รายงานผลการวิจัย

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การรวบรวมและจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมที่เพาะเพื่อการค้าด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

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

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2552

จำนวนเงิน 63,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาว เรือนแก้ว ประพฤติ

ผู้ร่วมโครงการ นาย ปรีชา รัตนัง

งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

29 มกราคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
อุปกรณ์และวิธีการ	5
ผลการทดลอง	9
วิจารณ์ผล	19
สรุป	24
อ้างอิง	27
ภาคผนวก	29

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชื่อไพรเมอร์, ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณ, จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด, จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน และเปอร์เซ็นต์การเกิดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน	10
2	ชื่อไพรเมอร์, ชื่อตัวอย่างที่พบดีเอเอ็นที่จำเพาะ และขนาดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ	11
3	ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม similarity coefficient	18

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ R3	12
2	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ S2	12
3	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ S3	13
4	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ S12	13
5	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ S2	14
6	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ R5	14
7	รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ S5	15
8	แผนภูมิแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (phylogenic tree)	17
9	ตัวอย่างดอกเห็ดหอมสายพันธุ์จากผู้ใหญ่มิตร	25
10	ตัวอย่างดอกเห็ดหอมสายพันธุ์จากคุณวิไลวรรณ	25
11	ตัวอย่างดอกเห็ดหอมสายพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ	26

คำนิยม

โครงการวิจัยฯ นี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2552 ผ่านคณะกรรมการการวิจัย และสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
ทางผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณเจ้าของฟาร์มเห็ดหอมทุกๆท่านที่กรุณาเอื้อเฟื้อเชื้อเห็ดหอม ข้อมูลหรือข้อเสนอแนะที่ได้แลกเปลี่ยนเรียนรู้ด้วยกัน นับว่าเป็นสิ่งที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยอย่างมาก ขอบคุณอีกครั้งสำหรับน้ำใจไมตรี และของฝากกลับบ้านที่มีให้พวกเราตลอดเส้นทาง

ขอบคุณพี่แดง ห้องทำหัวเชื้อเห็ด สาขาพืชผัก ที่อำนวยความสะดวกและให้โอกาสแก่ผู้วิจัยเข้าไปแวะเวียน เรียนรู้และใช้โรงเรือนเพาะเห็ดเป็นห้องเรียนได้ทุกเวลา

ผู้วิจัย

29 มกราคม 2552

การรวบรวมและจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมที่เพาะเพื่อการค้า ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

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

เรือนแก้ว ประพฤติ[1] และ ปรีชา รัตนัง[2]

RUEANKAEW PRAPHRUET PRICHA RATTANANG

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพและสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์

[2] สาขาพืชผัก ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

เห็ดหอมสายพันธุ์ที่เพาะเพื่อการค้าจำนวน 43 ตัวอย่าง ที่เพาะในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำปางและลำพูน ได้ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์และแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี สกัดดีเอ็นเอจากส่วนของดอกเห็ดสดดอก จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 27 ไพรเมอร์ พบว่าให้แถบดีเอ็นทั้งหมด 178 แถบมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 99 แถบ คิดเป็น 55.62 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามี 10 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในบางสายพันธุ์เท่านั้น สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกสายพันธุ์เห็ดหอม 4 สายพันธุ์ออกจากตัวอย่างอื่นได้อย่างชัดเจน ได้แก่ สายพันธุ์ของโครงการหลวงหมอกจ๋าม, สายพันธุ์ของผู้ใหญ่มิตร, สายพันธุ์ของคุณวิไลวรรณ และสายพันธุ์จากคุณอนุชิต จากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.311 – 0.963 นำมาสร้างเป็นแผนภูมิแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA สามารถแยกสายพันธุ์เห็ดหอมได้เป็น 6 กลุ่ม การใช้เครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธีอาร์เอพีดีสามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์เห็ดหอมที่เพาะเพื่อการค้าได้

คำสำคัญ: เห็ดหอม, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, เทคนิคอาร์เอพีดี

Abstract

Fourty-three commercial strains of shiitake mushroom , *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. collected from northern area in Chiangmai, Chiangrai, Lampang and Lamphun were evaluated the genetic diversity and strain identification by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. Genomic DNA was extracted from mycelium and RAPD analysis was performed using 27 decamer primers. 21 out of 27 primers produced 99 polymorphism bands. A total of 178 amplification products were scored of which 55.62% were polymorphic. 10 primers were given identical polymorphic band in the particular strains which could be used to distinguish that strain from the others. The identical bands were observed in four strains 'Royal project', 'Mit', 'Wilai' and 'Anuchit'. The genetic similarity index of these strains ranged from 0.311 to 0.963. A dendrogram generated by Unweighted Pair Group Method (UPGMA) analysis showed that the commercial strains of shiitake clustered into 6 groups. Molecular genetic markers obtained with the RAPD technique can be used to differentiate strains of *L. edodes*.

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

คำนำ

เห็ดหอม *(Lentinus edodes* (Berg.) Sing.) เป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญ มีการเพาะเชิงพาณิชย์มากในภาคเหนือโดยเฉพาะในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง แม่ฮ่องสอน เพราะมีสภาพอากาศค่อนข้างเย็นเหมาะต่อการเจริญของเห็ดชนิดนี้ ปัจจุบันปริมาณผลผลิตภายในประเทศยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ต้องนำเข้าจากต่างประเทศเช่น จีน เกาหลี และญี่ปุ่น ทั้งในรูปดอกเห็ดสดและแห้งนับเป็นมูลค่าหลายสิบล้านบาท มีหลายสาเหตุที่ทำให้ผลผลิตเห็ดหอมในประเทศยังไม่มีคุณภาพและปริมาณที่ทัดเทียมกับต่างประเทศ การขาดสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อสภาวะอากาศในประเทศก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่สำคัญ สายพันธุ์ที่เพาะในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่นำมาจากต่างประเทศ แล้วนำมาทดลองเพาะและคัดเลือกพันธุ์มานานนับหลายสิบปี เห็ดหอมแบ่งออกเป็น 5 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ฮานาดอนโก พันธุ์ดอนโก พันธุ์โคตซูบุดอนโก และพันธุ์โกโก พันธุ์โกซิน (ปัญญา, 2537) พันธุ์โกซินยังแบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยตามคุณภาพดอกเห็ดอีก 2 สายพันธุ์คือ โจโกซิน และ นามิโกซิน เกณฑ์ที่ใช้แยกชนิดสายพันธุ์คือความแตกต่างของลักษณะหมวกดอกเห็ด ขนาด รูปร่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น พันธุ์ดอนโกมีลักษณะคล้ายกับโคตซูบุดอนโกมากแตกต่างกันที่ลายบนดอกเห็ด พันธุ์ดอนโกมีลายมากและเห็นชัดกว่าพันธุ์โคตซูบุดอนโก ก้านดอกของพันธุ์ดอนโกสั้นกว่าพันธุ์โคตซูบุดอนโก สายพันธุ์โกซินและโกโกเป็นสายพันธุ์ที่นิยมเพาะในไทยเพราะเป็นสายพันธุ์ทนร้อน ให้ผลผลิตดีในสภาวะอากาศที่แปรปรวน สายพันธุ์นี้จึงแพร่หลายมากและได้มีการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์มาอย่างต่อเนื่องยาวนาน ส่วนสายพันธุ์อื่นๆยังไม่ค่อยมีการเพาะเพื่อการค้า เพราะต้องใช้เงินทุนในการทำโรงเรือนสูง จากการซักถามเกี่ยวกับลักษณะพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมเพาะในแหล่งต่างๆพบว่ายังมีความหลากหลายของสายพันธุ์อื่นๆ อีกหลายสายพันธุ์ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากพันธุ์ดั้งเดิมคือโกซินและโกโก ปัญหาของเกษตรกรและนักปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมคือไม่สามารถระบุหรือชี้ชัดลงไปได้ว่าแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันอย่างไร นอกจากนี้ยังไม่ทราบประวัติทางพันธุกรรมหรือที่มาของสายพันธุ์ที่ใช้เพาะ การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการแยกชนิดสายพันธุ์อาจเกิดความสับสนได้ เพราะเห็ดหอมมีลักษณะคล้ายกันและมีลักษณะเพียงไม่กี่อย่างที่สามารถสังเกตได้และสาเหตุสำคัญที่ทำให้การระบุสายพันธุ์เกิดความผิดพลาดได้ง่ายคือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกหรือลักษณะทางฟีโนไทป์อาจได้รับอิทธิพลจากปัจจัยของสภาวะแวดล้อม จึงทำให้เกิดความสับสน ไม่ชัดเจน มีการเรียกชื่อที่ซ้ำซ้อนกัน บางทีสายพันธุ์ที่มีแหล่งมาจากที่เดียวกัน แต่อาจมีชื่อเรียกต่างกัน หรือเมื่อนำสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากๆมาผสมกันอาจได้สายพันธุ์ที่ไม่ค่อยแตกต่างจากเดิมมากนัก หรือหากนำสายพันธุ์จากคนละแหล่งมาผสมกันโดยเข้าใจว่าเป็นคนละสายพันธุ์ แต่แท้จริงเป็นสายพันธุ์เดียวกัน เมื่อไม่ทราบสายพันธุ์ชัดเจน ทำให้ขั้นตอนการคัดเลือกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ไม่เกิดประสิทธิภาพเท่าที่ควร การปรับปรุงสายพันธุ์

นั้นๆก็จะไม่ประสบผลสำเร็จ และยังเกิดการสูญเปล่าทั้งเงินทุนและเวลา ดังนั้นควรใช้ลักษณะทางจีโนไทป์มาเป็นเครื่องมือในการแยกชนิดและศึกษาพื้นฐานทางพันธุกรรมของเห็ดชนิดนี้ เพราะลักษณะทางจีโนไทป์ไม่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ทำให้ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์เกิดประสิทธิภาพ และทำให้ทราบประวัติความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสามารถแยกชนิดของสายพันธุ์เห็ดหอมได้อย่างชัดเจนและถูกต้อง อันจะนำไปสู่การเพิ่มคุณภาพและผลผลิตของเห็ดหอมต่อไป

การจัดจำแนกเห็ดส่วนใหญ่จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดเช่นลักษณะสี ขนาด ความยาวของก้านดอกเป็นเกณฑ์ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยามักมีการแปรปรวน ไม่แน่นอน เพราะได้รับอิทธิพลมาจากสิ่งแวดล้อม ทำให้การระบุชนิดของเห็ดด้วยวิธีนี้อาจเกิดความผิดพลาด คลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิคทางชีวเคมีเช่น รูปแบบของไอโซไซม์ (Ohmasa and Furukawa,1986 ; Royse *et al.*, 1983) และเทคนิคทางเครื่องหมายดีเอ็นเอ เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)(Vos *et al.*, 1995; Terashima and Teruyuki. 2004) และ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)(Chiu *et al.*, 1996, Kwan *et al.*, 1992; Chang and Molina,1995) เทคนิคทางเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นการศึกษาถึงลักษณะทางจีโนไทป์หรือสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆซึ่งจะได้ผลการทดลองที่ถูกต้องชัดเจนกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพราะลักษณะทางจีโนไทป์ไม่ได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อม เครื่องหมายดีเอ็นเอได้จึงเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย และถูกนำไปประยุกต์ใช้ในงานหลายแขนง เทคนิค Random Amplified DNA Polymorphic (RAPD) มีหลักการคือใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR; Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทป์ขนาดประมาณ 10 เบส ซึ่งมีลำดับเบสแบบไม่จำเพาะหรือเรียกว่าไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer) ดีเอ็นเอบริเวณที่ถูกเพิ่มปริมาณจะมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับลำดับเบสบนสายของไพร์เมอร์ ความแตกต่างกันของลำดับเบสของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่ชนิดเดียวกัน จะปรากฏออกมาในรูปของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน สามารถบอกความแตกต่างในระดับสกุล สปีชีร์หรือ strain ได้อย่างถูกต้อง ดังเช่นจากรายงานการศึกษาของ Ito และคณะ (1998) รายงานว่าจากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 13 ไพรเมอร์พบว่า 12 ไพรเมอร์ ที่สามารถแยกเชื้อรา *Coprinus. cinereus* จำนวน 5 strains ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆ ออกจาก *Coprinus angulatus* และยังใช้ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้ มาระบุสปีชีร์ของ strain ที่ยังไม่ทราบสปีชีร์ได้ ในปี 2001 Ramirez และ คณะ ได้รายงานถึงการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ อาร์เอพีดี ในการศึกษาระดับความเหมือนและต่างกันของสายพันธุ์เห็ด *Agaricus bisporus* พบว่าสายพันธุ์เห็ดกระดุมที่เพาะมีความเหมือนกันทางพันธุกรรมอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูง และยังได้ใช้เทคนิคนี้ช่วยค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับน้ำหนักของดอกเห็ด ด้วยการทำ bulk segregant analysis ระดับความเหมือนและแตกต่างกันทางพันธุกรรมของเห็ดนางลมและเห็ดกระดุมสายพันธ์ที่เพาะเพื่อการค้ามีซึ่งใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ในรายงานการศึกษาของ Shnyreva และคณะ (2002) ระบุว่าความหลากหลายของสายพันธุ์ของเห็ดนางลมมีมากกว่าเห็ดกระดุม

นอกจากงานทางด้านการจัดจำแนกแล้ว เทคนิคอาร์เอพีดียังใช้ในการสืบค้นหายีนที่สัมพันธ์กับลักษณะที่น่าสนใจ รวมทั้งการทำแผนที่ยีน ในสิ่งมีชีวิตๆหลายชนิด จะเห็นได้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดี เป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับ เพราะมีข้อดีหลายประการเช่น มีค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก ขั้นตอนการทำไม่ซับซ้อน สามารถทราบผลได้ในเวลาสั้น ถึงแม้ว่าบางรายงานได้ระบุว่าเทคนิคนี้มีข้อด้อยคือมักให้ผลทดสอบที่ไม่ค่อยคงที่ แต่อย่างไรก็ตามหากสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆเช่นคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้สภาวะเหมาะสมที่ให้ผลที่สามารถทำซ้ำได้ (เสริมสกุล,2545) เทคนิคอาร์เอพีดีสามารถนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยเกี่ยวกับเห็ดหอมยังค่อยมีรายงานมากนักในประเทศไทย โดยเฉพาะการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจัดจำแนก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อนำเทคนิคนี้มาเป็นเครื่องมือช่วยจัดจำแนกและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดชนิดนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เห็ดหอมจำนวน 43 ตัวอย่าง (ตารางผนวกที่ 2)
2. สารเคมีสำหรับเลี้ยงเส้นใยเชื้อเห็ด
3. สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ด
4. สารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์
5. สารเคมีสำหรับแยกแถบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรส อิเล็คโตรโฟริซิส (agarose electrophoresis)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge)
7. เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
9. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (micropipette)
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
11. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermal cycle)
12. เครื่องแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (horizontal gel electrophoresis)
13. เครื่องถ่ายภาพแถบดีเอ็นเอ (gel documentation)
14. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล NTSYS version 2.01

ขั้นตอนวิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การเตรียมเส้นใยสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

1.1.1 แยกเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA (potato dextrose agar) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้เส้นใยเจริญ ประมาณ 2 สัปดาห์

1.1.2 ใช้ cork borer เจาะเอาชิ้นวุ้นซึ่งมีเส้นใยเจริญอยู่มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (potato dextrose broth) ประมาณ 2 สัปดาห์

1.1.3 ช้อนตักแผ่นของส้นใยที่ลอยอยู่ นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น ซับเอาน้ำออกให้มากที่สุดด้วยกระดาษกรอง

1.1.4 นำเส้นใยมาบดด้วยโกร่ง โดยเติมไนโตรเจนเหลว บดจนกระทั่งได้เป็นผงละเอียด

1.1.5 ตักผงของเส้นใยประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มล. จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987)

1.2 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

1.2.1 เติมสารละลาย 2X CTAB extraction buffer 700 ไมโครลิตร (ul) ลงไปในผงเส้นใยที่บดละเลียดแล้ว นำหลอดไปเขย่าเพื่อให้สารละลายผสมเข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

1.2.2 นำหลอดไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 65 ^{o}C นาน 1 ชั่วโมง

1.2.3 เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) 700 ul เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที (rpm) ใช้เวลา 5 นาที ดูดเก็บสารละลายชั้นบน 600 ul ใส่หลอดใหม่

1.2.4 เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 600 ul เขย่าด้วย vortex mixer นำไปปั่น 14,000 rpm นาน 5 นาที ดูดเก็บสารละลายชั้นบน 500 ul ใส่หลอดใหม่ ทำการสกัดซ้ำอีก 1 รอบ

1.2.5 ดูดเก็บสารละลายชั้นบน 300 ul ใส่หลอดใหม่ เติม absolute ethanol 600 ul และ 7.5 M ammonium acetate 90 ul นำไปบ่มที่ -20 ^{o}C นาน 1 ชั่วโมง

1.2.6 นำหลอดมาปั่นที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นนำมาปั่นล้างตะกอนของดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มล. ที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 3 นาที จำนวน 3 ครั้ง

1.2.7 ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH 8.0 เติม เอนไซม์ RNase 2 ul นำหลอดไปบ่มที่ 37 ^{o}C นาน 1 ชั่วโมง

1.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้

1.3.1 การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตรมิเตอร์

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาเจือจาง เตรียม dilution 1: 50 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

1.3.2 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

นำสารละลายดีเอ็นเอ 3 ul มาผสมกับสี loading dye จากนั้นนำมาหยอดลงในช่องของแผ่นเจลความเข้มข้น 0.8% ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลท์ เวลา 45 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บัพเฟอร์ จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ดูแถบดีเอ็นเอใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ

2. การทำเทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplification Polymorphic DNA : RAPD)

2.1 ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้ (ตารางภาคผนวกที่ 2)

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์นำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 40 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ng/ul) จากนั้นนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม ความเข้มข้นของสารเคมีแต่ละชนิดมีดังนี้

สารเคมี	1 reaction (1X)	final concentration
10X PCR buffer	1 ul	1X
25 mM Mg_2Cl	0.76	1.9 mM
10 mM dNTPs	1	1 mM
RAPD primer (10 uM)	1	10 pmole
Taq DNA polymerase	0.2 ul	1 unit
DNA template (40 ng/ul)	3 ul	120 ng
Deionized sterile water	3.04 ul	-
Total volume	10 ul	-

2.2 นำสารละลายใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (MJ Research รุ่น PCT-200 Peltier Thermal Cycler)โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

จำนวนรอบ / สภาวะ	1	40	1
Pre-denaturation	95 C 5 นาที	-	-
Denaturation	-	95 C 45 วินาที	
Annealing	-	36 C 1 นาที	-
Extension	-	72 C 2 นาที	-
Post-extension	-		72 C 10 นาที , soak 4 C

2.3 การตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณมาแยกแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5% ในสารละลายบัพเฟอร์ 0.5X TBE ใช้กระแสไฟ 100 โวทล์ ใช้เวลา 90 นาที จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ดูแถบดีเอ็นเอใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต บันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล และคำนวณหาขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene tool (Syngene bio image)

2.4 การเก็บข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ผล

ให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบจากความเหมือนและความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยสายพันธุ์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆจะให้คะแนนเป็น 1 ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันให้คะแนนเป็น 0 ทำการเปรียบเทียบจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดในทุกสายพันธุ์ ข้อมูลการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอนี้จะถูกนำมาเปรียบเทียบความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity) ทั้ง 43 ตัวอย่างด้วยวิธี Jaccacd coefficient (Sneath and Sokal, 1973) นำค่า similarity ที่ได้มาแสดงในรูปแผนภูมิด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method (UPGMA) เพื่อจัดกลุ่มของสายพันธุ์ที่มีความเหมือนทางพันธุกรรมหรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันอยู่ด้วยกัน การวิเคราะห์ผลข้อมูลดังกล่าวข้างต้นใช้โปรแกรม NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System)-pc เวอร์ชัน 2.01 (Rohlf, 1998)

ผลการทดลอง

1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดหอมโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์กับไพรเมอร์แบบสุ่มที่มี นิวคลีโอไทด์จำนวน 10 เบส จำนวน 27 ไพรเมอร์ ได้แก่ S1-20 , R1-5 และ S21-22 (ตาราง ภาคผนวกที่ 2) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเห็ดหอมจำนวน 43 ตัวอย่าง (ตาราง ภาคผนวกที่ 1) พบว่ามี 23 ไพรเมอร์ สามารถ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดหอมได้ทุกตัวอย่าง มี 21 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism) ส่วนไพรเมอร์อีก 2 ชนิดให้รูปแบบแถบแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphism) ได้แก่ R1,R4, และไพรเมอร์อีก 4 ชนิดไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ได้แก่ S1, S8,S15 และ S20 ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดอยู่ระหว่าง 2690 คู่เบสถึง 318 คู่เบส จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 178 แถบ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจำนวน 99 แถบคิดเป็น 55.62% ค่าเฉลี่ยของการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างเท่ากับ 4.95 แถบต่อ 1 ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นที่แตกต่างกันมากที่สุดได้แก่ S7 มีแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือไพรเมอร์ S3 และ S4 และ S17 เปอร์เซ็นต์การเกิดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันคิดเป็น 77.78, 75.00 และ 75.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมพบว่ามี 10 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในบางตัวอย่างเท่านั้นได้แก่ ไพรเมอร์ R3 และ S3 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 358 และ403 คู่เบส ในตัวอย่างโครงการหลวงหมอกจ๋าม (Royal Project) เท่านั้น (รูปที่ 1 และ 3)

ไพรเมอร์ S2, S12 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 727 และ 613 คู่เบส ที่พบเฉพาะในตัวอย่างของผู้ใหญ่มิตร เท่านั้น (Mit) (รูปที่ 2 และ 4)

ไพรเมอร์ S4 และ S5 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 957 และ 598 คู่เบส พบเฉพาะในตัวอย่างของคุณวิไลวรรณ เท่านั้น (Wilai) (รูปที่ 2 และ 7)

ไพรเมอร์ R5, S17, S5, S11, S12, และ S14 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 783, 2182, 724, 1112, 738 และ 993 คู่เบส ตามลำดับ ที่พบเฉพาะในตัวอย่างจากคุณอนุชิต (Anuchit-1และ Anuchit-2) เท่านั้น (รูปที่ 5 และ 6)

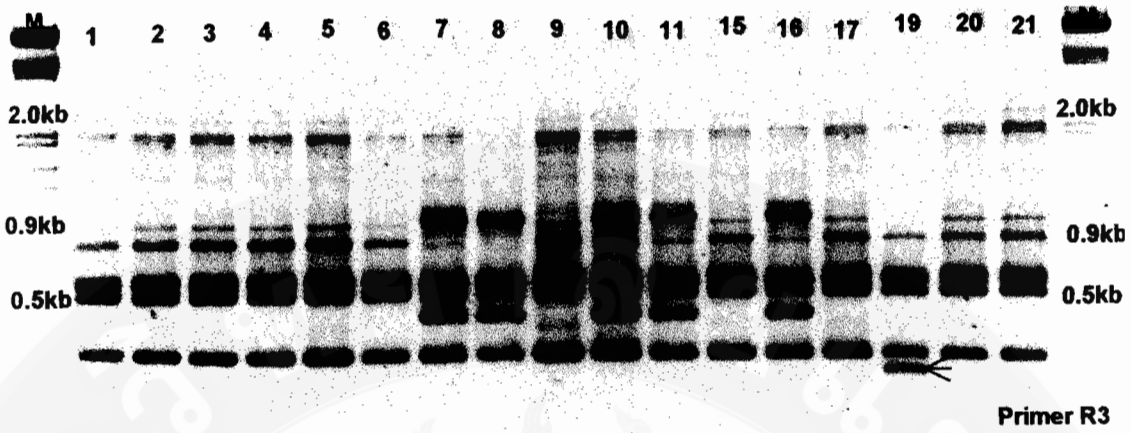
ส่วนตัวอย่างที่เหลืออีก 39 ตัวอย่าง ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์ที่พบเฉพาะสายพันธุ์ดังเช่นที่พบในสายพันธุ์ของโครงการหลวงหมอกจ๋าม (Royal Project), สายพันธุ์ของ คุณวิไลวรรณ (Wilai) , สายพันธุ์ของ ผู้ใหญ่มิตร (Mit) และสายพันธุ์จากคุณอนุชิต (Anuchit) แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีก็สามารถจัดจำแนกและแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ตารางที่ 1 ชื่อไพรเมอร์ ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำจวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน และ เปอร์เซ็นต์ของการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน

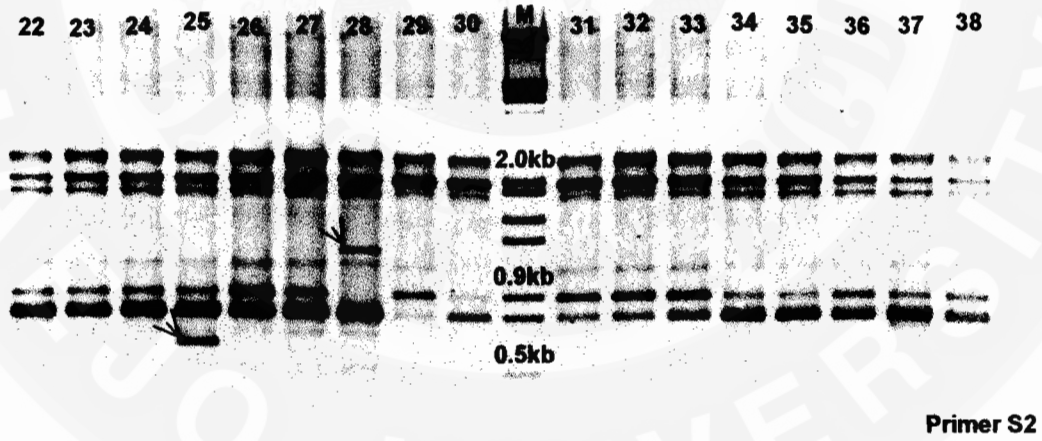
ชื่อไพรเมอร์	ขนาดแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (คู่เบส)	จำนวนแถบทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง	เปอร์เซ็นต์ของแถบที่แตกต่าง (%)
R3	2482-358	11	6	54.54
R2	2690 - 396	9	4	44.44
R5	1650 - 519	8	3	37.50
S21	1584 - 531	7	5	71.43
S22	1348 - 370	8	4	50.00
S2	2477 - 727	9	3	33.33
S3	2122 - 403	9	7	77.78
S4	1620 - 539	8	6	75.00
S5	1490 - 471	7	4	57.15
S6	1000 - 700	5	3	60.00
S7	2194 - 318	5	4	80.00
S9	1718 - 577	6	4	66.67
S10	1271 - 386	10	4	40.00
S11	1790 - 822	9	4	44.44
S12	1032 - 403	6	2	33.33
S13	1650 - 525	5	2	40.00
S14	2179 - 684	8	4	50.00
S16	1727 - 481	10	7	70.00
S17	2658 - 714	8	6	75.00
S18	1695-703	10	7	70.00
S19	805-452	5	3	60.00

ตารางที่ 2 ชื่อไพรเมอร์ ชื่อตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะและขนาดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ

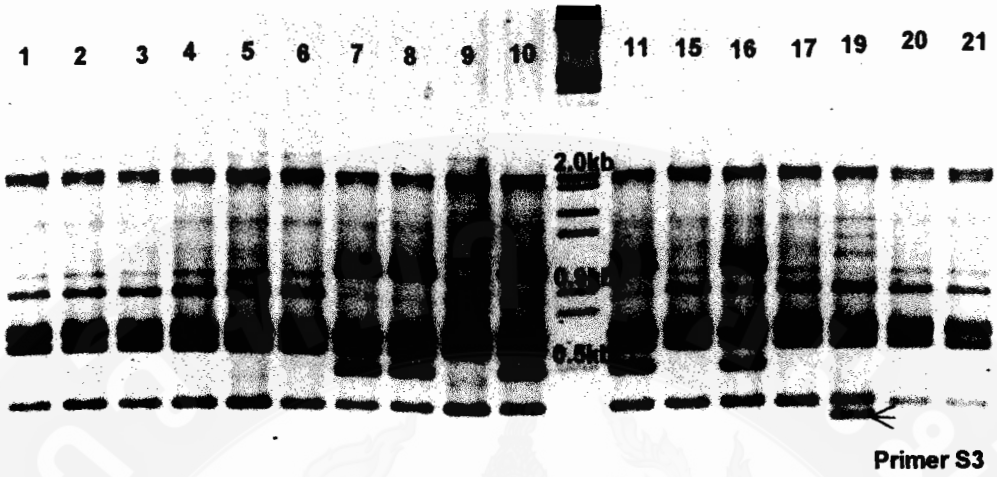
ชื่อไพรเมอร์	ชื่อตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ	ขนาดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ (คู่เบส)
R3	โครงการหลวงหมอกจ๋าม (Royal Project)	358
R5	อนุชิต (Anuchit)	783
S17	อนุชิต (Anuchit)	2182
S2	ผู้ใหญ่มิตร (Mit)	727
	วิไลวรรณ (Wilai)	1296
	อนุชิต (Anuchit)	1584
S3	โครงการหลวงหมอกจ๋าม (Royal Project)	403
S4	วิไลวรรณ (Wilai)	957
S5	วิไลวรรณ (Wilai)	598
	อนุชิต (Anuchit)	724
S11	อนุชิต (Anuchit)	1112
S12	ผู้ใหญ่มิตร (Mit)	613
	อนุชิต (Anuchit)	738
S14	อนุชิต (Anuchit)	993



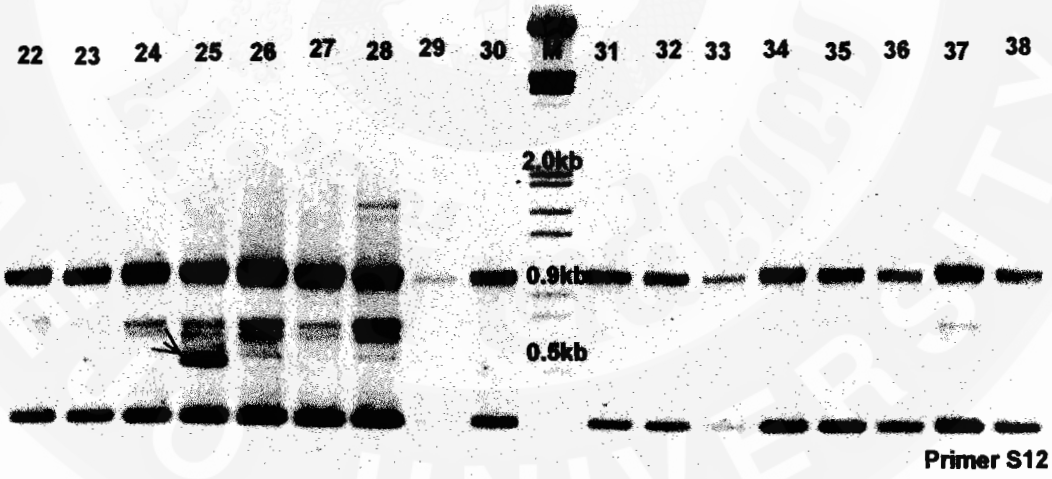
รูปที่ 1 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ R3 ชื่อตัวอย่างเรียงลำดับดังตาราง ผนวกที่ 1และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA EcoRI/Hind III แถบดีเอ็นเอที่ลูกศรชี้ มีขนาด 358 คู่เบส



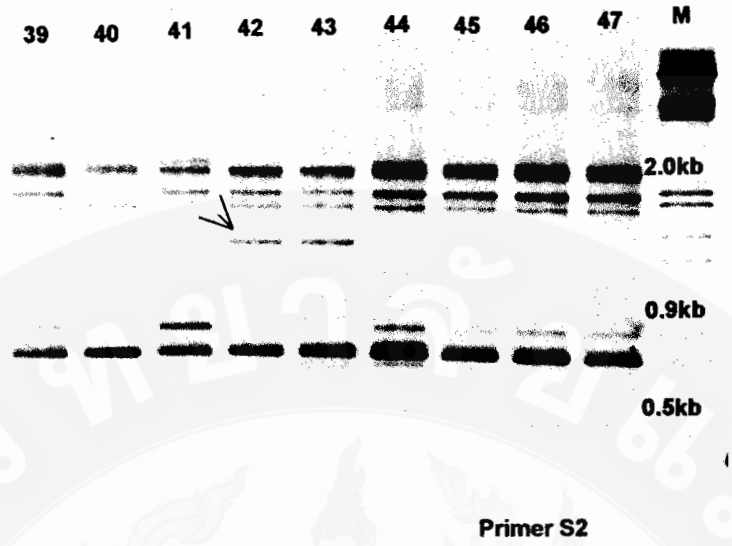
รูปที่ 2 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ S2 ชื่อตัวอย่างเรียงลำดับดังตาราง ผนวกที่ 1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA EcoRI/Hind III แถบดีเอ็นเอที่ลูกศรชี้ มีขนาด 727 และ1296 คู่เบส



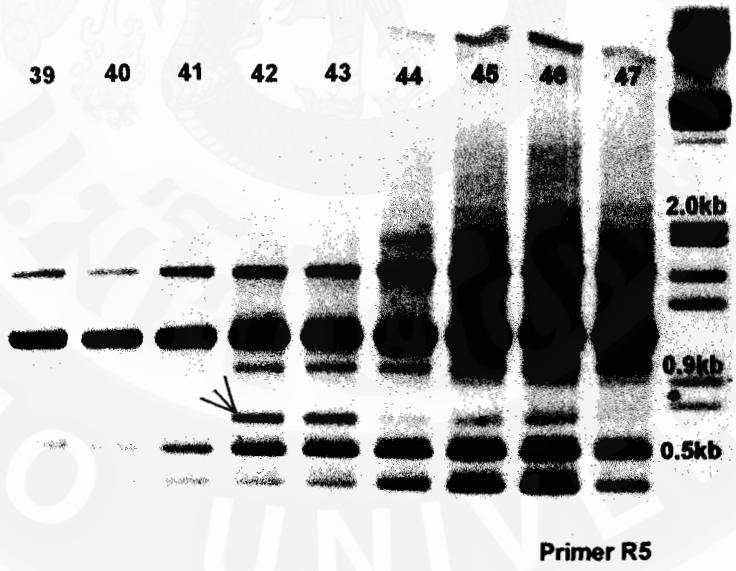
รูปที่ 3 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ S3 ชื่อตัวอย่างเรียงลำดับดังตารางผนวกที่ 1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA EcoRI/ Hind III แถบดีเอ็นเอที่ลูกศรชี้มีขนาด 403 คู่เบส



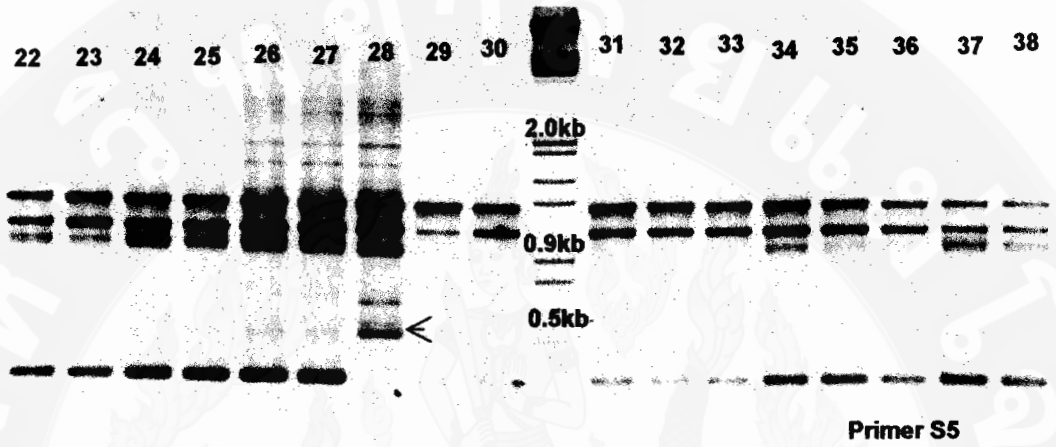
รูปที่ 4 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ S12 ชื่อตัวอย่างเรียงลำดับดังตารางผนวกที่ 1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA EcoRI/ Hind III แถบดีเอ็นเอที่ลูกศรชี้ มีขนาด 613 คู่เบส



รูปที่ 5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ S2 ชื่อตัวอย่างเรียงลำดับดังตารางผนวกที่ 1และM คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานLambda DNA EcoRI/ Hind III แถบดีเอ็นเอที่ลูกศรชี้มีขนาด 1584 คู่เบส



รูปที่ 6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ R5 ชื่อตัวอย่างเรียงลำดับดังตารางผนวกที่ 1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA EcoRI/ Hind III แถบดีเอ็นเอที่ลูกศรชี้มีขนาด 783 คู่เบส



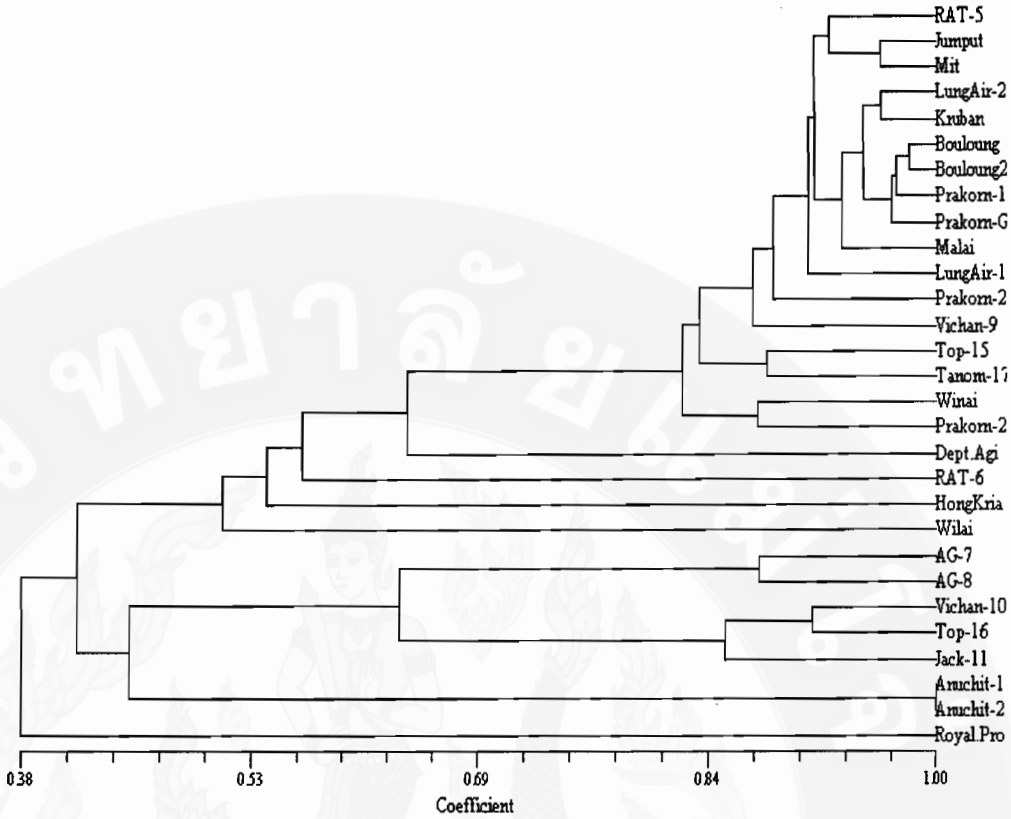
รูปที่ 7 รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ S5 ชื่อตัวอย่างเรียงลำดับดังตาราง ผนวกที่ 1 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA EcoRI/ Hind III แถบดีเอ็นเอที่ลูกศรชี้มีขนาด 598 คู่เบส

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากผลของอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

จากการทดสอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 27 ชนิดกับตัวอย่างจำนวน 43 ตัวอย่าง พบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งเดียวกันซึ่งได้แก่แหล่งที่เก็บจากรัตนะฟาร์ม มีจำนวน 5 ตัวอย่างคือ RAT-1 ถึง RAT-5 จำนวน 5 ตัวอย่างพบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างจากกรมวิชาการเกษตรคือเห็ดหอมเบอร์ 1 ถึง เบอร์ 5 (Dept.Agi) จำนวน 5 ตัวอย่าง ไม่พบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอเช่นกัน ดังนั้นในการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจึงได้ถือเป็นตัวอย่างเดียวกันคือเหลือเพียง RAT-5 และ Dept.Agi เท่านั้น

จากการนำข้อมูลของขนาดและจำนวนแถบของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากเทคนิคอาร์เอพีดี ซึ่งมีทั้งหมด 99 แถบ มาวิเคราะห์และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS version 2.01 โดยการกำหนดให้คะแนนเป็น “1” กรณีที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอและให้คะแนนเป็น “0” กรณีที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างจากสัดส่วนของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน เพื่อคำนวณความเหมือนและความแตกต่างกันของตัวอย่างทีละคู่สลับกัน (similarity coefficient) จนครบทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 3) หลังจากนั้นนำค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบไปแสดงความสัมพันธ์ในรูป phylogenic tree ด้วยวิธี UPGMA (รูปที่ 8)

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



รูปที่ 8 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมในรูป phylogenic tree

ตารางที่ 3 แสดงค่า similarity coefficient ที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอของเห็ดหอมทั้ง 29 ตัวอย่าง

	RAT-5	RAT-6	AG-7	AG-8	Vichan-9	Vichan-10	Jack-11	Top-15	Top-16	Tanom-17	Royal.Pro	Jumput	LungAir-1	LungAir-2	Malai	Bouloung	Mit	Kruban	Bouloung2	Wilai	Dept.Agi	Winai	Hongkria	Anuchit1	Anuchit2	Prakorn1	Prakorn2	Prakorn Golden	Prakorn 26
RAT-5	1.000																												
RAT-6	0.585	1.000																											
AG-7	0.344	0.306	1.000																										
AG-8	0.281	0.304	0.879	1.000																									
Vichan-9	0.911	0.545	0.299	0.239	1.000																								
Vichan-10	0.581	0.357	0.660	0.574	0.523	1.000																							
Jack-11	0.531	0.382	0.733	0.644	0.478	0.875	1.000																						
Top-15	0.833	0.604	0.317	0.250	0.786	0.492	0.468	1.000																					
Top-16	0.531	0.357	0.625	0.574	0.500	0.915	0.837	0.444	1.000																				
Tanom-17	0.909	0.566	0.328	0.266	0.828	0.565	0.516	0.885	0.516	1.000																			
Royal.Pro	0.388	0.340	0.259	0.232	0.382	0.349	0.349	0.387	0.308	0.394	1.000																		
Jumput	0.944	0.566	0.349	0.306	0.860	0.590	0.540	0.815	0.540	0.926	0.415	1.000																	
LungAir-1	0.873	0.528	0.317	0.274	0.857	0.557	0.484	0.846	0.508	0.889	0.429	0.925	1.000																
LungAir-2	0.909	0.537	0.308	0.266	0.893	0.540	0.492	0.782	0.492	0.857	0.415	0.926	0.925	1.000															
Malai	0.891	0.547	0.333	0.290	0.875	0.548	0.500	0.764	0.500	0.839	0.400	0.907	0.906	0.943	1.000														
Bouloung	0.927	0.556	0.323	0.281	0.877	0.556	0.508	0.833	0.508	0.909	0.409	0.944	0.907	0.944	0.926	1.000													
Mit	0.909	0.566	0.328	0.286	0.860	0.565	0.516	0.815	0.516	0.891	0.415	0.962	0.925	0.926	0.907	0.944	1.000												
Kruban	0.909	0.537	0.308	0.266	0.893	0.540	0.492	0.782	0.492	0.857	0.415	0.926	0.925	0.962	0.943	0.944	0.926	1.000											
Bouloung2	0.911	0.545	0.318	0.277	0.895	0.547	0.500	0.818	0.500	0.893	0.424	0.927	0.926	0.963	0.944	0.981	0.927	0.963	1.000										
Wilai	0.549	0.313	0.250	0.211	0.542	0.417	0.378	0.451	0.397	0.535	0.470	0.557	0.551	0.577	0.565	0.549	0.535	0.557	0.563	1.000									
Dept.Agi	0.611	0.625	0.288	0.286	0.571	0.386	0.362	0.569	0.339	0.623	0.370	0.654	0.615	0.654	0.635	0.642	0.654	0.654	0.630	0.379	1.000								
Winai	0.851	0.652	0.300	0.276	0.768	0.500	0.452	0.717	0.452	0.796	0.417	0.830	0.792	0.830	0.846	0.849	0.830	0.830	0.833	0.500	0.756	1.000							
Hongkria	0.579	0.333	0.373	0.320	0.517	0.577	0.519	0.509	0.519	0.561	0.400	0.618	0.582	0.589	0.571	0.579	0.589	0.561	0.569	0.469	0.392	0.519	1.000						
Anuchit1	0.448	0.230	0.375	0.327	0.400	0.561	0.483	0.364	0.508	0.433	0.273	0.477	0.446	0.433	0.418	0.448	0.455	0.433	0.441	0.403	0.300	0.391	0.500	1.000					
Anuchit2	0.448	0.230	0.375	0.327	0.400	0.561	0.483	0.364	0.508	0.433	0.273	0.477	0.446	0.433	0.418	0.448	0.455	0.433	0.441	0.403	0.300	0.391	0.500	1.000	1.000				
Prakorn1	0.893	0.556	0.323	0.281	0.877	0.556	0.508	0.800	0.508	0.875	0.431	0.909	0.907	0.944	0.926	0.963	0.909	0.944	0.981	0.571	0.642	0.815	0.579	0.448	0.448	1.000			
Prakorn2	0.893	0.528	0.317	0.274	0.825	0.508	0.484	0.778	0.462	0.821	0.406	0.855	0.852	0.925	0.87	0.907	0.855	0.889	0.926	0.507	0.615	0.792	0.582	0.424	0.424	0.900	1.000		
Prakorn-Golden	0.893	0.556	0.323	0.281	0.877	0.566	0.508	0.800	0.508	0.875	0.431	0.909	0.907	0.944	0.926	0.963	0.909	0.944	0.981	0.549	0.642	0.849	0.579	0.448	0.448	0.963	0.943	1.000	

วิจารณ์ผล

การเก็บตัวอย่างได้มีจดบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดที่เก็บมา ได้แก่ ลักษณะสีของผิวหมวกเห็ด ลักษณะมีเกล็ดหรือรอยแตกของผิวหมวกเห็ด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอกเห็ด ความยาวก้านดอก น้ำหนักดอก พบว่าสายพันธุ์ส่วนใหญ่มีลักษณะเหมือนหรือใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เพราะลักษณะรูปทรงใกล้เคียงกันมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะอุณหภูมิที่มีผลต่อรูปร่างและผลผลิตของดอกเห็ด อุณหภูมิจะมีผลต่อผลผลิตและรูปทรงของดอกเห็ดโดยเฉพาะในระยะที่ดอกมีการพัฒนา (Tokimoto and Komatsu,1978) สาเหตุประการหนึ่งคือระยะเวลาเก็บเกี่ยวผลผลิตเกษตรกรนิยมเก็บเกี่ยวในระยะที่ดอกยังตูม ขอบหมวกเห็ดยังไม่แยกออกจากก้านซึ่งถือว่าเป็นดอกเห็ดคุณภาพดีเหมาะที่จะใช้บริโภค ดอกเห็ดที่โตเกินขนาดหรือใกล้บานจะไม่เป็นที่นิยม ขนาดไม่ได้มาตรฐาน ราคาจะต่ำลงมา การเก็บเกี่ยวในขณะที่ดอกยังมีขนาดเล็ก ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของดอกเห็ดได้

การเปรียบเทียบลักษณะสีและขนาดของดอกที่บานเต็มที่แล้ว ก็ทำได้ยากเช่นเดียวกัน เพราะมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อสีและขนาดของดอกเห็ด เช่นปัจจัยของความชื้นสัมพันธ์โรงเรือนที่มีดีควรมีความชื้นสัมพันธ์ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้นสัมพันธ์ภายในวัสดุเพาะประมาณ 75 – 80 เปอร์เซ็นต์ (บรรณ,2533) ความชื้นสัมพันธ์มีผลต่อคุณภาพของดอกเห็ด ถ้าความชื้นต่ำ จะทำให้ดอกเห็ดชะงักการเจริญ หากความชื้นพอเหมาะ จะทำให้เนื้อหมวกดอกหนา ดอกสมบูรณ์ (อานนท์,2532) สีดอกเห็ดจะมีสีคล้ำ ถ้าความชื้นสัมพันธ์ต่ำดอกจะมีสีขาวนวลหรือออกเหลืองทอง นอกจากนี้อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงในขณะที่ดอกเริ่มมีการพัฒนาจะมีผลอย่างมากต่อคุณภาพของดอกเห็ด ถ้าในระยะนี้อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส จะทำให้ดอกเห็ดเจริญอย่างรวดเร็ว เนื้อดอกบาง บานง่าย แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำอยู่ในช่วง 7-18 องศาเซลเซียส ดอกจะเจริญช้า เนื้อดอกหนา ก้านดอกสั้น ได้เห็ดหอมที่คุณภาพดี (นภดล, 2546)

เช่นเดียวกับลักษณะการเกิดลายหรือรอยแตกบนผิวดอกเห็ดก็ไม่สามารถบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ เช่นตัวอย่าง อนุชิต-1 (Anuchit-1) ดอกจะมีรอยแตกของผิวหมวกเห็ด ส่วนอนุชิต-2 (Anuchit-2) ไม่มีรอยแตกบนหมวกดอก แต่จากการดูรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้พบว่าเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันเลย แสดงให้เห็นว่าลักษณะรอยแตกบนผิวดอกเห็ดหอมไม่สามารถนำมาใช้แยกสายพันธุ์ได้ หรืออาจพูดได้ว่าลักษณะรอยแตก ลายบนดอกเห็ดไม่สามารถนำมาแยกความต่างของสายพันธุ์ได้เสมอไป จากการสอบถามจากเกษตรกรที่มีประสบการณ์ในการเพาะเห็ดหอมมานาน ได้ให้ความเห็นเกี่ยวกับลักษณะการเกิดเกล็ดหรือรอยแตกบนผิวหมวกของดอกว่าลักษณะรอยแตกนี้อาจเกิดได้จาก 2 สาเหตุคือ เป็นลักษณะประจำพันธุ์เช่นสายพันธุ์ดอนโก ผิวหมวกดอกเห็ดจะมีรอยแตก ลายชัดเจน ซึ่งสายพันธุ์นี้ชอบอากาศที่เย็นจัดและในประเทศไทยยังไม่มีนำมา

การเพาะเป็นการค้า ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ อีกสาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่แปรปรวนมากๆในช่วงเวลาที่ออกดอก เช่นในช่วงเวลากลางวันอากาศร้อนแต่กลางคืนอากาศค่อนข้างเย็น จะทำให้มีเกล็ดหรือลายที่หมวกเห็ดมาก สายพันธุ์ที่พบลักษณะเช่นนี้คือสายพันธุ์โกชิน ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทนร้อน ทนต่อการแปรปรวนของอากาศได้ดีซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมเพาะมาในประเทศไทยโดยเฉพาะในพื้นที่ภาคเหนือ

จะเห็นว่ามีสภาวะแวดล้อมภายนอกหลายปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งไม่สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์เห็ดหอมได้ ดังนั้นการนำวิธีทางชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ จึงเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เทคนิคอาร์เอพีดีได้ถูกนำมาใช้ในงานดังกล่าวอย่างแพร่หลายดังได้มีรายงานในพืชหลายชนิดเช่น หัวหอม (Wilkie et al., 1993) ข้าว (Ray et al., 2001) ถั่วเหลือง (Li and Nelson,2002) อัลฟัลฟลา (Yu et al.,1993) ถั่วลิสง (ศิริพร และคณะ, 2549) และกล้วยไม้ (ศิริลักษณ์, 2547)

การเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดหอมจำนวน 43 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ทดสอบกับไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 27 ไพรเมอร์ พบว่ามี 23ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดหอมได้ในทุกๆตัวอย่าง มี 21ไพรเมอร์ ชนิดให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism) แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 2690 คู่เบสถึง 318 คู่เบส จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด 178 แถบ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจำนวน 99 แถบคิดเป็น 55.62% จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีนี้จะเห็นได้ว่าเป็นวิธีการที่ค่อนข้างมีประสิทธิภาพมากว่าเมื่อเทียบกับการใช้สัณฐานวิทยาในการระบุความแตกต่างของสายพันธุ์ วิธีอาร์เอพีดีที่นำมาใช้นี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์จะเป็นตัวเริ่มต้นในการเข้าไปจับกับเบสในสารพันธุกรรมของเห็ด และเกิดการสังเคราะห์ให้มีปริมาณมากขึ้น ด้วยหลักการนี้ไพรเมอร์ชนิดอาร์เอพีดีสามารถเข้าไปจับกับสารพันธุกรรมได้หลายๆตำแหน่ง (multiple loci) (Zhang and Molina,1995) ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และในรายงานของ Ramirez et al, 2001 ได้ใช้อาร์เอพีดีเพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับระบุสายพันธุ์เห็ด *Agaricus bisporus* ด้วยเหตุนี้วิธีอาร์เอพีดีจึงเหมาะนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายของสายพันธ์เห็ดหอม ซึ่งปัจจุบันนี้ยังไม่มีรายงานยืนยันแน่ชัดเกี่ยวกับสายพันธุ์ของเห็ดชนิดนี้ จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 27 ชนิด เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอระบุเอกลักษณ์เฉพาะสายพันธุ์ พบว่ามี 4 สายพันธุ์ที่ไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ สามารถนำมาใช้จำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมได้ ได้แก่

1. สายพันธุ์จากโครงการหลวงหมวกจ๋าม (Royal Project) มี 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ R3, S3 และ S4 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 358, 403 และ 1214 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 1,3) สายพันธุ์นี้เก็บตัวอย่างจากโครงการหลวงหมอกจ๋าม อำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่ เป็นสายพันธุ์ที่มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.232 – 0.394 ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำที่สุด เมื่อดูจาก phylogenic tree พบว่ามีความเหมือนทางพันธุกรรมเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆเพียง 0.38 หรือคิดเป็น 38 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับแหล่งที่มาของสายพันธุ์นี้ จากการสอบถามถึงแหล่งที่มาทราบว่าสายพันธุ์นี้มีผู้คัดแยกเอง โดยได้ดอกเห็ดมาจากจากป่าธรรมชาติ และได้ทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นเก็บเป็นหัวเชื้อไว้ใช้เอง จะเห็นว่าสายพันธุ์นี้มีฐานพันธุกรรมต่างจากสายพันธุ์ส่วนใหญ่ ทางผู้วิจัยเห็นว่าควรนำสายพันธุ์นี้มาศึกษาถึงลักษณะเด่นหรือลักษณะที่เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมเพาะเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกหรือปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ของเห็ดหอมที่เพาะเพื่อการค้าต่อไป

2. สายพันธุ์ของผู้ใหญ่มิตร (Mit) มี 2ไพรเมอร์ ได้แก่ S2 และ S12 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 727 และ 613 คู่เบส (รูปที่ 2,4) เป็นสายพันธุ์ที่เก็บตัวอย่างจาก ผู้ใหญ่มิตร พุทธเมืองชื่น อำเภอแม่ทะ จังหวัดลำปาง สายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจ เพราะเมื่อพิจารณาจากค่าความเหมือนทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับตัวอย่าง Jumput, LungAir-1, LungAir-2, Malai, Kruban, Bouloung และ Bouloung-2 (ตารางที่ 3) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งเดียวกัน พบว่า ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมสูงมากคืออยู่ระหว่าง 0.907-0.962 แต่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างหรือได้แถบดีเอ็นเอที่ไม่พบในสายพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 (รูปที่ 8) จากการสอบถามที่มาของสายพันธุ์ทราบว่าได้มาจากบ้านนาคด ในขณะที่สายพันธุ์อื่นส่วนใหญ่ได้สายพันธุ์มาจากบ้านปางมะโอ อย่างไรก็ตามกรณีนี้ยังคงสรุปไม่ได้ว่าเป็นเพราะแหล่งที่มาของสายพันธุ์แตกต่างกัน เพราะตัวอย่าง Kruban ก็มาจากจากบ้านนาคดเหมือนกันแต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเช่นเดียวกับสายพันธุ์ของผู้ใหญ่มิตร ในเบื้องต้นคงบอกได้เพียงว่าเห็ดหอมที่เพาะในอำเภอแม่ทะน่าจะมีสายพันธุ์หลักอยู่ 2 สายพันธุ์คือที่บ้านปางมะโอและบ้านนาคด

3. สายพันธุ์ของ คุณวิไลวรรณ (Wilai) มี 2ไพรเมอร์ ได้แก่ S4 และ S5 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1214 และ 598 คู่เบส (รูปที่ 7) เป็นสายพันธุ์ที่เก็บตัวอย่างจาก คุณวิไลวรรณ แปงใจ อำเภอแม่ทะ จังหวัดลำปาง ได้สายพันธุ์มาจากสวนเห็ดนงนุช จังหวัดลำพูน ถ้าพิจารณาจากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแล้วจะเห็นว่าไม่สอดคล้องกับแหล่งที่เก็บตัวอย่าง สายพันธุ์ที่เก็บจากอำเภอแม่ทะทุกตัวอย่างถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ยกเว้นสายพันธุ์วิไลวรรณ ทั้งนี้เพราะสายพันธุ์ดั้งเดิมนั้นได้มาจากจังหวัดลำพูน ซึ่งพันธุกรรมย่อมแตกต่างจากสายพันธุ์จากบ้านปางมะโอและบ้านนาคด อำเภอแม่ทะ

4. สายพันธุ์ อนุชิต-1 (Anuchit-1) และ อนุชิต-2 (Anuchit-2) มี 6ไพรเมอร์ ได้แก่ R5, S5, S11, S12,S14 และ S17 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะมีขนาด 783, 724,1112,738,993 และ 2182 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 5,6) ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างออกจากตัวอย่างอื่นๆค่อนข้างมาก ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในตัวอย่างนี้เท่านั้นถึง 6 แถบ ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแสดงเอกลักษณ์ของสายพันธุ์นี้เท่านั้น นอกจากนี้แล้วเมื่อดูจากค่าความเหมือนทางพันธุกรรมพบว่าสายพันธุ์นี้มีความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 0.45 หรือคิดเป็น 45 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ดอกมีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ท้องถิ่น ดอกมีลักษณะเป็นรอยแตกเป็นร่องลึกเห็นได้อย่างชัดเจน ซึ่งลักษณะของลายบนดอกเห็ดส่วนใหญ่แล้วจะเป็นลักษณะที่พบในสายพันธุ์ดอนโก้ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ออกดอกในฤดูหนาว อากาศเย็นจัดต้องการความชื้นต่ำ สภาพอากาศแห้ง ผิวหมวกเห็ดแตกเป็นลาย ร่องลึกชัดเจน มีสีซีด เนื้อหมวกหนา ก้านดอกสั้น ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการเพาะเพื่อการค้าในประเทศไทย เพราะสภาพอากาศยังไม่มีอุณหภูมิต่ำมากพอ หากจะเพาะต้องลงทุนในการสร้างโรงเรือนค่อนข้างสูง จึงได้สอบถามไปยังแหล่งที่มาของตัวอย่างพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีการนำเข้าในรูปเห็ดหอมดอกสดจากจีนแล้วนำมาแบ่งบรรจุขาย

เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์อนุชิต-1 และอนุชิต-2 พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 21 ชนิดพบว่าให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันทุกประการ ไม่มีความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอเลย แต่จากลักษณะหมวกดอกเห็ดของทั้ง 2 ตัวอย่างมีแตกต่างกันเห็นได้ชัดเจน คืออนุชิต-1 หมวกดอกมีรอยแตกเห็นชัดเจน ขณะที่อนุชิต-2 ดอกไม่ปรากฏรอยแตกเลย ผิวหมวกเห็ดจะเรียบ (รูปที่ 11) เป็นการยืนยันได้อย่างชัดเจนว่าลักษณะสัณฐานวิทยาไม่สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้เสมอไป ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาได้รับอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมนั่นเอง ดังนั้นวิธีอาร์เอพีดีจึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่า

5. สายพันธุ์ Rat -1 ถึง Rat – 5 ซึ่งเก็บตัวอย่างจากรัตนะฟาร์มและสายพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตร (Dept. Agi) เป็นตัวอย่างที่สั่งซื้อจากกรมวิชาการเกษตร เบอร์ 1 ถึง เบอร์ 5 จำนวน 5 สายพันธุ์พบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอไม่มีความแตกต่างกันเลย จากการสอบถามเจ้าของฟาร์มรัตนะได้แจ้งว่าได้ซื้อหัวเชื้อเห็ดมาจากกรมวิชาการเกษตรเช่นเดียวกัน ซึ่งทำให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน (monomorphism) อนึ่งสายพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตรทั้ง 5 เบอร์ จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ทั้ง 5 ได้ ทั้งนี้อาจต้องใช้เทคนิคที่มีความจำเพาะและละเอียดมากกว่า เช่น เทคนิคเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism : AFLP) หรือเทคนิค ซีเอฟแอลพี (cleavage fragment length polymorphism : CFLP) มาช่วยในการจำแนกความแตกต่างของ 5 สายพันธุ์นี้

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากผลของอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรรมจาก phylogenic tree ซึ่งจัดแบ่งเห็ดหอมได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่นั้นมีความสอดคล้องกับแหล่งหรือพื้นที่ที่ได้ไปเก็บตัวอย่าง เช่น กลุ่มที่ 1 มีสายพันธุ์ที่มาจากอำเภอแม่ทะถึง 8 ตัวอย่างในจำนวนทั้งหมด 9 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 89 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มนี้มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมสูงถึงประมาณ 0.95 กลุ่มที่ 2,3 และ 4 ซึ่งมี 13 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของกลุ่มนี้ค่อนข้างสูงประมาณ 0.85 จากการสอบถามถึงแหล่งที่มาของสายพันธุ์ ทุกฟาร์มบอกว่า ได้จากที่เดียวกันคือฟาร์มของคุณประกรณ์ แต่บางทีได้เรียกชื่อใหม่เป็นของตนเอง จากข้อมูลดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่า การกระจายตัวของสายพันธุ์เห็ดหอมในพื้นที่เพาะภาคเหนือตอนบนมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ แหล่งที่มาของหัวเชื้อมาจากการแลกเปลี่ยนกันในกลุ่มผู้เพาะเห็ดหอม คนรู้จักหรือในเครือญาติ โดยเฉพาะที่อยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกัน เกษตรกรยังไม่มีความมั่นใจที่จะนำสายพันธุ์ต่างถิ่นมาทดลองเพาะ เพราะเชื่อว่าสายพันธุ์ที่ตัวเองมีอยู่เป็นสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศในพื้นที่นั้นๆอยู่แล้ว

อย่างไรก็ตามการใช้สายพันธุ์เดิมอยู่ตลอดและต่อเนื่องกันนานขึ้น อาจทำให้ผลผลิตค่อยๆลดลง การเปลี่ยนแปลงนี้อาจใช้ระยะเวลานานหลายเดือนหรือเป็นปี การลดลงของผลผลิตเป็นเรื่องที่ซับซ้อนและควบคุมไม่ได้ ดังนั้นการผลิตเห็ดหอมเชิงการค้าควรมีสายพันธุ์ที่ดีหลายสายพันธุ์ เพื่อการผลิตที่มีเสถียรภาพ (Albert,1993) การสร้างความหลากหลายของสายพันธุ์เห็ดหอมให้มีมากขึ้นควรมีการนำมาปรับปรุงสายพันธุ์ให้ฐานพันธุกรรมของเห็ดชนิดนี้กว้างขึ้นเช่นนำสายพันธุ์ป่าซึ่งแยกจากธรรมชาติมาปรับปรุงพันธุ์ร่วมกับสายพันธุ์ที่เพาะในปัจจุบัน ผลจากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่ามีสายพันธุ์ที่น่าสนใจ ซึ่งมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สูงคือเท่ากับ 0.38 (38%) เช่นสายพันธุ์จากโครงการหลวงหมวกจ๋าม สายพันธุ์จากฟาร์มอนุชิต ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 0.45 (45%) นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ของคุณวิไลวรรณและของผู้ใหญ่มิตร สายพันธุ์เหล่านี้ควรได้รับการศึกษาถึงลักษณะดีเด่นที่เป็นที่ต้องการ แล้วนำมาปรับปรุงพันธุ์กับสายพันธุ์เดิมที่มีอยู่แล้ว เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่รวมลักษณะที่ดีไว้ด้วยกัน

สรุป

การรวบรวมสายพันธุ์เห็ดหอมที่เพาะเพื่อการค้าในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง จำนวน 43 ตัวอย่าง โดยเตรียมดีเอ็นเอจากเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method พบว่าให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและมีปริมาณมากพอ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 เบส ทั้งหมด 27 ชนิด พบว่าให้มีแถบดีเอ็นทั้งหมด 107 แถบและดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 99 แถบ คิดเป็น 55.62 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ามีไพรเมอร์ 10 ชนิด ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในบางสายพันธุ์เท่านั้น ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมกุลในการแยกชนิดของสายพันธุ์เห็ดหอม 4 สายพันธุ์ออกจากตัวอย่างอื่นได้อย่างชัดเจน ได้แก่ สายพันธุ์จากโครงการหลวงหมอกจ๋าม, สายพันธุ์ของผู้ใหญ่มิตร, สายพันธุ์ของคุณวิไลวรรณ และสายพันธุ์จากคุณอนุชิตซึ่งเป็นสายพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ และจากการวิเคราะห์ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.311 – 0.963 เมื่อข้อมูลมาสร้างเป็นแผนภูมิแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถแยกเห็ดหอมได้เป็น 6 กลุ่ม ผลจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าสายพันธุ์เห็ดหอมที่เพาะเพื่อการค้าในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน ซึ่งถือเป็นแหล่งผลิตที่สำคัญของประเทศมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดชนิดนี้ค่อนข้างต่ำ ควรมีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ เช่น การแสวงหาแหล่งพันธุกรรมจากสายพันธุ์ป่าหรือสายพันธุ์จากต่างประเทศ นำมาปรับปรุงร่วมกับสายพันธุ์ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันเพื่อให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ ทำให้เกษตรกรมีโอกาสที่จะเลือกสายพันธุ์ให้เหมาะสมกับฤดูกาลหรือพื้นที่เพาะได้มากขึ้น

รูปที่ 9 ตัวอย่างดอกเห็ดหอมสายพันธุ์ของผู้ใหญ่มิตร

รูปที่ 10 ตัวอย่างดอกเห็ดหอมสายพันธุ์ของคุณวิไลวรรณ

ก) ดอกเห็ดที่มีรอยแตก ข) ดอกเห็ดที่ไม่มีรอยแตก

รูปที่ 11 ตัวอย่างดอกเห็ดหอมสายพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เอกสารอ้างอิง

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ ศิริพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2537. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 421 หน้า.

ธวัชชัย ฑีฆชุณหเสถียร. 2542. เทคโนโลยีการกระตุ้นเห็ดหอมออกดอก. หนังสือพิมพ์ไทยรัฐ. 7 กรกฎาคม 2542. หน้า 7.

นภดล อาวุธกรรมปรีชา. 2546. ศักยภาพในการขยายการผลิตเห็ดหอมในจังหวัดเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 110 หน้า.

เสริมสกุล พจนการุณ เรือนแก้ว ประพฤติ เชวง แก้วรักษ์ และ อัมพร ยอดดี.2549. การศึกษาลักษณะพันธุ์กระชายดำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี. แก่นเกษตร. 34(4) : 274-285.

เสริมสกุล พจนการุณ เรือนแก้ว ประพฤติ เชวง แก้วรักษ์ และ อัมพร ยอดดี.2547. การศึกษาลักษณะพันธุ์กระชายดำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี, ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ. ใน : เอกสารเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 สาขาพืช (3-6 กุมภาพันธุ์ 2547) ภาคบรรยาย. กรุงเทพฯ. หน้า 55-64.

ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์ เรือนแก้ว ประพฤติ และ ชลิต พงส์ศุภสมิทธิ์. 2549. การผลิตเม็ดพันธุ์ขยายและเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่. รายงานผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 27 หน้า.

อานนท์ เอื้อตระกูล. 2532. การเพาะเห็ดหอมในท่อนไม้. กรุงเทพฯ. ชมรมเห็ดหอม. 204 หน้า.

Albert, H.E. 1993. Breeding for mushroom product in *Lentinus edodes*. pp.111-122. *In* Chang S.T. J.A. Buswell and P.G. Miles.(eds). Genetics and breeding of edible mushroom. Gordon and Breach, Philadelpha.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 19:11-15.

Khush, R.S., Berker, E. and Wach, M. 1992. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Appl. Environ, Microbiol. 58 :2971-2977.

Kullkami, R.K. 1991. DNA polymorphism om *Lentinula edodes*, the Shiitake mushroom. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1735-1739.

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

Li, Z. and R.L. Nelson. 2002. RAPD markers diversity among cultivated and wild soybean accessions from four Chinese province. Crop Sci (online) 42: 1737-1744. Aviable http://crop.scijournals.org/cgi/reprint/42/5/1737 (September 23, 2005)

Ohmasa, M. and Furukawa, H. 1986. Analysis of esterase and malate dehydrogenase isozymes of *Lentinula edodes* by isoelectric focusing for the identification and discrimination of stocks. Trans Mycol. Soc. Japan. 27 :79-90.

Ray, C.P., S. kohli ., T. Mohapatra and R.P. Sharma. 2001. Identification and classification of aromatic rice based on DNA fingerprinting. Euphytica. 118:243-251.

Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc Numerical taxonomic and multivariate analysis system. Version 2.01. Applied Biostatistics, Inc. New York.

Tokimoto, K. and M. Komatsu. 1978. Biological Nature of *Lentinus edodes*. pp. 445 - 459. *In* S.T. Chang and W.A. Hayes (eds.). The Biological and Cultivation of Edible Mushroom. Academic Press. New York.

Sunagawa, M., H. Neda and K. Miyazaki. 1995. Identification of *Lentinla edodes*. By random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. pp. 141-145. *In* Elliott, T.J. (ed.). Proceeding of 14 International Congress on the Science and Cultivation of edible fungi, Oxford/17-22 September 1995. Wellesbourne, UK.

Williums, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18 : 6531-6535.

Wilkie, S.E., Isaac, P.G. and R.J. Slater. 1993. Randon amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in Allium. Theor. Appl. Genet. 86:497-504.

Yu, K. and K.P. Pauls. 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplified polymorphic DNA samples. Theor. Appl.Genet. 86:788-794.

Zhang, Y., Francis, I.M. 1995. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. FEMS Microbiology Letters. 131 : 17-20.

ภาคผนวกที่ 1

ตารางแสดงรายละเอียดตัวอย่างเห็ดหอม

ลำดับตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่างที่เก็บมา	ชื่อตัวอย่าง	สีของดอกดอกเห็ด	จากฟาร์ม	แหล่งที่ได้มา	วันที่เก็บ
1	ดอก	Rat - 1	สีน้ำตาลอ่อน	รัตนะฟาร์ม คุณ รัตนวดี รัตนะ 244 หมู่ 9 ต.ป่าอ้อดอนชัย อ. เมือง จ.เชียงราย 053 726698, 081 6036314	กรมวิชาการเกษตร	6 ก.พ. 52
2	ดอก	Rat - 2	สีน้ำตาลอ่อน	รัตนะฟาร์ม	กรมวิชาการเกษตร	6 ก.พ. 52
3	ดอก	Rat - 3	สีน้ำตาลอ่อน	รัตนะฟาร์ม	กรมวิชาการเกษตร	6 ก.พ. 52
4	ดอก	Rat - 4	สีน้ำตาลอ่อน	รัตนะฟาร์ม	กรมวิชาการเกษตร	6 ก.พ. 52
5	ดอก	Rat - 5	สีน้ำตาลอ่อน	รัตนะฟาร์ม	กรมวิชาการเกษตร	6 ก.พ. 52
6	เส้นใยในอาหารวุ้น	Rat - 6	สีน้ำตาลอ่อน	รัตนะฟาร์ม	แยกเชื้อเอง	6 ก.พ. 52
7	เส้นใยในอาหารวุ้น	AG - 7	สีน้ำตาลอ่อน	รัตนะฟาร์ม	พืชสวนเชียงราย	6 ก.พ. 52
8	เส้นใยในอาหารวุ้น	AG – 8	สีน้ำตาลอ่อน	รัตนะฟาร์ม	พืชสวนเชียงราย	6 ก.พ. 52
9	ดอก	Vichan- 9	สีน้ำตาลอ่อน มีเกล็ดหรือขุยบนดอก	ม่อนปลายรุ้งฟาร์ม คุณวิชาญ คิดอ่าน 192 หมู่ 7 ต.เวียงกาหลง อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย 089 5560448	ไม่สามารถระบุแหล่งที่มาได้ (-)	6 ก.พ. 52

ลำดับตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่างที่เก็บมา	ชื่อตัวอย่าง	สีของดอกดอกเห็ด	จากฟาร์ม	แหล่งที่ได้มา	วันที่เก็บ
9	ดอก	Vichan- 9	สีน้ำตาลอ่อน มีเกล็ดหรือขุยบนดอก	ม่อนปลายรุ้งฟาร์ม คุณวิชาญ คิดอ่าน 192 หมู่ 7 ต.เวียงกาหลง อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย 089 5560448	ไม่สามารถระบุแหล่งที่มาได้ (-)	6 ก.พ. 52
10	ดอก	Vichan-10	สีน้ำตาลอ่อน มีเกล็ดหรือขุยบนดอก	ม่อนปลายรุ้ง	ไม่สามารถระบุแหล่งที่มาได้ (-)	6 ก.พ. 52
11	ดอก	Jack - 11	สีน้ำตาลอ่อน มีเกล็ดหรือขุยบนดอก	แจ๊คฟาร์ม คุณวิชาญ ลือโขง 79 หมู่ 6 ต.บ้านโป่ง อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย 086 1968370	แยกเชื้อเอง	6 ก.พ. 52
15	ดอก	Top - 15	สีน้ำตาลเข้ม มีเกล็ดบนดอกมาก น้ำหนักแน่น มาก	ท๊อปฟาร์ม คุณอำพรรณ อินต๊ะไหล 15 หมู่ 6 ต.ทุ่งหลวง อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ 084 8105134	(-)	13 ก.พ. 52
16	ดอก	Top - 16	น้ำตาลอ่อน ใส มีเกล็ดบนดอกค่อนข้างน้อย น้ำหนักเบา	ท๊อปฟาร์ม	(-)	13 ก.พ. 52
17	ดอก	Tanom - 17		ถนอมฟาร์ม	ปรีชาฟาร์ม	13 ก.พ. 52

ลำดับตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่างที่เก็บมา	ชื่อตัวอย่าง	สีของดอกดอกเห็ด	จากฟาร์ม	แหล่งที่ได้มา	วันที่เก็บ
19	ดอก	Royal Project	สีน้ำตาลเข้ม ก้านดอกยาว น้ำหนักเบา	โครงการหลวงหมอกจ๋าม อำเภอแม่อาย จ.เชียงใหม่	แยกเชื้อเอง	13 ก.พ. 52
20	ดอก	Jumpot	สีน้ำตาลอ่อน มีเกล็ดเล็กน้อย	บุญธรรม สุขพี้ 41 หมู่ 8 ต.วังเงิน อ.แม่ทะ จ.ลำปาง 085 0382192	บ้านหม้อลุงแอร์	20 ก.พ. 52
21	ดอก	Loung Air-1	สีน้ำตาลอ่อน มีเกล็ดเล็กน้อย	สุนทร คำมาจันทร์ 44/1 หมู่ 8 อ.เมือง จ.ลำปาง	ลุงแอร์	20 ก.พ. 52
22	ดอก	Loung Air-2	สีน้ำตาลอ่อน มีเกล็ดเล็กน้อย ก้านดอกยาวเรียว	วิไลวรรณ แปงใจ 48/1 หมู่ 8 อ.เมือง จ.ลำปาง	พันธุ์นงนุช	20 ก.พ. 52
23	ดอก	Malai	น้ำตาลเข้ม มีเกล็ดเล็กน้อย	มาลัยฟาร์ม นายโกษ สายวงค์ใย 18 หมู่ 8 ต.วังเงิน อ.แม่ทะ จ.ลำปาง 086 9245809	ลุงแอร์	20 ก.พ. 52
24	ดอก	Bouloung-1	สีน้ำตาลอ่อน มีเกล็ดเล็กน้อย ก้านดอกค่อนข้างใหญ่	นางบัว 77 หมู่ 8 ต.วังเงิน อ. แม่ทะ จ.ลำปาง 086 9126062	บ้านปางมะโอ	20 ก.พ. 52

ลำดับตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่างที่เก็บมา	ชื่อตัวอย่าง	สีของดอกดอกเห็ด	จากฟาร์ม	แหล่งที่ได้มา	วันที่เก็บ
25	ดอก	Mit	สีน้ำตาลอ่อน	ผู้ใหญ่มิตร พุทธเมืองชื่น 40 หมู่ 7 ต.วังเงิน อ.แม่ทะ จ.ลำปาง 084 0438563	บ้านนาคด อ.แม่ทะ	20 ก.พ. 52
26	ดอก	Kruban	สีน้ำตาลอ่อน ก้านยาวเรียว	นางติ๋ม ศิรินันท์ 25 หมู่ 8 ต.วังเงิน อ.แม่ทะ จ.ลำปาง 081 6729733	บ้านนาคด อ.แม่ทะ	20 ก.พ. 52
27	ดอก	Bouloung-2	สีน้ำตาลอ่อน ก้านใหญ่	นางอ๋อ ต้านเขียว 67 หมู่ 8 ต.วังเงิน อ.แม่ทะ จ.ลำปาง 083 1567965	บ้านปางมะโอ	20 ก.พ. 52
28	ดอก	Wilai	สีน้ำตาลอ่อน นวล ออกขาว ดอกเล็ก ก้านยาว	วิไลวรรณ แปงใจ อ.แม่ทะ จ.ลำปาง	สวนนงนุช ลำพูน	20 ก.พ. 52
29	เส้นใยบนอาหารวุ้น	Dept.Agi-1	-	กรมวิชาการเกษตร	-	20 ก.พ. 52
30	เส้นใยบนอาหารวุ้น	Dept.Agi-2	-	กรมวิชาการเกษตร	-	20 ก.พ. 52
31	เส้นใยบนอาหารวุ้น	Dept.Agi-3	-	กรมวิชาการเกษตร	-	20 ก.พ. 52
32	เส้นใยบนอาหารวุ้น	Dept.Agi-4	-	กรมวิชาการเกษตร	-	20 ก.พ. 52

ลำดับตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่างที่เก็บมา	ชื่อตัวอย่าง	สีของดอกดอกเห็ด	จากฟาร์ม	แหล่งที่ได้มา	วันที่เก็บ
33	เส้นใยบนอาหารวุ้น	Dept.Agi- 5	-	กรมวิชาการเกษตร	-	20 ก.พ. 52
34	ดอก	Winai	สีน้ำตาลเข้ม	วินัย สัมพันธุ์	พันธุ์เชียงราย คัดจาก เบอร์ 3	6 มี.ค 52
35	ดอก	Winai	น้ำตาลอ่อน	วินัย สัมพันธุ์	ประกรณ์ # 1	6 มี.ค. 52
36	ดอก	-	สีน้ำตาลอ่อน ดอกเล็ก ก้านเรียวยาว	พี่เพียร อ. ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่	เบอร์ 3 –สวนนงนุช	6 มี.ค. 52
37	ดอก	-	สีน้ำตาลเข้ม ก้านใหญ่	สวิง อ. สันป่าตอง จ.เชียงใหม่	-	6 มี.ค. 52
38	ดอก	-	สีน้ำตาลอ่อน ก้านเรียวยาว	สวิง อ. สันป่าตอง จ.เชียงใหม่	-	6 มี.ค. 52
39	เส้นใย	Hongkria - 1	-	ห้วยฮ่องไคร้	-	6 มี.ค. 52
40	เส้นใย	Hongkria - 2	-	ห้วยฮ่องไคร้	-	6 มี.ค. 52
41	เส้นใย	Hongkria - 3	-	ห้วยฮ่องไคร้	-	6 มี.ค. 52

ลำดับตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่างที่เก็บมา	ชื่อตัวอย่าง	สีของดอกดอกเห็ด	จากฟาร์ม	แหล่งที่ได้มา	วันที่เก็บ
42	ดอก	Anuchit - 1	ดอกแตกลายเป็นร่อง ๆ สีน้ำตาลอ่อน	อนุชิต ใหม่จันทร์แดง 110 หมู่ 7 ต.พุกร่าง อ.พระพุทธบาท จ. สระบุรี 084 0889782	นำเข้าจากต่างประเทศ	17 มี.ค. 52
43	ดอก	Anuchit – 2	ดอกไม่มีลักษณะแตกลาย มีเกล็ดเล็กน้อย สีน้ำตาลเข้ม	อนุชิต ใหม่จันทร์แดง 110 หมู่ 7 ต.พุกร่าง อ.พระพุทธบาท จ. สระบุรี 084 0889782	นำเข้าจากต่างประเทศ	17 มี.ค. 52
44	ดอก	ประกรณ์#1	สีน้ำตาลอ่อน (ชอบหนาว)	นายประกรณ์ นามเมือง 197 ม. 4 ต.แม่แฝกใหม่ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	คัดแยกเชื้อเอง	26 มี.ค. 52
45	ดอก	ประกรณ์ #2	สีน้ำตาลอ่อน (ชอบฝน)	นายประกรณ์ นามเมือง	คัดแยกเชื้อเอง	26 มี.ค. 52
46	ดอก	ประกรณ์-สีทอง	สีน้ำตาลอ่อน ออกเหลืองนวล	นายประกรณ์ นามเมือง	คัดแยกเชื้อเอง	26 มี.ค.52
47	ดอก	ประกรณ์-สีทอง #26	สีน้ำตาลอ่อน ออกเหลืองนวล	นายประกรณ์ นามเมือง	คัดแยกเชื้อเอง	26 มี.ค.52

ภาคผนวกที่ 2

รายชื่อไพรเมอร์

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')
1	S1	CTA CGG AGG A
2	S2	GGC ACT GAG G
3	S3	GAG CCC TCC A
4	S4	AGC GTG TCT G
5	S5	CTG AGA CGG A
6	S6	GTG CCT AAC C
7	S7	GAA CCT GCG G
8	S8	TCA CGT CCA C
9	S9	CTG ACG TCA C
10	S0	AGG GCC GTC T
11	S1	TGC CCG TCG T
12	S2	CAG CTC ACG A
13	S3	CTC TCC GCC A
14	S4	GGA TGA GAC C
15	S5	ACT GGG ACT C
16	S6	AGC GTC CTC C
17	S7	ACG ACC GAC A
18	S8	GGC TCA TGT G
19	S9	GTC AGG GCA A
20	S10	TCT CCC TCA G
21	R1	TGC CGA GCT G
22	R2	AGT CAG CCA C
23	R3	AAT CGG GCT G
24	R4	GAA ACG GGT G
25	R5	GCG ATC CCC A
26	RA1	CTC ACG TTG G
27	RA2	ACC AGG GGC A