การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan

นางสาววันทนี ทาทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS FOR ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan

Miss Wantanee Tatong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492115

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์สำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซา เห็ดเผาะ *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan
โดย	นางสาววันทนี ทาทอง
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กนกวรรณ เสรีภาพ)

วันทนี ทาทอง : การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์สำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan. (DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS FOR ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan) อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล 98 หน้า.

เห็ดเผาะหรือเห็ดถอบ *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan เป็นเห็ดที่มีความสำคัญทางการค้าและนิยมบริโภคเป็นอาหารในประเทศไทย เห็ดเผาะเป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาซึ่งอาศัยอยู่ร่วมกันกับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในป่าไม้ยางนา ในปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรทั้งบนดินและใต้ดินและระบบการสืบพันธุ์ของเห็ดชนิดนี้ยังไม่มีรายงาน ซึ่งการวิจัยในด้านพันธุศาสตร์ประชากรนั้นต้องการเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงถึงระดับของความแปรผันที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษา ด้วยเหตุนี้จึงได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์โดยเทคนิค inter-simple sequence repeat (ISSR)-suppression-PCR จำนวนทั้งหมด 11 ตำแหน่ง โดยได้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์จำนวน 4 ตำแหน่งที่มีโพลีมอร์ฟิซึม ได้แก่ CA -05 GTC-01 GTC-04 และ GTC-05 ซึ่งมีจำนวนอัลลีล 2 - 7 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คาดหมายและค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 0.275 ถึง 0.450 และ 0.025 ถึง 0.175 ตามลำดับ เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ 2 ตำแหน่ง คือ CA -05 และ GTC-05 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ ที่ทำการศึกษาได้ ชี้ให้เห็นว่าเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์นี้เป็นเครื่องหมายที่จำเพาะกับเห็ดเผาะ สามารถนำไปใช้ในการศึกษาเอคโตไมคอร์ไรซาและกลุ่มของเส้นใยในดิน เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่มีโพลีมอร์ฟิซึมซึ่งได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรและการสืบพันธุ์ในเห็ดเผาะสำหรับการศึกษาในอนาคตได้ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามการอยู่รอดของสายพันธุ์เห็ดเผาะที่ใส่ให้กับกล้าไม้เพื่อใช้ในการปลูกป่าหลังจากการย้ายต้นกล้าไม้สู่พื้นที่ปลูกจริง

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4772466423 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: Microsatellite marker / Ectomycorrhiza / *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan

WANTANEE TATONG: DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS FOR ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan. THESIS ADVISOR: JITTRA PIAPUKIEW, Ph.D., THESIS COASVISOR: ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALUKSANANUKUL, Ph.D., 98 pp.

Astraeus hygrometricus (Pers.) Morgan is commercially important and edible mushroom in Thailand. This species forms ectomycorrhizal associated with a wide range of economically important host trees in Dipterocarp forests. Until now, knowledge about above and below ground population genetic structure and reproduction in this species has not been reported yet. Population genetic research requires genetic markers that exhibit levels of variability appropriated for use in studies. Therefore, eleven co-dominant microsatellite markers were developed using an inter-simple sequence repeat (ISSR)-suppression- PCR technique. Four polymorphic loci, CA -05, GTC-01, GTC-04 and GTC-05, were characterized varying from two to seven alleles per locus. The observed and expected heterozygosites ranged from 0.025 to 0.175 and 0.275 to 0.450, respectively. The two microsatellite loci, CA-05 and GTC-05, did not amplify any other ectomycorrhizal species, indicating that they were species-specific markers. These microsatellite markers could be employed to investigate this ectomycorrhizae and mycelial aggregation in the soil. The polymorphic microsatellite markers obtained from this research could be used to investigate the population genetic structure and reproduction in this species for further studies. Furthermore, these markers could be used to monitor the environmental survival of this ectomycorrhizae after inoculated seedlings are transplanted into the site of plantations.

Department.....Botany..... Student's signature.....Wantanee Tatong.....

Field of study.....Genetics..... Advisor's signature.....Jittra Piapukiew.....

Academic year.....2006..... Co-advisor's signature.....Warawut Chulaluksananukul.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของอาจารย์ ดร. จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการวิจัยด้วยดีเสมอมา ผู้เขียนวิทยานิพนธ์ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ และอาจารย์ ดร. กนกวรรณ เสรีภาพ กรรมการสอบ ที่ให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ สมาคมราชกรีฑาสโมสร ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษา

ขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Taizo Hogetsu และ Dr. Chunlan Lian Asia Natural Environmental Science Center, the University of Tokyo, Japan ที่ได้ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ผล

ขอขอบพระคุณ คุณสุนัดดา โยมญาติ ที่ได้ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ภาพถ่าย และให้คำแนะนำในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและให้ความสะดวกในด้านต่าง ๆ

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ทุกคนในภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่ให้การช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ห้อง 401 ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่ให้การช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอขอบคุณ ญาติพี่น้อง และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ห่วงใยและคอยเป็นกำลังใจด้วยดีตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 เอคโตไมคอร์ไรซา 4
2.2 เครื่องหมายทางโมเลกุล 11
2.3 เทคนิคในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ 14
2.4 เห็ดเผาะ 17
2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 19

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย 22
3.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี 22
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย 25

บทที่ 4 ผลการวิจัย 35
4.1 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ของเห็ดเผาะ 35
4.2 ออกแบบไพรเมอร์บริเวณขนาบข้างของไมโครแซเทลไลต์ 36
4.3 ออกแบบไพรเมอร์บริเวณขนาบข้างอีกด้านหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์ 40
4.4 คัดเลือกไพรเมอร์และตรวจสอบการมีโพลีมอร์ฟิซึม 48
4.5 ศึกษาลักษณะเฉพาะของตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ของเครื่องหมาย ไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้น 52
4.6 ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 54

หน้า

บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย 60

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย 64

รายการอ้างอิง 65

ภาคผนวก 69

ภาคผนวก ก 70

ภาคผนวก ข 74

ภาคผนวก ค 76

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 98

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ตัวอย่างของราเอคโตไมคอร์ไรซา....6
2.2 ชนิดของไม้วงศ์ต่าง ๆ ที่พบราเอคโตไมคอร์ไรซา....8
3.1 ลำดับเบสและอุณหภูมิในการเข้าจับสายดีเอ็นเอ (T_m) ของไพรเมอร์ไมโครแซเทลไลต์....27
4.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ IP_1 และไพรเมอร์ IP_2 ที่ออกแบบจากชิ้นส่วนไอเอสเอสอาร์ ในแต่ละตำแหน่ง....37
4.2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ IP_3 ที่ออกแบบในแต่ละตำแหน่ง....47
4.3 ชุดซ้ำของไมโครแซเทลไลต์ ลำดับเบสของไพรเมอร์ และอุณหภูมิในการเข้าจับ สายดีเอ็นเอ (T_m) ของไพรเมอร์ในแต่ละตำแหน่ง....49
4.4 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ที่ให้ผลเป็นโมโนมอร์ฟิก....51
4.5 ลักษณะเฉพาะของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้นจากเห็ดเผาะ....53
4.6 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนไมโครแซเทลไลต์จากเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ โดยไพรเมอร์ที่พัฒนาจากเห็ดเผาะ....59

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ภาพตัดขวางแสดงลักษณะสัณฐานของรากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซา 4
2.2 ลักษณะปลายรากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซา 5
2.3 ลักษณะดอกเห็ดของเห็ดเผาะ 18
4.1 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ของเห็ดเผาะ
ด้วยไพรเมอร์ไมโครแซเทลไลต์ต่าง ๆ 35
4.2 ผลการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเห็ดเผาะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ 40
4.3 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขั้นตอนที่ 2 จากผลิตผลพีซีอาร์ขั้นตอนแรก
ด้วยไพรเมอร์ AP_2 และ IP_2 ของแต่ละตำแหน่ง 43
4.4 ความถี่อัลลีลของตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ 52
4.5 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ
จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ IP_1 และ IP_3 ของตำแหน่ง CA-05 55
4.6 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ
จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ IP_2 และ IP_3 ของตำแหน่ง GTC-01 56
4.7 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ
จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ IP_2 และ IP_3 ของตำแหน่ง GTC-04 57
4.8 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ
จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ IP_2 และ IP_3 ของตำแหน่ง GTC-05 58
ค-1 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเผาะจำนวน 40 ตัวอย่าง
ด้วยไพรเมอร์ IP_1 และ IP_3 ของตำแหน่ง CA-05 89
ค-2 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเผาะจำนวน 40 ตัวอย่าง
ด้วยไพรเมอร์ IP_2 และ IP_3 ของตำแหน่ง GTC-01 90
ค-3 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเผาะจำนวน 40 ตัวอย่าง
ด้วยไพรเมอร์ IP_2 และ IP_3 ของตำแหน่ง GTC-04 91
ค-4 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเผาะจำนวน 40 ตัวอย่าง
ด้วยไพรเมอร์ IP_2 และ IP_3 ของตำแหน่ง GTC-05 92