ความสัมพันธ์ระหว่างดีเอนเอทั้งหมดกับลักษณะโคโลนีลูกผสมจากการรวมเซลล์ของเห็ดโคน *Termitomyces sp.* และเห็ดฟาง *Volvariella volvacea*

นางสาว บุญลักษณ์ เชิญศิริดำรงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชา จุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2538

ISBN 974-632-274-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18076919

Relationship Between Total DNA Content and Colony Characteristic of Fusant-Hybrids of *Termitomyces sp.* and *Volvariella volvacea*

Miss Boonluck Chernsiridumrong

A Thesis Submitted in Partial Fulfiment of the Requirments

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

1995

Chulalongkorn University

ISBN 974-632-274-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างดีเอนเอทั้งหมดกับลักษณะโคโลนีลูกผสมจากการรวมเซลล์ของเห็ดโคน *Termitomyces sp.* และเห็ดฟาง *Volvariella volvacea*
โดย	นางสาวบุญลักษณ์ เชิญศิริดำรงค์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

บุญลักษณ์ เชิญศิริตำรงค์ : ความสัมพันธ์ระหว่างดีเอนเอทั้งหมดกับลักษณะโคโลนีลูกผสมจากการรวมเซลล์ของเห็ดโคน Termitomyces sp. และเห็ดฟาง Volvariella volvacea RELATIONSHIP BETWEEN TOTAL DNA CONTENT AND COLONY CHARACTERISTIC OF FUSANT-HYBRIDS OF Termitomyces sp. AND Volvariella volvacea) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สุมาลี พิชญางกูร, 86 หน้า. ISBN 974-632-274-5

เตรียมโปรโตพลาสต์จากสายใยเห็ดโคน (T3) อายุ 4 วัน โดยสลายผนังเซลล์ด้วยไลติกเอนไซม์บางชนิด และเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดโปรโตพลาสต์ พบว่าโนโวไซม์ที่ความเข้มข้น 20% ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ $7x10^4$ เซลล์ต่อมล. ในชั่วโมงที่ 4 ของการบ่ม จากการเตรียมโปรโตพลาสต์ด้วยการผสมเซลลูเลส 2 มก.ต่อมล. ลงในเอนไซม์โนโวไซม์ความเข้มข้น 20% พบว่าเกิดโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้นถึง $2.25x10^5$ เซลล์ต่อมล. ในระยะการบ่ม 3 ชม. โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 30^0ซ. ความเป็นกรดด่าง 7.5 และใช้โปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ เป็นออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ โปรโตพลาสต์เห็ดโคนมีเปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับเป็นเซลล์บนอาหารรีเจนเนอเรท สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 เท่ากับ 0.53 0.17 และ 0.40 ตามลำดับ จากโปรโตพลาสต์ของเห็ดโคนที่เตรียมได้นำไปรวมกับโปรโตพลาสต์เห็ดฟาง ซึ่งเตรียมจากสายใยอายุ 4 วัน โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างไซโมไลเอส 0.2 มก.ต่อมล. และเซลลูเลส 2 มก.ต่อมล. แล้วผสมรวมกันในสารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอล -8000 นำไปเลี้ยงให้คืนกลับเป็นเซลล์บนอาหารรีเจนเนอเรทชนิดต่าง ๆ นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณการกลับเป็นเซลล์จะเท่ากับ 0.0046 0.0028 และ 0.0033 บนอาหารรีเจนเนอเรท สูตร 1 สูตร 2 และสูตร 3 ตามลำดับ ลักษณะของโคโลนีจัดจำแนกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่ม 1 สายใยเกาะตัวแน่น โคโลนีนูน ขนาดประมาณ 0.5-1.0 ซม. กลุ่ม 2 สายใยกระจาย แล้วศึกษาปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในแต่ละกลุ่มฟิวแล่นท์เทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ พบว่าฟิวแล่นท์ในกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 มีปริมาณดีเอนเอทั้งหมดมากกว่าสายพันธุ์ต้นแบบทั้งสองรวมกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนในกลุ่ม 3 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเดียวกัน คัดเลือกตัวแทนแต่ละกลุ่มฟิวแล่นท์เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนทั้งหมดที่สกัดจากสายใยโดยใช้วิธีอิเล็กโตรโฟรีสิสในตำแหน่งคล้ายสายพันธุ์ต้นแบบ พบว่าสายพันธุ์ฟิวแล่นท์ส่วนใหญ่มีแถบในตำแหน่งคล้ายสายพันธุ์ต้นแบบ ยกเว้นฟิวแล่นท์ A1 ในกลุ่ม 1 B8, B12 ในกลุ่ม 2 C6, C30 ในกลุ่ม 3 จะมีบางตำแหน่งของแถบโปรตีนต่างไปจากสายพันธุ์ต้นแบบทั้งสอง

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต บุญลักษณ์ เชิญศิริตำรงค์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C426122 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD: : Termitomyces sp./Volvariella volvacea/FUSANT-HYBRIDS

BOONLUCK CHERNSIRIDUMRONG : RELATIONSHIP BETWEEN TOTAL DND CONTENT AND COLONY CHARACTERISTIC OF FUSANT-HYBRIDS OF Termitomyces sp. AND Volvariella volvacea. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SUMALEE PICHYANGKURA, Ph.D. 86 pp. ISBN 974-632-274-5

Protoplasts were obtained from Termitomyces sp. (T3) mycelium cultivated for 4 days. There were some lytic enzymes used to compared their activities of forming protoplasts. It was found that, $7x10^4$ cells/ml of protoplast were formed by using 20% Novozyme incubated for 4 hours. When mixing enzyme of 2 mg/ml Cellulase with 20% of Novozyme, the reaction showed increasing number of protoplasts. There were $2.25x10^5$ cells/ml of protoplast in this reaction at optimal conditions of $30^{o}c$, pH 7.5 using 0.6 M Kcl as an osmotic stabilizer. Protoplasts of T3 were regenerated on 3 kinds of regenerating media : type I, II and III, the percentage of regenerated colonies were 0.53, 0.17 and 0.40, respectively. The protoplasts of Volvariella volvacea (V) were prepared by using mycelium cultivated for 4 days and lysed the cell wall by using mixed enzymes of 0.2 mg/ml Zymolase and 2 mg/ml Cellulase. After two strains of protoplast were obtained from T3 and V, the fusion were done in PEG(MW 8000) solution. The percentage of reversed protoplast cell on regenerating medium of type I, II and III were 0.0046, 0.0028 and 0.0033 respectively. Each of the colonies showed differences in their characters that could be arranged into 3 groups. Group I : mycelium was tiny, dense and convex (size 0.5-1 cm), Group II : mycelium was dense and size of colonies were 1-1.5 cm and Group III : mycelium light and fully. These fusant colonies, were detected total DNA and compared with parent strain. From this comparing, the fusant group I and II have more total DNA than two parent strains which show at 95% significant. But the fusant group III showed no significance. Each group was selected only few of them to be a representative for comparing the whole protein pattern separating by using DISC-gel electrophoresis. Most of representative fusant, showed the total protein bands similar to parent strains where as fusant a1 (represent group I) B8, B12 (represent group II) and C6, C30 (represent group III) showed few of uncommon band patterns.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต บุญลักษณ์ เชิงศิริดำรงค์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำปรึกษาทางวิชาการ คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ประธานกรรมการคือ รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรีและคณะกรรมการทุกท่านได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ที่กรุณาตรวจสอบและแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ จนสำเร็จลุล่วงตามจุดมุ่งหมายอย่างดี

ขอขอบคุณ กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อสายพันธุ์เห็ดฟางสำหรับงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาทุกท่าน

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆในภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้ให้ช่วยเหลือ จนสามารถสำเร็จลุล่วงได้

ขอกราบขอบพระคุณ แม่ และขอบคุณพ่อ พี่ๆ และน้องที่ให้และช่วยเหลือทุกสิ่งที่ช่วยได้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข
กิตติกรรมประกาศ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... จ
สารบัญรูป..... ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ..... ฌ
บทที่
1. บทนำ..... 1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 8
3. ผลการทดลองและวิจารณ์..... 21
4. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 63
เอกสารอ้างอิง..... 66
ภาคผนวก
ภาคผนวก 1.1..... 72
ภาคผนวก 1.2..... 74
ภาคผนวก 1.3..... 77
ภาคผนวก 1.4..... 79
ภาคผนวก 1.5..... 82
ภาคผนวก 2..... 84
ภาคผนวก 3..... 85
ประวัติผู้เขียน..... 86

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงเปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์เห็ดโคนบนอาหาร 3 ชนิด..... 41
2. แสดงเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่รวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ของเห็ดโคนและเห็ดฟางบนอาหารแข็ง 3 ชนิด..... 46
3. แสดงปริมาณดีเอนเอทั้งหมดในสายใย(มก/กรัม)ของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 1 2 3 และสายพันธุ์ต้นแบบ..... 51
4. แสดงค่า Rf จากแถบโปรตีนของเจลอิเลคโตรโฟริสิส..... 61
5. แสดงการรวมโปรโตพลาสต์แบบต่างๆ..... 72
6. แสดงการคาดเดาผลรวมของปริมาณดีเอนเอของสายพันธุ์ต้นแบบ V T3... 84

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1.1 แสดงสายใยของเห็ดโคนบนอาหารแข็งพีดีเอ..... 21
1.2 แสดงสายใยของเห็ดฟางบนอาหารแข็งพีดีเอ..... 21
2. แสดงการเจริญเติบโตของสายใยเห็ดโคนในอาหารเหลว
พีดีบี อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที..... 24
3. แสดงโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคน กำลังขยาย
400เท่า..... 23
4. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้
เอนไซม์โนโวไซม์188 ที่ความเข้มข้น 2.5-20%..... 25
5. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้
เบตา-กลูคูโรนิเดสที่ความเข้มข้น 0.2-4 มก/มล..... 26
6. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้
ไซโมไลเอส ที่ความเข้มข้น 0.2-4 มก/มล..... 27
7. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้
ไลซิงเอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 0.2-4 มก/มล..... 29
8. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้
เอนไซม์ชนิดต่างๆ 4 ชนิด..... 30
9. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้
เอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์และเซลลูเลส..... 31
10. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้
เอนไซม์ผสมระหว่างเบตา-กลูคูโรนิเดสและเซลลูเลส..... 33
11. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้
เอนไซม์ผสมระหว่างไซโมไลเอสและเซลลูเลส..... 34

12. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างไลซิงเอนไซม์และเซลลูเลส..... 36
13. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้เอนไซม์ผสมชนิดต่างๆ..... 36
14. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์ 20% และเซลลูเลส 2 มก/มล. ที่อุณหภูมิ 22 30 และ 40°ซ..... 37
15. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากสายใยเห็ดโคนโดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์ 20 % และเซลลูเลส 2 มก/มล. ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. โดยแปรพีเอชในช่วง 7-8..... 39
16. เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดจากการใช้ออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ 2 ชนิดผสมใน เอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์20%และเซลลูเลส 2 มก/มล. บ่มสายใยเห็ดโคน ที่อุณหภูมิ 30°ซ..... 40
17. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นในระยะต่างๆของการบ่มสายใยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์ 20 % และเซลลูเลส 2 มก/มล. พีเอช 7.5 ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และมี 0.6โมลาร์โซเดียมคลอไรด์เป็นออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์..... 42
18ก แสดงลักษณะโคโลนีของเซลล์โปรโตพลาสต์เห็ดโคน อายุ 8 วัน บนอาหารแข็ง(Regenerating medium)สูตร 1..... 43
18ข แสดงลักษณะโคโลนีของเซลล์โปรโตพลาสต์เห็ดโคน อายุ 8 วัน บนอาหารแข็ง สูตร 2..... 44
18ค แสดงลักษณะโคโลนีของเซลล์โปรโตพลาสต์เห็ดโคน อายุ 8 วัน บนอาหารแข็ง สูตร 3..... 44
19. แสดงลักษณะโคโลนีของเซลล์โปรโตพลาสต์เห็ดฟางบนอาหารแข็ง สูตร 3..... 45
20. แสดงลักษณะต่างๆของโคโลนีฟิวแสนท์อายุ 10 วันบนอาหารแข็ง..... 47
21ก ลักษณะโคโลนีของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่1 ที่เจริญช้า(ธ)บนพีดีเอ..... 48
21ข ลักษณะโคโลนีของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่1 ที่เจริญปกติ(A)บนพีดีเอ..... 49
21ค ลักษณะโคโลนีของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 2 บนพีดีเอ..... 49

21ง ลักษณะโคโลนีของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 3 บนพีดีเอ..... 50
22. แสดงแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแท่งเจลของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 1
(ส) เทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ..... 53
22ก ภาพอธิบายแถบโปรตีนที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T3 s1
s2 s5 s14 V บนแท่งเจล..... 54
23. แสดงแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแท่งเจลของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 1
(A) เทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ..... 55
23ก ภาพอธิบายแถบโปรตีนที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T3 A2
A3 A4 V บนแท่งเจล..... 56
24. แสดงแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแท่งเจลของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 2
เทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ..... 57
24ก ภาพอธิบายแถบโปรตีนที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T3 B4
B8 B12 V บนแท่งเจล..... 58
25. แสดงแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแท่งเจลของฟิวแสนท์ในกลุ่มที่ 3
เทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ..... 59
25ก ภาพอธิบายแถบโปรตีนที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T3 C6
C13 C30 V บนแท่งเจล..... 60

สัญลักษณ์ และคำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ชม.	=	ชั่วโมง
ซม.	=	เซ็นติเมตร
%	=	เปอร์เซ็นต์
°ซ.	=	องศาเซลเซียส