ความหลากหลายและความสมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราบนขาวกล้องและการผลิตสารเมแทบอไลต์บางชนิด

กชกร ลาภมาก*

บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อราจาก 14 ตัวอย่างของเมล็ดข้าวเปลือกที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิว (SS) และข้าวกล้อง (BR) ของข้าวจำนวน 8 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกลุ่มสังคมและความหลากหลายของชนิดของเชื้อราที่พบใน BR และ SS ของข้าวแต่ละพันธุ์ สามารถแยกเชื้อราได้ 1,464 ไอโซเลท นำมาจัดจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 52 ชนิด ประกอบด้วย กลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 31 ชนิด ascomycetes 9 ชนิด และเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ (mycelia sterilia: MS) 12 ชนิด จากการศึกษาพบเชื้อราในกลุ่ม ascomycetes เฉพาะใน SS เท่านั้น ส่วนเชื้อราที่พบมากที่สุดอยู่ในกลุ่ม MS ซึ่งได้แก่ MS1 พบใน BR (43.09%) และ SS (35.46%) ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ MS2 พบใน BR 15.14% และ SS 26.30% ตามลำดับ จากการจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่ม MS โดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง 28S และ ITS1-5.8S-ITS2 สามารถจัดจำแนกได้ 7 จีนัส ได้แก่ *Alternaria* (MS3), *Bipolaris* (MS2), *Coriolopsis* (MS4), *Curvularia* (MS6), *Dendryphiella* (MS1), *Massarina* (MS5), และ *Persiciospora* (MS8) ยังมี MS อีก 5 ชนิดที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ในระดับจีนัส พบว่าเชื้อราใน BR และ SS มีความหลากหลายที่ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้พบว่าข้าวเหนียว (RD6) มีความหลากหลายของเชื้อราสูงกว่าข้าวเจ้า (KDML105) แหล่งที่มาของข้าวและพันธุ์ข้าวมีผลต่อความหลากหลายและกลุ่มสังคมของเชื้อราทั้ง BR และ SS

สารเมแทบอไลต์จากเชื้อราเป็นที่รู้จักและนำมาใช้อย่างแพร่หลายทางอุตสาหกรรม ในการศึกษานี้ ได้คัดเลือกเชื้อราในกลุ่มที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แอลแอสพาราจิเนส และฮอร์โมนพืช ได้แก่ GA_3 และ IAA จากการคัดเลือกเชื้อราจำนวน 112 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนโดย gel diffusion assay และตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์โดยวัดน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าราจำนวน 27 ไอโซเลทให้วงใสบนอาหารแข็ง โดยเชื้อราไอโซเลท BR307 (MS12) สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด (0.481±0.018 U/ml)

คัดเลือกราจำนวน 36 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตแอลแอสพาราจิเนสบนอาหารแข็ง modified Czapek Dox (mCD) ที่มีแอลแอสพาราจีนเป็นแหล่งไนโตรเจน และฟีนอลเรด เชื้อราจำนวน 24 ไอโซเลท สามารถเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์เป็นสีชมพู จึงนำมาตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์โดยวิธี Nesslerization พบว่า *Bipolaris australiensis* ไอโซเลท BR438 ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด (6.3±0.65 U/ml) เมื่อเลี้ยงในอาหาร mCD ที่มีแอลแอสพาราจีน 1% และกลูโคส 0.4% เป็นส่วนประกอบ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์นี้ไม่มีพิษต่อ Vero cell lines

สำหรับการศึกษาเบื้องต้นในการผลิตฮอร์โมนพืชจากเชื้อรา ได้คัดเลือกเชื้อราจำนวน 12 ไอโซเลท ในการผลิต GA_3 และ IAA นำเชื้อรามาเลี้ยงในอาหาร Czapek ที่เติมเปปโตน 1% และกลูโคส 1% บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนามากรองและทำให้แห้งเป็นผงสำหรับวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวภาพของสาร

---

* วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ความหลากหลายทางชีวภาพและชีววิทยาชาติพันธุ์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 214 หน้า.

ตรวจสอบผลของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 10 μg/ml ของต่อความแข็งแรงของต้นกล้าถั่วเขียวเทียบกับฮอร์โมนมาตรฐาน GA_3, IAA และน้ำ วัดผลโดยคำนวณจากค่า vigour index (VI) พบว่า *Fusarium oxysporum* ไอโซเลท BR464 และ *Acremonium* sp. ไอโซเลท BR484 แสดงค่า VI สูงสุดที่ 1117.67 และ 1115.67 ตามลำดับ ซึ่งค่า VI ที่ได้ต่ำกว่า GA_3 (1336.33) แต่สูงกว่า IAA (875) และน้ำ (864.67) สารสกัดจากเชื้อราทั้งสองไอโซเลทแสดงเปอร์เซ็นต์การงอกดีเทียบเท่ากับ GA_3, IAA และน้ำ โดยพบว่าต้นถั่วเขียวมีน้ำหนักสดและแห้งน้อยกว่าต้นที่ได้รับ GA_3 มาตรฐานแต่มีลักษณะของลำต้นที่ปกติกว่า ทำการตรวจสอบองค์ประกอบของฮอร์โมนในสารสกัดหยาบจากเชื้อราโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography) เทียบกับ GA_3 และ IAA มาตรฐาน พบว่า *Acremonium* sp. ไอโซเลท BR484 มีฮอร์โมนทั้งสองชนิด

Diversity and Phylogenetic Relationship of Fungi on Brown Rice and Production of Some Metabolites

Kodchakorn Lapmak*

Abstract

Fungi were isolated from 14 samples of surface sterilized rice grain (SS) and brown rice (BR) of eight varieties. The fungal communities and species diversity among different rice varieties were compared. One thounsand four hundred and sixty four fungal isolates were identified based on morphological characteristics to 52 taxa comprising 31 anamorphic fungi, 9 ascomycetes and 12 morphospecies of nonsporulating fungi (mycelia sterilia: MS). Ascomycetous fungi were found only on SS. The most common taxa found on both of the BR and SS are MS1 (43.09% BR and 35.46% SS) followed by MS2 (15.14% BR and 26.30% SS). Twelve MS fungi were identified by molecular techniques based on 28S rDNA and ITS1-5.8S-ITS2 sequences analysis. The results revealed that 7 MS belonged to the genera Alternaria (MS3), Bipolaris (MS2), Coriolopsis (MS4), Curvularia (MS6), Dendryphiella (MS1), Massarina (MS5), and Persiciospora (MS8). However, the other 5 MS species could not be identified to generic level. Generally, fungal species diversity on BR does not differ from SS. However, fungi associated with glutinous rice (RD6) are more diverse than those associated with non-glutinous rice (KDML105). Collection sites and rice varieties affected the fungal diversity and community on both of the BR and SS.

Metabolites from fungi are well known and widely used in industries. In this study, potential fungi as refered from previous research were selected for cellulase, Lasparaginase, and plant hormones (GA3 and IAA) production. A total of 112 isolates were studied for cellulase production using gel diffusion assay on basal medium with carboxymethyl cellulose (CMC) as a carbon source. Cellulase activity was assayed by measuring the release of reducing sugar using the Miller method. Clear zones were developed from 27 isolates on agar plates and the enzyme activities were examined. The maximum cellulase production (0.481 ± 0.018 U/ml) was obtained from isolate BR307 (MS12).

Thirty-six isolates were screened for their ability to produce L-asparaginase using modified Czapek Dox (mCD) agar containing L-asparagine as a nitrogen source and phenol red. Twenty-four isolates could be preliminary identified by observing a pink colour formation and were analyzed for quantitative assayed of L-asparaginase activity using the Nesslerization technique. The result showed that Bipolaris australiensis isolate BR438 cultured in the mCD medium containing 1% L-asparagine and 0.4% glucose at 30°C for 72 h exhibited the highest activity (6.3 ± 0.65 U/ml). The crude enzyme of this fungal isolate was also proved to be non-cytotoxic against Vero cell lines.

For the primary screening of plant hormone, twelve isolates were determined for their GA_3 and IAA production. Fungi were cultured in Czapek's medium containing 1% peptone and 1% glucose, incubated at 28°C at

* Doctor of Philosophy (Biodiversity and Ethnobiology), Chiang Mai University. 214 pages.

stationary cultivation for 7 days. The culture filtrates were lyophilized and then used for bioassay. From effect of 10 µg/ml concentration of crude on the seedling, the viability of mung bean was determined. GA_3 and IAA were used as a positive control and H_2O was used as a negative control. The vigour index (VI) of the seedling was calculated. Crude from Fusarium oxysporum isolate BR464 and Acremonium sp. isolate BR484 affected the VI of mungbean seedling at 1117.67 and 1115.67 respectively. The VI obtained was less than GA_3 (1336.33) but higher than IAA (875) and H_2O (864.67). Both fungal extracts showed a germination percentage as good as GA_3, IAA and H_2O. The extracts improved yeild (fresh and dry weight) less than GA_3 but their seedlings were more normal. Fungal extracts were examined for hormone components by TLC using GA_3 and IAA as reference standards. Only Acremonium sp. isolate BR484 was capable to produce both hormones.