การวิเคราะห์เรสทริกชั่นแฟคเมนท์ดีเอ็นเอของสายใยเห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) และ เห็ดลูกผสมจากการรวมเซลล์

นางสาว จำรูญศรี พุ่มเทียน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชา จุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ. ศ. 2538

ISBN 974 - 632 - 266 - 4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16452168.

Restriction Fragment Analysis of DNA from Mycelium of *Termitomyces sp.*, *Volvariella volvacea* and Fusant – Hybrid Mushrooms

Miss Jamroonsri Poomtien

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

1995

Chulalongkorn University

ISBN 974 - 632 - 266 - 4

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์เรสทริกชั่นแฟคเมนท์ดีเอ็นเอของสายใยเห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) และเห็ดลูกผสมจากการรวมเซลล์

โดย นางสาว จำรูญศรี พุ่มเทียน

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จำรูญศรี พุ่มเทียน : การวิเคราะห์เรสทริกชั่นแฟคเมนท์ดีเอ็นเอของสายใยเห็ดโคน *(Termitomyces sp.)* เห็ดฟาง *(Volvariella volvacea)* และเห็ดลูกผสมจากการรวมเซลล์ (RESTRICTION FRAGMENT ANALYSIS OF DNA FROM MYCELIUM OF *Termitomyces sp.*, *Volvariella volvacea* AND FUSANT HYBRID MUSHROOMS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สุมาลี พิชญางกูร, 89 หน้า. ISBN 974-632-266-4

การวิเคราะห์เรสทริกชั่นแฟคเมนท์ดีเอ็นเอ และวิธีการทำ RFLP ได้นำมาใช้ในการตรวจสอบเห็ดลูกผสมจากการรวมเซลล์ โดยได้ศึกษารูปแบบของการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ในสายใยของเห็ดโคน *(Termitomyces sp.)* สายพันธุ์ T1 และ T3 เห็ดฟาง *(Volvariella volvacea)*, V และเห็ดลูกผสมที่เกิดจากการรวมเซลล์ของสายพันธุ์ทั้งสองชนิด ได้แก่ สายพันธุ์ $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$ และ VT3 พบว่าการตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์จะใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ประมาณ 3-5 ไมโครกรัม และเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III, *Eco*R I, *Pst* I หรือ *Sma* I 6-10 หน่วย และเมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอไปแยกด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีสจะได้รูปแบบของการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III, *Eco*R I หรือ *Pst* I ที่แสดงแถบเด่นปรากฏชัดเจนในแต่ละสายพันธุ์ของเห็ดซึ่งแถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ลูกผสมจะมีขนาดเท่ากันกับแถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ต้นแบบ

วิเคราะห์ RFLP ด้วยการทำ Southern blot hybridization โดยนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วย *Hind* III มาไฮบริไดซ์กับไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) โพรบขนาด 1.9 kb จากเห็ด *Schizophyllum commune* ได้ผลแสดงแถบดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์กันขึ้น ในสายพันธุ์ T1 จำนวน 6 แถบ ที่ขนาด 23.1, 9.4, 6.6, 6.0, 4.4 และ 3.5 kb สายพันธุ์ T3 จำนวน 3 แถบที่ขนาด 23.1, 9.4 และ 6.6 kb ส่วนในเห็ดฟางมีจำนวน 2 แถบ ที่ขนาด 23.1 และ 9.4 kb ในสายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(7)}$ และ VT3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์ที่ขนาด 9.4 และ 6.6 kb และสายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ จำนวน 2 แถบ ที่ขนาด 23.1 และ 3.5 kb

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต จำรูญศรี พุ่มเทียน

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

C426021 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD: : *Termitomyces sp.* / *Volvariella volvacea* / FUSANT / RFLP
JAMROONSRI POOMTIEN : RESTRICTION FRAGMENT ANALYSIS OF DNA FROM MYCELIUM OF *Termitomyces sp.*, *Volvariella volvacea* AND FUSANT HYBRID MUSHROOMS. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SUMALEE PICHYANGKURA, Ph.D. 89 pp. ISBN 974-632-266-4

Restriction fragment analysis and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were studied on the purpose to investigate fusant DNA from protoplast fusion. Restriction fragment analysis was performed using extracted DNA from *Termitomyces sp.*, (strain T1, T3), *Volvariella volvacea* (V) and fusant strains of $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$ and VT3. Approximately, 3-5 ug of extracted DNA was completely digested by restriction enzyme *Hin*d III, *Eco*R I, *Pst* I or *Sma* I using 6-10 units of individual enzyme. After complete digesttion, the DNA fragments were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. The restriction patterns obtained from digestion of DNA with *Hin*d III, *Eco*R I, *Pst* I, clearly showed the distinctive bands of each strain of mushrooms. The restriction patterns of *Hin*d III, *Eco*R I or *Pst* I digested DNA from fusants showed similar molecular size of all distinctive bands to those of the parents, *Termitomyces sp.* and *Volvariella volvacea*.

The restriction fragment length polymorphism (RFLP) was performed by Southern blot hybridization of *Hin*d III digested mushroom DNA with 1.9 kb rDNA of *Schizophyllum commune* as DNA probe. The results from DNA - DNA hybridization showed 6 hybridized bands of T1 at size 23.1, 9.4, 6.6, 6.0, 4.4 and 3.5 kb, 3 hybridized bands of T3 at size 23.1, 9.4 and 6.6 kb and 2 bands of V at size 23.1 and 9.4 kb. Two bands of 9.4 and 6.6 kb were obtained from hybridization of *Hin*d III digested DNA from fusant strain ($VT1_{(7)}$ and VT3) whereas two bands of 23.1 and 3.5 kb were obtained from fusant $VT1_{(4y)}$.

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต จำรูญศรี พุ่มเทียน
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2537	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ในการวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างมาก

ขอขอบพระคุณ Dr. Tsutomu Morinaga แห่ง University of Hiroshima, Japan ที่เอื้อเฟื้อให้ไรโบโซมอลดีเอ็นเอมาใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นในงานวิจัยนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ในปี 2536 ตลอดจนบัณฑิตวิทยาลัยและเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่ได้ให้กำลังใจ โดยเฉพาะพี่ยุวดี ตาลาวนิช ที่มีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัยนี้

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้องรวมทั้งญาติทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือ สนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ..... ฌ

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญรูป..... ..... ฌ

สัญลักษณ์และคำย่อ..... ..... ฅ

บทที่

1. บทนำ..... 1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 16
3. ผลการทดลองและวิจารณ์..... 28
4. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 70

รายการอ้างอิง..... 73

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก..... 79

ภาคผนวก ข..... 81

ภาคผนวก ค..... 87

ภาคผนวก ง..... 88

ประวัติผู้เขียน..... 89

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. แสดงส่วนประกอบทางคุณค่าทางอาหารของเห็ดโคน และเห็ดฟาง..... 2
2. เปรียบเทียบลักษณะบางประการของดอกเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$ และ $VT1_{(4y)}$..... 38
3. ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร และความเข้มข้นของดีเอ็นเอสายพันธุเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมเมื่อใช้ไนโตรเจนเหลว และน้ำแข็งแห้งในการบดเซลล์..... 40
4. แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III..... 53
5. แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Eco*R I..... 58
6. แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Pst* I..... 63
7. วิเคราะห์ผลรวมอธิบายขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่ตัดด้วยเรสทริกชั่น-เอนไซม์ *Hind* III เมื่อไฮบริไดซ์กับ rDNA probe..... 68

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ **หน้า**

1. แสดงลักษณะของดอกเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสม..... 31
2. แสดงลักษณะของสายใยเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) อายุ 7 วัน..... 34
3. แสดงลักษณะของสายใยเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมเมื่อส่องดูกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า..... 35
4. แสดงลักษณะสายใยเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมที่เลี้ยงในอาหารเหลว..... 39
5. แถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, T3, V และ $VT1_{(7)}$ เมื่อวิเคราะห์โดย 0.7 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส
ดีเอ็นเอที่สกัดได้เมื่อใช้น้ำแข็งแห้งหรือน้ำแข็งแห้งและผงทราย zircon (+z) ในการทำให้เซลล์แตก..... 43
6. แถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, T3, V และ $VT1_{(7)}$ เมื่อวิเคราะห์โดย 0.7 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส
ดีเอ็นเอที่สกัดได้เมื่อใช้ไนโตรเจนเหลวหรือไนโตรเจนเหลวและผงทราย zircon (+z) ในการทำให้เซลล์แตก..... 44
7. แสดงกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างขนาดโมเลกุลและระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเฟจแลมดาที่ถูกตัดด้วย *Hin*d III 45
8. แสดงการแปรความเข้มข้นของเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III ที่ตัดดีเอ็นเอ ได้รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดฟาง (V) เมื่อแยกด้วย 1 % บนอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีสที่ความต่างศักย์ 8 โวลต์/ ซ.ม. ของความยาวเจล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที..... 47

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

9. แสดงการแปรปริมาณดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอ็นไซม์ *Hin*d III ได้รูปแบบเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดฟาง (V) เมื่อแยกบน 1 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส ที่ความต่างศักย์ 8 โวลต์/ ซ.ม. ของความยาวเจลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30นาที..... 48
10. การใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III แสดงรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่แยกด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส..... 51
11. ภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III แปรจากรูป 10 และ ตารางที่ 4. 52
12. การใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Eco*R I แสดงรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่แยกด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส..... 56
13. ภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดของ สายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Eco*R I แปรจากรูป 12 และ ตารางที่ 5..... 57
14. การใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Pst* I แสดงรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่แยกด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส..... 60

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

15. ภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดของ สายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Pst* I แปรจากรูป 14 และ ตารางที่ 6..... 61

16. การใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Sma* I แสดงรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่แยกด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส..... 64

17. ออโตเรดิโอแกรมแสดงรูปแบบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III แล้วนำมาไฮบริไดซ์กับ rDNA..... 66

18. ภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III แล้วนำมาไฮบริไดซ์กับ rDNA ผ่านการทำออโตเรดิโอ-กราฟฟี แปรจากรูปที่ 17 และตารางที่ 7..... 67

สัญลักษณ์และคำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ซม.	=	เซนติเมตร
^{o} ซ	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซนต์
λ/*Hind* III	=	ดีเอ็นเอของแบคเทอริโอฟาจแลมดา (λ)ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III
kb	=	กิโลเบส