RECEIVED
BY DATE 22 S.A. 2541

รายงาน

การใช้ Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting ในการจัดจำแนกเชื้อรา Genus *Paecilomyces*

ระยะเวลา: 1 มีนาคม 2541 ถึง 28 กุมภาพันธ์ 2542

รหัสโครงการ : BRT 141018

โดย ดร. น้ำทิพย์ ชุมพลกุลวงศ์ (หัวหน้าโครงการ)
ดร. ไนเจล เลสลี่ ไฮเวล โจนส์ (ผู้ร่วมโครงการ)

BRT 111018

รายงาน

ชื่อโครงการ: การใช้ Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting ในการจัดจำแนกเชื้อรา Genus *Paecilomyces*

ระยะเวลา: 1 มีนาคม 2541 ถึง 28 กุมภาพันธ์ 2542

โดย : ดร. น้ำทิพย์ ชุมพลกุลวงศ์ (หัวหน้าโครงการ)
ดร. ไนเจล เลสลี่ ไฮเวล โจนส์ (ผู้ร่วมโครงการ)

วัตถุประสงค์ :

1. เพื่อทำการจัดจำแนกเชื้อรา Genus *Paecilomyces* ที่แยกได้จากหลายจังหวัดใน ประเทศไทย
2. เพื่อใช้วิธีการทางด้าน Molecular มาใช้ในงาน Identify เชื้อรา
3. เพื่อใช้ข้อมูลทางด้าน Molecular มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ Insect Pathogenic Fungi ต่อไป

การดำเนินงานวิจัย :

1. การแยก Spore เดี่ยว
2. การเลี้ยงเชื้อรา
3. การสกัด DNA
4. การทำปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)
5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางคอมพิวเตอร์

1. การแยก Spore เดี่ยว

เชื้อรา *Paecilomyces*, *Nomuraea*, *Torrubiella*, and *Cordycep* ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ของเมืองไทยทั้งหมด 35 isolates ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และในแผนที่นั้น ได้ถูกนำมาเลี้ยงใน PDA plate เก็บไว้ในตู้เก็บเชื้อ 22 ^{o}C จากนั้นใช้กล้อง steriomicroscope ส่องดู จนกระทั่งเห็นว่ามีการสร้าง spore จึงจะใช้เข็มในการแยกให้ได้ spore เดี่ยวออกมา จากนั้นเลี้ยง spore นั้นบน PDA จนเชื้อโตสร้าง mycelium ออกมา

2. การเลี้ยงเชื้อรา

เชื้อราแต่ละ isolate ที่ได้จากในข้อ 1 ได้ถูกนำมาเลี้ยงลงในอาหารเหลว 50 ml ซึ่งประกอบด้วย ส่วนประกอบของอาหาร คือ K_2HPO_4 2 กรัม, yeast extract 2 กรัม, malt extract 2 กรัม, $FeSO_4$. 7 H_2O 0.2 กรัม, NH_4NO_3 3 กรัม และน้ำตาล dextrose 20 กรัม ต่อปริมาณน้ำกลั่น 1 ลิตร(Strongman, *et al.* 1993) จากนั้น นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 10 วัน เมื่อได้เชื้อที่จนสร้างสายใยมากพอควรแล้วนำมากรอง โดยใช้กระดาษ Whatman No.1 จากนั้นเอา mycelium ที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer และเก็บไว้ที่ตู้อุณหภูมิ -20 ^{o}C

3. การสกัด DNA

วิธีการสกัด DNA ได้ถูก modified จาก วิธีของ Myrian *et al.* 1995. Genomic DNA จะถูกสกัดจาก mycelium ที่แห้งแล้ว ประมาณ 100 mg ซึ่งจะถูกบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้ liquid Nitrogen จากนั้นเติมสารละลายซึ่งประกอบด้วย (0.7 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 10%w/v

Table 1 Origin of *Paecilomyces spp.* isolates

Species	Isolate Number	Location	Host or substrate
T. luteorostrata	5747	Khlong Lan National Park	Scale insect
	6500	Doi Inthanon National Park	Scale insect
P. cinnamomous			
	2685	Khao Sabap National Park	Scale insect
	2692	Khao Sabap National Park	Scale insect
	5260	Khao Yai National Park	Scale insect
P. javanicus			
	3514	Khlong Naka Wildlife reserve	Spider
	4988	Nam Nao National Park	Spider
	5870	Ko Charng National Park	Spider
	6047	Khao Pu Khao Ya National Park	Spider
	6170	Khao Yai National Park	Spider
	6224	Kaeng Krachan National Park	Spider
	6377	Khao Soi Dao Wildlife reserve	Spider
P. tenuipes			
	4076	Kaeng Krachan National Park	Lepidoptera
	4993	Nam Nao National Park	Lepidoptera
	5597	Doi Inthanon National Park	Lepidoptera
	5732	Khlong Lan National Park	Lepidoptera
	6300	Khao Yai National Park	Lepidoptera
	6033	Khao Pu Khao Ya National Park	Lepidoptera
	6073	Khlong Naka Wildlife Reserve	Lepidoptera
P. lilacinus	5066	Nam Nao National Park	Cydnidae
	5096	Khao Yai National Park	Cydnidae
P. cf ghanensis	4441	Khao Yai National Park	Lepidoptera larva
P .amoeneroseus	2518	Chalerm Rattanakosin National park	Lepidoptera larva
N . rileyi	0299	Chachongsao rice field	Lepidoptera larva
C. cylindrica	2347	Sam Lan , Saraburi	Spider
N. atypicola	2856	Khoa Yai National Park	Spider
	3076	Khao Yai National Park	Spider
	6174	Khao Yai Nationnal Park	Spider
P. farinosus			
	5850	Kaeng Krachan National Park	Lepidoptera larva
	6196	Kaeng Krachan National Park	Lepidoptera larva
P. marquandii			
	0100	Kasetsart University , Bangkok	Soil
	0345	Kasetsart University, Bangkok	Soil
P. lilacinus			
	0119	Kasetsart University, Bangkok	Soil
	0046	Kasetsart University, Bangkok	Soil
P. variotii			
	0001	Kasetsart University, Bangkok	Soil

Location of collected fungal isolates

cetyltrimethyl ammoniumbromide ; CTAB) 500 ไมโครลิตร , แช่หลอดไว้ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 65°C, 1 ชั่วโมง , เติมสาร chloroform/ isoamylalcohol (24 : 1 v/v) ลงไปในปริมาตรที่เท่ากัน สิ่งสกปรกพวกโปรตีนจะถูกสกัดลงไปอยู่ในชั้นของ chloroform/ isoamylalcohol ส่วนของเหลวในชั้นบนของหลอด จะถูกสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยปริมาณที่เท่ากันของ chloroform/ isoamylalcohol จากนั้นเติม RNaseA 5 ไมโครลิตร (10 mg/ml) ลงไป ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ที่ 37°C จากนั้นเติม iso propanal ปริมาตร 0.6 เท่า ลงไปเมื่อตกตะกอน DNA จากนั้นล้างตะกอน DNA ด้วย 70% (v/v) ethanol หลังจากตะกอนแห้งแล้ว ละลายตะกอน DNAใน TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 , 1 mMEDTA pH. 8.0) และวัดปริมาณ DNA ด้วยการ run gel electrophoresis.

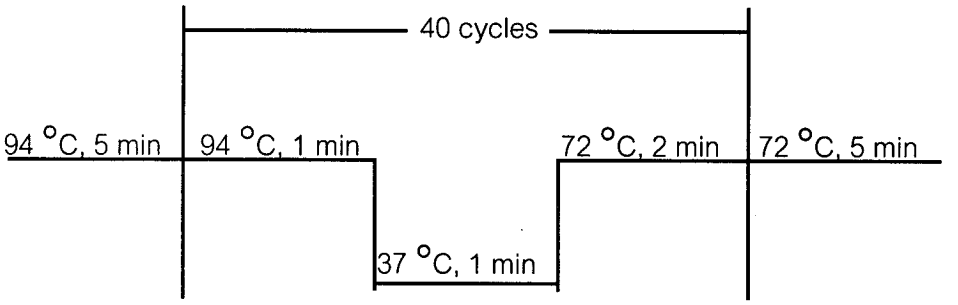
4. การทำปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

การทดลองนี้ใช้ primer ทั้งหมด 60 primers โดย 20 primers สั่งสังเคราะห์จากบริษัทเอกซนและอีก 40 primers จากมหาวิทยาลัยบริติชโคลัมเบีย primers ทั้ง 60 ตัวนี้ได้ถูกนำมาคัดเลือกโดยการทำปฏิกิริยา PCR โดย primers ตัวที่จะถูกคัดเลือกนั้นจะต้องแสดงความแตกต่าง (polymorphic) ของ *Paecilomyces* spp. ได้

ส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR

1. dNTP 100 - 200 µM
2. $MgCl_2$ 1 - 4 mM
3. Tag polymerase 1 - 2 unit
4. primer 0.5 - 2 µM
5. buffer 1X
6. Template 10 - 50 nmol

ปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดทำในเครื่อง Perkin Elmer - Cetus Thermal cycles โดยใช้วงจรดังนี้คือ



จากนั้น PCR products จะถูกนำมาตรวจความเป็น polymorphic โดยใช้ 2 % agarose gel electrophoresis, ใน 1 x TBE buffer, และ stain ด้วย ethidium bromide (*Maniatis et al., 1982*).

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางคอมพิวเตอร์

Bands ที่ได้จากการ amplified ด้วย primer ทั้ง 5 ตัว จะถูกนับและนำมาคำนวณในสูตรร่วมกัน ใน isolate หนึ่งๆ ถ้ามี band จะนับเป็น 1, ถ้าไม่มี band จะถูกนับเป็น 0

สูตรในการคำนวณหา genetic distance ได้จาก

$$S_{ij} = 2n_{ij} / n_i+n_j$$

โดย S_{ij} = index of similarity ของ isolate i and j

n_i and n_j = จำนวนของ bands ที่นับได้จาก isolate i and j ตามลำดับ

n_{ij} = จำนวนของ bands ที่ share อยู่ทั้งใน isolate i and j

Genetic distance $D_{ij}= 1-S_{ij}$

จากนั้น Phylogenetic tree จะถูกสร้างโดยใช้ unweighed pair-group method with arithmetic average (UPGMA) of Phylip version 3.57c(Felsenstein 1991)

ผลการทดลอง

จากการคัดเลือกทั้งหมด 60 primers พบว่ามี 5 primers ที่แสดง polymorphic ของเชื้อในการศึกษานี้ดังที่ได้แสดงในตารางข้างล่างนี้พร้อมทั้งแสดงconcentration ของ dNTP and $MgCl_2$ที่ใช้ในแต่ละ primerด้วย

Primer	Sequences (5' - 3')	dNTP(μM) and $MgCl_2$(mM) concentration used in each primer
UBC 70	GGG CAC GCG A	150 and 3.0
K9	TGC GGC TGA G	150 and 2.0
R10	AGT CAG CCA G	100 and 2.5
UBC 81	GAG CAC GGG G	100 and 2.0
UBC 88	CGG GGG ATG G	100 and 2.0

Polymorphic bands ที่ได้จาก primer ทั้ง 5 ตัวนี้ได้ถูกแสดงในรูปที่ 1-5, ส่วนรูปที่ 6-7 นั้น เป็นแผนภาพphylogenetic tree ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง *Paecilomyces* ในแต่ละ species กับเชื้อกลุ่มอื่น.

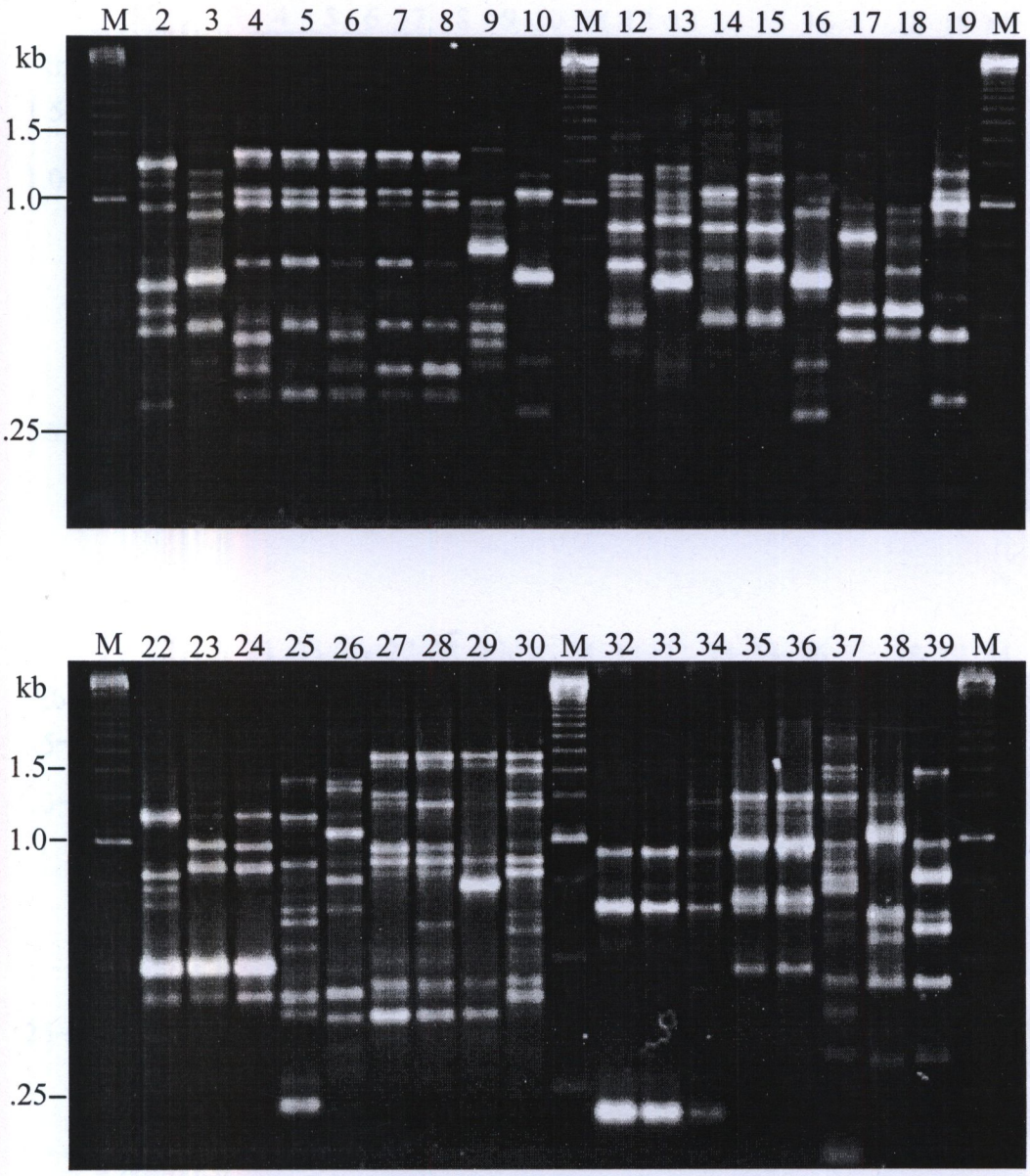


Fig. 1 RAPD markers generated by primer UBC 70. Lanes 2-8 = *P. tenuipes* isolates 4076, 4993, 5597, 5732, 6300, 6033, and 6073; lanes 9-10 = *P. farinosus* isolates 5850 and 6196; lanes 12-18 = *P. javanicus* isolates 3514, 6047, 4988, 5870, 6170, 6224, and 6377; lane 19 = *N. rileyi* isolate 0299; Lanes 22-24 = *P. cinnamomeus* isolates 2692, 2685,and 5260; lanes 25-26 = *T. luteorostrata* isolates 5747 and 6500; lanes 27-30 = *P. lilacinus* isolates 5066, 5096, 0119 and 0046; lanes 32-34 = *N. atypicola* isolates 2856, 3076, and 6174; lanes 35-36 = *P. marquandii* isolates 0100 and 0345; lane 37 = *P. variotii* isolate 0001; lane 38 = *P. amoeneroseus* isolate 2518; lane 39 = *P. cf ghanensis* isolate 4441, lane M = 250 bp DNA size marker.

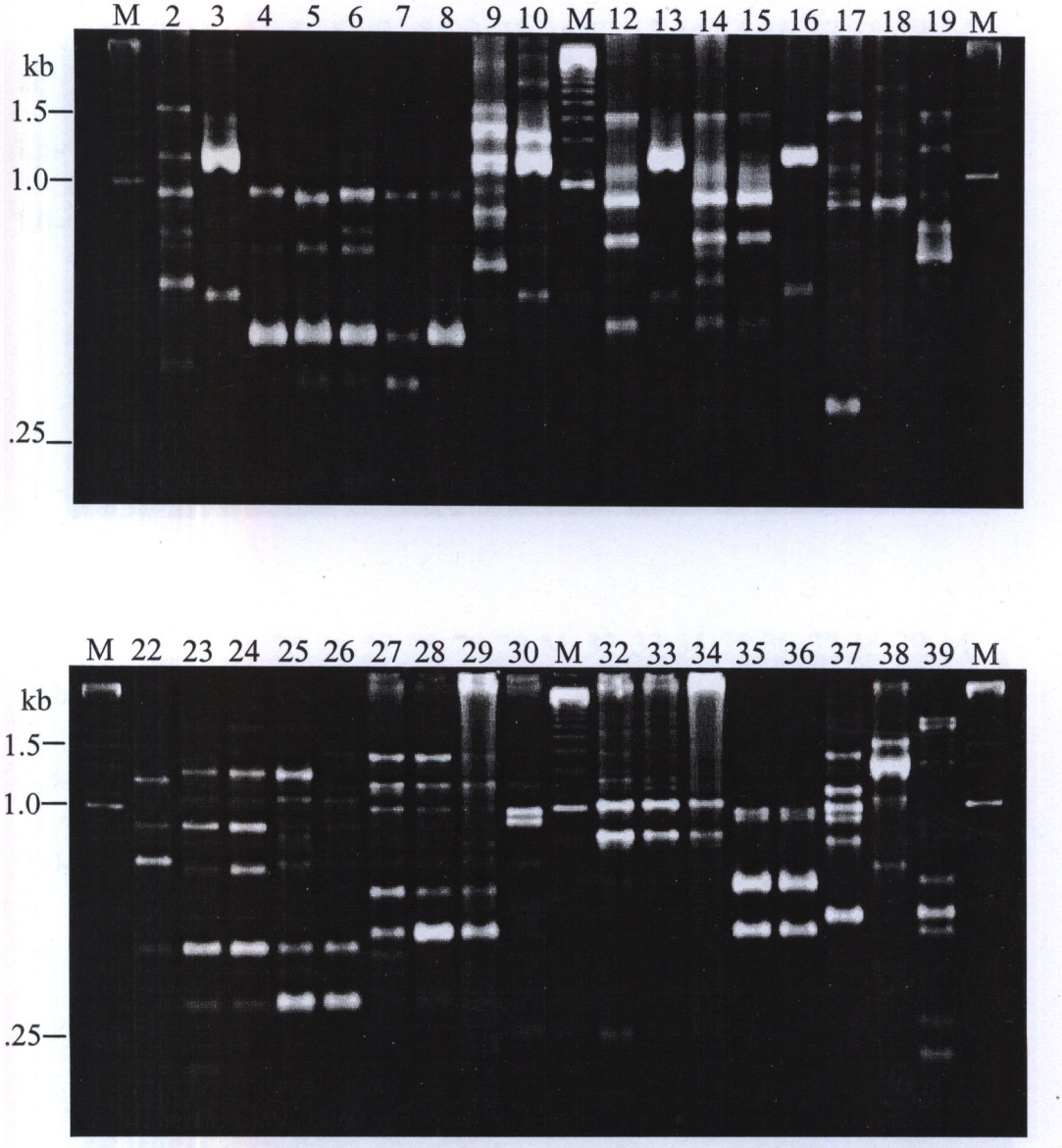


Fig. 2 RAPD markers generated by primer K9. Lanes 2-8 = *P. tenuipes* isolates 4076, 4993, 5597, 5732, 6300, 6033, and 6073; lanes 9-10 = *P. farinosus* isolates 5850 and 6196; lanes 12-18 = *P. javanicus* isolates 3514, 6047, 4988, 5870, 6170, 6224, and 6377; lane 19 = *N. rileyi* isolate 0299; Lanes 22-24 = *P. cinnamomeus* isolates 2692, 2685,and 5260; lanes 25-26 = *T. luteorostrata* isolates 5747 and 6500; lanes 27-30 = *P. lilacinus* isolates 5066, 5096, 0119 and 0046; lanes 32-34 = *N. atypicola* isolates 2856, 3076, and 6174; lanes 35-36 = *P. marquandii* isolates 0100 and 0345; lane 37 = *P. variotii* isolate 0001; lane 38 = *P. amoeneroseus* isolate 2518; lane 39 = *P. cf ghanensis* isolate 4441, lane M = 250 bp DNA size marker.

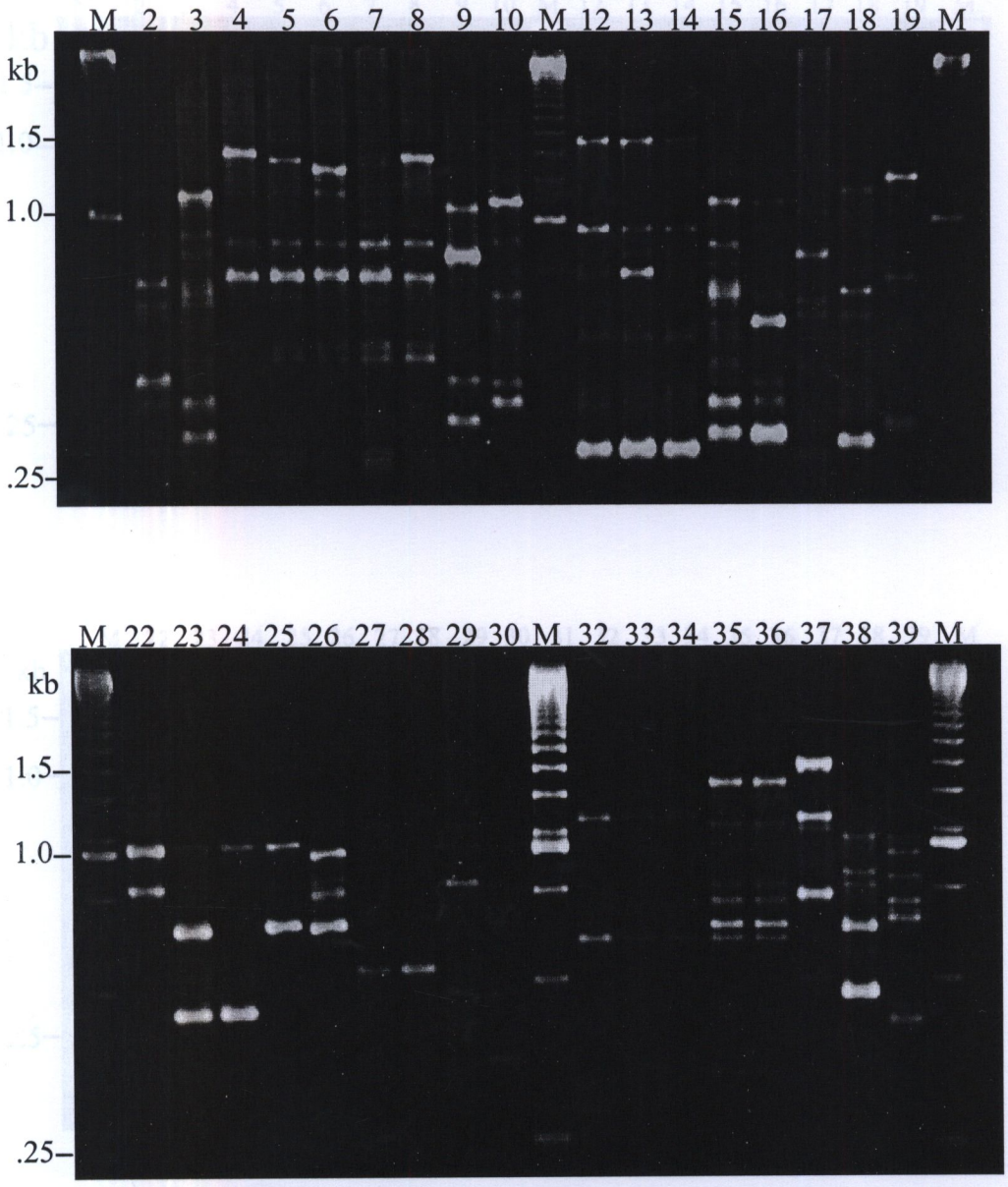


Fig. 3 RAPD markers generated by primer R10. Lanes 2-8 = *P. tenuipes* isolates 4076, 4993, 5597, 5732, 6300, 6033, and 6073; lanes 9-10 = *P. farinosus* isolates 5850 and 6196; lanes 12-18 = *P. javanicus* isolates 3514, 4988, 5870, 6047, 6170, 6224, and 6377; lane 19 = *N. rileyi* isolate 0299; Lanes 22-24 = *P. cinnamomeus* isolates 2692, 2685,and 5260; lanes 25-26 = *T. luteorostrata* isolates 5747 and 6500; lanes 27-30 = *P. lilacinus* isolates 5066, 5096, 0119 and 0046; lanes 32-34 = *N. atypicola* isolates 2856, 3076, and 6174; lanes 35-36 = *P. marquandii* isolates 0100 and 0345; lane 37 = *P. variotii* isolate 0001; lane 38 = *P. amoeneroseus* isolate 2518; lane 39 = *P. cf ghanensis* isolate 4441, lane M = 250 bp DNA size marker.

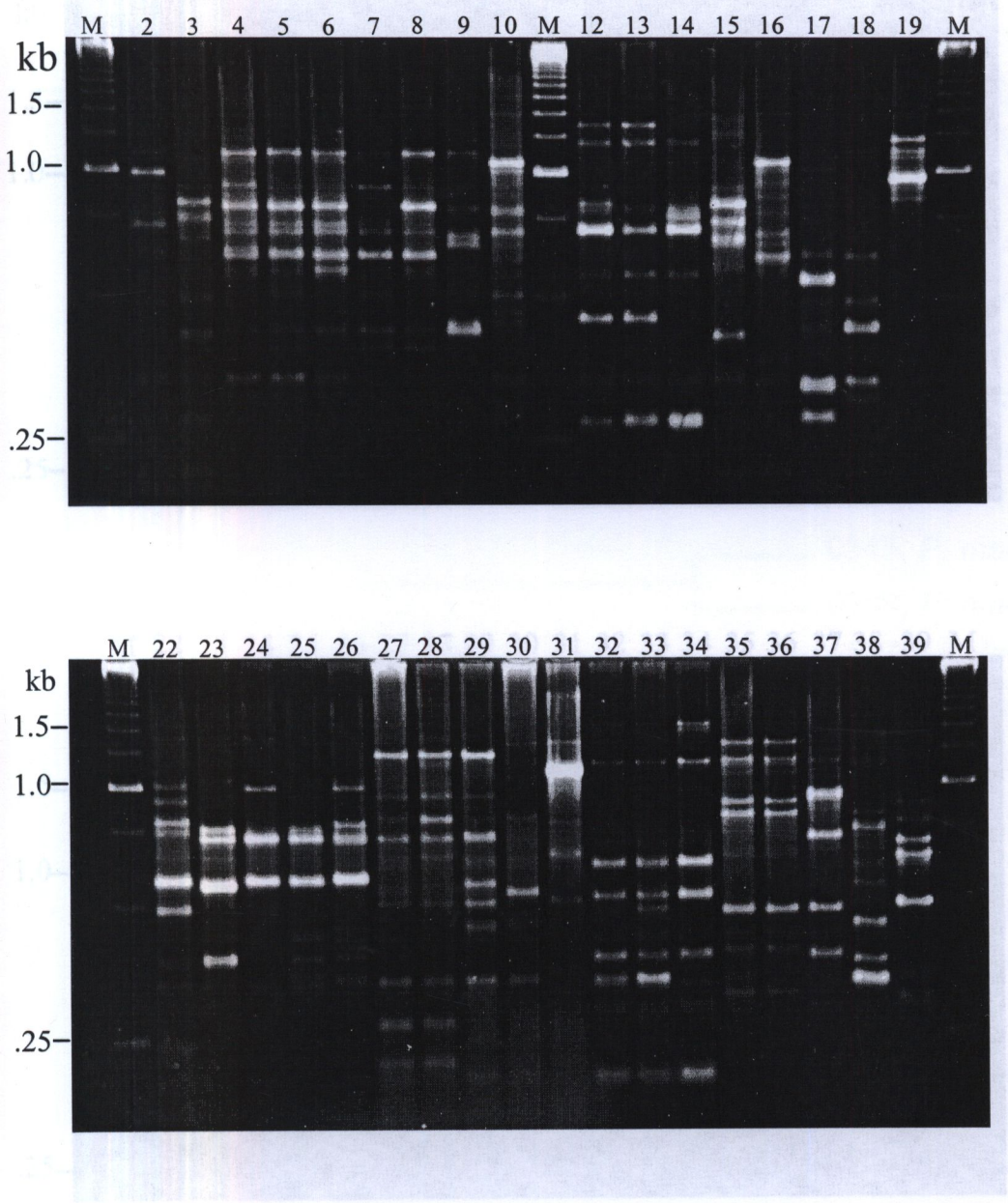


Fig. 4 RAPD markers generated by primer UBC 88. Lanes 2-8 = *P. tenuipes* isolates 4076, 4993, 5597, 5732, 6300, 6033, and 6073; lanes 9-10 = *P. farinosus* isolates 5850 and 6196; lanes 12-18 = *P. javanicus* isolates 3514, 4988, 5870, 6047, 6170, 6224, and 6377; lane 19 = *N. rileyi* isolate 0299; Lanes 22-24 = *P. cinnamomeus* isolates 2692, 2685,and 5260; lanes 25-26 = *T. luteorostrata* isolates 5747 and 6500; lanes 27-30 = *P. lilacinus* isolates 5066, 5096, 0119 and 0046; lane 31 = *C. cylindrica* isolate 2347; lanes 32-34 = *N. atypicola* isolates 2856, 3076, and 6174; lanes 35-36 = *P. marquandii* isolates 0100 and 0345; lane 37 = *P. variotii* isolate 0001; lane 38 = *P. amoeneroseus* isolate 2518; lane 39 = *P. cf ghanensis* isolate 4441, lane M = 250 bp DNA size marker.

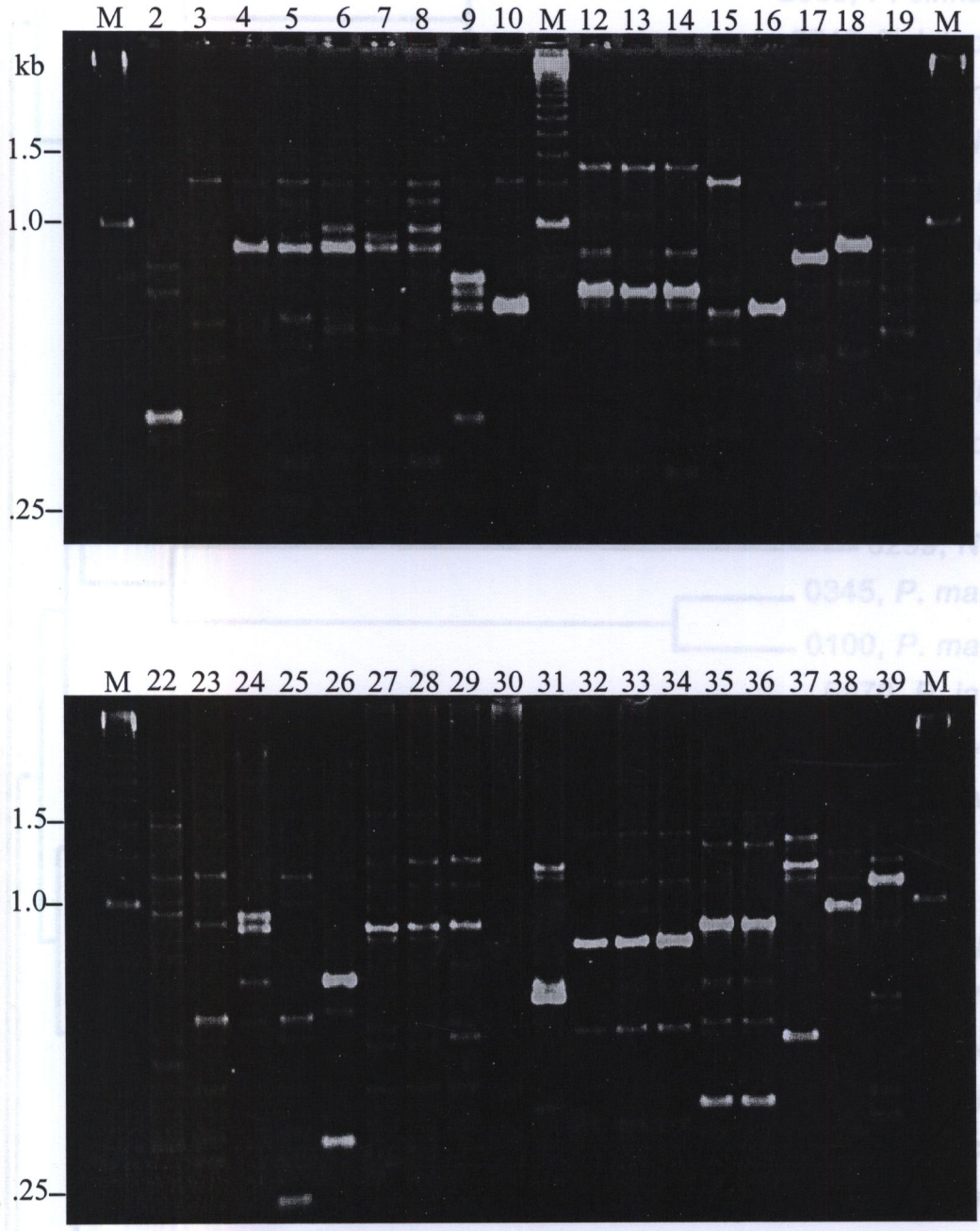
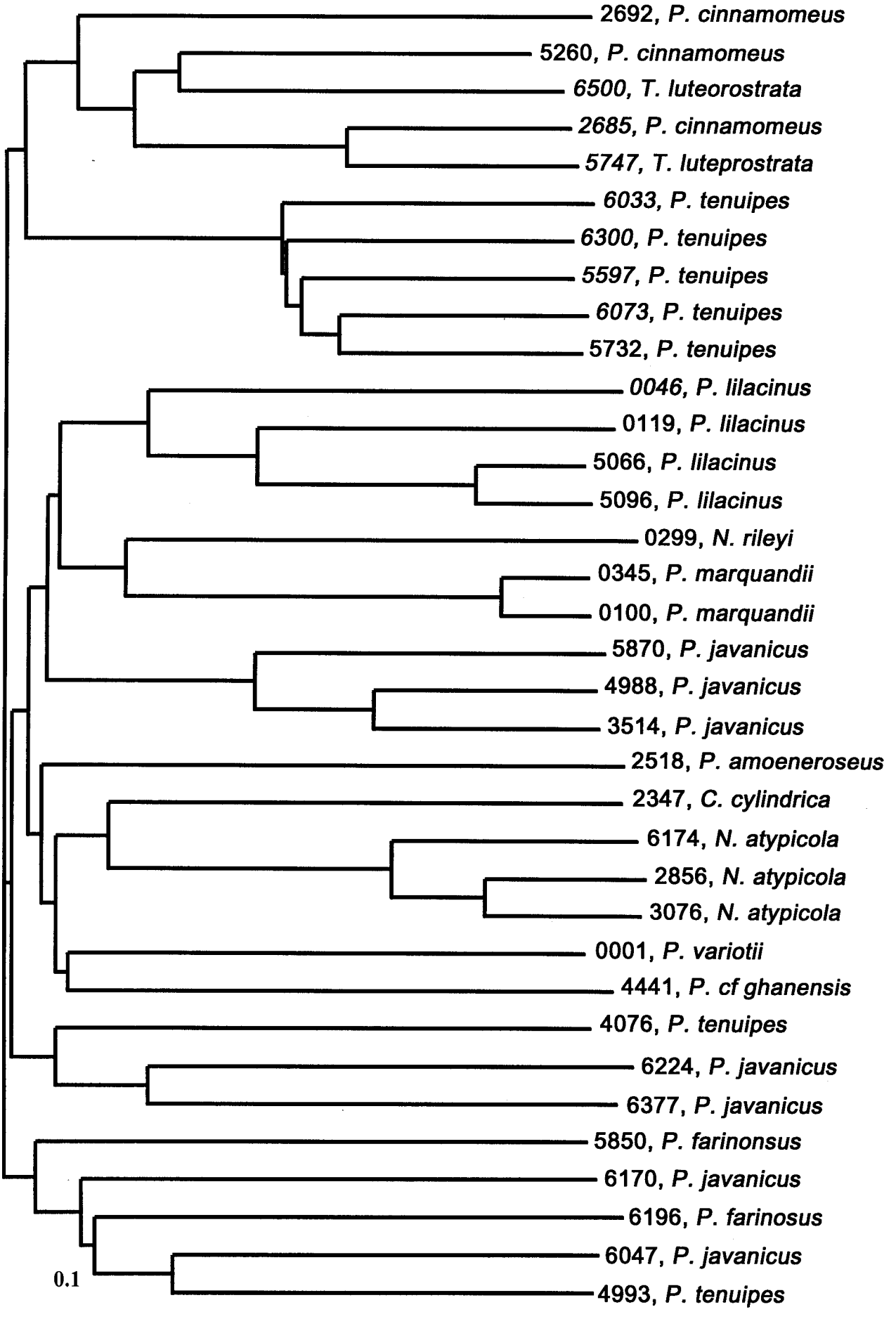
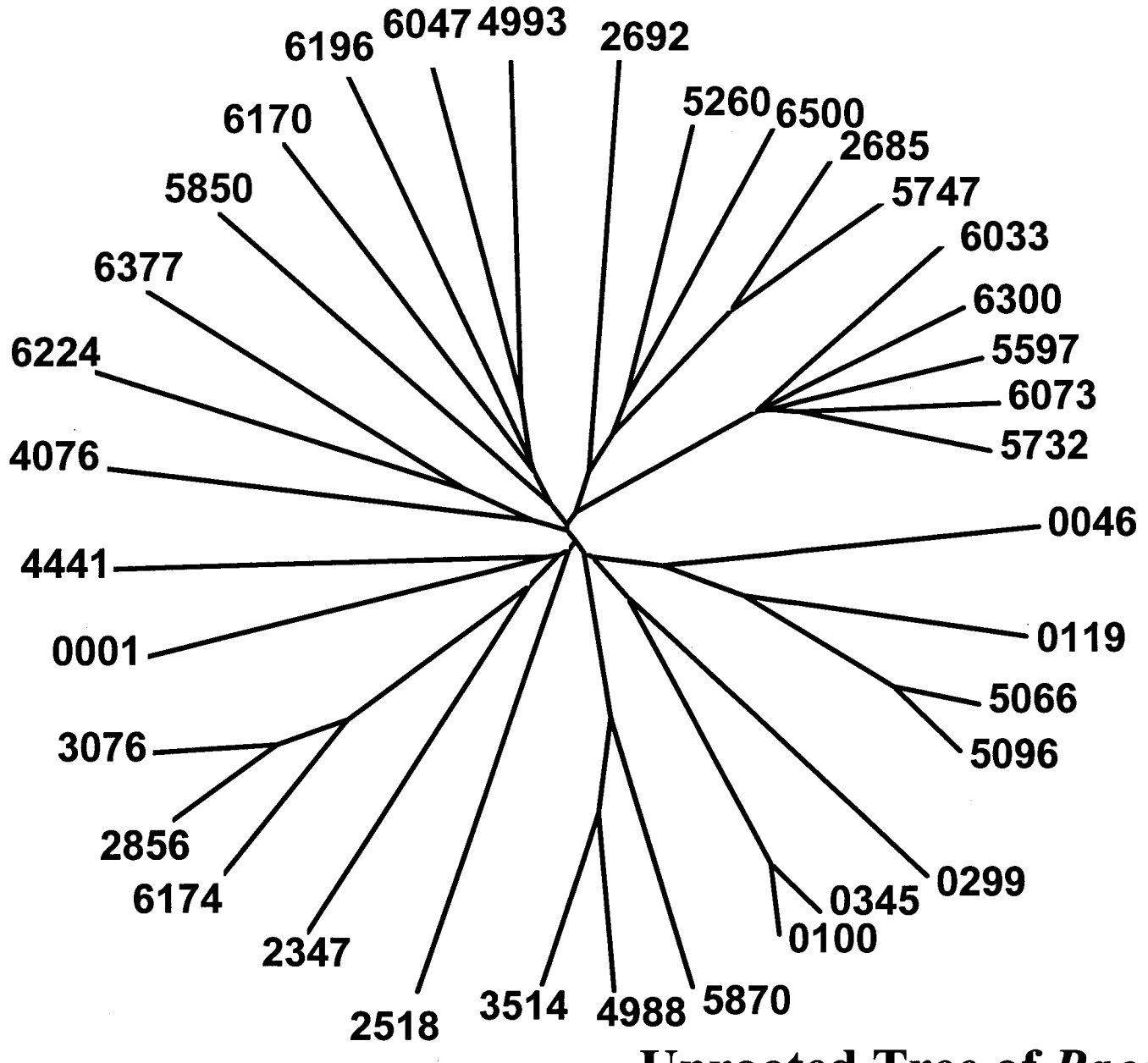


Fig. 5 RAPD markers generated by primer UBC 81. Lanes 2-8 = *P. tenuipes* isolates 4076, 4993, 5597, 5732, 6300, 6033, and 6073; lanes 9-10 = *P. farinosus* isolates 5850 and 6196; lanes 12-18 = *P. javanicus* isolates 3514, 4988, 5870, 6047, 6170, 6224, and 6377; lane 19 = *N. rileyi* isolate 0299; Lanes 22-24 = *P. cinnamomeus* isolates 2692, 2685,and 5260; lanes 25-26 = *T. luteorostrata* isolates 5747 and 6500; lanes 27-30 = *P. lilacinus* isolates 5066, 5096, 0119, and 0046; lane 31 = *C. cylindrica* isolate 2347; lanes 32-34 = *N. atypicola* isolates 2856, 3076, and 6174; lanes 35-36 = *P. marquandii* isolates 0100 and 0345; lane 37 = *P. variotii* isolate 0001; lane 38 = *P. amoeneroseus* isolate 2518; lane 39 = *P. cf ghanensis* isolate 4441, lane M = 250 bp DNA size marker.



Dendogram based on RAPD patterns



Unrooted Tree of *Paecilomyces* spp.

ผลการทดลอง(ต่อ)

จาก RAPD profiles ในรูปที่ 1-5, พบว่า *P. tenuipes* ทั้งหมดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ 7 isolates นั้น isolates 5597, 5732, 6300, 6033, and 6073 แสดง banding pattern ที่ คล้ายคลึงกันใน primer ทุกตัว และใน Phylogenetic tree , isolate ทั้ง 5 ตัวนี้ก็ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันด้วย. ในขณะที่ isolates 4076 และ 4993 นั้นแสดง pattern ที่แตกต่างออกไป ใน phylogenetic tree ก็ได้ผลที่สอดคล้องกันด้วย จากผลการทดลองตรงนี้แสดงให้เห็นว่า isolates 4076 และ 4993 ควรจะมีการตรวจสอบกลับไปทางด้าน morphology และ check รายละเอียดต่างๆให้มากขึ้นว่า isolates 2 ตัวนี้เป็น species ไหน.

ทางด้านกลุ่มของ anamorph *P. cinnamomeus* (isolates 2692, 2685, 5260) - telemorph *T. luteorostrata* (isolates 5747, 6500) พบว่าทั้ง 5 isolates ถึงแม้ว่ามี banding pattern ที่ไม่เหมือนกันทีเดียว แต่ก็มี commond band ที่ share กันอยู่ ซึ่งจะสังเกตุเห็นได้ชัดใน amplified products ของ Primer UBC 70, K9, UBC 88 ใน Phylogenetic tree ก็ยังสามารถบอกได้อีกว่า isolate 2685 จะมีความสัมพันธ์ กับ 5747 , isolate 5260 มีความสัมพันธ์กับ 6500 ในขณะที่ isolate 2692 อยู่แยกออกมาจาก 4 ตัวนี้ แต่ก็คงอยู่ใน branch tree เดียวกัน.

ทางด้าน *P. lilacinus* พบว่าตัวที่มี host เป็นแมลง และตัวที่ได้จากดินนั้นมี banding pattern ที่คล้ายคลึงกันโดย isolate 0119 จะมีความเหมือนของ banding pattern คล้ายคลึงกับ isolates 5066 และ 5096 มากกว่า 0046 ซึ่งเป็นเรื่องที่หน้าแปลกที่ว่า host ของเชื้อราที่ได้นั้น ค่อนข้างแตกต่างกัน ซึ่งตามสมมติฐานคาดว่าเชื้อราที่ได้จากแมลงควรจะมีความแตกต่างกับเชื้อราที่ได้จากดิน แต่ผลการทดลองกลับพบว่าทั้ง 4 isolates นี้อยู่ในกลุ่มของ tree เดียวกัน.

กลุ่มของ *N. atypicola* นั้น ทั้ง 3 isolates คือ 2856, 3076 และ 6174 มี banding pattern ที่เรียกว่าคล้ายกันมากประมาณ 95% และพบว่า *C. cylindrica* ซึ่งเป็น telemorph ของเชื้อรากลุ่มนี้ ก็ออกมาใน branch tree เดียวกันด้วย.

จาก RAPD profiles ของ primer UBC70 พบว่าที่ระดับประมาณ 1250 bp เป็น specific band ที่พบใน *P. tenuipes* ทั้ง 5 isolates คือ 5597, 5732, 6300, 6033, 6073 นอกจากนี้ยังพบ speific band สำหรับ species นี้ อีกใน primer K9 ที่ระดับประมาณ 350 bp ซึ่ง speific band เหล่านี้จะ speific สำหรับ species template เท่านั้น ดังนั้นในงานวิจัยข้างหน้าการ identify *P. tenuipes* อย่างรวดเร็วนั้นอาจทำได้โดยการนำ DNA ของunknown มา amplify กับ primer UBC70 และ K9. ถ้าสามารถ detect band ดังกล่าวได้ ก็หมายความว่า unknown ตัวนั้นเป็น *P. tenuipes*.

นอกจากนี้ยังพบ speific band ของกลุ่ม *P. lilacinus* คือที่ระดับประมาณ 1750 bp เมื่อใช้ UBC70 เป็น primer และในกลุ่มของ *P. cinnamomeus - T. luterostrata* ที่ระดับประมาณ 450 bp ใน amplified products ของ primer K9 และที่ระดับประมาณ 200 bp พบ specific band ของกลุ่ม *N. atypicola.* ใน primer เดียวกัน.

ในบางกลุ่มเช่น *P. javanicus* ซึ่งมีการแตกแยกไป 3 กลุ่มย่อย คือ (กลุ่ม 5870, 4988, 3514) , (6047, 6170) และ กลุ่ม 6229, 6377 ซึ่งทั้งหมดนี้ ควรที่จะมีการกลับไปพิจารณา ทางด้าน morphology และลักษณะของ spore อีกครั้งนึง เมื่อเป็นการ confirm ให้เห็นว่า กลุ่มใดที่แตกต่างออกมาจากพวก.

สรุปผลการทดลอง

จากการใช้ primer ทั้งหมด 5 ตัวนี้ พบว่า primer UBC70 แสดง polymerphic ของ isolates ทั้งหมด 35 ตัว ได้ดีกว่า primer ตัวอื่น อีกทั้งยังสามารถแสดง specific band ให้กับ species ได้ด้วย เช่น *P. tenuipes*, *P. lilacinus* และ *N. atypicola*.

ผลการทดลองในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มของ *P. cinnamomeus - T. luterostrata*, แสดงถึงการมี host specific ใน scale inscet.

ผลของความสัมพันธ์ระหว่าง anamorph- telemorph นั้น ออกมาได้อย่างมีเหตุผล คือ T. *luterostrata* ซึ่งเป็น telemorph ของกลุ่ม *P. cinnamomeus* แสดง banding pattern ที่คล้ายคลึงกันและอยู่ในกลุ่มเดียวกันของ phylogenetic tree ในขณะที่ telemorph ของ *N. atypicola* คือ *C. cylindrica* ก็ได้ผลออกมาอยู่ในกลุ่มเดียวกัน.

P. amoeneroseus isolate 2518 นั้นเท่าที่กลุ่มของ Dr. Nigel ได้เข้าไปสำรวจและเก็บเชื้อรามานั้น ได้ตัวนี้เพียงตัวเดียว ซึ่งจะบอกว่าเป็นตัวที่อิงกลุ่มไหนอยู่คงยังสรุปไม่ได้ เพราะคิดว่าควรจะมีจำนวน isolates ของ species เดียวกันที่มากกว่านี้การทดลองครั้งคิดว่า ควรจะมีการใช้จำนวน isolate ของแต่ละ species เพิ่มขึ้นมากกว่านี้ หรือมีการใช้จำนวน primer ที่มากกว่านี้เพื่อให้ได้ข้อมูลทีมีความน่าเชื่อถือมากขึ้นและเพื่อที่จะทำการสรุปว่า ในแต่ location ของแต่ละ isolate นั้นมีผลต่อชนิดของเชื้อราหรือไม่.

การทดลองครั้งนี้ เราจะเห็นได้ว่าการ identify เชื้อราโดยการศึกษาจากลักษณะ morphology ภายนอกและรูปร่างลักษณะของ spore นั้น ยังมีโอกาสผิดพลาดเกิดขึ้นได้ การศึกษาในระดับขั้น molecular นั้นจะทำการแก้ปัญหานี้ได้ โดยการทำ DNA fingerprint ซึ่งจะสามารถทำให้เราแจกแจง ได้อย่างชัดเจนว่า isolates ไหนควรจะอยู่กลุ่มไหน นอกจากนี้วิธีการ RADP นี้ยังสามารถทำให้เราค้นพบ RAPD specific marker คือ band ที่มีความเฉพาะเจาะจงในแต่ละ species ทำให้เราสามารถ identify เชื้อราได้สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำขึ้น อีกทั้งยังเป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยากมากเพียงแต่มี PCR machine และ Electrophoresis เท่านั้นก็สามารถดำเนินงานได้.