

วงศํวณวิวัฒนาการและสารทุดิยภูมิจากกราฟที่ก่อกำเนิดไลเคนของสกุลทริพิทีเลียมในประเทศไทย



นายธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย



5 0 7 2 3 0 9 2 2 3

PHYLOGENY AND SECONDARY METABOLITES FROM LICHEN-FORMING FUNGI OF
GENUS *Trypethelium* IN THAILAND

Mister Theerapat Luangsuphabool

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

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

522209

ธีรภัทร เหลืองศุภบุลย์ : วงศ์วานวิวัฒนาการและสารทุติยภูมิจากราที่ก่อให้เกิดไลเคน
ของสกุลทริพิทีเลียมในประเทศไทย (PHYLOGENY AND SECONDARY
METABOLITES FROM LICHEN-FORMING FUNGI OF GENUS *Trypethelium* IN
THAILAND) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.จิตรตรา เพ็ญเขียว อ. ที่ปริกษา
วิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.ดร. เอก แสงวิเชียร, 144 หน้า

ไลเคนสกุลทริพิทีเลียมเป็นไลเคนในเขตร้อนพบได้ทั่วไปเกือบทุกระบบนิเวศในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้ได้แยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนจากแหล่งด้วยวิธีการปลดปล่อยแอสโคสปอร์เป็นจำนวน 64 ไอโซเลต จากแหล่งต่างๆ ใน 15 จังหวัด ของประเทศไทย โดย 64 ไอโซเลตนี้สามารถจัดกลุ่มได้ 6 กลุ่ม ตาม ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะสีของเพอริทีเซีย จำนวนผนังกันสปอร์ และการทำปฏิกิริยาเคมีของ เพอริทีเซียกับสารละลาย 10% KOH จากการจัดกลุ่มรูปแบบความแตกต่างของราที่ก่อให้เกิดไลเคนด้วยเทคนิค ITS-RFLP สามารถจัดกลุ่มได้ 22 จีโนไทป์ แสดงให้เห็นถึงความแปรผันทางพันธุกรรมที่มีความหลากหลายที่ ตำแหน่ง ITS และจากการวิเคราะห์วงศ์วานวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแทนแต่ละ จีโนไทป์ที่ ตำแหน่ง ITS และ mtSSU พบว่า ทั้งสองตำแหน่งมีความสอดคล้องกัน และวงศ์วานวิวัฒนาการที่สร้างจาก ตำแหน่ง ITS ร่วมกับ mtSSU สามารถแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้เป็น 2 เคลดหลัก โดยเคลดหนึ่งเป็นเคลดของ ราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุลไพรินูลา ส่วนที่เหลือเป็นราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุลทริพิทีเลียม จากการวิเคราะห์ วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงให้เห็นการแบ่งแยกอย่างชัดเจนระหว่างไพรินูลาและทริพิทีเลียม ซึ่งการเป็นการยากที่จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกแต่เพียงอย่างเดียว การวิเคราะห์วงศ์วานวิวัฒนาการที่ตำแหน่ง ITS ร่วมกับ mtSSU สามารถจัดจำแนกราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียมในประเทศไทยได้ 9 ชนิด โดยมี 3 ตัวอย่าง ที่สามารถระบุชนิดได้แน่นอนด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ ตำแหน่ง mtSSU ได้แก่ *Trypethelium nitidiusculum* *Trypethelium tropicum* และ *Trypethelium eluteriae* นอกจากนี้ยังพบว่า *T. eluteriae* สามารถแบ่งแยกย่อยได้อีก 3 ชนิด จึงควรที่จะมีการทบทวนการจัดแนก ไลเคนชนิดนี้ใหม่ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลักษณะของโคไลนีนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การแยกสารทุติยภูมิของตัวแทนราที่ก่อให้เกิดไลเคนแต่ละจีโนไทป์โดยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี ด้วยระบบตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 10 : 0.2 พบว่าสามารถจัดกลุ่ม รูปแบบของสารทุติยภูมิได้จำนวน 8 กลุ่ม เมื่อทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของตัวแทนราที่ก่อให้เกิดไล เคนแต่ละจีโนไทป์กับแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ยีสต์ *Candida albicans* และ ในราเส้นใย *Aspergillus niger* ด้วยวิธีไบโอออโตกราฟี พบว่า มีไลเคนสกุล ทริพิทีเลียมไอโซเลต KY 418 เท่านั้น ที่สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. coli* ที่ Rf เท่ากับ 0.12 และ 0.56 *S. aureus* ที่ Rf เท่ากับ 0.12 และ *C. albicans* ที่ Rf เท่ากับ 0.09 นอกจากนี้ยังยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *A. niger* ในช่วง Rf ระหว่าง 0.09-0.56

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....^{ช.ภัท} ^นในครองศุภบุลย์.....
ปีการศึกษา..... 2552.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....จิตรตรา เพ็ญเขียว
ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....เอก แสงวิเชียร

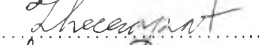
##5072309223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : LICHEN-FORMING FUNGI / *Trypethelium* / PHYLOGENY /
SECONDARY METABOLITES


THEERAPAT LUANGSUPHABOOL : PHYLOGENY AND SECONDARY
METABOLITES FROM LICHEN-FORMING FUNGI OF GENUS *Trypethelium* IN
THAILAND. THESIS ADVISOR : ASST. PROF JITTRA PIAPUKIEW, Ph.D., THESIS
CO-ADVISOR : ASST. PROF EK SANGVICHEN, Ph.D., 144 pp.

Trypethelium is a tropical crustose lichen, which is widely distributed in most natural habitats occurring in Thailand. Sixty-four mycobionts were isolated from lichen thalli collected from various locations in 15 provinces of Thailand using the ascospore discharge technique. Lichen thalli were classified into 6 groups based on combination of morphological characters perithecial color, spore shape, setate number and 10% KOH reaction. The ITS polymorphism of these mycobionts was determined by RFLP technique. ITS-RFLP analysis among isolated mycobionts divided them into 22 genotypes and showed high genetic variation in ITS region. ITS and mtSSU in the representative mycobiont of each genotype were sequenced and phylogenetic analysis were performed. Both ITS and mtSSU sequences were corresponded on phylogenetic tree divided mycobionts to two major clades with high bootstrap values. One clade was the mycobionts in genus *Pyrenula*, another was the mycobiont in genus *Trypethelium*. The phylogenetic analysis clearly confirmed separation between *Pyrenula* and *Trypethelium* since identification based on sole morphological characters was difficult. Phylogenetic combination of ITS and mtSSU sequences showed that at least nine *Trypethelium* species were presented in Thailand. Three *Trypethelium* species, *Trypethelium nitidiusculum*, *Trypethelium tropicum* and *Trypethelium eluteriae* were strongly or identified by morphological characters and mtSSU sequence analysis. The phylogenetic tree revealed that *T. eluteriae* could be clearly separated into 3 species. The taxonomic position of *T. eluteriae* should be reevaluated using morphological and molecular data

Secondary metabolites of the representative from each genotypes were isolated by TLC technique using CH_2Cl_2 :MeOH (10:0.2) as solvent system. The chemical patterns from these mycobionts were separated into 8 groups. The antimicrobial potential activity of these genotypes was tested with bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, yeast (*Candida albicans*) and filamentous fungus (*Aspergillus niger*) by bioautography technique. Only *Trypethelium* isolate KY 418 showed antimicrobial activities against *E. coli* at Rf value 0.12 and 0.56, *S. aureus* at Rf value 0.12 and *C. albicans* at Rf value 0.09 and inhibition of spore formation of *A. niger* was also observed from Rf range 0.09 to 0.56.

Field of Study :Biotechnology..... Student's Signature..... 

Academic Year :2009..... Advisor's Signature..... 

Co-Advisor's Signature..... 

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตรตรา เพ็ญเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งได้ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอก แสงวิเชียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างไลเคนและได้ให้คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งได้ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้ข้อคิดเห็น ข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และรองศาสตราจารย์ ดร. กัณษริย์ บุญประกอบ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้ข้อคิดเห็น ข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุพันธ์ กงบังเกิด ที่ได้ให้การอนุเคราะห์ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างไลเคน

ขอขอบคุณนายมนตรี แสงลามเจริญกิจ และสมาชิกหน่วยวิจัยไลเคน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหงทุกท่าน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างไลเคน ตลอดจนให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณนางสาวกฤษณา นุราช ที่ได้ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ และนางสาว นุชจรรย์ สิงคราช ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างไลเคน

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ และห้องปฏิบัติการ 401 ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ บริษัท พาราไซแอนติฟิค จำกัด ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ที่ได้ให้ทุนในการทำวิจัย และ โครงการพัฒนากำลังคนทางวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ที่ได้ให้ทุนการศึกษา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังใจ และช่วยเหลือสนับสนุนตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ไลเคน.....	4
2.2 ราที่ก่อให้เกิดไลเคน.....	9
2.3 การจัดจำแนกชนิดไลเคน.....	10
2.4 การศึกษาอนุวิธานของไลเคน.....	12
2.5 สารทุติยภูมิของไลเคน.....	14
2.6 ราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียม.....	22
3. อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการทดลอง.....	26
3.1 อุปกรณ์.....	26
3.2 สารเคมี.....	27
3.3 วิธีดำเนินการทดลอง.....	28
3.3.1 สํารวจและเก็บตัวอย่าง.....	28
3.3.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน.....	30
3.3.3 การจัดจำแนกไลเคนด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	30
3.3.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุล ทริพิทีเลียมด้วยเทคนิคทางด้านอนุวิธาน.....	31
3.3.5 การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของราที่ก่อให้เกิดไลเคนใน สกุลทริพิทีเลียม ด้วยเทคนิค ITS-RFLP.....	33
3.3.6 การศึกษาการสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุล ทริพิทีเลียม.....	36

บทที่	หน้า
3.3.7 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดที่แยกได้ บนแผ่น TLC โดยวิธีไบโอออโตกราฟี (Bioautography).....	37
4. ผลการทดลอง.....	40
4.1 ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างไลเคน.....	40
4.2 ผลการแยกและเพาะเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียม.....	40
4.3 ผลการจัดจำแนกไลเคนด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	58
4.4 ผลการเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS จากราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุล ทริพิทีเลียม.....	58
4.5 ผลการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุล ทริพิทีเลียมด้วยเทคนิค ITS-RFLP.....	61
4.6 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียม ด้วยเทคนิคอนุวิทยาที่ตำแหน่ง ITS และ mtSSU.....	64
4.7 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียมโดย สร้างวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree).....	68
4.8 ผลการศึกษาการสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุล ทริพิทีเลียม.....	74
4.9 ความสัมพันธ์ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดที่แยกได้บน แผ่น TLC โดยวิธีไบโอออโตกราฟี (Bioautography).....	76
5. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	78
6. สรุปผลการทดลอง.....	83
รายการอ้างอิง.....	86
ภาคผนวก.....	99
ภาคผนวก ก.....	100
ภาคผนวก ข.....	102
ภาคผนวก ค.....	105
ภาคผนวก ง.....	106
ภาคผนวก จ.....	110
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	144

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงชนิดของราที่ก่อให้เกิดไลเคนในซับดิวิชัน (subdivision) ของรา	9
2.2 แสดงกลุ่มของสารทุติยภูมิหลักที่พบในไลเคน.....	16
2.3 รายงานการใช้ประโยชน์สารเมตาบอไลต์จากไลเคน.....	17
2.4 แสดงสารทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคนและราที่ดำรงชีวิต อย่างอิสระ	20
3.1 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส.....	32
3.2 แสดงชนิดของเอนไซม์และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	34
3.3 แสดงสาร ความเข้มข้น และปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RFLP.....	34
3.4 แสดงตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GeneBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัว อย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุลทริพิทิลีเยมที่ใช้ศึกษา.....	36
4.1 แสดงแหล่งที่มา จำนวนตัวอย่างไลเคนที่เก็บ และจำนวนไอโซเลต.....	40
4.2 แสดงการจัดกลุ่มจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไลเคน.....	59
4.3 แสดงการวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค ITS-RFLP.....	62
4.4 แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS และ mtSSU ของตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุลที่ศึกษากับตัวอย่างชนิดราจากฐานข้อมูล GeneBank	65
4.5 แสดงรูปแบบตำแหน่งค่า Rf ของแถบสารสกัดจากตัวแทนกลุ่มของราที่ก่อให้เกิดไลเคน บนแผ่น TLC.....	75

สารบัญญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
2.1 แสดงลักษณะของแทลลัสของไลเคน	5
2.2 แสดงลักษณะของแทลลัสแบบครัสโตส	6
2.3 แสดงลักษณะของแทลลัสแบบโพลีออส	6
2.4 แสดงลักษณะของแทลลัสแบบฟรุติโคส	7
2.5 แสดงลักษณะของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบบอะโพธิเซีย	7
2.6 แสดงลักษณะของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบบเพอริทียเซีย	8
2.7 แสดงลักษณะของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ	8
2.8 แสดงลักษณะโครงสร้างภายในและแอสโคสปอร์ของไลเคน	11
2.9 แสดงบริเวณของไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS)	13
2.10 แสดงบริเวณของไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง Mitochondria Small Subunit (mtSSU)	13
2.11 แสดงตัวไลเคนสกุลทริพิทิลีียม	24
3.1 แสดงบริเวณแหล่งที่ใช้ในการสำรวจและเก็บตัวอย่างไลเคนสกุลทริพิทิลีียม	29
4.1 แสดงลักษณะของแทลลัสที่สามารถแยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนได้ และลักษณะ โคไลน์ของราที่แยกได้บนอาหาร MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์	42
4.2 แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ตำแหน่ง ITS	58
4.3 แสดงวงศาวินิจฉัยการของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ตำแหน่ง ITS กับลักษณะทาง สัณฐานวิทยาในแต่ละไอโซเลต	71
4.4 แสดงวงศาวินิจฉัยการของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ตำแหน่ง mtSSU กับลักษณะทาง สัณฐานวิทยาในแต่ละไอโซเลต	72
4.5 แสดงวงศาวินิจฉัยการของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิลีียมของไทยที่ตำแหน่ง ITS ร่วมกับ mtSSU กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาในแต่ละไอโซเลต	73
4.6 แสดงรูปแบบของแถบสารสกัดของราที่ก่อให้เกิดไลเคนในแต่ละกลุ่มบนแผ่น TLC	74
4.7 แสดงรูปแบบของแถบสารสกัดของราที่ก่อให้เกิดไลเคนไอโซเลต KY 418 บนแผ่น TLC	76
4.8 แสดงการแยกและทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากไอโซเลต KY 418	77