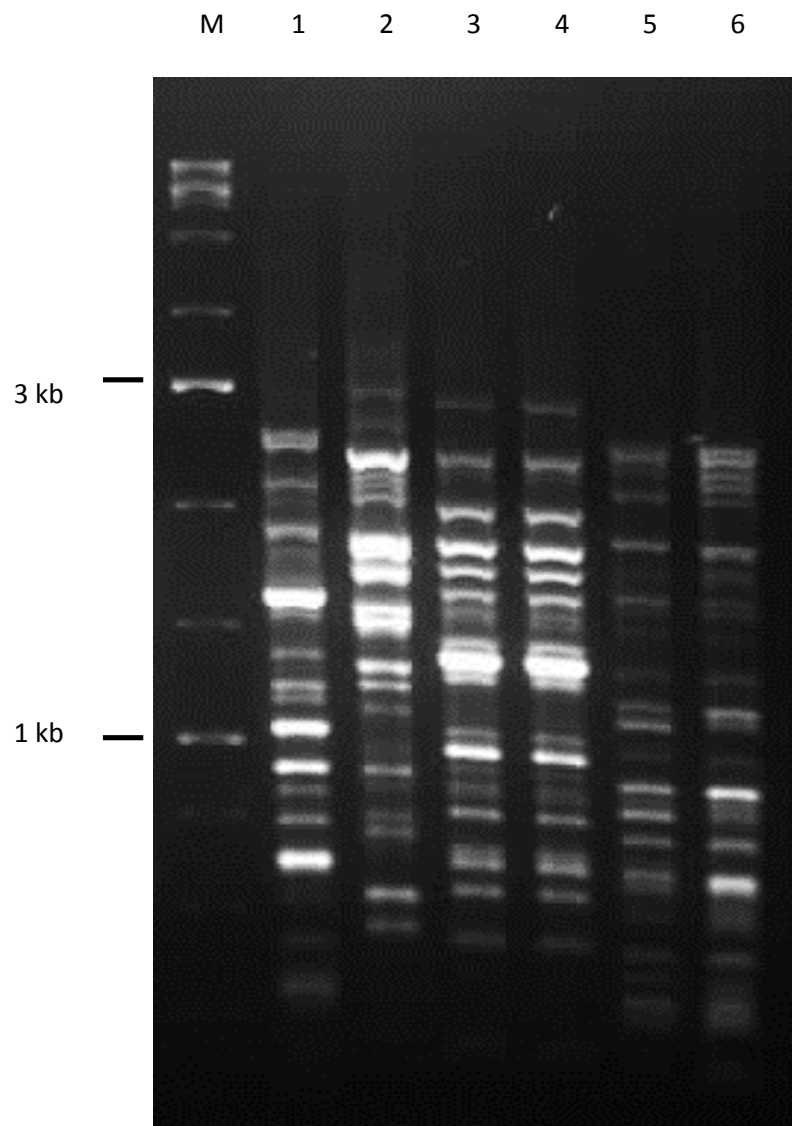
ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAJ-05 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao ;6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



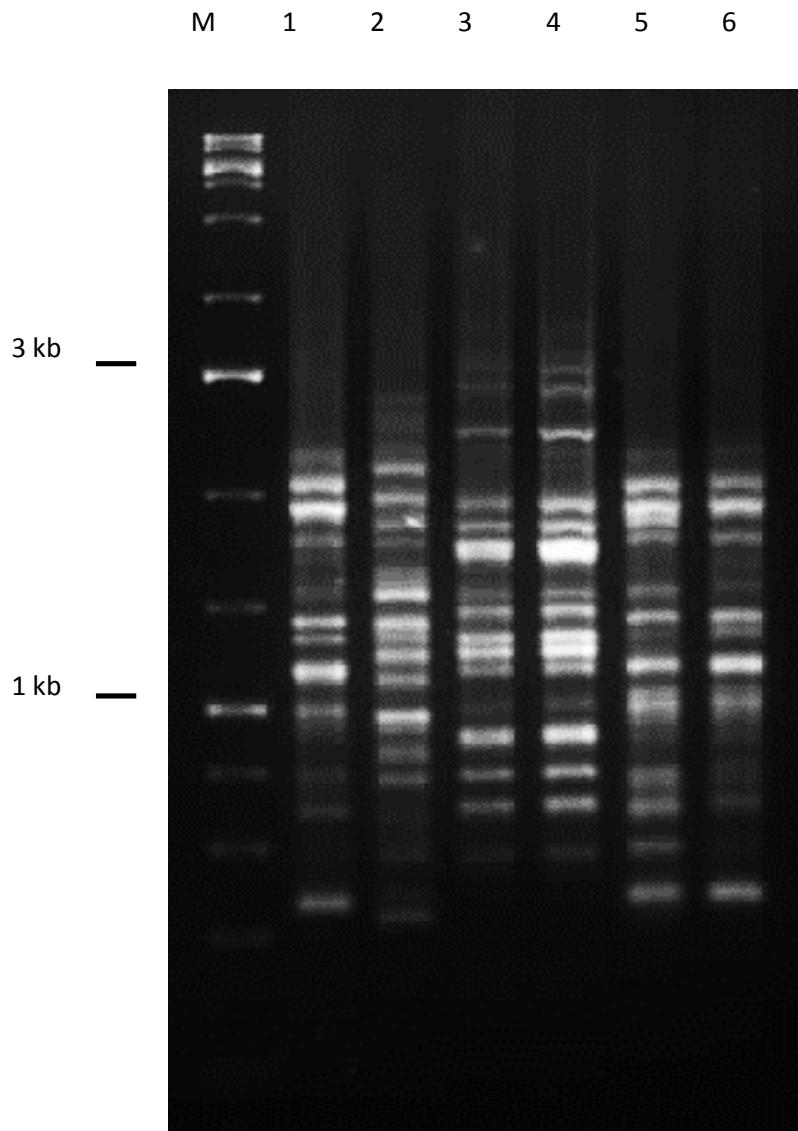
ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPL-07 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



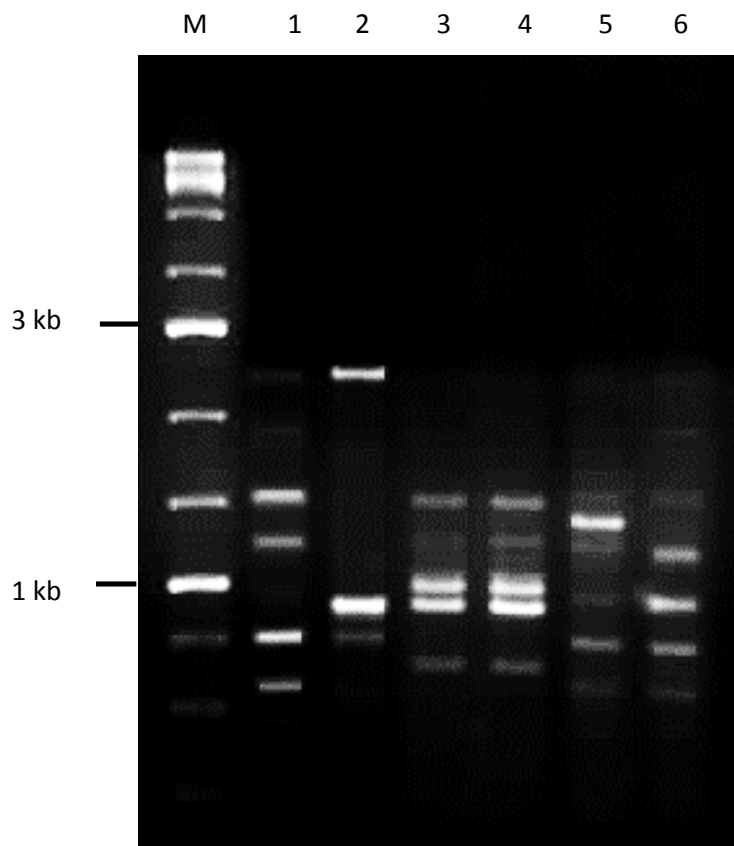
ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAO-18 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



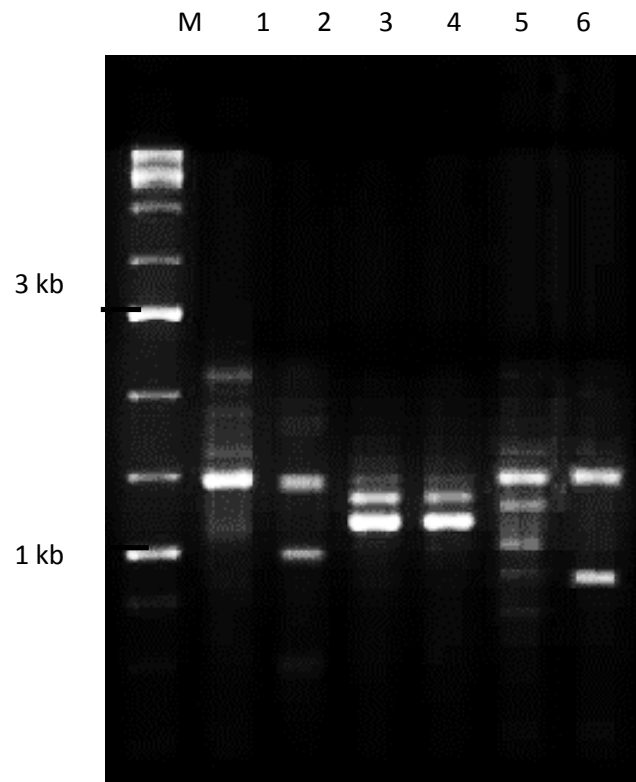
ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAH-10 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



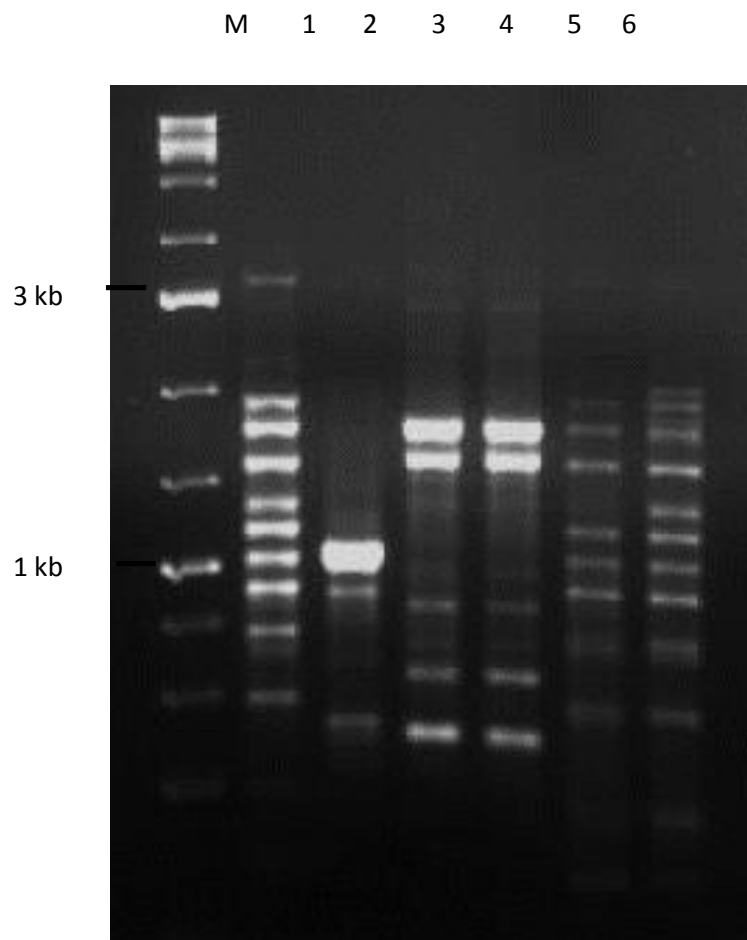
ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPU-05 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



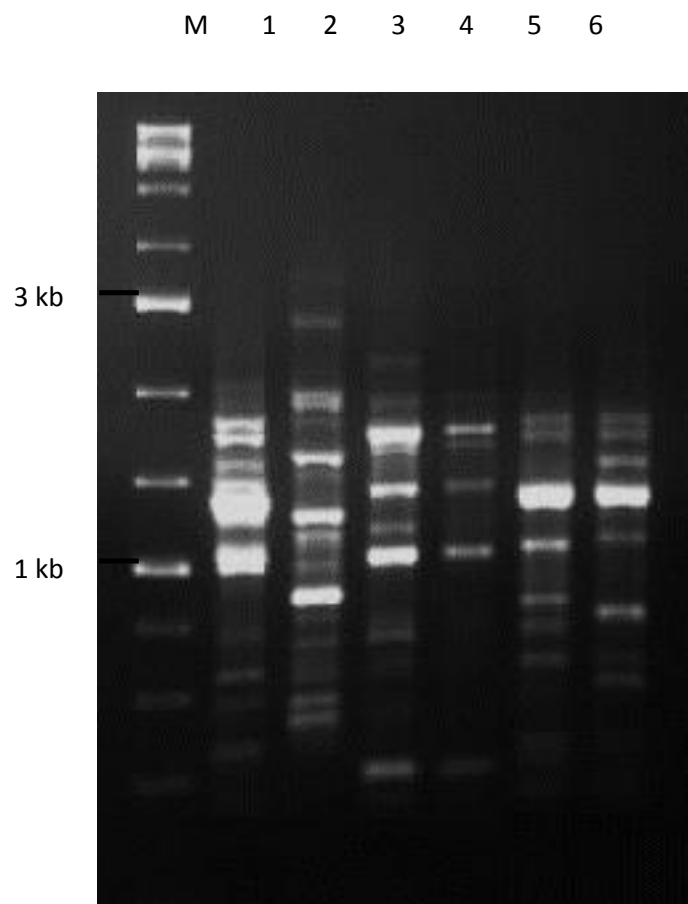
ภาพที่ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAA0-17 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K 3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



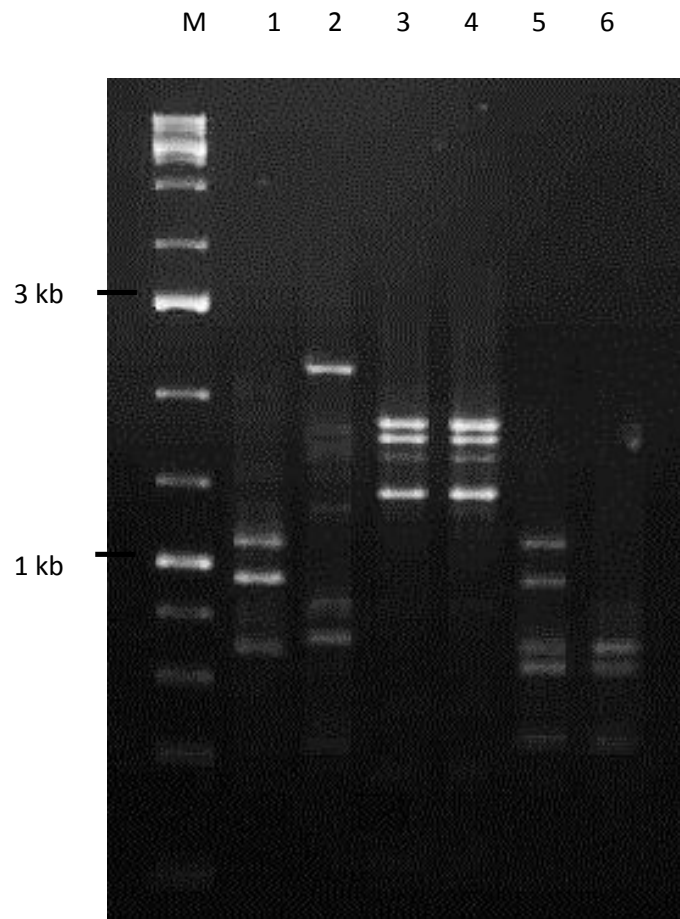
ภาพที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPCO-16 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์Prao;6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



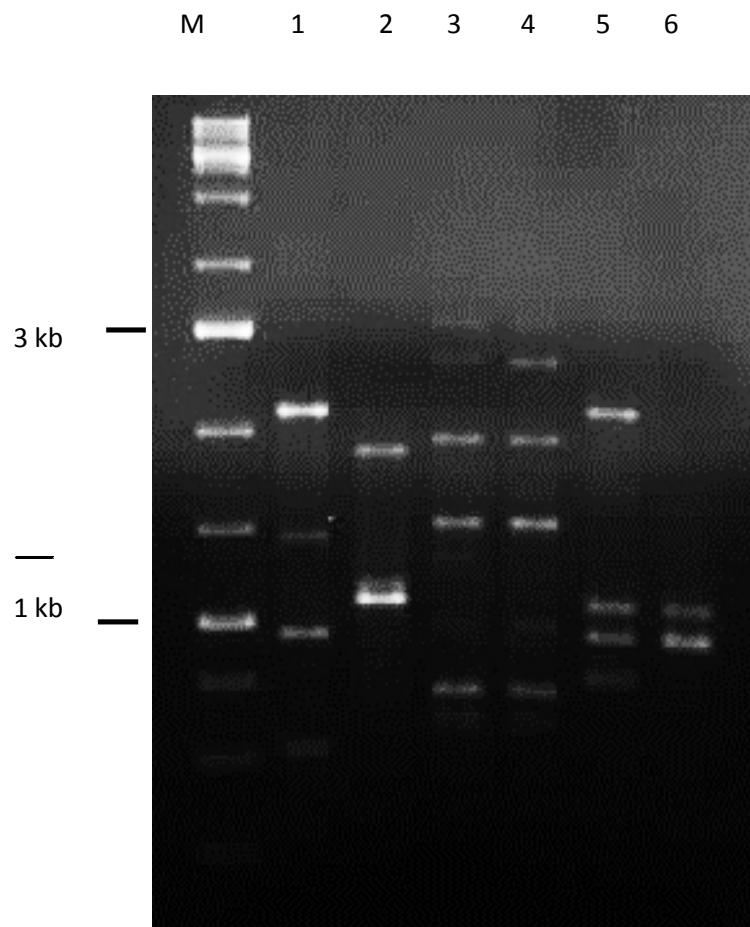
ภาพที่ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPHO-14 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



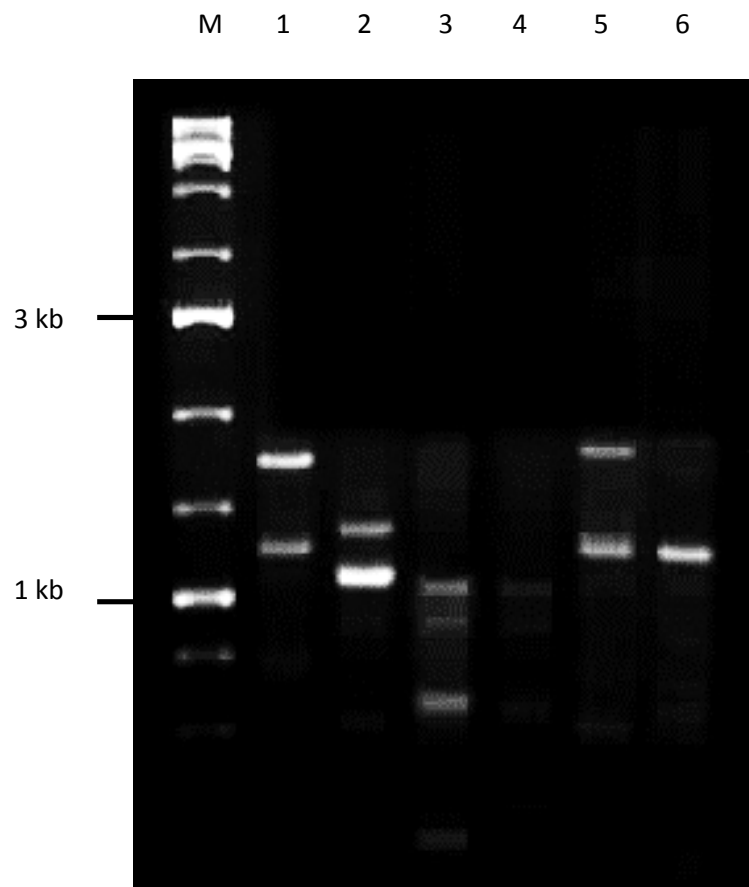
ภาพที่ 15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPHO-19 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



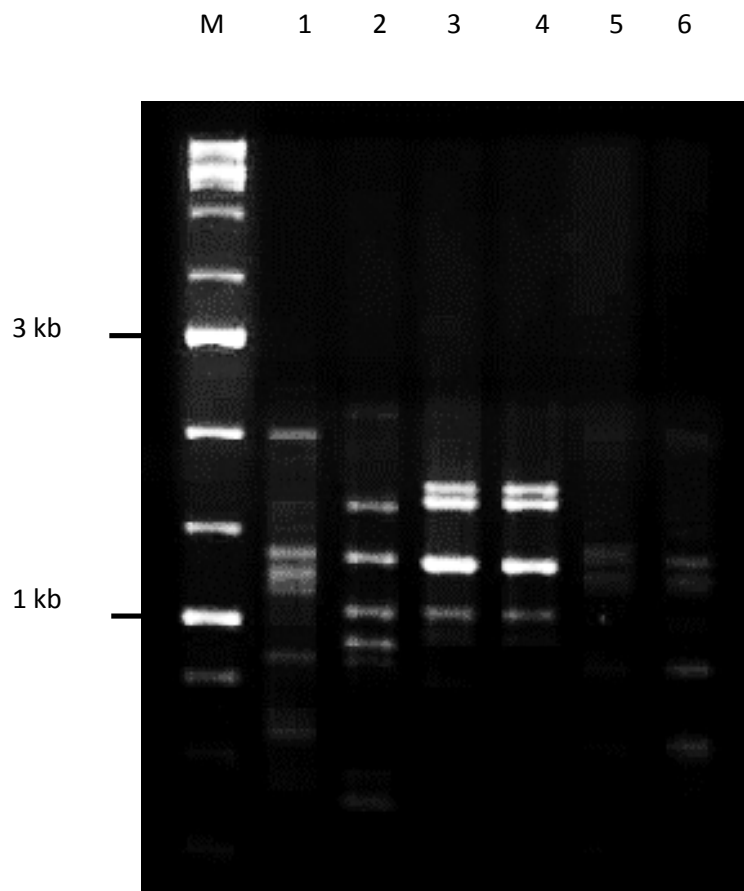
ภาพที่ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPHO-10 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



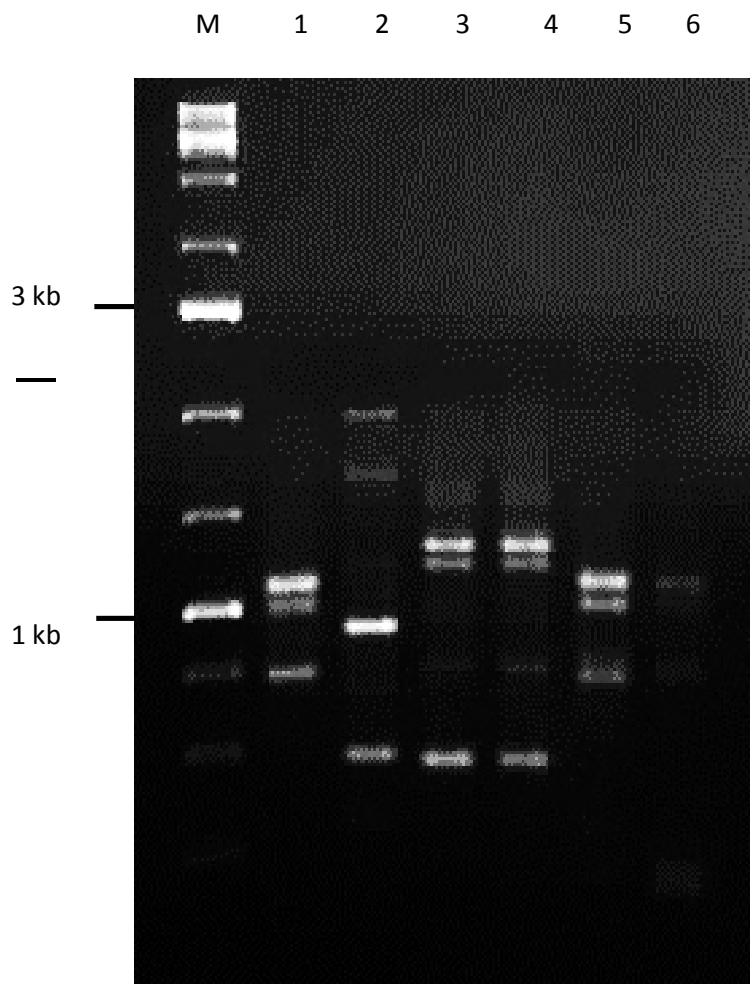
ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAH-011 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์Pras; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



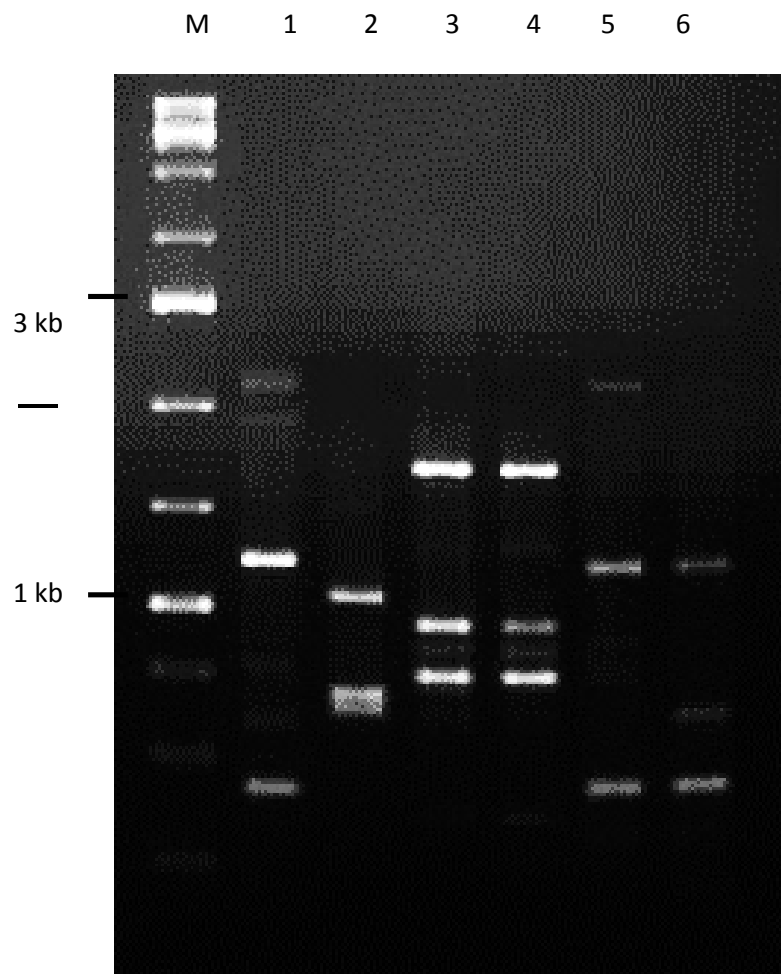
ภาพที่ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPD- 016 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



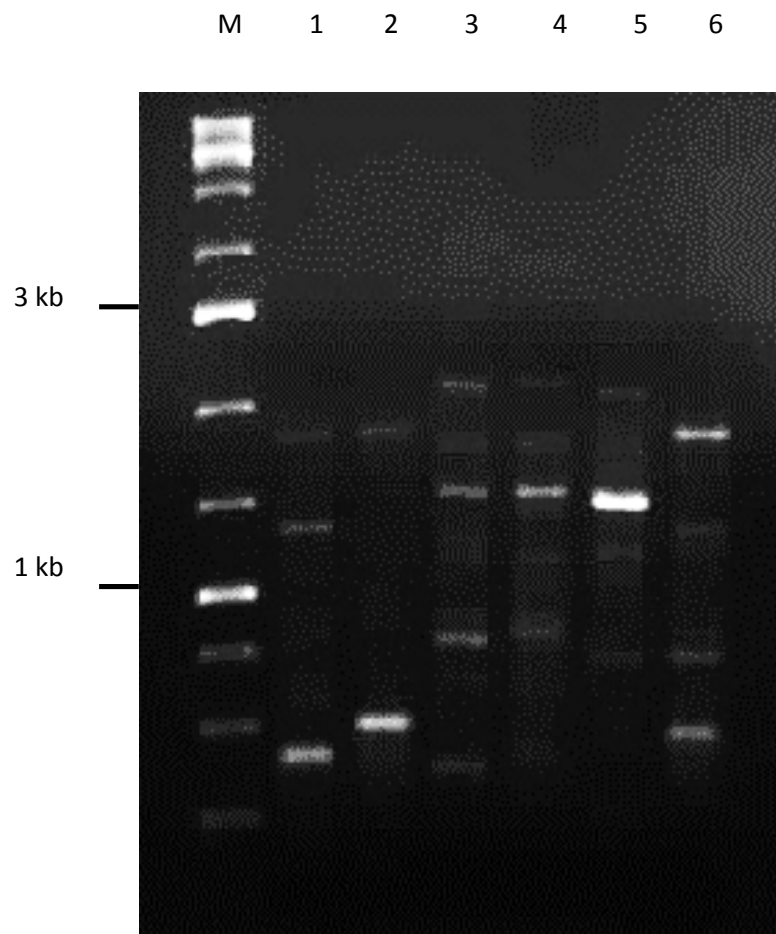
ภาพที่ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPD 019 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



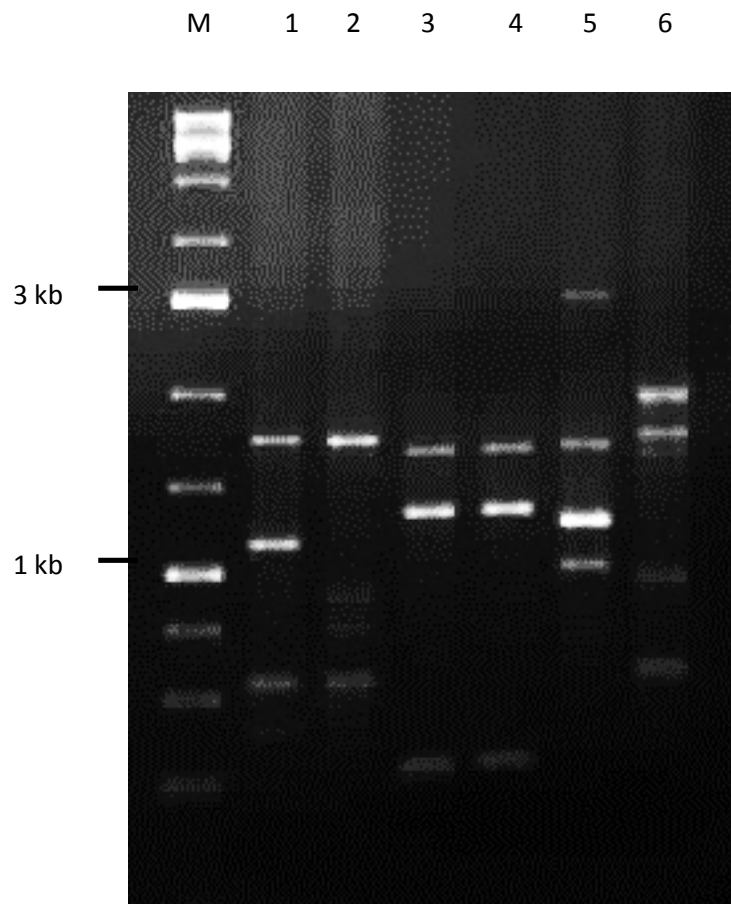
ภาพที่ 20 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAD- 014 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



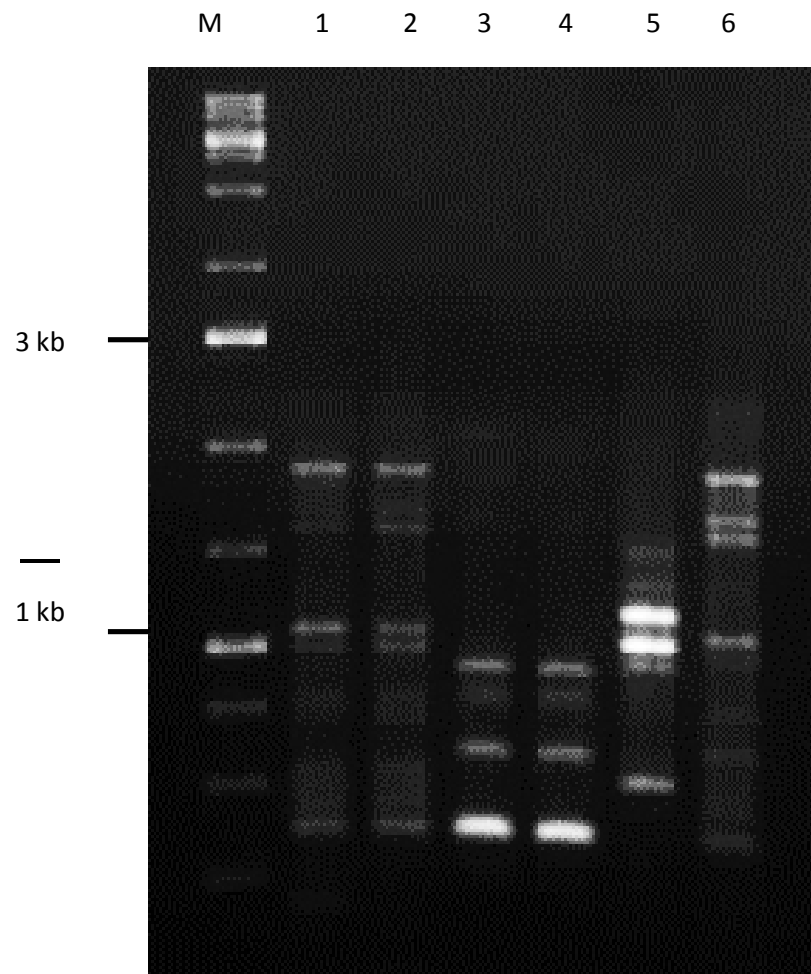
ภาพที่ 21 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAD- 015 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K 3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์Prad; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



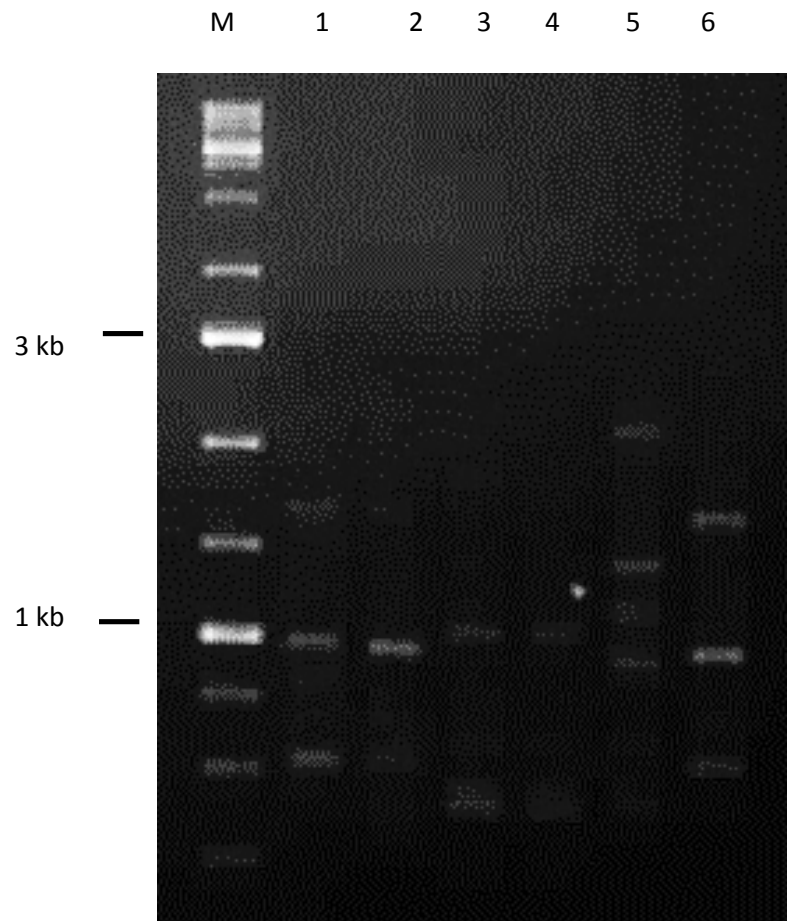
ภาพที่ 22 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAD- 020 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K 3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



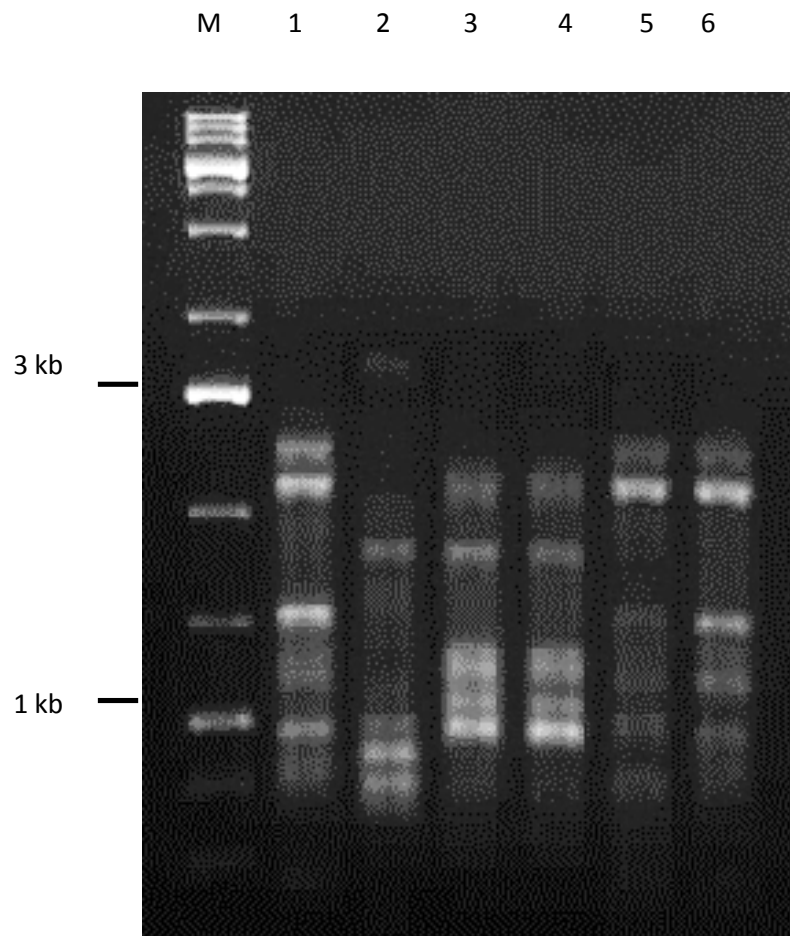
ภาพที่ 23 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAH- 012 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Proo; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



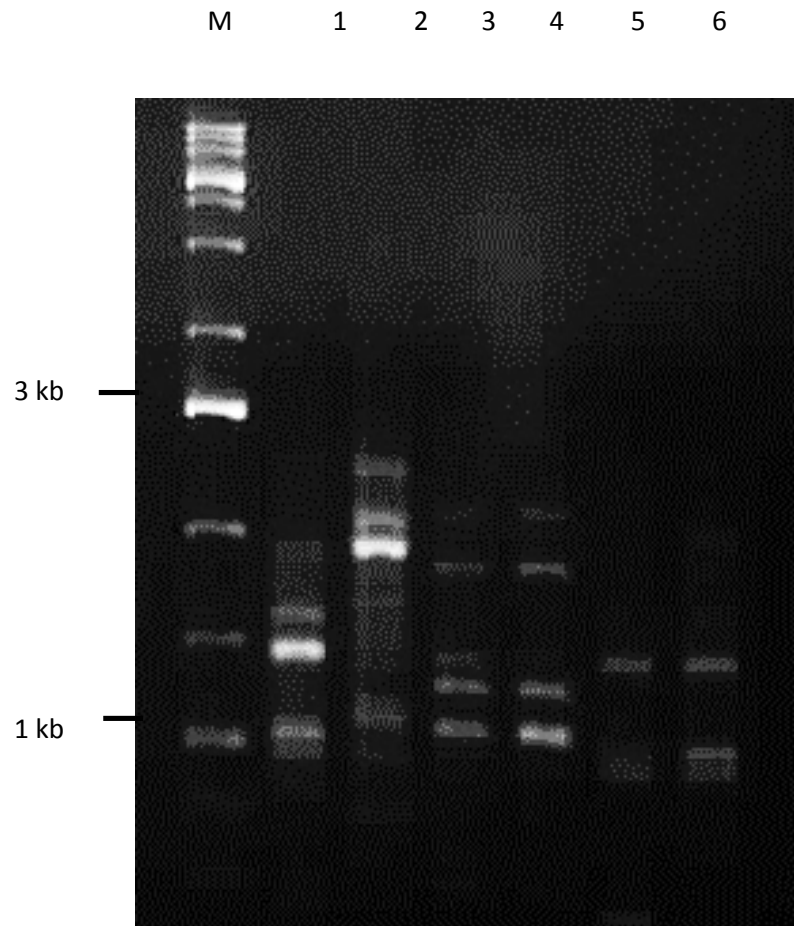
ภาพที่ 24 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAH- 015 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



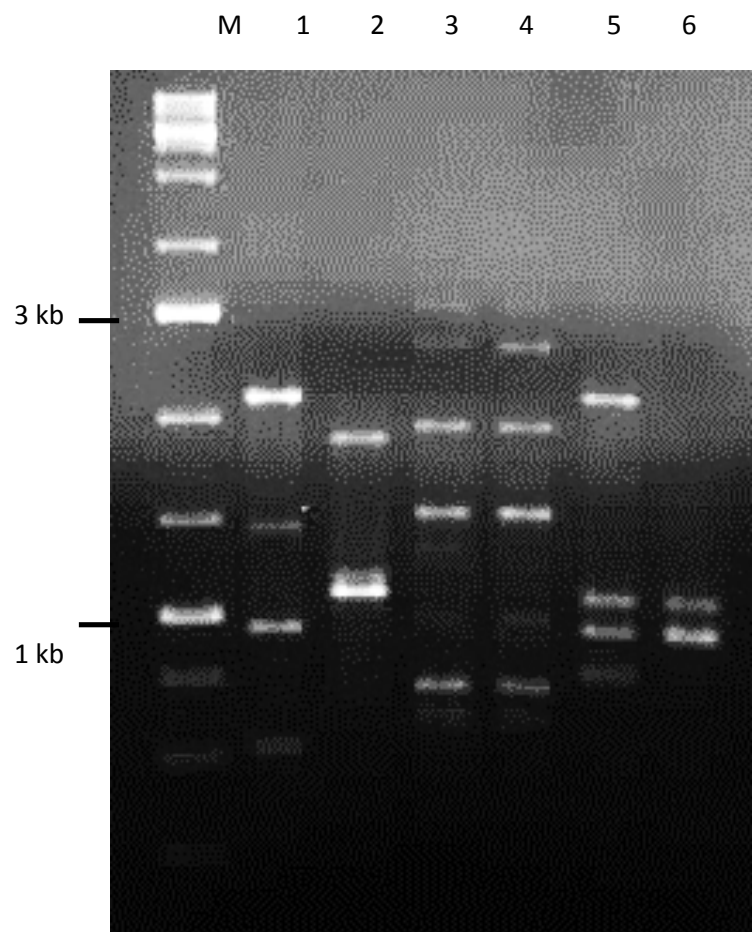
ภาพที่ 25 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAH- 017 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Proo; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



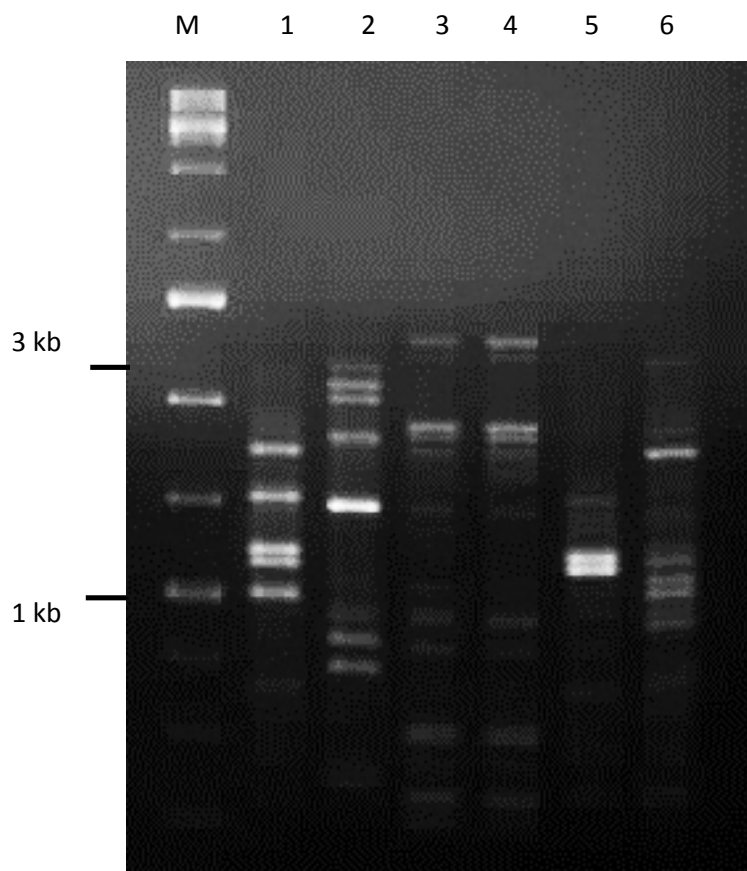
ภาพที่ 26 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์OPAI- 08โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K 3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



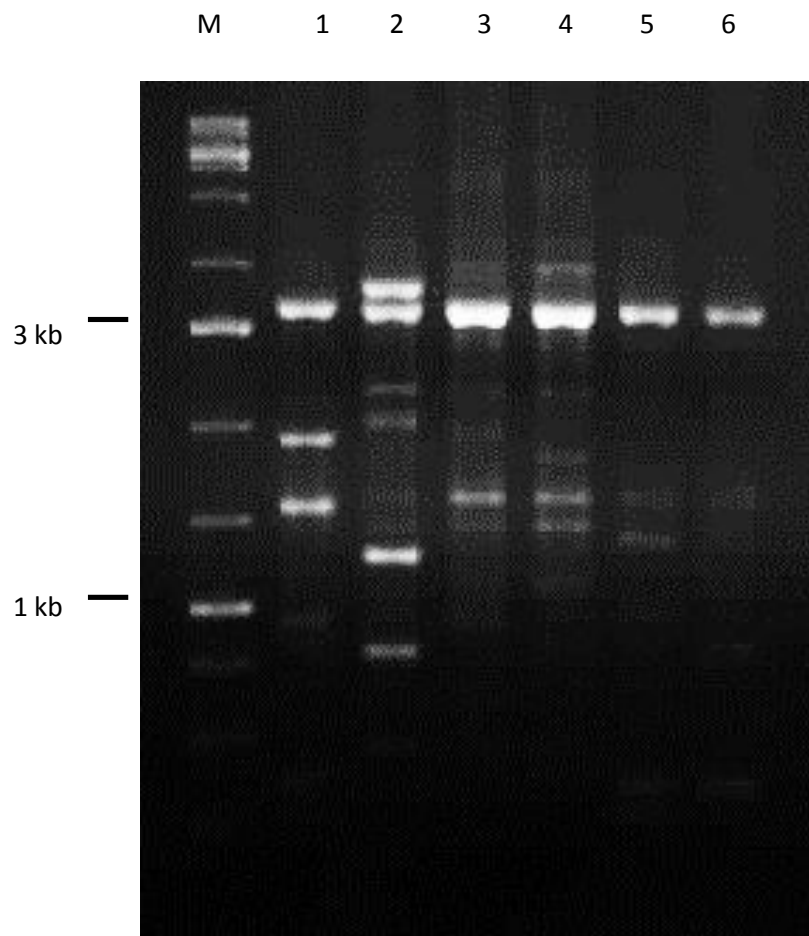
ภาพที่ 27 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAI- 014 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K 3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



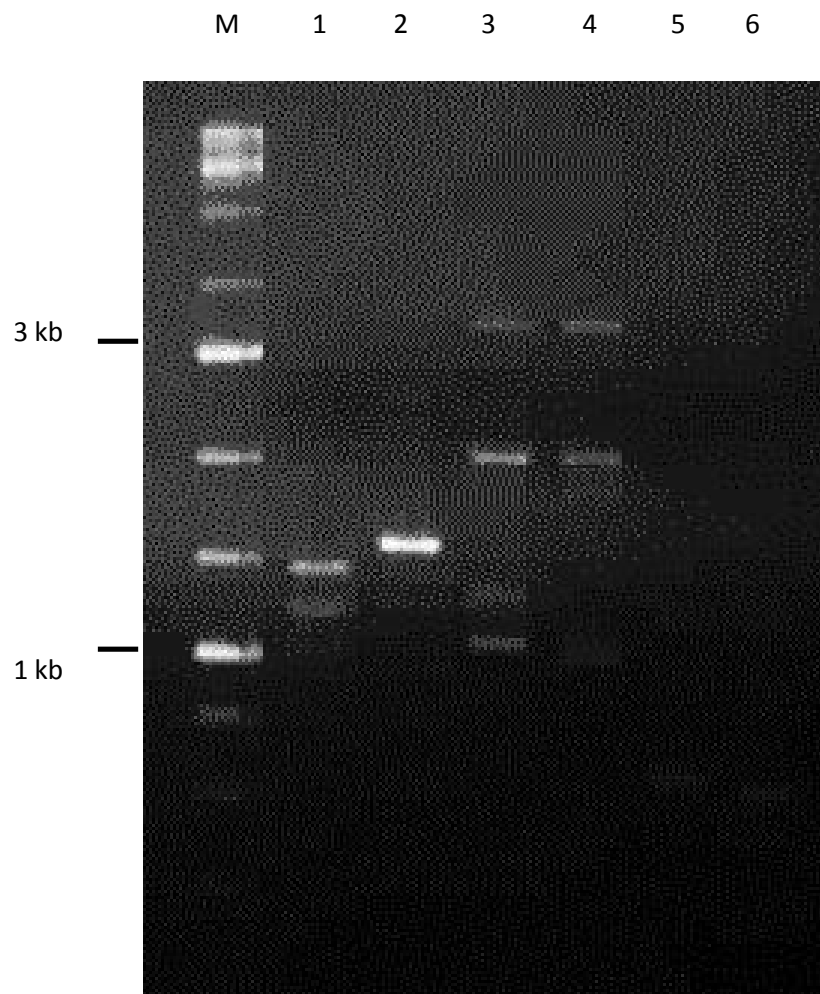
ภาพที่ 28 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAH- 011 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



ภาพที่ 29 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPJ-010 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



ภาพที่ 30 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPJ- 04 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5



ภาพที่ 31 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ด จำนวน 6 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAJ- 07 โดยที่ M=Marker 1kb (GeneRuler™ 1kb ladder, Fermentas, USA); 1 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A , 2 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B; 3 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3; 4 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16; 5 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao; 6 คือ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5

4.ผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ (Cluster analysis) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

จากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้างต้นได้คัดเลือกลายพิมพ์ที่ชัดเจนและเป็นลายพิมพ์ที่สามารถบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้คือลายพิมพ์ดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAA-03, OPAJ-05, OPAA-10, OPL-07, OPAO-18, OPAH-10 และ OPU05 นำข้อมูลไปวิเคราะห์ด้วยการให้คะแนนเป็น binary data โดย หากพันธุ์เห็ด/ สายพันธุ์เห็ดมีแถบดีเอ็นเอที่พบแถบดีเอ็นเอ จะให้คะแนนเป็น 1 แต่หากพันธุ์/สายพันธุ์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่าง(ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ?) จะให้คะแนนเป็น 0 แล้วนำข้อมูลไปวิเคราะห์ด้วยการใช้ Cluster analysis โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>) วิธีประยุกต์จาก Garcia-Vallve et al., 1999 และเลือกค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard's similarity coefficient เพื่อดำหนดค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าทั้ง 7 ไพรเมอร์ให้ค่าดัชนีความเหมือน (similarity matrix) และแผนภูมิความสัมพันธ์(dendrogram) สอดคล้องกันทั้ง 7 ไพรเมอร์คือ ถ้าพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมากกว่า 0.55 ขึ้นไปจะพบว่าสามารถแบ่งเห็ดโคนน้อยออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prad กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A

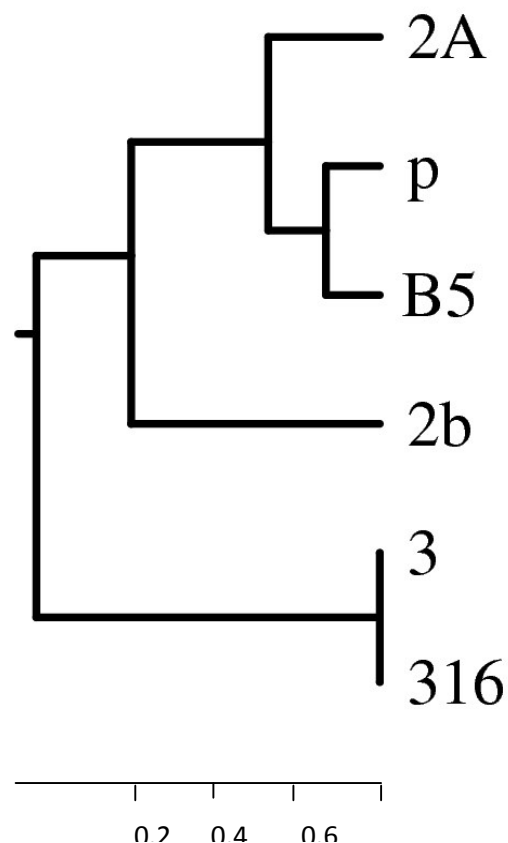
กลุ่มที่ 4 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAA-03 ให้ค่าดัชนีความเหมือน 0.111-1.000 ซึ่งค่าสูงสุดพบในเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16 และค่าดัชนีต่ำสุดพบใน เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 และ K3.16 ดังแสดงในภาพที่ 32 และตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ดัชนีความเหมือนของเห็ดโคนน้อย วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม OPAA-03

ดัชนีความเหมือน (Similarity Matrix computed with Jaccard coefficient)

	2A	2b	3	316	p	B5
2A	1	0.267	0.111	0.111	0.769	0.643
2b		1	0.056	0.056	0.375	0.467
3			1	1.000	0.150	0.150
316				1	0.150	0.150
p					1	0.857
B5						1



2A = สายพันธุ์ 2A
 P = สายพันธุ์ Prao
 B5 = สายพันธุ์ B5
 2b = สายพันธุ์ 2b
 3 = สายพันธุ์ K3
 316 = สายพันธุ์ K3.16

ภาพที่ 32 แผนภูมิความสัมพันธ์ของเห็ดโคนน้อยโดยวิเคราะห์จากการทำสายพิมพ์ดีเอ็นเอ
 โปรแกรม OPAA-03

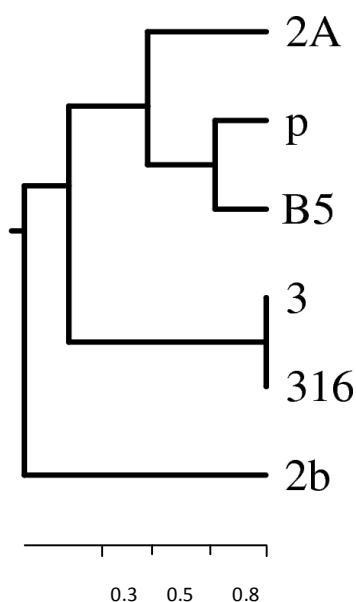
2A = สายพันธุ์ 2A; 2b = สายพันธุ์ 2B; 3 = สายพันธุ์ K3; 316 = สายพันธุ์ K3.16; p = สายพันธุ์ Prao ;
 B5 = สายพันธุ์ B5

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAA-10 ให้ค่าดัชนีความเหมือน 0.000–1.000 ซึ่งค่าสูงสุดพบในเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16 และค่าดัชนีต่ำสุดพบใน เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao และ B5 ดังแสดงในภาพที่ 33 และตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ดัชนีความเหมือนของเห็ดโคนน้อย วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAA-10

ดัชนีความเหมือน (Similarity Matrix computed with Jaccard coefficient)

	2A	2b	3	316	p	B5
2A	1	0.000	0.250	0.250	0.571	0.500
2b		1	0.111	0.111	0.000	0.000
3			1	1.000	0.214	0.200
316				1	0.214	0.200
p					1	0.800
B5						1



ภาพที่ 33 แผนภูมิความสัมพันธ์ของเห็ดโคนน้อยโดยวิเคราะห์จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพรเมอร์ OPAA-10

2A = สายพันธุ์ 2A; 2b = สายพันธุ์ 2B; 3 = สายพันธุ์ K3; 316 = สายพันธุ์ K3.16;

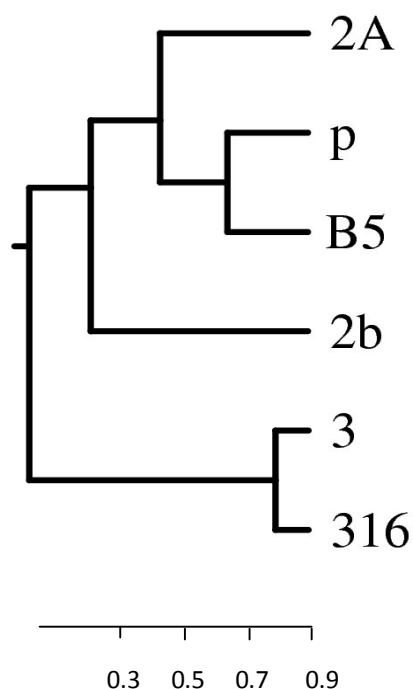
p = สายพันธุ์ Prao ; B5 = สายพันธุ์ B5

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAJ-05 ให้ค่าดัชนีความเหมือน 0.050-0.889 ซึ่งค่าสูงสุดพบในเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16 และค่าดัชนีต่ำสุดพบใน เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16 ดังแสดงในภาพที่ 34 และตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ดัชนีความเหมือนของเห็ดโคนน้อย วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAJ-05

ดัชนีความเหมือน (Similarity Matrix computed with Jaccard coefficient)

	2A	2b	3	316	p	B5
2A	1	0.267	0.071	0.067	0.455	0.545
2b		1	0.053	0.050	0.235	0.294
3			1	0.889	0.062	0.059
316				1	0.059	0.056
p					1	0.727
B5						1



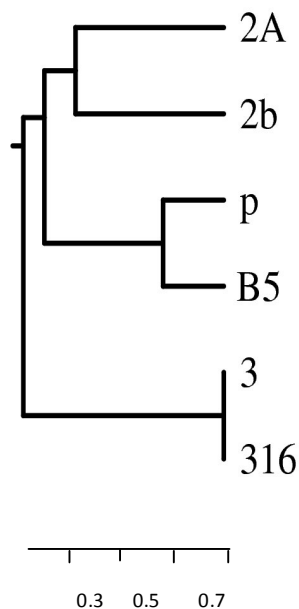
ภาพที่ 34 แผนภูมิความสัมพันธ์ของเห็ดโคนน้อยโดยวิเคราะห์จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพรเมอร์ OPAJ-05

เมื่อวิเคราะห์สายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPL-07 ให้ค่าดัชนีความเหมือน 0.208–1.000 ซึ่งค่าสูงสุดพบในเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K 3.16 และค่าดัชนีต่ำสุดพบใน เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 และ K3.16 ดังแสดงในภาพที่ 35 และตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ดัชนีความเหมือนของเห็ดโคนน้อย วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ OPL-07

ดัชนีความเหมือน (Similarity Matrix computed with Jaccard coefficient)

	2A	2b	3	316	p	B5
2A	1	0.438	0.208	0.208	0.333	0.438
2b		1	0.273	0.273	0.211	0.294
3			1	1.000	0.261	0.217
316				1	0.261	0.217
p					1	0.769
B5						1



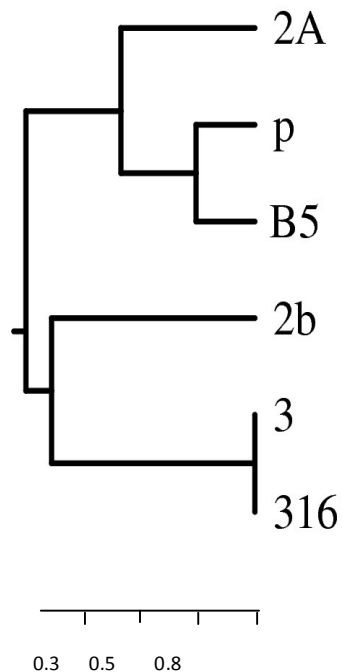
ภาพที่ 35 แผนภูมิความสัมพันธ์ของเห็ดโคนน้อยโดยวิเคราะห์จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
ไพรเมอร์ OPL-07

เมื่อวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAO-18 ให้ค่าดัชนีความเหมือน 0.217–1.000 ซึ่งค่าสูงสุดพบในเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K 3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K 3.16 และค่าดัชนีต่ำสุดพบใน เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์พรวากับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 และ K3.16 ดังแสดงในภาพที่ 36 และตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ดัชนีความเหมือนของเห็ดโคนน้อย วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAO-18

ดัชนีความเหมือน (Similarity Matrix computed with Jaccard coefficient)

2A	2b	3	316	p	B5	
2A	1	0.286	0.300	0.300	0.556	0.588
2b		1	0.350	0.350	0.261	0.273
3			1	1.000	0.217	0.227
316				1	0.217	0.227
p					1	0.812
B5						1



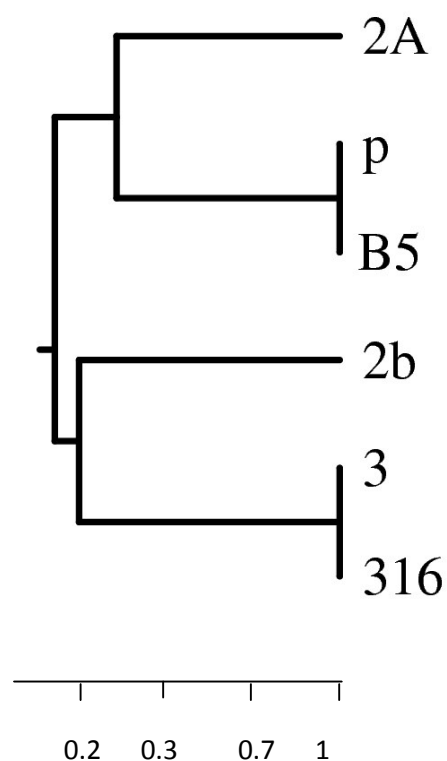
ภาพที่ 36 แผนภูมิความสัมพันธ์ของเห็ดโคนน้อยโดยวิเคราะห์จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพรเมอร์ OPAO-18

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPAH-10 ให้ค่าดัชนีความเหมือน 0.100–1.000 ซึ่งค่าสูงสุดพบในเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K 3.16 , และค่าดัชนีต่ำสุดพบใน เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B ดังแสดงในภาพที่ 37 และตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ดัชนีความเหมือนของเห็ดโคนน้อย วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ OPAH-10

ดัชนีความเหมือน (Similarity Matrix computed with Jaccard coefficient)

	2A	2b	3	316	p	B5
2A	1	0.100	0.150	0.150	0.357	0.357
2b		1	0.250	0.250	0.312	0.312
3			1	1.000	0.158	0.158
316				1	0.158	0.158
p					1	1.000
B5						1



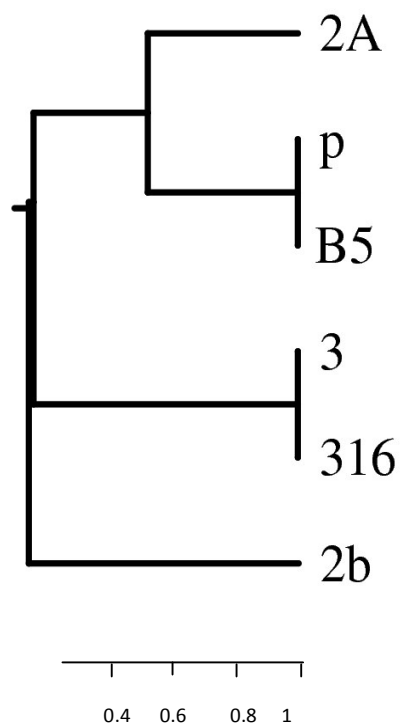
ภาพที่ 37 แผนภูมิความสัมพันธ์ของเห็ดโคนน้อยโดยวิเคราะห์จากการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอไพรเมอร์ OPAH-10

เมื่อวิเคราะห์หลายพหุพีดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPU-05 ให้ค่าดัชนีความเหมือน 0.278–1.000 ซึ่งค่าสูงสุดพบในเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K 3.16 , และค่าดัชนีต่ำสุดพบใน เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prad และ B5 ดังแสดงในภาพที่ 38 และตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ดัชนีความเหมือนของเห็ดโคนน้อยวิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ OPU-05

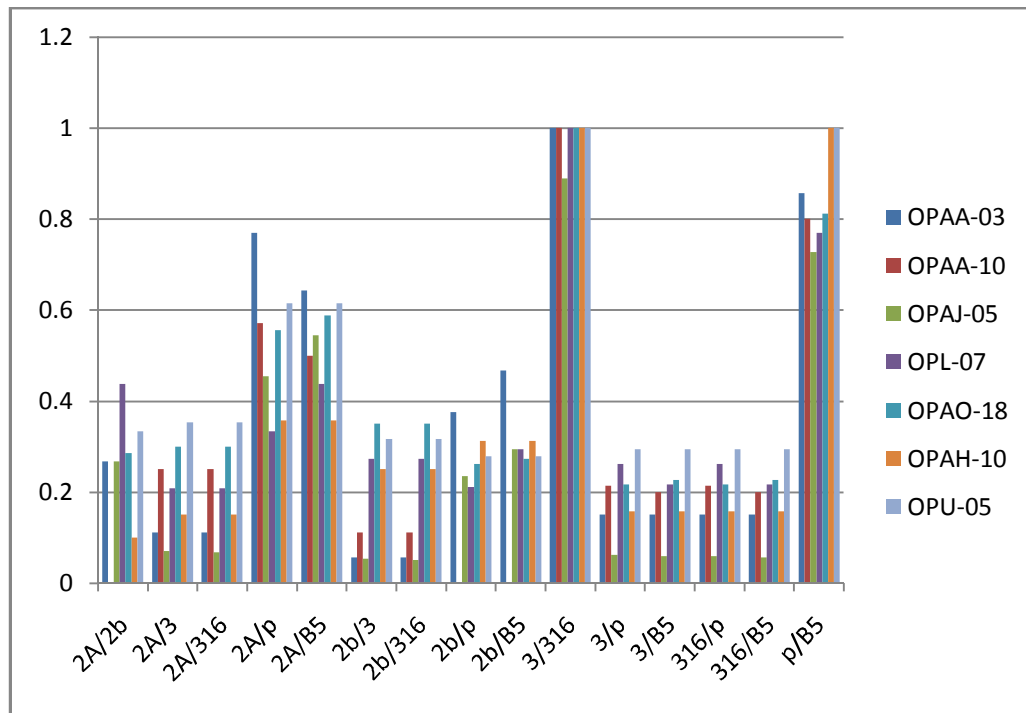
ดัชนีความเหมือน (Similarity Matrix computed with Jaccard coefficient)

	2A	2b	3	316	p	B5
2A	1	0.333	0.353	0.353	0.615	0.615
2b		1	0.316	0.316	0.278	0.278
3			1	1.000	0.294	0.294
316				1	0.294	0.294
p					1	1.000
B5						1



ภาพที่ 38 แผนภูมิความสัมพันธ์ของเห็ดโคนน้อยโดยวิเคราะห์จากการทำหลายพหุพีดีเอ็นเอ
ไพรเมอร์ OPU-05

ทั้งนี้สามารถสรุปความสัมพันธ์ของสายพันธุ์เห็ดโคนน้อยโดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 7 ชนิดที่ดูจากค่า genetic similarity ของแต่ละสายพันธุ์เปรียบเทียบกับ ได้ดังแผนภาพที่ 39



ภาพที่ 39 แผนภูมิความสัมพันธ์ของการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 7 ชนิด

2A = สายพันธุ์ 2A ; P = สายพันธุ์ Prao; B5 = สายพันธุ์ B5; 2b = สายพันธุ์ 2b;

3 = สายพันธุ์ K3;;316 = สายพันธุ์ K3.16

5.ผลการทดสอบการพัฒนากิ่งเห็ดโคนน้อยในโรงเรือนเพาะเห็ด

จากการนำเชื้อเห็ดที่คัดเลือกไว้สายพันธุ์ต่างๆที่ได้มาจากการเก็บตัวอย่างจากตลาดชุมชนในเขตภาคเหนือตอนบน มาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำมาขยายลงบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปเตรียมเป็นก้อนเชื้อ (spawn) แล้วเพาะเลี้ยงในโรงเรือนฟาร์มเพาะเห็ดโคนน้อยของเกษตรกรในเขตอำเภอสันป่าตอง และอำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่พบว่าเห็ดโคนน้อยทั้ง 6 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ 2A; สายพันธุ์ 2B; สายพันธุ์ K3; สายพันธุ์ K3.16; สายพันธุ์ Prao และสายพันธุ์ B5) ยังคงให้ผลผลิตดอกเห็ดที่ยังคงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเดิม ในรุ่นที่ 1 และ 2 คือ กลุ่มดอกเห็ดขนาดใหญ่ได้แก่สายพันธุ์ 2A 2B B5 และ Prao

และกลุ่มที่ให้ดอกเห็ดขนาดเล็ก ได้แก่สายพันธุ์ K3 และ K3.16 ดังแสดงในตารางที่ 11 และภาพที่ 40 และ 41

ตารางที่ 11 ลักษณะของดอกเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ต่างๆที่เพาะได้จากโรงเรือนเพาะเห็ด

กลุ่ม	สีของดอกเห็ด	ความยาวของก้าน	เส้นผ่านศูนย์กลางดอกเห็ด
Prao	ขาว	40-65 มม.	10 -15มม.
K3	ขาวปนเทา	20-35 มม.	7-10มม.
K3.16	ขาวปนเทา	20-35 มม.	7-10มม.
2A	เทา	40-65 มม.	10 -15มม.
2B	น้ำตาลปนเทา	40-65 มม.	10 -15 มม.
B5	น้ำตาลปนเทา	40-65 มม.	10 -15 มม.



ภาพที่ 40 การทดสอบการพัฒนาของดอกเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ต่างๆที่เจริญในโรงเพาะเห็ด



ภาพที่ 41 ดอกเห็ดโคนน้อยที่ได้จากการเพาะในโรงเรือนประกอบด้วยกลุ่มดอกเห็ดขนาดเล็ก และดอกขนาดใหญ่

อภิปรายผลการวิจัย

สายพันธุ์เห็ดโคนน้อยที่เพาะเป็นการค้าในปัจจุบัน ได้ถูกจำแนกชนิดว่าเป็น *Coprinus comatus* (หรือ *Coprinus comatus* var. *ovatus* (Schaeff. ex Fr.)) (นิฤมล, 2543) ซึ่งมีลักษณะดอกเห็ดค่อนข้างใหญ่ และ *Coprinus cinereus* (หรือ *Coprinus fimetarius* var. *cinereus* (Schaeff. ex Fr.) S.F. Gray) (วรพล, 2545) ที่มีขนาดของดอกเห็ดเล็ก อย่างไรก็ตามในสายพันธุ์ของสกุล *Coprinus* ยังพบว่ามีความหลากหลายในระดับสปีชีส์ จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 72 ไพรเมอร์ เพื่อคัดเลือกรหัสพันธุกรรมที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อระบุเอกลักษณ์ของสายพันธุ์เห็ดโคนน้อย พบว่ามี 6 สายพันธุ์ที่ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ สามารถบ่งชี้สายพันธุ์ของเห็ดโคนน้อยโดยที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมากกว่า 0.55 ขึ้นไปจะพบว่าสามารถแบ่งเห็ดโคนน้อยออกเป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่ม 1 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Prao กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A และ กลุ่มที่ 4 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B จากงานวิจัยนี้ การวิเคราะห์หลายพหุดีเอ็นเอโดยวิธี HAT-RAPD สามารถบ่งบอกความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอได้ โดยจากงานวิจัยแสดงว่า เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16 มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากที่สุด และจัดเป็นสายพันธุ์เดียวกัน ส่วนสายพันธุ์ Prao กับสายพันธุ์ B5 อยู่ในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงรองลงมา และพบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ต่างกันในกลุ่ม 2A และ 2B ซึ่งการจัดกลุ่มได้มาจากค่า similarity index ของแต่ละไพรเมอร์ จึงสามารถแยกสายพันธุ์ 2A (กลุ่ม 3) ออกจากสายพันธุ์ 2B (กลุ่ม 4) ได้ จึงเป็นไปได้ว่า 2A และ 2B เป็นเห็ดต่างสายพันธุ์กัน ในขณะที่สายพันธุ์ Prao กับสายพันธุ์ B5 มีโอกาสที่จะเป็นเห็ดสายพันธุ์เดียวกันได้ อย่างไรก็ตามสามารถแสดงให้เห็นผลชัดเจนเมื่อทำแผนภูมิความสัมพันธ์ของสายพันธุ์เห็ดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 7 ชนิดและดูค่า genetic similarity ของแต่ละสายพันธุ์ที่เปรียบเทียบกัน

จากการพิจารณาลักษณะทางกายภาพหรือสัณฐานวิทยา ในการจัดกลุ่มของเห็ดโคนน้อยออกเป็น 4 กลุ่มนั้นมีความสอดคล้องกับแหล่งพื้นที่เก็บตัวอย่าง เช่นสายพันธุ์ที่ได้มาจากส้มเก็บในตลาดชุมชน ในอำเภอต่างๆของจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่อำเภอสันป่าตอง อำเภอหางดง อำเภอพร้าว อำเภอเมือง และอำเภอแมริม มีถึง 22 ตัวอย่าง จากจำนวนทั้งหมด 49 ตัวอย่าง ที่มีความเหมือนทางสัณฐานวิทยา ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มดอกเห็ดขนาดเล็ก และกลุ่มที่ 2 และ 4 ซึ่งมีดอกเห็ดขนาดใหญ่ เช่นเดียวกับสายพันธุ์ที่มาจากจังหวัดลำพูน (15 ตัวอย่าง) ลำปาง (9 ตัวอย่าง) และแพร่ (2 ตัวอย่าง) ที่มีค่าความเหมือนทางสัณฐานวิทยาและ

จัดอยู่ในกลุ่มที่ 4 (2B) เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นตัวอย่างเห็ดจากจังหวัดน่านเพียง 1 ตัวอย่าง (2A) ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างจากตัวอย่างที่เก็บได้จากจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง และแพร่ กล่าวคือมีลักษณะของดอกเห็ดขนาดใหญ่กว่าจากแหล่งอื่นๆ อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของสายพันธุ์เห็ดโคนน้อยในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แพร่ และน่าน เท่าที่สามารถสุ่มเก็บตัวอย่างเห็ดโคนน้อยในตลาดชุมชนได้ (ในช่วงระยะเวลาทำการวิจัยนี้ ไม่สามารถสุ่มเก็บตัวอย่างเห็ดโคนน้อยจากตลาดชุมชนในจังหวัดเชียงราย พะเยา และแม่ฮ่องสอนได้ เพราะในช่วงที่ออกทำการเก็บตัวอย่างไม่พบว่ามีกรวางจำหน่ายของเห็ดโคนน้อยในพื้นที่ดังกล่าวเลย) น่าจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากแหล่งที่มาของหัวเชื้อเห็ดโคนน้อย น่าจะได้มาจากผู้ประกอบการผลิตหัวเชื้อเห็ดโคนน้อยในจังหวัดเชียงใหม่เป็นหลัก และการนำไปขยายหัวเชื้อเห็ดเองของผู้เพาะเห็ดบางรายทั้งนี้เนื่องจากการผลิตหัวเชื้อเห็ดโคนน้อยเองต้องอาศัยความชำนาญและการลงทุนเครื่องมือในการผลิตหัวเชื้อเห็ดค่อนข้างสูง เกษตรกรผู้เพาะเห็ดโคนน้อยส่วนใหญ่จึงนิยมสั่งหัวเชื้อเห็ดจากฟาร์มมากกว่า เพราะมีความเชื่อถือในสายพันธุ์ที่เพาะอยู่ในปัจจุบัน ที่มีความเหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมของภาคเหนือตอนบน

จากผลการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ K3 และ K3.16 พบว่าให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกันทุกประการ แต่เมื่อพิจารณาจากลักษณะของดอก พบว่ามีความแตกต่างในเรื่องของสี ซึ่งสายพันธุ์ K3 จะมีสีขาวปนเทาที่เข้มกว่าสายพันธุ์ K3.16 ในขณะที่รูปทรงและขนาดของดอกเห็ดใกล้เคียงกัน คือจัดอยู่ในกลุ่มดอกเห็ดขนาดเล็ก แสดงให้เห็นว่าลักษณะสัณฐานวิทยา ที่พิจารณาจากลักษณะที่ปรากฏไม่เพียงพอในการนำมาใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้เสมอไป เพราะเนื่องจากปัจจัยจากสภาพแวดล้อมมักมีอิทธิพลต่อการแสดงลักษณะที่ปรากฏของดอกเห็ดในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันเช่นเดียวกับที่พบในสิ่งมีชีวิตอื่นๆทั่วไป เช่นพืชปลูก และเห็ดอีกหลายชนิด ที่พบว่าอุณหภูมิ ชั่วแสง มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยา

งานวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิเคราะห์จากวิธี HAT-RAPD สามารถบ่งบอกความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอได้ โดยจากงานวิจัยแสดงว่า เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16 มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากที่สุดจนอาจจะระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกันซึ่งวิธี HAT-RAPD ดังกล่าวถูกนำมาใช้บ่งบอกความแตกต่างในพืชชนิด เช่นสาหร่ายเตา (พีระวุฒิ และคณะ, 2556) กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (นฤมล และคณะ, 2557) มะพร้าว (นภาพร และอนุชิตรา, 2555) และกล้วยไม้สกุลเข็มปีเดียม (Sharma *et al.*,

2013) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคRAPD ในกลุ่มเห็ดราเช่น *Agaricus* (Khush *et al.* 1992; Calvo-Bado *et al.* 2000), *Coprinus* (Ito *et al.* 1998), *Lentinula* (Chiu *et al.* 1996) และ *Volvariella* (Chiu *et al.* 1995) อย่างไรก็ตามการใช้สายพันธุ์เดิมอยู่ตลอดและอย่างต่อเนื่อง อาจทำให้ผลผลิตค่อยๆ ลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ เป็นเรื่องที่ซับซ้อนและควบคุมไม่ได้ ดังนั้น การผลิตเห็ดโคนน้อยเชิงการค้าควรมีสายพันธุ์ที่หลากหลาย เช่นเดียวกับเห็ดเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ โดยอาศัยการนำมาปรับปรุงสายพันธุ์ให้ฐานพันธุกรรมของเห็ดชนิดนี้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น โดยต้องมีการศึกษาลักษณะเด่น นำมาปรับปรุงพันธุ์ร่วมกับสายพันธุ์ที่มีในปัจจุบันที่เพาะกันอยู่ตามภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย เพื่อเป็นการรวมลักษณะที่ดีไว้เข้าด้วยกันในสายพันธุ์ใหม่ ในการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดจึงมีความจำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เห็ดที่จะนำมาปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งการพิจารณาแต่เพียงลักษณะภายนอก (phenotype) หรือใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา อาจไม่เพียงพอที่จะบ่งบอกว่าเป็นเห็ดที่ต่างสายพันธุ์กัน ในการที่จะนำมาคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์.

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนน้อยจากตลาดชุมชนในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน จำนวน 49 ตัวอย่าง และเมื่อนำมาจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถแบ่งเห็ดโคนน้อยออกเป็น 6 กลุ่มหรือ 6 สายพันธุ์ และวิเคราะห์สายพหุดีเอ็นเอของเห็ดโคนน้อยโดยการนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD (High annealing temperature-Random amplification polymorphic DNA) พบว่าไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบ polymorphic จำนวน 5 แถบขึ้นไป มีจำนวน 7 ไพรเมอร์คือ OPAA-03, OPAA-10, OPAJ-05, OPL-07, OPA-018, OPAH-10 และ OPU-05 และเมื่อนำสายพหุดีเอ็นเอไปวิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ (Cluster analysis) ใช้วิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA ได้ค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ โดยทั้ง 7 ไพรเมอร์ ให้ค่าดัชนีความเหมือน (similarity matrix) และแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) สอดคล้องกัน คือ ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมากกว่า 0.55 ขึ้นไปซึ่งผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า สายพันธุ์เห็ดโคนน้อยที่เพาะเป็นการค้าและวางจำหน่ายในตลาดชุมชนของพื้นที่ภาคเหนือตอนบน ที่นำมาวิเคราะห์สายพหุดีเอ็นเอ สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่ม 1 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับเห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ Proo กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ B5 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2A และ กลุ่มที่ 4 ได้แก่ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ 2B จากการวิเคราะห์สายพหุดีเอ็นเอโดยวิธี HAT-RAPD สามารถบ่งบอกความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอได้ โดยจากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3 กับ เห็ดโคนน้อยสายพันธุ์ K3.16 มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากที่สุด และสามารถระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกัน

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป

ในการที่ต้องการระบุชี้ชัดว่า สายพันธุ์เห็ดที่นำมาศึกษาเป็นเห็ดสายพันธุ์เดียวกันหรือไม่ และมีความหลากหลายในระดับของสายพันธุ์ของเห็ดโคนน้อยในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนอาจมีความจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนซ้ำของตัวอย่างสำหรับศึกษาด้านระดับชีวโมเลกุล แต่ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ต้องการจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดโคนน้อยหรือเห็ดถั่วที่เพาะในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน โดยนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลมาช่วยในการจำแนกนอกเหนือไปจากเดิมที่มีการระบุสายพันธุ์ตามลักษณะภายนอกที่ปรากฏ ซึ่งอาจไม่เพียงพอในการจำแนกหรือระบุว่าเป็นสายพันธุ์ชนิดเดียวกัน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเปรียบเทียบกับเห็ดโคนน้อยสาย

พันธุ์ต่างๆของประเทศไทย ซึ่งการเพาะเห็ดโคนน้อยหรือเห็ดถั่วนี้มีการเพาะกันทั่วไปอย่างแพร่หลายตามภูมิภาคต่างๆของประเทศ ดังนั้นย่อมจะต้องมีความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลักษณะของดอกเห็ดที่มีการเพาะตามภูมิภาคต่างๆก็มีความแตกต่างทางลักษณะสัณฐานวิทยาอย่างเห็นได้ชัด ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของขนาดของดอก สี และรวมไปถึงรสชาติ ทั้งนี้เนื่องมาจากสภาพแวดล้อมและวัสดุในการเพาะเห็ด ซึ่งในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือมักใช้ฟางข้าวและกากถั่วเหลืองเป็นวัสดุเพาะเป็นส่วนใหญ่ บางพื้นที่อาจใช้ขี้วัวโคตหมักเป็นวัสดุเพาะ หรือภาคกลางอาจใช้ผักตบชวา ภาคใต้ใช้เศษทะเลลายปาล์มน้ำมัน มาใช้เป็นวัสดุเพาะเหล่านี้เป็นต้น นอกจากนี้สภาพแวดล้อมและภูมิอากาศก็มีส่วนทำให้ดอกเห็ดโคนน้อยมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ทั้งที่ อาจจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน หรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ข้อมูลทางพันธุกรรมจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์เห็ด เพื่อให้เห็ดชนิดนี้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น โดยนำลักษณะเด่นจากแต่ละพันธุ์ที่แตกต่างกันมาปรับปรุงเป็นสายพันธุ์ใหม่ให้รวมลักษณะที่ดีต่างๆเอาไว้ด้วยกัน โดยไม่ต้องเกิดความสับสนจากการนำสายพันธุ์ชนิดเดียวกันมาปรับปรุงเพราะขาดข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของเห็ดชนิดนั้นๆ เพียงเพราะคัดเลืออกจากสายตาโดยพิจารณาจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

การศึกษาลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างเห็ดโคนน้อยในอนาคตจากพื้นที่เพาะตามแหล่งต่างๆของประเทศไทย ในการสำรวจนั้นควรนำจำนวนประชากรจากตัวอย่างของแต่ละแหล่งที่เก็บมาศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งในการศึกษาควรมีตัวอย่างประชากรจากแต่ละแหล่งที่เก็บมากกว่า 1 ตัวอย่างมาตรวจสอบเพื่อดูความแตกต่างของทั้งสายพันธุ์และแหล่งเก็บว่ามีความสอดคล้องกันหรือไม่อย่างไร จึงจะสามารถบ่งบอกถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมและการกระจายตัวของเห็ดโคนน้อยทั้งประเทศ

บรรณานุกรม

- เกษม สร้อยทอง.2537. เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. อุบลราชธานี, โรงพิมพ์ศิริธรรมออฟเซ็ท
- จิราพร นิลฉวี. 2546. การศึกษาสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus* โดยเทคนิค PCR/RFLP. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.
- นิคมล สิมปิโชติพงษ์.2543. ผลของอุณหภูมิและแสงต่อการเจริญเติบโตและการสลายตัวของเห็ดโคนน้อย. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นฤมล ธนानันต์, สฐิตพร โทมัสโสภา และธีรชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี, วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 99-108.
- นภาพร แก้วดวงดี และอนุชรา แซ่ตั้ง, 2555, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มะพร้าว, วารสารก้าวหน้าโลกวิทยาศาสตร์ 12(1): 108-120.
- บรรณ บุรณะชนบท. 2547. คู่มือเพาะเห็ด. เพ็ท-แพลัน พับลิชชิง. กรุงเทพฯ. 278 หน้า.
- พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์ และยุวดี พีระพรพิศาล, 2556, ความสัมพันธ์เชิงนิเวศวิทยาและสัณฐานวิทยาภาพของสาหร่ายเตา *Spirogyra* sp. ในภาคเหนือของประเทศไทย, วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา 8(1):1-8.
- พรพันธ์ ภู่อ้อมพันธ์, 2538. เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ เรื่องการตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ isozyme pattern และ RAPD ครั้งที่ 1 ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนเพาะปลูกทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. น. 29-60.
- ยงยศ ส้าราญสุข. 2545. การจำแนกสายพันธุ์สตรอบอรี่โดยวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- วรพล สุรพัฒน์. 2545. ผลของแสงต่อการผลิตเห็ดโคนน้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. โรงพิมพ์นันทชัย, กรุงเทพฯ. 275 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540. การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคทาง

- ชีวโมเลกุล ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต วันที่ 19-23 พฤษภาคม 2540.
- สลักษณ์ ภัสสรอาภา.2541. การศึกษาเทคนิคการเพาะเห็ดถั่วเหลือง. ปัญหาพิเศษ
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อานนท์ เอื้อตระกูล. 2518. การเพาะเห็ดถั่ว.วารสารพืชสวน,11: 19 – 31.
- อานนท์ เอื้อตระกูล.2541. การเพาะเห็ดโคนน้อย(เห็ดถั่ว).กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์คมชัด.
- Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K. and Sussman, A. S. (Editors). 1973. The Fungi. An
Advanced Treatise. Vol. IV B: A Taxonomic Review with Keys: Basidiomycetes
and Lower Fungi. XXII, Academic Press.
- Allen M., Peissel, M. 1993. The encyclopedia of danger : Dangerous plants and
mushrooms. New York, Chelsea House Publisher.
- Al Zahim, M. A., Ford Lloyd, B. V., Newbury, H. J. 1999. Detection of somaclonal
variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell
Reports. 18: 473-477.
- Anuntalabhochai, S., Chandet, R., Chiangda, J. and Apavatjirut, P., 2000, Genetic diversity
within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis, Acta Hort. 575:
253-259.
- Arora D. 1986. Mushrooms Demystified: A Comprehensive Guide to the Fleshy Fungi
(2nd edition). Berkeley: Ten Speed Press.
- Bassiri,A. 1976. Barley cultivar identification by use of isozyme electrophoresis pattern.
Can. J. Plant Sci. 56: 1-6.
- Benjamin, D.R. 1995. Mushrooms : Poison and panaceas : A handbook for naturalists,
mycologists and physicians. New York, W.H. Freeman and Company.
- Bowers, J.E., Bandman,E.B. and Meredith.C.P. 1993. DNA fingerprint characterization of
some wine grape cultivars. Amer. J. Enol. Viticult. 44(3): 266-274.
- Bresinky, A. and Besel, H. 1990. A colour atlas of poisonous fungi. London, Wolfe
Publishing.
- Burnouf, T. and Bietz, J. A. 1987. Identification of wheat cultivars and prediction of quality
by reverse-phase high-performance liquid chromatographic analysis of endosperm
storage proteins. Seed Sci. Technol. 15: 79-99.

- Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J. and Gresshoff, P. M. 1991. DNA fingerprint using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio-Technology* 9: 553–557.
- Calvo-Bado L., Noble R., Challen, M., Dobrovin-Pennington, A., Elliott, T. 2000. Sexuality and genetic identity in the *Agaricus* section *Arvenses*. *Appl Environ Microbiol.* 66:728–734.
- Casselto, L.A. 1995. Genetics of *Coprinus*. In *The Mycota ; a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research; II genetics and biotechnology*, Berlin, Springer-Verlag.
- Chiu, S.W., Chen, M.J., Chang, S.T. 1995. Differentiating homothallic *Volvariella* mushrooms by RFLPs and AP-PCR. *Mycol Res*, 99:333–336
- Chiu, S.W., Ma, A., Lin, F., Moore, D., Chiu, S.W., Ma, A.M., Lin, F.C. 1996. Genetic homogeneity of cultivated strains of shiitake (*Lentinula edodes*) used in China as revealed by the polymerase chain reaction. *Mycol Res*, 100:1393–1399.
- Coldwell, B.B., Genest, K. and Hughes, D.W. 1969. Effect of *Coprinus atramentarius* on the metabolism of ethanol in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 21: 176 – 179.
- Cooke, R.C. and Whipps, J.M. 1993. *Ecophysiology of fungi*. London, Blackwell Sci. Pub.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- García-Vallvé, S., Palau, J. and Rowmieu, A. 1999. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1125–1134.
- Heebkaew, R., Saksirirat, W., Sirithorn, P. and Thummabenjapone, P. 2004. DNA fingerprinting of straw mushroom [(*Volvariella volvacea* Bull.ex.Fr.) Sing] in Thailand. The IV Asia-Pacific Mycological Congress & The IX International Marine and Freshwater Mycology Symposium. Chiang Mai, Thailand : November, 14–19, 2004.
- Hubbard, M., Kelly, J., Rajapakse, S., Abbott, A. and Ballard, R. 1992. Restriction fragment length polymorphism in rose and their use for cultures of peach. *Plant Cell Reports* 16: 624–627

- Ito, Y., Fushimi, T. and Yanagi, S.O. 1998. Discrimination of species and strains of Basidiomycetegenus *Coprinus* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Mycoscience*, 39:361–365
- Jeffrey, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L. 1985. Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature* 316:76–77.
- Khush RS, Becker E, Wach, M. 1992. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol* 58:2971–2977
- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J.M. and Gessler, C. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85:901–904.
- Kresovich, S., William, J.G.K., McFerson, J.R., Routman, E.J. and Schaal, B.A. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.* 85: 190–196.
- Ku, H.L. and Henry, R.J. 1996. Distinction of *Ozothamnus diomifolius* (Vent.) DC genotype using RAPD. *Hort Science* 31: 858–861
- Ladizinsky, G. and Hymowitz, T. 1979. Seed proteins electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.* 54: 145–151.
- Lo'pez-Valenzuela, J.A., Martinez, O and Paredes-Lopez, O. 1997. Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers. *Hort Science* 32(6): 1105–1108.
- Lu, Z.X., Reighard, G.L. and Baird, W.V. 1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. *Hort Science* 31: 127–129.
- Mailer, R.J., R. Scarth and B. Fritensky. 1994. Discrimination among cultivars rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 697–704.
- Moser, M. 1978. Keys to Agarics and Boleti. (English edition, 1983). Roger Phillips
- Meyer, J.H. Herlcoher, J.E. and Parisian, J. 1971. Esophageal rupture after mushroom–alcohol ingestion. *New England Journal of Medicine*, 285: 1323–1327.
- Muruke, M.H.S., Kivasi, A.K. and Magingo, F.S.S. 2002. Identification of mushroom mycelia using DNA techniques. *Tanzania Journal of Science*. 28(1): 115 –128.

- Payapanon, A. and Hiranpradit, S. 2004. Genetic difference analysis in *Volvariella* spp. By RAPD technique. The IV Asia-Pacific Mycological Congress & The IX International Marine and Freshwater Mycology Symposium. Chiang Mai, Thailand : November, 14–19, 2004.
- Sharma, S.K., Dawson, I.K. and Waugh, R. 1995. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 91:647–654.
- Sharma, S.K., Kumaria, S., Tandon, P. and Rao, S.R., 2013, Assessment of genetic variation and identification of species-specific ISSR markers in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae), *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 22: 250–255.
- Shah, F.H., Rashid, O., Simons, A.J. and Dunsdon, A. 1994. The utility of RAPD marks of the determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Theor. Appl. Genet.* 89:713–718.
- Stegemann, H. 1984. Retrospect on 25 years of cultivar identification by protein patterns and prospects for the future. *Seed Sci. Technol.* 15:20–31.
- Thormann, C.E. and Osborn, T.C. 1992. Use of RAPD and RFLP markers for germ plasm evaluation. *In: Application of RAPD Technology to Plant Breeding.* Joint Plant Breeding Symp. Ser. Crop Sci. Amer. Soc. Hort Sci., and Amer. Genet. Assn., Minneapolis, 1 Nov. 1992. P. 9–11.
- Weeden, N.F. 1991. Chromosomal organization and gene mapping. *In: Advances Methods in Plant Breeding and Biotechnology.* Edited by Murray, D. CAB Intt, Wallingford, U.K. p. 23–45.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213–7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism applied by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531–6535.
- Wilkie, S.E., Isaac, P.G. and Slater, R.J. 1992. Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*, *Theor. Appl. Genet.* 86: 497–504.
- Ying, J. 1987. Icons of medicinal fungi. Beijing, Science Press.

ภาคผนวก

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับการเตรียมตัวอย่างเห็ดและตรวจสอบ

- 1.1 อาหารเพาะเชื้อ เช่น potato dextrose agar(PDA)
- 1.2 ถังพลาสติกเก็บตัวอย่างขนาดต่างๆ
- 1.3 จานเลี้ยงเชื้อและหลอดแก้วเก็บรักษาเชื้อ
- 1.4 อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา
- 1.5 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound microscope และ Stereomicroscope

2. อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

เครื่องมือและอุปกรณ์

- 2.1 ช้อนตักสาร
- 2.2 เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (water bath)
- 2.3 ตู้ดูดควัน
- 2.4 โถสำหรับบดละเอียดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว
- 2.5 แท่นวางหลอดสำหรับลอยน้ำ
- 2.6 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C
- 2.7 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ -20°C
- 2.8 ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 4°C
- 2.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
- 2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ
- 2.11 เครื่องปรับความร้อน
- 2.12 เครื่อง spin down
- 2.13 เครื่อง vortex
- 2.14 Microwave
- 2.15 PX2 Thermal Cycler (PCR machine)
- 2.16 pH meter
- 2.17 Autoclave
- 2.18 เครื่องเครื่องชั่งสาร 2 ตำแหน่ง
- 2.19 เครื่องเครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง

- 2.20 เครื่องปั่นเจล
- 2.21 อุปกรณ์ปั่นเจล
- 2.22 กระดาษทิชชู
- 2.23 กล้องโฟมใส่น้ำแข็ง
- 2.24 ขวดน้ำกลั่น
- 2.25 ถังพลาสติก
- 2.26 ยางรัด
- 2.27 Aluminium foil
- 2.28 Auto pipette ขนาด 0.1 μ l, 2–20 μ l, 20–200 μ l, 100–1000 μ l
- 2.29 Beaker ขนาด 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml
- 2.30 Duran ขนาด 50 ml, 100ml, 250 ml, 500ml
- 2.31 Erlenmeyer flask
- 2.32 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- 2.33 PCR tube ขนาด 0.2 ml
- 2.34 Paraffin film
- 2.35 Pipette Tip ขนาด 0.1–10 μ l, 20–200 μ l, 100–1000 μ l
- 2.36 ที่วางหลอดขนาดต่างๆ (Rack)
- 2.37 Volumetric flask

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- 2.38 0.7M NaCl
- 2.39 10mM EDTA pH=8.0
- 2.40 50mM TrisHCl pH=8.0
- 2.41 4% CTAB
- 2.42 1.5% PVPP
- 2.43 20mM β -mercaptoethanol
- 2.44 RNase
- 2.45 Dionizewater

สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

- 2.46 Operon theory Primer (0.5 μ g/ μ l)
- 2.47 10X buffer H

- 2.48 DNA template
- 2.49 dNTPs mix
- 2.50 Taq DNA Polymerase
- 2.51 Deionize water

สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis

- 2.52 Agarose powder
- 2.53 Autoclaved distilled water
- 2.54 6X loading dry
- 2.55 TBE buffer
- 2.56 Ethidium bromide (10 mg/ml)

การเตรียมสารเคมี

1. ส่วนประกอบของ DNA Extraction Buffer

ลำดับที่	สารเคมี
1.	0.7 M NaCl
2.	10mM EDTA pH = 8.0
3.	50mM Tris-HCl pH = 8.0
4.	4% CTAB
5.	1.5% PVPP
6.	20mM β -mercaptoethanol
7.	100 μ g/ml RNase
8.	Deionized Water

2. การเตรียมเจล

การเตรียม 0.8% agarose gel

ละลาย agarose powder 0.4 g ใน TBE buffer ปริมาตร 50 ml ใส่ลงใน flask ขนาด 100 ml นำไปอุ่นให้ละลายจนหมด จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนเจลอุ่นประมาณ

60°C จากนั้นเทลงบนชุดประกอบเจลและใส่หวีเสียบ (comb) จากนั้นรอให้เจลแข็งตัวประมาณ 10–15 นาที

3. การเตรียม 5X TBE buffer

ส่วนประกอบ	Tris-base	54 g
	Boric acid	27.5 g
	EDTA	4.65 g
	Autoclaved distilled water	1000 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียม TE buffer

ส่วนประกอบ	Tris-base	40 mM
	EDTA	2 mM

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย glacial acetic acid นำไปหนึ่งชั่วโมงด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5. การเตรียม Gel loading buffer (6X)

ส่วนประกอบ	Bromophenol blue	0.5%
	Xylene cyanol	0.25%
	Glycerol	30%

ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บรักษาในตู้เย็น 4 °C

6. การเตรียม 10% Ethidium bromide (10 mg/ml)

เติม Ethidium bromide 10 µl ลงในน้ำกลั่น 100 ml ผสมให้เข้ากัน ห่อภาชนะบรรจุด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ข้อควรระวัง Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็งที่มีพลังงานมาก และมีความเป็นพิษปานกลาง ควรสวมถุงมือเมื่อทำงานที่เกี่ยวข้องกับสารชนิดนี้ เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกาย

7. วิธีการวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis

- 1) เตรียม agarose ความเข้มข้น 0.8% หรือ 1% โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1X TBE buffer จากนั้นนำไปต้มให้ละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนเจลอุ่นประมาณ 60°C

- 2) ทำความสะอาดถาดเจลและหวีเสียบ (comb) ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำถาดเจลประกบเข้ากับบล็อก
- 3) วางหวีเสียบลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ สำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่สนใจ
- 4) เท agarose ลงบนถาดที่เตรียมไว้โดยให้ความหนาประมาณ 3–5 mm ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
- 5) นำถาด agarose gel ออกจากบล็อก จากนั้นวางถาดลงในอ่าง electrophoresis โดยให้ด้านที่มีหวีเสียบอยู่ทางซ้าย แล้วเท 1X TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น agarose gel โดยให้ระดับ 1X TBE buffer อยู่เหนือผิวเจลประมาณ 1–3 mm ตั้งหวีเสียบออก
- 6) ผสม 6X loading dye เข้ากับตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแล้วค่อยๆ หยดลงในช่องที่เกิดจากหวีเสียบ
- 7) ปิดฝาอ่าง electrophoresis แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 60 – 100 นาที หรือเมื่อแถบสีด้านล่างของ 6X loading dye เคลื่อนที่ไปอยู่อีกปลายด้านหนึ่งของเจล โดยห่างจากด้านล่างของถาดประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- 8) ทำการย้อมดีเอ็นเอโดยนำแผ่น agarose gel ไปแช่ใน Ethidium bromide นาน 10 นาที จากนั้นย้ายไปแช่น้ำสะอาดอีก 5 นาที เพื่อล้าง Ethidium bromide ส่วนเกินออก นำแผ่น agarose gel ไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่อง UV transilluminator พร้อมบันทึกภาพ

ตารางภาคผนวกที่ 1 โพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

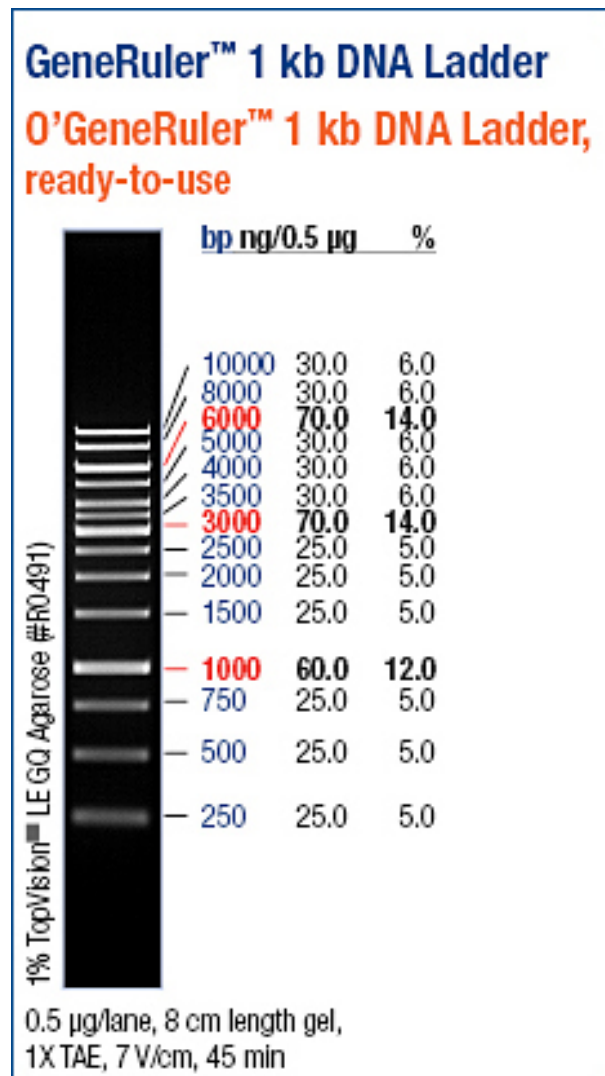
ที่	Primers	Sequence	Phenotype	No. of polymorphic bands
1	OPAT-07	ACTGCGACCA	Not amplified	0
2	OPAJ-01	ACGGGTCAGA	Not amplified	0
3	OPF-14	TGCTGCAGGT	Not amplified	0
4	OPAG-12	CTCCCAGGGT	Not amplified	0
5	OPAI-20	CCTGTTCCT	Not amplified	0
6	OPAR-07	TCCTTCGGTG	Not amplified	0
7	OPAI-04	CTATCCTGCC	Not amplified	0
8	OPAA-03	TTAGCGCCCC	Amplified	5
9	OPAJ-16	TCTGGACCGA	Not amplified	0
10	OPAA-02	GAGACCAGAC	Not amplified	0
11	OPAT-08	TCCTCGTGGG	Not amplified	0
12	OPAI-19	GGCAAAGCTG	Amplified	0
13	OPAO-09	CCAGATGGGG	Not amplified	0
14	OPAJ-02	TCGCACAGTC	Not amplified	0
15	OPAN-13	CTCCAGGAC	Not amplified	0

Sl. No.	Primers	Sequence	Phenotype	No. of polymorphic bands
16	OPAR-05	CATACCTGCC	Not amplified	0
17	OPAA-10	TGGTCGGGTG	Amplified	5
18	OPAJ-04	GAATGCGACC	Not amplified	0
19	OPAR-09	GGGGTGTCT	Not amplified	0
20	OPAD-08	GGCAGGCAAG	Amplified	0
21	OPAT-10	ACCTCCGGTC	Not amplified	0
22	OPAT-03	GACTGGGAGG	Not amplified	0
23	OPAJ-05	CAGCGTTGCC	Amplified	5
24	OPF-17	AACCCGGGAA	Not amplified	0
25	OPAD-03	TCTCGCCTAC	Not amplified	0
26	OPL-07	AGGCGGGAAC	Amplified	5
27	OPAD-09	TCGCTTCTCC	Not amplified	0
28	OPAO-18	GGGAGCGCTT	Amplified	8
29	OPAH-07	CCCTACGGAG	Not amplified	0
30	OPAP-12	GTCTTACCCC	Not amplified	0
31	OPAK-13	TCCCACGAGT	Not amplified	0

क्र.सं.	Primers	Sequence	Phenotype	No. of polymorphic bands
32	OPAP-06	GTCACGTCTC	Not amplified	0
33	OPAQ17	TTCGCCTGTC	Not amplified	0
34	OPAD-04	GTAGGCCTCA	Not amplified	0
35	OPAJ-20	ACACGTGGTC	Amplified	0
36	OPAV-07	CTACCAGGGA	Not amplified	0
37	OPAP-14	TGCCATGCTG	Not amplified	0
38	OPAD-07	CCCTACTGGT	Not amplified	0
39	OPJ-06	TCGTTCCGCA	Amplified	0
40	OPAE-03	CATAGAGCGG	Not amplified	0
41	OPAH-10	GGGATGACCA	Amplified	5
42	OPAJ-18	GGCTAGGTGG	Not amplified	0
43	OPY-16	GGGCCAATGT	Not amplified	0
44	OPAK-01	TCTGCTACGG	Not amplified	0
45	OPAT-02	CAGGTCTAGG	Not amplified	0
46	OPAR-15	ACACTCTGCC	Not amplified	0
47	OPAQ-07	GGAGTAACGG	Not amplified	0

Sl. No.	Primers	Sequence	Phenotype	No. of polymorphic bands
48	OPAR-04	CCAGGAGAAG	Not amplified	0
49	OPU-05	TTGGCGGCCT	Amplified	5
50	OPF-11	TTGGTACCCC	Not amplified	0
51	OPAD-06	AAGTGCACGG	Not amplified	0
52	OPF-03	CCTGATCACC	Not amplified	0
53	OPAA-017	GACCGCTTGT	Amplified	2
54	OPC-016	CACATCCAG	Amplified	1
55	OPH-014	ACCAGGTTGG	Amplified	1
56	OPH-019	CTGACCAGCC	Amplified	3
57	OPH-010	CCTACGTCAG	Amplified	2
58	OPAH-011	CTCCCGCAGT	Amplified	3
59	OPD-016	AGGGCGTAAG	Amplified	4
60	OPD-019	CTGGGACTT	Amplified	3
61	OPAD-014	CTCCCCAAG	Amplified	1
62	OPAD-015	CTGGGGACTT	Amplified	2
63	OPAD-020	ACCCGGTCAC	Amplified	3

Sl. No.	Primers	Sequence	Phenotype	No. of polymorphic bands
64	OPAH-0-12	ACGCGCATGT	Amplified	3
65	OPAH-015	AATGGCGCAG	Amplified	3
66	OPAH-017	CACTCTCCTC	Amplified	1
67	OPAI-08	TTTGCCCGGT	Amplified	3
68	OPAI-014	TGACGGCGGT	Amplified	2
69	OPAH-011	CTTCCGCAGT	Amplified	2
70	OPJ-010	CCCGGCATAA	Amplified	2
71	OPJ-04	CCGAACACGG	Amplified	4
72	OPAJ-07	CCTCTCGACA	Amplified	2



ภาพขนาดของแถบดีเอ็นเอของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบในงานวิจัย

ขั้นตอนการเพาะเห็ดโคนน้อย (เห็ดถั่ว) ในโรงเรือน

1. การหมักวัสดุสำหรับขยายเชื้อและการทำก้อนเชื้อเห็ดโคนน้อย

ขั้นตอนหมักวัสดุประกอบด้วย

- เปลือกถั่วเหลือง 10 กระสอบปุย
- ฟางข้าว(จากข้าวเหนียว)ตัดเป็นท่อนๆ ขนาด 1 – 1 นิ้วครึ่ง จำนวน 1 เชง
- ปุ๋ยยูเรีย 2-3 ซีด (200-300 กรัม) หรือปุ๋ยพวกแคลเซียมไนเตรท (CaNO_3) สูตร 15-0-0(อัตรา 1.5 -2 กิโลกรัมต่อน้ำ 200 ลิตร)
- ปูนขาว ครึ่งกิโลกรัม

วิธีการหมักให้นำเปลือกถั่วเหลืองที่ควรบดหรือไม่ก่อนแล้วนำมาผสมกับฟางข้าวที่ตัดเป็นท่อนๆ แล้วมากองรวมกันบนพื้นซีเมนต์ แล้วใช้บัวรดน้ำผสมปุ๋ยยูเรีย รดบนกองวัสดุ ใช้คราดหรือจอบพลิกกองไปมาเพื่อผสมให้เข้ากันจนกองวัสดุนั้นเปียกและอ่อนตัวได้ที่ แล้วจึงนำพลาสติกมาคลุมกองวัสดุ โดยคลุมปิดให้สนิท ทิ้งไว้ประมาณ 3 วัน แล้วกลับกองวัสดุทุกๆวัน โดยคลุมพลาสติกไว้ตามเดิม จนกระทั่งทิ้งไว้อย่างน้อย 7 วัน จึงจะนำมาใช้ได้

ขั้นตอนการเตรียมก้อนเชื้อเห็ด

- ถังพลาสติกชนิดทนร้อนขนาด 6 ½ – 12 ½ นิ้ว
- รำละเอียด 5 กิโลกรัม
- ลำสาลี
- คอขวด
- ยางรัด
- กระดาษปิดปากขวด

นำวัสดุ(เปลือกถั่วเหลือง+ฟางข้าว)ที่หมักเรียบร้อยแล้ว โดยให้สังเกตว่าไม่มีกลิ่นแอมโมเนียเหลืออยู่ ผสมกับรำละเอียดให้ทั่วและเข้ากันดี นำไปบรรจุในถังพลาสติก โดยอัดวัสดุให้แน่นพอประมาณ ใส่คอขวด รัดยาง อุดจุกด้วยลำสาลีแล้วใช้กระดาษปิดปากคอขวด จากนั้นนำไปทิ้งในหม้อน้ำลวกทิ้ง ใช้เวลาหนึ่งประมาณ 2-3 ชั่วโมง ถังที่บรรจุวัสดุสำหรับทำก้อนเชื้อที่ผ่านการนึ่งเรียบร้อยแล้วปล่อยให้เย็นและจะถูกนำไปหยอดหัวเชื้อเห็ดที่เลี้ยงไว้บนเมล็ดข้าวฟ่างที่เตรียมไว้ โดยหยอดเมล็ดข้าวฟ่างที่มีหัวเชื้อเห็ดลงถังก้อนเชื้อนี้ ประมาณ 2 – 3 เมล็ด ต่อถัง บ่มไว้จนกระทั่งเชื้อเห็ดเจริญเป็นเส้นใยเต็มถังก้อนเชื้อ โดยปกติใช้เวลาประมาณ 10 – 12 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ

2. การเพาะเพื่อผลิตดอกเห็ดโคนน้อย

เป็นการนำเชื้อเห็ดที่เจริญเต็มทีภายในก้อนเชื้อมาใช้โรยลงในวัสดุเพาะ (ก้อนฟางหรือมัดฟาง) เพื่อใช้ผลิตดอกเห็ดซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ใช้ฟางแห้ง (จากข้าวเหนียว) มัดเป็นท่อนขนาด 30 x 60 เซนติเมตร
 2. ต้มน้ำในถัง (ถังน้ำมัน 200 ลิตร ที่ผ่า 3 ใน 4) เติมน้ำเชื้อเห็ดโคนน้อย 1 ถัง (หรือปุ๋ยเห็ดฟาง) ต้มน้ำจนเดือดเป็นไอขึ้นมา
 3. นำฟางแห้งลงแช่หรือลวกจนกระทั่งฟางนิ่ม แล้วทิ้งไว้ให้เย็น
 4. เตรียมเชื้อเห็ดโคนน้อย โดยนำถุงก้อนเชื้อที่เตรียมไว้ที่มีเส้นใยเดินเต็มถุง นำมาขยี้ให้แตก ผสมรำละเอียดประมาณ 1 กำมือ แป้งข้าวเหนียว 1 ช้อนแกง อาหารสูตร 201 2 ช้อนแกง
 5. นำฟางข้าวที่เตรียมไว้จากข้อ 3 มาเรียงในกระบะไม้หรือโลหะที่เตรียมเป็นแม่พิมพ์ขนาด 30 x 50 – 60 x 30 เซนติเมตรเรียงฟางชั้นที่ 1 ให้โรยเชื้อเห็ดให้ทั่ว ชั้นที่ 2 และ 3 ให้โรยเชื้อเห็ดรอบๆ หรือด้านข้าง ชั้นที่ 4 โรยเชื้อเห็ดให้ทั่ว ทำทั้งหมด 4 ชั้น มัดหัวท้ายด้วยเชือกฟาง
 6. นำฟางที่มัดแล้วเข้าไปเก็บในโรงเรือน รักษาอุณหภูมิ 37 – 40 องศาเซลเซียส โดยให้ความชื้นสัมพัทธ์ 75 – 90 % ถ้าหากผิวมัดฟางแห้ง ให้ฉีดน้ำพ่นให้ทั่วจนชื้น
- เห็ดโคนน้อยจะเริ่มออกดอกเห็ดให้เก็บผลผลิตได้ประมาณ 5 – 6 วันหลังจากที่นำมัดฟางไปเก็บไว้ในโรงเรือน และจะทยอยเก็บดอกเห็ดได้ติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลาประมาณ 20 ถึง 30 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศว่าเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของดอกเห็ด

สถานที่เพาะเห็ดโคนน้อย ส่วนใหญ่จะนิยมเพาะในโรงเรือนขนาดเริ่มตั้งแต่ 4 x 6 เมตร ซึ่งจะสามารถจุก้อนเชื้อได้ประมาณ 70-100 ก้อน กรณีที่ไม่มีโรงเรือน ก็สามารถทำบนพื้นดินไถด้นไม้ก็ได้แต่จะให้ผลผลิตไม่ค่อยดีเท่าที่ควร เนื่องจากจะใช้พลาสติกคลุมกองเอาไว้ ทำให้การรักษาอุณหภูมิภายในกองและการพัฒนาเป็นดอกเห็ดสู้ในสภาพการเพาะแบบโรงเรือนไม่ได้ แต่ถ้าโรงเรือนหากอยู่กลางแจ้งและสัมผัสกับแดดโดยตรง จะทำให้อุณหภูมิในโรงเรือนสูงมากเกินไป ส่งผลให้เชื้อเห็ดได้รับอันตราย ก้อนเห็ดจะแห้งและดอกเห็ดจะไม่ค่อยเกิด เพราะฉะนั้นความชื้นควรมีอย่างสม่ำเสมอ สถานที่ตั้งของโรงเรือนควรปลูกอยู่ระหว่างต้นไม้โดยให้มีแสงแดดรำไร อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเห็ดโคนน้อย ควรปรับสภาพให้อยู่ระหว่าง 28 °C – 35 °C