การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอม *Lentinus edodes (Berk.)*Sing

นางสาว วชิราภรณ์ พวงภู่

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-050-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DNA ANALYSIS FOR DIFFERENTIATION OF THE SHIITAKE MUSHROOM ISOLATES OF *Lentinus edodes* (Berk.) Sing

Miss Vachiraphorn Phuangphoo

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 1999

ISBN 974-334-050-5

Thesis Title	DNA Analysis for Differentiation of the Shiitake Mushroom Isolates of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing
By	Miss Vachiraphorn Phuangphoo
Programme	Genetics
Department	Botany
Thesis Advisor	Piyasak Chaumpluk, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Mukda Kuhirun
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Tuenchai Kosakul

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Sumitra Kongchuensin)

..... Thesis Advisor
(Piyasak Chaumpluk, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Mukda Kuhirun)

..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Tuenchai Kosakul)

วชิราภรณ์ พวงภู่ : การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (DNA ANALYSIS FOR DIFFERENTIATION OF THE SHIITAKE MUSHROOM ISOLATES OF *Lentinus edodes* (Berk.) Sing) อ. ที่ปรึกษา : ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. มุกดา คูหิรัญ และ ผศ. เตือนใจ โก้สกุล, 68 หน้า. ISBN 974-334-050-5.

ศึกษาการจำแนกความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์เห็ดหอม (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing) ทั้ง 8 สายพันธุ์ ได้แก่ MuL2, MuL4, MuL5, MuL9/2, MuL9/4, MuL11 และ MuL12 จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสายพันธุ์จากญี่ปุ่น โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเพื่อให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้แผนการทดลองแบบ Split Plot Design และการประยุกต์ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานร่วมกับวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD พบว่าเส้นใยเห็ดหอมเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 11 ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 1, MEB, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, MYG และ PDB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เส้นใยที่ได้เมื่อนำมาประยุกต์ใช้กับวิธีการสกัดดีเอ็นเอต่างๆ พบว่าวิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐาน ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดในปริมาณที่สูงกว่าและมีความบริสุทธิ์กว่าวิธีสกัดด้วยเทคนิคอื่น เช่น CTAB, Chelex, Urea และ NaOH แต่ให้ผลใกล้เคียงกับวิธีการสกัดด้วย SDS และ Glass bead ทั้ง 3 วิธีซึ่งได้แก่วิธีมาตรฐาน วิธี SDS และวิธี Glass bead เป็นวิธีที่มีความสะดวก รวดเร็ว ให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและบริสุทธิ์ สามารถนำมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR และสามารถเก็บรักษาเพื่อทำ PCR ได้ในภายหลัง เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณและจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ร่วมกับเทคนิค RAPD โดยใช้ random primer ที่จำหน่ายเป็นการค้า (University of British Columbia Biotechnology Laboratory) พบ primer ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกเห็ดหอม 4 primer ให้ดีเอ็นเอโพลไฟล์ภายหลังเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ที่แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อนำมา score ค่าคะแนนในรูป matrix โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ของ Jaccard's similarity coefficient ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วย UPGMA method สามารถจำแนกความสัมพันธ์ของสายพันธุ์เห็ดหอมได้เป็น 2 cluster คือ Cluster A ซึ่งประกอบด้วย Subcluster A1 ได้แก่ MuL4, MuL9/2 และ MuL9/4 Subcluster A2 ได้แก่ MuL2 และสายพันธุ์จากญี่ปุ่น Subcluster A3 ได้แก่ MuL11 และ Subcluster A4 ได้แก่ MuL5 และ Cluster B ได้แก่ MuL12

วิธีดังกล่าวนี้สามารถจำแนกความแตกต่างและความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์เห็ดหอมได้ภายในเวลา 4 วัน ซึ่งนับได้ว่าเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัดแรงงาน และสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานทำนายความสัมพันธ์ของสายพันธุ์เห็ดหอมเพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ และเทคนิคดังกล่าวนี้ยังอาจใช้เป็นพื้นฐานในการจำแนกสายพันธุ์เห็ดชนิดอื่น

ภาควิชา พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

3971527823 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: RAPD, PCR, shiitake, differentiation

VACHIRAPHORN PHUANGPHOO : DNA ANALYSIS FOR DIFFERENTIATION OF THE SHIITAKE MUSHROOM ISOLATES OF *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. THESIS ADVISOR: PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D., THESIS COADVISORS: ASSOC. PROF. MUKDA KUHIRUN, ASSIST. PROF. TUENCHAI KOSAKUL. 68 pp. ISBN 974-334-050-5.

Studies on differentiation of the 8 shiitake mushroom isolates of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing strains MuL2, MuL4, MuL5, MuL9/2, MuL9/4, MuL11 and MuL12 obtained from Mushroom Research Unit, Chulalongkorn University, and a Japanese cultivar were carried out. First the development of cultivation system was established to obtain suitable starting mycelia used for DNA preparation. The experiment was conducted in Split Plot Design with 4 replications. The development of a simple and rapid DNA extraction method suitable for DNA analysis was used in combination with the application of the RAPD analysis. Results revealed that among 12 media conditions, the liquid culture formulation 11 provided better mycelia growth to *L. edodes* within a short period of time than those of other formulations significantly. This formulation was used to obtain suitable mycelia for DNA preparation and RAPD analysis in further step. Several DNA extraction methods were performed and DNA quality and quantity were compared. Results showed that the CTAB method, the NaOH method, the Chelex method did not give good results. However, standard method, SDS method, and Glass bead method provided better quality and yield of DNA. Thus these later three methods were appropriate for simultaneous assessing of several samples in a single working day due to their less operating time, The resulting DNA could also be a template for PCR amplification and differentiation with RAPD analysis using random primers. Only 4 primers were applicable for RAPD analysis giving DNA profile scorable in form of matrix file and analyzable with Jaccard's similarity coefficient and UPGMA method. The RAPD analysis classified the relationship of *L. edodes* isolates into two groups. First group was cluster A having members of subcluster A1 MuL4, MuL9/2, MuL9/4; subcluster A2 MuL2 and Japan; subcluster A3 MuL11 and subcluster A4 MuL5 and second group is a cluster B having a member of MuL12.

The combination of DNA extraction methods and RAPD analysis that enabled the prediction of the differentiation of *L. edodes* and subsequent phylogenetic relationships (can be predicted) within 4 days indicated its simplicity, rapidness and its non-labor-intensiveness. The method not only provided basic information for the improvement program of this mushroom but also for other mushroom isolate differentiation.

ภาควิชา พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา พันธุศาสตร์
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGMENTS

I wish to express my deepest gratitude and sincerest appreciation to my advisor, Dr. Piyasak Chaumpluk for his excellent supervision, guidance and constant encouragement throughout my graduate course.

I wish to extend my deep and sincere appreciation and gratefulness to my co-advisors, Associate Professor Mukda Kuhirun and Assistant Professor Tuenchai Kosakul, for their valuable recommendations, useful suggestions for the manuscript and full encouragement throughout the period of my study.

I am indebted to Associate Professor Sumitra Kongchuensin for serving as thesis committee, and for her recommendations and critical reading of the manuscript.

I would like to express my sincere gratitude to Dr. Sirawut Klinbunga for supplying random primers used in this study and for his kind encouragement, advice and for providing the computer analysis of the results.

I would like to thank Professor Yong Poovorawan, M.D. for allowing me to use the PCR amplifier instrument.

Special thanks also go to the Botany Dept.'s faculty members : Dr. Panpim Vonkhorporn, Miss Jittra Kanchanaprayudh and Mr. Songsak Samransuk for the encouragement, kind recommendations and friendship.

My sincere thanks also go to Miss Niyada Tangsirimit, Miss Vijittra Samukkanut, Miss Montarop Sudhadham, Miss Tarinee Pangjunan and Mr. Suwicha Boonleang for their expert computer technical assistances.

Likewise, sincere thanks go to all my friends for their very friendly assistance, constant encouragement and friendship as well.

I wish to acknowledge NSTDA and UDC for the financial support during my study. I wish also to express my sincere thanks to all the faculty and staff of the Department of Botany for their kindness, generosity and friendships.

Finally, I would like to express my sincere gratitude to my parents for bringing me up with love, great care, encouragement and support throughout my study and to my sisters and everybody in my family who have always encouraged me. Without their love, I could never have completed my study.

CONTENT

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGMENTS	vi
CONTENT	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	4
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	13
Materials	13
A. Mycelia material	13
B. Molecular weight marker and primers	13
C. Instruments	14
D. Inventory Supplies	14
E. Chemicals	15
Methods	17
A. Cultivation of mycelia from 8 isolates of *Lentinus edodes*	17
1. Culturing and harvesting of shiitake mushroom isolates	17
2. Studies on a suitable liquid culture of *L. edodes* for DNA preparation	17
B. Development of a simple and rapid method for the preparation of *Lentinus edodes* genomic DNA for RAPD analysis	18
C. RAPD analysis of the genomic DNA	21
1. PCR amplification	21
2. PAGE and silver staining	21
D. Data analysis	22

	Page
CHAPTER IV RESULTS	23
A. Studies on a suitable liquid culture condition for maximum mycelial growth rate of *L. edodes* for DNA extraction	23
B. Comparative studies on methods for *Lentinus edodes* genomic DNA extraction in for PCR analysis	26
C. RAPD analysis	29
1. Amplification of *Lentinus edodes* DNA	29
2. Genetic similarity among isolates	29
CHAPTER V DISCUSSION	34
A. Studies on a suitable liquid culture medium for the preparation of *Lentinus edodes* mycelia for DNA extraction	34
B. A simple and rapid method *L. edodes* genomic DNA isolation for RAPD analysis	35
C. RAPD analysis	37
CHAPTER VI CONCLUSIONS	39
REFERENCES	40
APPENDICES	49
BIOGRAPHY	68

LIST OF TABLES

		Page
Table 1	Average quantity of DNA from different extraction methods using 100 mg mycelia from 5 replications.....	28
Table 2	Number and percentage of DNA polymorphisms when synthetic arbitrary oligonucleotides were used as primers for RAPD analysis in 8 *L. edodes* isolates.....	30
Table 3	Genetic distances of 8 *Lentinus edodes* isolates based on Jaccard's similarity coefficients.....	31

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	The mycelial growth rate in dry weight of *Lentinus edodes* cultured on different liquid culture formulations.....	24
Figure 2	The mycelial growth rate in fresh weight of *Lentinus edodes* cultured on different liquid culture formulations	25
Figure 3	*Lentinus edodes* DNA prepared from different techniques after electrophoresed on a 8% PAGE for 7 hr at 120 V at room temperature.....	27
Figure 4	Patterns of Random Amplified Polymorphic DNA detected in 25 ng of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing genomic DNA on an 8% polyacrylamide gels and silver staining	32
Figure 5	A UPGMA dendogram based on Jaccard's similarity coefficients illustrating the genetic relationships among 8 *Lentinus edodes* isolates. Relative lengths indicate similarity indices.....	33

ABBREVIATIONS

Bis	=	N, N'-methylene-bisacrylamide
bp	=	base pair(s)
°C	=	degree celsius
CH_3COONa	=	Sodium acetate
CTAB	=	Cetyl trimethyl ammonium bromide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DNase	=	deoxyribonuclease
dNTP	=	deoxyribonucleotide triphosphate
DW	=	distilled water
EDTA	=	ethylene diamine tetra-acetic acid
g	=	gram
μg	=	microgram
h	=	hour
l	=	litre
μl	=	microlitre
M	=	molar
μM	=	micromolar
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
mm	=	millimeter
ng	=	nanogram
nm	=	nanometer
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
RAPD	=	Random amplified polymorphic DNA
PDA	=	Potato dextrose agar
PDB	=	Potato dextrose broth

sec	=	second
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
Taq	=	*Thermus aquaticus* DNA polymerase
TBE	=	tris / borate electrophoresis (buffer)
TE	=	Tris / EDTA (buffer)
TEMED	=	N,N,N',N' – tetramethylethylenediamine
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	=	Unit(s)
V	=	Volts
W	=	weight