การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SRAP ในการจำแนกเส้นใยเห็ดสกุลนางรม และเห็ดถั่งเช่าสีทอง

The Using of SRAP DNA Markers to Identify the Mycelium of Oyster Mushroom and *Cordyceps militaris*

เพ็ญแข รุ่งเรือง[1] อดิศักดิ์ แก้วคำ[2] สนธิชัย จันทร์เปรม[3] และเสริมศิริ จันทร์เปรม[4*]

Penkhae Rungrueng[1], Adisak Kaewkam[2], Sontichai Chanprame[3] and Sermsiri Chanprame[4*]

Received: May 30, 2024
Revised: July 3, 2024
Accepted: July 4, 2024

Abstract: The *Pleurotus* and *Cordyceps* mushrooms are popular among consumers due to their rich nutritional and medicinal benefits. *Pleurotus* mushrooms are easy to grow and inexpensive, while *Cordyceps* mushrooms must be grown in aseptic conditions and are quite expensive. The classification of these two genera can be easily done by morphological characterization during the fruiting body stage. However, in the early stage of mycelial growth, morphological characterization is unsuccessful due to their resemblance. The objective of this study was to utilize SRAP DNA markers to discriminate between Pleurotus and Cordyceps mushroom species in an early mycelial stage, which will benefit genetic improvement through protoplast fusion. In this study, two cultivars of *P. ostreatus*, the Phoenix oyster mushroom and the Bhutan oyster mushroom, and *C. militaris* were investigated. A total of one hundred SRAP primer pairs (Me1-10/Em1-10) were examined. The results revealed that 57 primer pairs can be used to discriminate *C. militaris* from the two oyster mushrooms. Additionally, 33 primer pairs successfully discriminated between the Phoenix oyster mushroom and the Bhutan oyster mushroom. However, only 16 pairs of primers allowed for discrimination between these two *P. ostreatus* cultivars and *C. militaris.*

Keywords: mushroom identification, molecular markers, PCR

[1] สาขาวิจัยและพัฒนาการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[1] Research and Development Program, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (AG-BIO/MHESI), กรุงเทพฯ

[2] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140 and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/MHESI), Bangkok, 10900

[3] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[3] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

[4] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[4] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

*Corresponding author: agrsrc@ku.ac.th

Agricultural Science and Management J. 8 (3) : 162-173 (2025)

บทคัดย่อ: เห็ดสกุลนางรมและสกุลถั่งเช่าเป็นเห็ดที่มีประโยชน์ทางโภชนการและสรรพคุณทางยา และเป็นที่นิยมของผู้บริโภค โดยเห็ดสกุลนางรมปลูกเลี้ยงง่ายและราคาไม่แพง ส่วนเห็ดถั่งเช่าต้องเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อและมีราคาสูง แม้ว่าการจำแนกเห็ดทั้งสองสกุลนี้สามารถจำแนกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในระยะเกิดดอก แต่ในระยะการเจริญเป็นเส้นใยในระยะเริ่มแรกนั้นเส้นใยเห็ดทั้งสองสกุลมีความคล้ายคลึงกันทำให้ยากต่อการจำแนก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SRAP สำหรับตรวจสอบความแตกต่างของเห็ดสกุลนางรมและสกุลถั่งเช่าในระยะเส้นใย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดเหล่านี้โดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ โดยได้ศึกษาในเห็ดสกุลนางรม 2 ชนิด ได้แก่ เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางฟ้าภูฏาน และเห็ดสกุลถั่งเช่า 1 ชนิด ได้แก่ เห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 100 คู่ (Me1-10/Em1-10) ผลการทดลองพบว่า มีไพรเมอร์ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้ากับเห็ดถั่งเช่าสีทอง และระหว่างเห็ดนางฟ้าภูฏานกับเห็ดถั่งเช่าสีทอง จำนวนอย่างละ 57 คู่ไพรเมอร์ และไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้าและเห็ดนางฟ้าภูฏาน มีจำนวน 33 คู่ ส่วนไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างเห็ดทั้งสามชนิดได้มีจำนวน 16 คู่

คำสำคัญ: การจำแนกเห็ด, เครื่องหมายโมเลกุล, พีซีอาร์

คำนำ

เห็ดเป็นเชื้อราที่มีขนาดใหญ่ซึ่งในระยะหนึ่งของการเจริญจะสร้างโครงสร้างขนาดใหญ่ คือ ดอกเห็ด หรือ fruiting body ที่สามารถมองเห็นได้ชัดเจน โครงสร้างขนาดใหญ่นี้มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันตามชนิด สำหรับเห็ดสกุลนางรม หรือ oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*; Phylum Basidiomycota, Subphylum Agaricomycotina, Class Agaricomycetes, Subclass Agaricomycetidae, Order Agaricales, Family Pleurotaceae) มีชื่อเรียกตามลักษณะของดอกเห็ดที่รูปร่างคล้ายหอยนางรม ชื่อสกุลมาจากคำภาษาละติน pileus ที่หมายถึงหอยนางรม ลักษณะทั่วไปคือหมวกดอกมีผิวด้านบนเรียบกลางหมวกเว้าเป็นแอ่ง ขอบกลีบดอกโค้งลงด้านล่างเล็กน้อย หลังดอกมีลักษณะเป็นครีบ (gill) (Dube, 2013) เห็ดชนิดนี้มีชื่อไทยว่าเห็ดนางรม มีสีและขนาดแตกต่างกันตามสายพันธุ์ย่อยของเห็ด เช่น เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฏาน และเห็ดนางรมฮังการี เป็นต้น เห็ดนางรมสามารถปลูกเลี้ยงได้ง่ายในสภาพแวดล้อมที่ยืดหยุ่นสูง จึงเป็นเห็ดที่ปลูกเป็นการค้ามากที่สุดในโลกชนิดหนึ่ง ในด้านโภชนาการจัดเป็นโปรตีนคุณภาพสูงเนื่องจากมีปริมาณไขมันและแคลอรีต่ำมากและยังมีกากใยอาหารเช่นเดียวกับผักผลไม้ (Chang and Miles, 2004; Regula and Siwulski, 2007)

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*; Phylum Ascomycota, Class Sordariomycete, Subclass Hypocreomycetidae, Order Hypocreales, Family Cordycipitaceae) จัดเป็นเชื้อราปรสิตของแมลง (entomofungus) (Dube, 2013) ชาวจีนเชื่อว่าเห็ดถั่งเช่าสามารถใช้รักษาโรคได้หลายอย่างและมีสรรพคุณเป็นยาอายุวัฒนะ จึงเป็นที่นิยมบริโภคกันมาก แต่เห็ดถั่งเช่าที่เป็นที่ต้องการมากคือเห็ดถั่งเช่าธิเบต (Cordyceps sinensis) ซึ่งเป็นชนิดที่หาได้ยากในธรรมชาติจึงมีราคาสูง (Winkler, 2008) ส่วนชนิดที่มีการเพาะเลี้ยงกันมากในปัจจุบันคือเห็ดถั่งเช่าสีทอง ซึ่งเริ่มมีการพัฒนาเพาะเลี้ยงเป็นการค้าเมื่อประมาณ 15 ปีที่ผ่านมา โดยเพาะเลี้ยงกันมากในประเทศจีน เกาหลีและญี่ปุ่น ทำให้ปัจจุบันเห็ดเพาะเลี้ยงมีราคาถูกลงส่งผลให้การบริโภคเห็ดถั่งเช่ามีมากขึ้น ทั้งในรูปของอาหารเสริม ใช้เป็นยา และใช้ประกอบอาหาร (Das *et al*., 2010)

เนื่องจากข้อดีเด่นของเห็ดสกุลนางรมที่สามารถปลูกเลี้ยงได้ง่าย และข้อดีเด่นในเชิงเป็นเห็ดสมุนไพรของถั่งเช่าสีทอง การพัฒนาสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างเห็ดทั้งสองชนิดนี้จึงเป็นที่น่าสนใจ เพื่อให้ได้เห็ดชนิดใหม่ที่สามารถปลูกเลี้ยงได้ง่าย ราคาไม่แพง และมีทั้งคุณค่าทางอาหารและสรรพคุณทางยา แต่ด้วยการที่เห็ดทั้งสองชนิดอยู่ต่างวงศ์กันการนำเห็ดทั้งสองชนิดมาปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการมาตรฐานไม่

สามารถทำได้ จึงต้องอาศัยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้าช่วย โดยเทคนิคการรวม

โปรโตพลาสต์จัดเป็นเทคนิคที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะประสบความสำเร็จ อย่างไรก็ตาม ภายหลังการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดทั้งสองชนิดแล้ว ขั้นตอนที่สำคัญคือการแยกความแตกต่างระหว่างลูกผสมจากสายพันธุ์พ่อแม่ เพื่อให้สามารถคัดแยกโคโลนีลูกผสมออกจากโคโลนีของเห็ดตั้งต้นได้ตั้งแต่ระยะแรก ทั้งนี้ แม้ว่าในระยะที่เป็นดอกเห็ดนั้นเห็ดทั้งสองชนิดสามารถแยกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานอย่างเด่นชัด เช่น ลักษณะดอก สี ขนาด และความยาวของก้านดอก เป็นต้น (เรือนแก้ว และ ปรีชา, 2553) แต่ในระยะการเจริญเป็นเส้นใยโดยเฉพาะในระยะเริ่มแรกนั้น เส้นใยของเห็ดหลายชนิดมีความคล้ายคลึงกันมาก บางครั้งไม่สามารถจำแนกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐาน อย่างไรก็ตาม มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมเข้ามาช่วยตรวจสอบความแตกต่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งโดยทั่วไปเครื่องหมายโมเลกุลที่ตรวจสอบระดับดีเอ็นเอหรือที่เรียกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นจะช่วยให้สามารถตรวจสอบและแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบได้อย่างละเอียด ดังนั้น จึงคาดว่าหากนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมเข้ามาช่วยจะทำให้สามารถคัดแยกโคโลนีที่เป็นลูกผสมของเห็ดทั้งสองชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) เป็นเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดย Li and Quiros (2001) โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 ชนิด ชนิด forward primer มีขนาด 17 เบส ที่ประกอบด้วยลำดับเบสแกน (core sequence) ที่เหมือนกันยาว 14 เบส ประกอบด้วยส่วนของลำดับเบสเรียกว่า filler ยาว 10 เบส ต่อด้วยเบส CCGG เพื่อให้จับได้กับส่วน exon หรือ ORF ซึ่งมักเป็นบริเวณที่มีองค์ประกอบของเบสเป็น GC สูง (GC rich) และตรงส่วนปลาย 3’ ของไพรเมอร์นี้มีเบสคัดเลือก (selective bases) อีก 3 เบส เบสทั้ง 3 นี้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ ส่วน reverse primer มีขนาด 18 เบส ประกอบด้วยลำดับเบสแกนที่เหมือนกันยาว 15 เบส ประกอบด้วยส่วน filler ยาว 11 เบส ต่อด้วยเบส AATT เพื่อให้จับได้กับดีเอ็นเอในจีโนมบริเวณ AT สูง ซึ่งมักพบในส่วน intron และ promoter ของยีน ตรงปลาย 3’ ของไพรเมอร์เป็นเบสคัดเลือกที่เปลี่ยนแปลงได้อีก 3 เบส (Table 1) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างของเทคนิคนี้ใช้วิธี step up PCR คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำที่ 35 องศาเซลเซียส 5 รอบ เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดีแล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นตามปกติอีก 30-35 รอบ เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มาจาก 5 รอบแรกเท่านั้น ทำให้ผลที่ได้มีความคงที่ และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน (สุรินทร์, 2552) โดยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายได้ดี เช่น Ren *et al*. (2012) พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP มีประสิทธิภาพในการระบุลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา endophytic ได้ดีกว่าการใช้เทคนิค AFLP แบบดั้งเดิม ทำให้สามารถตรวจคัดกรองสายพันธุ์เชื้อรา endophytic ได้อย่างแม่นยำ ในด้านการปรับปรุงพันธุ์นั้นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกลูกผสมต่าง ๆ จะช่วยลดระยะเวลาของการคัดเลือก (Zhang *et al*., 2009) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SRAP ในการคัดเลือกโปรโตพลาสต์ลูกผสมของเห็ดหลินจือ โดยตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 153 คู่ และพบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอเฉพาะสำหรับสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ และสามารถใช้เพื่อตรวจยืนยันโปรโตพลาสต์ลูกผสมของเห็ดหลินจือได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SRAP ในการตรวจสอบความแตกต่างของเห็ดสกุลนางรมและสกุลถั่งเช่า ผลการทดลองที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปใช้ในการคัดเลือกลูกผสมระหว่างเห็ดสกุลนางรมและสกุลถั่งเช่าที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดนางฟ้า (Phoenix oyster mushroom) นางฟ้าภูฏาน (Bhutan oyster mushroom) (เชื้อพันธุกรรมเห็ดจาก สำนักวิจัยพัฒนา

เทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร) และเห็ดถั่งเช่าสีทอง (เชื้อพันธุกรรมจากบริษัท ที เอส ทวิน จำกัด) ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ BioFACTTM Genomic DNA Prep Kit For Fungus (BIOFACT Co., Ltd., Korea) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ ด้วยวิธี electrophoresis ใน 1% agarose gel วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร

การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP ทำโดยจับคู่ forward primer จำนวน 10 ไพรเมอร์ และ reverse primer จำนวน 10 ไพรเมอร์ ได้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 100 คู่ (Table 1) นำดีเอ็นเอเห็ดทั้ง 3 ชนิด มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP โดยการเตรียมปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัม forward primer 100 นาโนกรัม reverse primer 100 นาโนกรัม 10 mM dNTP 10x PCR buffer และ Taq polymerase (RBC) 1 ยูนิต นำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค step up PCR โดยมีขั้นตอนคือ ขั้นที่ 1) pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยาขั้นที่ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 35 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, จำนวน 5 รอบ ทำปฏิกิริยาขั้นที่ 3) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, จำนวน 35 รอบ และในขั้นสุดท้าย final extension ทำปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis ใน 1.5% agarose gel โดยเทียบขนาดของ PCR product กับ GeneRuler 100 bp plus DNA ladder (Thermo Scientific) และนำแถบดีเอ็นเอมาเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละคู่ไพรเมอร์

Table 1 The sequences of SRAP primers used in this study. The dash line (.....) represents filler, the underline (___) represents a GC– or AT–rich region and the thick underline (___) represents the selective bases at 3' end.

SRAP forward primers (5′-3′)	SRAP reverse primers (5′-3′)
Me1 TGAGTCCAAACCGGAAA	Em1 GACTGCGTACGAATTAAC
Me2 TGAGTCCAAACCGGAAG	Em2 GACTGCGTACGAATTAAT
Me3 TGAGTCCAAACCGGAAC	Em3 GACTGCGTACGAATTGAC
Me4 TGAGTCCAAACCGGAAT	Em4 GACTGCGTACGAATTGCA
Me5 TGAGTCCAAACCGGAGC	Em5 GACTGCGTACGAATTCAA
Me6 TGAGTCCAAACCGGACA	Em6 GACTGCGTACGAATTCAG
Me7 TGAGTCCAAACCGGACC	Em7 GACTGCGTACGAATTCAC
Me8 TGAGTCCAAACCGGATA	Em8 GACTGCGTACGAATTCTG
Me9 TGAGTCCAAACCGGTAG	Em9 GACTGCGTACGAATTTGA
Me10 TGAGTCCAAACCGGTCA	Em10 GACTGCGTACGAATTTGC

ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการทดลองคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP สำหรับระบุสายพันธุ์เห็ด ที่ได้ศึกษาโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเห็ด 3 ชนิด ได้แก่ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฏาน และเห็ดถั่งเช่าสีทอง ด้วยไพรเมอร์จำนวน 100 คู่ หลังการตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ใน 1.5% agarose gel พบว่า พบว่า มี 3 คู่ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ คือ Me2-Em7, Me5-Em7 และ Me6-Em8 และมี 97 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (Table 2) โดยมีขนาดแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 100-1,000 เบส แต่คู่

ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน สามารถแยกเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้ มีจำนวน 16 คู่ ได้แก่ Me1-Em7, Me2-Em8, Me3-Em4, Me3-Em8, Me3-Em9, Me4-Em1, Me4-Em7, Me4-Em9, Me5-Em1, Me5-Em5, Me5-Em10, Me7-Em1, Me8-Em1, Me9-Em10, Me10-Em2 และ Me10-Em7 ซึ่งทั้ง 16 คู่นี้ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 86 แถบ มีค่าเฉลี่ยจำนวนแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 5.38 แถบต่อคู่ไพร์เมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic bands) จำนวน 82 แถบ (96.18 เปอร์เซ็นต์) คิดเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเท่ากับ 5.31 แถบต่อคู่ไพร์เมอร์ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ Me4-Em1 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 8 แถบ

สำหรับคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้ (Table 2) นั้น เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่ได้สามารถแยกความแตกต่างได้เฉพาะเห็ดคู่ใดคู่หนึ่งเท่านั้น เช่น คู่ไพรเมอร์ Me1-Em2 ที่มีจำนวนแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 6 แถบ และมีเปอร์เซ็นต์พอลิมอฟิกส์ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหมายถึงแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณทั้ง 6 แถบนี้ มีขนาดแตกต่างกัน และพบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้ากับเห็ดถั่งเช่าสีทอง และเห็ดนางฟ้าภูฏานกับเห็ดถั่งเช่าสีทองได้อย่างชัดเจน (Table 5, 6) แต่อย่างไรก็ตาม คู่ไพรเมอร์นี้กลับไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้าและเห็ดนางฟ้าภูฏานได้ เนื่องจากแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ที่พบในเห็ดนางฟ้าและเห็ดนางฟ้าภูฏานมีขนาดเท่ากัน

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ทั้ง 16 คู่ ในเห็ดทั้ง 3 ชนิด (Table 3) พบว่า เห็ดนางฟ้าให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด เท่ากับ 43 แถบ เฉลี่ย 2.68 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ Me4-Em1 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 7 แถบต่อคู่ ส่วนเห็ดถั่งเช่าสีทองให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด เท่ากับ 31 แถบ เฉลี่ย 1.93 แถบต่อคู่

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบคู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ด 2 ชนิด ได้แก่ 1) เห็ดนางฟ้ากับเห็ดนางฟ้าภูฏาน 2) เห็ดนางฟ้ากับเห็ดถั่งเช่าสีทอง และ 3) เห็ดนางฟ้าภูฏานกับเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่า จำนวนคู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้ากับนางฟ้าภูฏานได้มีจำนวน 33 คู่ (Table 4) โดยให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 159 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความความแตกต่างจำนวน 112 แถบ คิดเป็น 70.44 เปอร์เซ็นต์ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ Me4-Em1 มีจำนวนแถบทั้งหมด 8 แถบ และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 7 แถบ

สำหรับจำนวนคู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้ากับเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ มีจำนวน 57 คู่ (Table 5) ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 241 แถบ มีแถบที่มีความแตกต่าง 217 แถบ คิดเป็น 90.04 เปอร์เซ็นต์ คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ Me3-Em2 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 9 แถบ และคู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้าภูฏานและเห็ดถั่งเช่าสีทองได้มีจำนวนเท่ากับ 57 คู่ (Table 6) จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 231 แถบ มีแถบที่ทำให้เกิดความแตกต่างเท่ากับ 199 แถบ คิดเป็น 86.15 เปอร์เซ็นต์ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ Me8-Em5 ให้แถบดีเอ็นเอเท่ากับ 7 แถบ ทั้งนี้ จำนวนคู่ไพรเมอร์และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันที่พบว่า มีมากกว่าการเปรียบเทียบระหว่าง ในการเปรียบเทียบระหว่างเห็ดนางฟ้ากับเห็ดถั่งเช่าสีทอง และเห็ดนางฟ้าภูฏานกับเห็ดถั่งเช่าสีทอง แสดงให้เห็น

Table 2 The number of DNA band generated by SRAP primer pairs in all of three mushrooms, the Phoenix oyster mushroom, the Bhutan oyster mushroom and *Cordyceps militaris*. A set of number in form of x/x in each cell represent a total number of DNA bands / polymorphic bands.

Primers	Em1	Em2	Em3	Em4	Em5	Em6	Em7	Em8	Em9	Em10
Me1	3/3	6/6	4/3	6/5	4/4	2/2	4/4	7/7	3/3	4/4
Me2	5/5	4/2	4/4	6/5	6/6	5/5	0/0	5/5	3/3	3/2
Me3	1/1	9/9	5/4	7/6	3/3	2/2	3/3	5/4	7/7	2/2
Me4	8/7	3/3	2/2	7/6	3/3	5/5	6/6	6/6	6/6	2/2
Me5	4/4	4/4	5/5	4/3	4/4	3/3	0/0	4/3	6/4	5/5
Me6	4/4	5/5	5/5	3/2	2/2	4/4	5/5	0/0	4/4	4/4
Me7	4/4	6/6	3/2	4/4	3/3	4/4	5/5	3/2	4/4	4/4
Me8	4/4	6/4	7/5	5/5	8/8	4/4	6/6	4//4	5/3	5/5
Me9	5/5	3/3	7/6	7/7	2/1	4/4	8/8	4/4	5/5	4/4
Me10	4/4	7/6	3/3	3/2	5/5	5/5	6/6	5/5	4/4	6/6

SRAP primers cannot differentiate SRAP primers can differentiate

Table 3 The number of DNA bands of the Phoenix oyster mushroom, the Bhutan oyster mushroom and *Cordyceps militaris* revealed by SRAP primers that can differentiate. A set of numbers in the form of x-x-x represents the number of DNA bands of the Phoenix oyster mushroom – the Bhutan oyster mushroom – *C. militaris* respectively. The total number of DNA bands and the (average) of each mushroom are 43 (2.68) for the Phoenix oyster mushroom, 35 (2.18) for the Bhutan oyster mushroom and 31 (1.93) for *C. militaris*.

Primers	Em1	Em2	Em3	Em4	Em5	Em6	Em7	Em8	Em9	Em10
Me1							2-1-1			
Me2								2-2-2		
Me3				5-3-2				4-4-2	5-3-1	
Me4	7-2-3						2-1-2		1-3-2	
Me5	2-2-2				1-2-2					2-1-2
Me6										
Me7	1-2-1									
Me8	2-2-1									
Me9										1-1-3
Me10		4-3-4					2-3-1			

SRAP primers cannot differentiate SRAP primers can differentiate

Table 4 Total DNA bands and the polymorphic bands of the Phoenix oyster mushroom and the Bhutan oyster mushroom revealed by SRAP primers that can differentiate. A set of number in the form of x/x in each cell represents a total number of DNA bands / polymorphic bands.

Primers	Em1	Em2	Em3	Em4	Em5	Em6	Em7	Em8	Em9	Em10
Me1							3/3			4/3
Me2					6/6			4/4		
Me3				6/4				5/3	6/4	
Me4	8/7						3/3		4/4	
Me5	3/2				3/3					3/3
Me6			5/4			4/4				4/2
Me7	3/3	6/4								
Me8	3/2		7/3		8/3		6/2			
Me9	5/3		5/2	7/4			6/5		4/2	2/2
Me10		5/2			5/5	5/3	5/5			6/3

SRAP primers cannot differentiate SRAP primers can differentiate

Table 5 Total DNA bands and polymeric bands of the Phoenix oyster mushroom and *Cordyceps militaris* revealed by SRAP primers that can differentiate. A set of number in the form of x/x in each cell represents a total number of DNA bands / polymorphic bands.

Primers	Em1	Em2	Em3	Em4	Em5	Em6	Em7	Em8	Em9	Em10
Me1	3/3	6/6		6/4	3/3		3/3	8/8		
Me2		5/3	3/3	4/3		3/3		4/4	3/3	
Me3		9/8	5/3	6/5				5/4	6/6	
Me4			2/2	5/4	3/3	4/4		6/6	3/3	2/2
Me5	3/2	4/4	5/5		3/3				4/2	4/4
Me6	4/4	4/4		4/3						
Me7	2/2						4/4	3/2	4/3	4/4
Me8	4/4	5/4		4/4		4/4		4/3	6/2	5/4
Me9		3/3	6/5			3/3	8/8	4/4	5/5	
Me10	4/4	6/4		3/2	5/5		3/3	4/4		

SRAP primers cannot differentiate SRAP primers can differentiate

Table 6 Total DNA bands and polymeric bands of the Bhutan oyster mushroom and *Cordyceps militaris* revealed by SRAP primers that can differentiate. A set of numbers in the form of x/x in each cell represents a total number of DNA bands / polymorphic bands.

Primers	Em1	Em2	Em3	Em4	Em5	Em6	Em7	Em8	Em9	Em10
Me1		6/6	3/2	5/4	3/3			4/4		
Me2		5/2		6/4		4/4		3/3		
Me3		6/6	5/4	4/3			4/4	5/3	4/4	
Me4	4/3	3/3		6/5		3/3	3/3	3/3	5/5	2/2
Me5	4/4	3/3	5/5	4/3	3/2					
Me6	4/3	4/4		3/2	2/2					
Me7	2/2						4/4			4/4
Me8	3/3	6/4		4/4	7/7	4/4		4/3	6/3	5/3
Me9	4/3	3/3	6/5			4/4	3/3	3/3	4/4	4/4
Me10	4/4	6/5		3/2	4/4		4/4	5/4		

SRAP primers cannot differentiate SRAP primers can differentiate

จากผลการศึกษาการแยกความแตกต่างของเห็ด 3 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฏาน และเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยใช้เครื่องหมาย SRAP ที่พบว่ามีคู่ไพรเมอร์ 97 คู่ จากจำนวนทั้งหมด 100 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยพบว่าเห็ดนางฟ้าและนางฟ้าภูฏาน ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอและขนาดดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกัน และมีจำนวนคู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้ากับนางฟ้าภูฏานได้เพียง 33 คู่ และมีเปอร์เซ็นต์พอลิมอฟิกส์เพียง 70.44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการที่มีเปอร์เซ็นต์พอลิมอฟิกส์น้อยนี้แสดงให้เห็นว่า เห็ดทั้งสองสายพันธุ์นี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันค่อนข้างน้อย ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานของเห็ดทั้งสองสายพันธุ์ที่คล้ายกันมาก (Figure 2) เนื่องจากเห็ดทั้งสองสายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์ย่อยในชนิด (species) เดียวกันคือ Pleurotus ostreatus จึงมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก (กรมวิชาการเกษตร, 2556) และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน คือ หมวกดอกมีผิวเรียบ กลางหมวกเว้าเป็นแอ่ง ขอบหมวกม้วนลงเล็กน้อย เมื่อดอกเห็ดบานเต็มที่ด้านใต้ของหมวกเห็ดจะมีลักษณะเป็นครีบ ก้านดอกยาวปานกลางติดเป็นเนื้อเดียวกับหมวก ดอกเห็ดอาจเกิดเป็นดอกเดียวหรือเกิดเป็นกระจุก (อุราภรณ์ และคณะ, 2552) ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานทดลองของ Atila *et al*. (2018) ที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP ในการทดสอบความแตกต่างของเห็ดหัวลิง (Hericium) จำนวน 8 สายพันธุ์ พบว่า มีคู่ไพรเมอร์จำนวน 16 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอ 164 แถบ พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphic bands) จำนวน 154 แถบ และพบว่าเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิกอยู่ในช่วง 72.7-100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 7-22 แถบ เฉลี่ย 9.75 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ โดยคู่ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากสุดคือ Me1-Em3 และสรุปได้ว่าเห็ดหัวลิงบางสายพันธุ์มีพันธุกรรมใกล้ชิดกันมาก ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐาน

ส่วนเห็ดถั่งเช่าสีทองนั้นอยู่ในสกุล Cordyceps (เยาวภา, 2558) มีลักษณะทางสัณฐานและพันธุกรรมที่ต่างจากเห็ดสกุลนางรมมาก จึงทำให้พบแถบดีเอ็นเอที่ต่างจากเห็ดสกุลนางรม และมีจำนวนคู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างได้จำนวนมากกว่า ซึ่งในการทดลองนี้พบว่ามีจำนวนคู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้ากับเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ มากถึง 57 คู่ ซึ่งเท่ากัน

กับที่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้าภูฏานกับเห็ดถั่งเช่าสีทอง แสดงให้เห็นว่าเห็ดทั้งสองสกุลนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก ซึ่งสอดคล้องกับการที่ลักษณะทางสัณฐานของเห็ดทั้งสองสกุลมีความแตกต่างกันมาก แต่อย่างไรก็ตาม มีคู่ไพรเมอร์ที่สามารถใช้จำแนกเห็ดทั้งสองชนิดนี้ที่ต่างกันและมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างที่ต่างกันด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า คู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเส้นใยเห็ดทั้ง 3 ชนิด มีจำนวนเพียง 16 คู่เท่านั้น

อย่างไรก็ตาม การมีแถบดีเอ็นเอบางตำแหน่งมีความจำเพาะกับเห็ดชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้นจึงจะช่วยให้สามารถแยกเห็ดทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP มาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมและจัดจำแนกสายพันธุ์เห็ดได้ และคาดว่าน่าจะใช้ในการบ่งชี้สายพันธุ์ที่เป็นลูกผสมได้ด้วย โดยเมื่อพิจารณาคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างชัดเจนซึ่งสามารถนำไปใช้ตรวจสอบเพื่อยืนยันความแตกต่างระหว่างเห็ดแต่ละชนิดได้ ดังตัวอย่างของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ที่แสดงใน (Figure 1) ที่แสดงให้เห็นว่าในกรณีการแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้ากับนางฟ้าภูฏาน พบว่าคู่ไพรเมอร์ Me1-Em10 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 4 แถบ คู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้าภูฏานกับเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ดีคือ Me2-Em6 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 6 แถบ และคู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้ากับเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ดีคือ Me4-Em8 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 4 แถบ ดังนั้น คู่ไพรเมอร์เหล่านี้จึงเป็นตัวอย่างของคู่ไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SRAP ที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฏาน และเห็ดถั่งเช่าสีทองได้

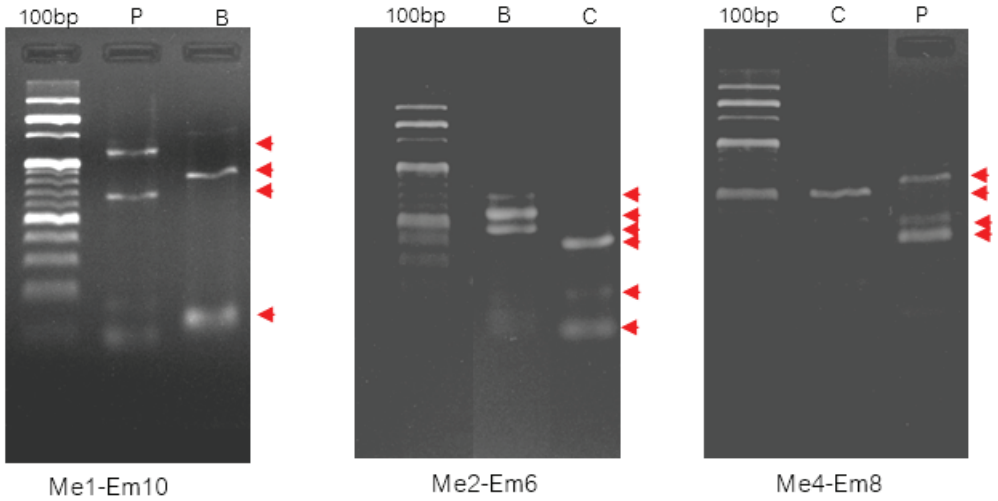

Figure 1 The example of SRAP amplification profiles using Me1-Em10, Me2-Em6 and Me4-Em8 primer pairs visualized on agarose gel electrophoresis. The red arrows indicate the uniquely distinguished bands of each moshroom. (100bp: 100 bp plus DNA Ladder; P: the Phoenix oyster mushroom; B: the Bhutan oyster mushroom; C: *Cordyceps militaris*)

ทั้งนี้ การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของการปรับปรุงพันธุ์เห็ดโดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP ที่ผ่านมามีรายงานว่ามีประสิทธิภาพสูง เช่นงานวิจัยของ Zhang *et al*. (2009) ที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP ในการคัดเลือกโปรโตพลาสต์ลูกผสมของเห็ดหลินจือ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 153 คู่ พบ 4 คู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอเฉพาะสำหรับสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ และสามารถใช้เพื่อยืนยันความเป็นโปรโตพลาสต์ลูกผสมของเห็ดหลินจือได้ และในพืชชั้นสูงมีงานวิจัยของ Huang *et al.* (2014) ที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของ Stylosanthes guianensis โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ได้จำนวน 35 คู่ เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบความเป็นลูกผสมจำนวน 84 ลูกผสม พบว่า มีจำนวนลูกผสมทั้งหมด 68 ลูกผสม ที่มีแถบดีเอ็นเอทั้งของพ่อและแม่ส่วนลูกผสมที่เหลือเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมตัวเอง

นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ของเห็ดทั้ง 3 ชนิด พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.27 ถึง 0.44 โดยเห็ดนางฟ้าและเห็ดนางฟ้าภูฏานมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่เท่ากัน คือ 0.27 ซึ่งเมื่อนำค่าที่ได้มาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA (Figure 2) พบว่าสามารถจัดกลุ่มแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเห็ดนางฟ้าและนางฟ้าภูฏาน และกลุ่มที่ 2 คือ เห็ดถังเช่าสีทอง และเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกของเห็ดทั้งสามชนิด (Figure 2) ก็พบว่ามีความสอดคล้องกันคือ เห็ดนางฟ้าและเห็ดนางฟ้าภูฏาน จะมีลักษณะดอกที่คล้ายคลึงกันมาก โดยเห็ดนางฟ้าจะมีดอกหนาขนาดใหญ่ มีสีน้ำตาลดำอมเทา ส่วนเห็ดนางฟ้าภูฏานดอกเห็ดมีสีขาวนวลหรือน้ำตาลเทา หากอากาศเย็นจะมีสีเข้มขึ้นเป็นสีเทาเข้ม (กลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์, 2541) ส่วนเห็ดถังเช่าสีทอง ดอกจะมีลักษณะเป็นกระบองสีเหลืองทอง ซึ่งแตกต่างจากเห็ดนางฟ้าและนางฟ้าภูฏานอย่างชัดเจน

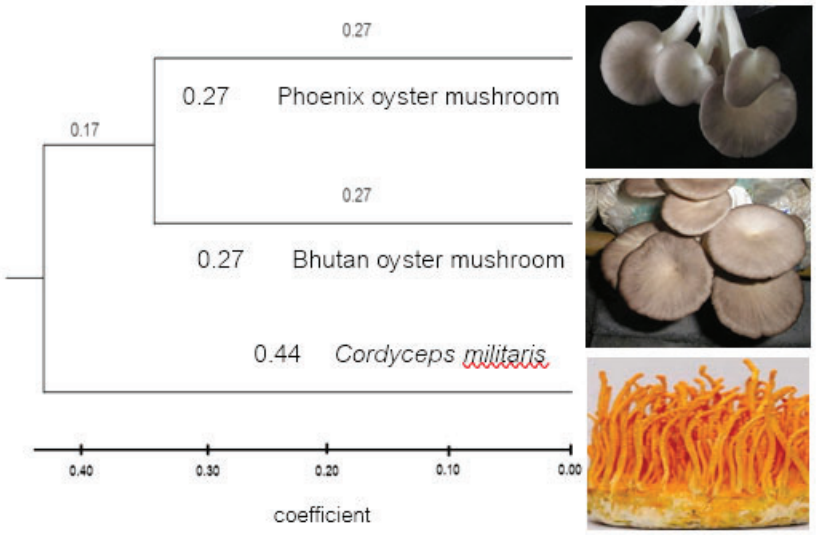

Figure 2 The UPGMA dendrogram based on SRAP data demonstrated the genetic relationships among two oyster mushrooms and *Cordyceps militaris*.

สรุป

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SRAP สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดนางฟ้า นางฟ้าภูฏาน และถั่งเช่าสีทองได้ โดยจากการทดลองใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 100 คู่ (Me1-10/Em1-10) พบว่ามี 16 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้ โดยพบแถบดีเอ็นเอ 86 แถบ พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphic bands) จำนวน 82 แถบ คิดเป็น 96.18 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการแยกความแตกต่างทีละคู่พบว่ามีคู่ไพรเมอร์ 33 คู่ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้าและนางฟ้าภูฏานได้ และมีคู่ไพรเมอร์ 57 คู่ ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างเห็ดนางฟ้ากับเห็ดถั่งเช่าสีทอง หรือ ระหว่างเห็ดนางฟ้าภูฏานกับเห็ดถั่งเช่าสีทองได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาเกษตรและเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (AG-BIO/MHESI) ประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2556. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเห็ด. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.aopdh02.doae.go.th/ wonlop_het.pdf (15 ธันวาคม 2565).

กลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์. 2541. ข้อมูลเชื้อพันธุ์เห็ดบริการ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพมหานคร. 21 หน้า.

เยาวภา ทองอร่าม. 2558. การศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองโดยใช้หัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อแข็งของ *Cordyceps militalis* บนเมล็ดธัญพืช. วารสารวิชาการโรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า 13(13): 87-99.

เรือนแก้ว ประพฤติ และปรีชา รัตนัง. 2553. การรวบรวมและจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมที่เพาะเป็นการค้าด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี. วารสารเกษตร 26(2): 137-145.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 269 หน้า.

อุราภรณ์ สอาดสุด, วิชชา สอาดสุด, ธวัช ทะพิงค์แก, ศิริพร หัสสรังสี, นภาวรรณ โฆษิตเรืองชัย, อรอนงค์ อาร์ตีโร, เพ็ญศิริ ศรีบุรี และสุรพันธ์ กาญจนวงศ์. 2552. การควบคุมคุณภาพและยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยวเห็ดสกุลนางรม. ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 106 หน้า.

Atila, F., Y. Tüzel, B. Çakir and D. Erogul. 2018. Genetic diversity analysis of *Hericium* isolates by ISSR and SRAP markers. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 7(5): 532-536.

Chang, S.T. and P.G. Miles. 2004. Mushrooms-Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact. 2nd Edition. CRC Press. Boca Raton. 477 p.

Das, S.K., M. Masuda, A. Sakurai and M. Sakukabara. 2010. Medicinal uses of the mushroom Codyceps militaris: Current state and prospects. Fitoterapia 81(8): 961-968.

Dube, H.C. 2013. An Introduction to Fungi. 4th Revised Edition. Scientific Publishers. Jodhpur, India. 603 p.

Huang, C.Q., G.D. Liu, C.J. Bai, W.Q. Wang and J. Tang. 2014. Application of SRAP markers in the identification of *Stylosanthes guianensis* hybrids. Molecular Biology Reports 41: 5923–5929.

Li, G. and C.F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. Theoretical and Applied Genetics 103: 455-461.

Regula, J. and M. Siwulski. 2007. Dried shitake (*Lentinulla edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) Mushrooms as a good source of nutrient. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria 6(4): 135-142.

Ren, N., J. Liu, D. Yang, J. Chen, M. Luan and J. Hong. 2012. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) marker as a new method for identification of endophytic fungi from Taxus. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28: 215–221.

Winkler, D. 2008. Yartsa Gunbu (Cordyceps sinensis) and the fungal commodification of Tibet's rural economy. Economic Botany 62(3): 291-305.

Zhang, H., L. Fu, X. Wu, H. Li, H. Wei, Q. Wu and L. Wang. 2009. Identification of protoplast fusion hybrids of Ganoderma lucidum by SRAP analysis. Acta Edulis Fungi 16(04): 9-13.