


ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคน *Termitomyces straitus* (Beeli) Heim

โดยใช้ลำดับเบสไอทีเอส



นางสาว สายรัก กวางแก้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-3385-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC VARIATIONS OF TERMITE MUSHROOM *Termitomyces straitus* (Beeli) Heim
BASED ON THE ITS SEQUENCES



Miss Sairak Kwangkeow

ศูนย์วิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-3385-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคน *Termitomyces*
straitus(Beeli) Heim โดยใช้ลำดับเบสไอทีเอส

โดย นางสาวสายรัก กวางแก้ว

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ

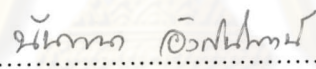
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ


รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกุล

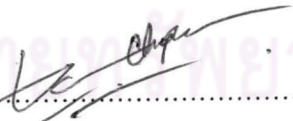
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันท์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกุล)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ ไก่สกุล)

สายรัก กวางแก้ว : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคน *Termitomyces straitus* (Beeli) Heim โดยใช้ลำดับเบสไอทีเอส. (GENETIC VARIATIONS OF TERMITE MUSHROOM *Termitomyces straitus* (Beeli) Heim BASED ON THE ITS SEQUENCES) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญญ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ์ รองศาสตราจารย์.ดร.วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล 94 หน้า. ISBN 974-17-3385-2

เห็ดโคนถูกจำแนกไว้ในสกุล *Termitomyces* จากการสุ่มเก็บตัวอย่างดอกเห็ดโคนจากจังหวัดต่างๆ ถูกนำมาจัดหมวดหมู่เพื่อให้ได้เห็ดโคนชนิด *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim ทำให้ทราบว่าเห็ดโคนชนิดนี้สามารถขึ้นได้ในจังหวัดต่างๆ 5 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี นครปฐม อุทัยธานี เพชรบุรี และตาก ซึ่งจังหวัดเหล่านี้ได้ถูกคัดเลือกให้เป็นแหล่งสำหรับการเก็บตัวอย่างจำนวน 17 ตัวอย่าง นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร PDA และอาหารเหลวสูตร PDB ทำให้ได้เส้นใยแล้วจึงนำมาสกัดดีเอ็นเอ การศึกษาดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โดยเลือกใช้คู่ ITS primers ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยเทคนิค DNA sequencing พบว่าเห็ดโคนทั้ง 17 ตัวอย่าง ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 - 700 นิวคลีโอไทด์ จากลำดับเบสที่ได้เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่า homology ของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีค่าสูงคือ 99-100 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลการวิเคราะห์ alignment และ phylogenetic tree สามารถแบ่งเห็ดโคนได้เป็น 2 กลุ่ม ที่มีความเด่นชัดต่างจากเห็ดโคน *T. straitus* ที่ได้จากประเทศอินโดนีเซีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... พฤษศาสตร์.....

สาขาวิชา..... พันธุศาสตร์.....

ปีการศึกษา.....2545.....

ลายมือชื่อผู้ผลิต.....สายรัก กวางแก้ว.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อ.มุกดา คูหิรัญญ์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....อ.ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....อ.ดร.วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล.....

4272426923 : MAJOR GENETICS

KEYWORD: TERMITOMYCES / RIBOSOMAL DNA / DNA SEQUENCE / PCR

SAIRAK KWANGKEOW : GENETIC VARIATIONS OF TERMITE MUSHROOM *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim BASED ON THE ITS SEQUENCES

THESIS ADVISOR : Assoc. Prof. MUKDA KUHIRUN, THESIS COADVISOR :

Dr. PIYASAK CHAUMPLUK and Assoc. Prof. Dr. WARAWUT CHULALUKSANANUKUL

94 pp. ISBN 974-14-3385-2

Termite mushroom is classified in genus *Termitomyces*. The Termite mushroom sample collection from many province were brought to be identified for species *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim. It was found that this species of mushroom could grow in many provinces. From these provinces, 17 samples were collected from 5 provinces, such as Khanchanaburi, Nakornpatom, Uthaithani, Petchaburi and Tak. The tissue of 17 samples were cultured on solid media, PDA and in liquid media, PDB for DNA extraction from mycelium. The extracted DNA from the samples were subjected to sequencing and studied on its ITS region using ITS primers. It was found that DNA sequences of among each 17 samples has 600-700 nucleotides long. Comparison on DNA sequences, revealed the homology value of 99 -100 % . From DNA alignment and phylogenetic analysis, relationships among termite mushroom in this study can be divided into two groups which hold different characteristic from that of Indonesia one.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department/Program.....Botany.....

Field of study.....Genetics.....

Academic year.....2002.....

Student's signature.....*Sairak Kwangkeow*.....

Advisor's signature.....*Mukda Kuhirun*.....

Co- Advisor's signature.....*Prof. Piyasak Chaumpluk*.....

Co- Advisor's signature.....*Warawut Chulaluksananukul*.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อแนะนำ และคำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อข้าพเจ้า ตลอดจนได้สละเวลาอันมีค่าในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรุณี จุฬาลักษณ์านุกูล ที่คอยให้คำแนะนำและคำปรึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นันทนา อังกินันท์ ประธานกรรมการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์เตือนใจ ไก่สกุล ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อนิวรรณ เฉลิมพงษ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำเกี่ยวกับการจัดจำแนกชนิดเห็ด

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ รวมถึงบุคลากรในภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ และน้อง ทุกคน ที่กรุณาเอื้อเฟื้อและให้ความช่วยเหลือเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ท้ายสุด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่ได้สนับสนุนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา จนงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3 วิธีดำเนินการวิจัย	18
4 ผลการทดลอง	25
4.1 การเก็บรวบรวมและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน	25
4.2 การแยกเส้นใยจากดอกเห็ดเพื่อให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ	31
4.3 คุณภาพดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โดยเทคนิค PCR และการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS	36
4.4 การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนตัวอย่างโดยวิธี DNA sequencing	42
4.5 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนต่างกลุ่มกัน	54
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	71
รายการอ้างอิง	77
ภาคผนวก	81
ภาคผนวก ก	82
ภาคผนวก ข	84
ภาคผนวก ค	87
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	94

1	แสดงคุณค่าทางอาหารของเห็ดโคน	5
2	แสดงปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นที่เป็นส่วนประกอบในเห็ดโคน	6
3	แสดง universal ITS primer ที่นิยมใช้ในการ amplify	14
4	สรุปข้อมูลการสุ่มเก็บตัวอย่างเห็ดโคนในพื้นที่จังหวัดต่างๆใน 4 ภูมิภาค	25
5	วันที่เก็บตัวอย่าง แหล่งที่เก็บเห็ดโคน สัญลักษณ์แทนชื่อ และจำนวนตัวอย่าง เห็ดโคน <i>Termitomyces striatus</i> (Beeli) Heim ที่เก็บได้	26
6	ลักษณะทางสัณฐานของเห็ดโคน <i>Termitomyces striatus</i> (Beeli) Heim. ที่เก็บ ตัวอย่างจาก 5 จังหวัด	30
7	แสดงค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 260, 280 และ 320 นาโนเมตร ดีเอ็นเอสกัดจากเส้นใยเห็ดแห้ง 10 กรัม	36
8	ประสิทธิภาพในการโคลนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ของเห็ดโคน <i>Termitomyces striatus</i> (Beeli) Heim	40
9	แสดงสัญลักษณ์แทนชื่อโคลนที่โคลนได้	41
10	เปรียบเทียบขนาดลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของ ITS จากตัวอย่าง เห็ดโคน <i>Termitomyces striatus</i> (Beeli) Heim จำนวน 17 ตัวอย่าง	43
11	เปรียบเทียบค่า homology และ distance ภายในกลุ่มตัวอย่าง <i>Termitomyces striatus</i> (Beeli) Heim จำนวน 17 ตัวอย่าง	45
12	alignment ลำดับเบส ITS จากตัวอย่างเห็ดโคนอย่าง <i>Termitomyces striatus (Beeli) Heim</i> ในการทดลองนี้จำนวน 17 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CLUSTAL W (1.82)	46
13	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคน อย่าง <i>Termitomyces striatus (Beeli) Heim</i> กับกลุ่ม <i>Termitomyces sp.</i> และ <i>Termitomyces striatus (Beeli) Heim</i> ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ในรูปแบบของ distance และ homology	56
14	alignment ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบส ITS โดยวิธี CLUSTAL W (1.82) เปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างในงานทดลอง 17 ตัวอย่าง กับตัวอย่างต่างกลุ่ม (<i>Termitomyces sp</i> และ <i>Termitomyces striatus</i>) ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้	58

1	แสดงชุดของ rDNA (multiple copy gene family) ที่มีลักษณะซ้ำๆ ในจีโนม	12
2	แสดงส่วนของ ITS region	13
3	แผนที่แสดงแหล่งเก็บตัวอย่างเห็ดโคน <i>Termitomyces striatus</i> (Beeli) Heim ครอบคลุมพื้นที่ 5 จังหวัด	27
4	ตัวอย่างเห็ดโคนชนิด <i>Termitomyces striatus</i> (Beeli) Heim จากแหล่ง เห็ดโคน 8 แหล่ง ครอบคลุมพื้นที่ 5 จังหวัด	28
5	เซลล์หมัน (cystidia) ของเห็ดโคนชนิด <i>Termitomyces striatus</i> (Beeli) Heim จากแหล่งเห็ดโคน 8 แหล่ง ครอบคลุมพื้นที่ 5 จังหวัด	29
6	การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดโคน จากอำเภอสรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี(TK1) ในอาหารเหลว PDB.....	32
7	การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดโคน จากอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม(TN10) ใน อาหารเหลว PDB.....	33
8	การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดโคน จากอำเภอเมืองจังหวัดเพชรบุรี(TP16) ใน อาหารเหลว PDB.....	34
9	ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดโคน <i>Termitomyces striatus</i> (Beeli) Heim ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB	35
10	ผลผลิตดีเอ็นเอจาก PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS ของเห็ดโคน จำนวน 17 ตัวอย่าง	37
11	แสดงการตรวจคัดเลือกโคลน	38
12	ผลผลิตดีเอ็นเอจาก PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS เพื่อตรวจสอบว่าพลาสมิด ดีเอ็นเอที่โคลนได้มีดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการ	39
13	phylogram แสดงความสัมพันธ์ภายในกลุ่มแบบหยาบของเห็ดโคน <i>Termitomyces striatus</i> (Beeli) Heim จำนวน 17 ตัวอย่างตามวิธี CLUSTAL W (1.82) โดยอาศัยลำดับเบส ITS (ITS sequence)	52

ภาพที่

หน้า

- 14 ตัวแทน phylogenetic tree ชนิด nj แสดงความสัมพันธ์ภายในกลุ่มตัวอย่าง
ของเห็ดโคน *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim จำนวน 17 ตัวอย่าง
ตามวิธี CLUSTAL W (1.82) โดยอาศัยลำดับเบส ITS (ITS sequence) 53
- 15 phylogenetic tree ชนิด nj แสดงความสัมพันธ์ภายในกลุ่มตัวอย่างของ
เห็ดโคน *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim ที่ใช้ในการทดลองนี้
เปรียบเทียบกับกลุ่ม *Termitomyces sp.* และ *Termitomyces striatus*
(Beeli) Heim ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ ตามวิธี CLUSTAL W (1.82)
โดยอาศัยลำดับเบส ITS (ITS sequence) 70



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย