โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความหลากหลายของ *Aureobasidium* spp. บนผิวใบชก

Diversity of *Aureobasidium* spp. on leaf surfaces *Arenga pinnata*

ชื่อนิสิต นายนพรัตน์ ธรรมทัตโต **เลขประจำตัว** 5832034823

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

ความหลากหลายของ *Aureobasidium* spp. บนผิวใบชก

Diversity of *Aureobasidium* spp. on leaf surfaces *Arenga pinnata*

โดย

นายนพรัตน์ ธรรมทัตโต

อาจารย์ที่ปรึกษา

ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ชื่อโครงงานวิจัย : ความหลากหลายของ *Aureobasidium* spp. บนผิวใบชก
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ : นายนพรัตน์ ธรรมทัตโต
อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
ภาควิชา : ชีววิทยา

บทคัดย่อ

Aureobasidium spp. เป็นหนึ่งในสกุลยีสต์ดำ (Black yeast) ที่มีลักษณะคล้ายกับราในสกุล *Ascomycota* ซึ่งสามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลายตั้งแต่ใบพืชรวมไปถึงพื้นผิวภายในอาคาร ราในกลุ่มนี้มีความหลากหลายในสายพันธุ์ และถูกจัดจำแนกเพิ่มเติมออกมาอีก 4 สปีชีส์ ได้แก่ *A. pullulans, A. melanogenum, A. namibiae* และ *A. subglaciale* ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของ *Aureobasidium* spp. บนผิวใบชก (*Arenga pinnata*) โดยคัดแยก *Aureobasidium* spp. จากผิวใบชก ทำการวางตัวอย่างใบชกในอาหารเลี้ยงเชื้อ half strength malt extract agar ที่มี Chloramphenicol และ 0.01% (w/v) Rose Bengal ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อจนเกิดเป็นโคโลนีเดี่ยว เมื่อทำการแยกประเภทโดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยการใช้ ITS5 และ ITS4 บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ระบบสายพันธุ์นั้น พบว่า ตัวอย่าง *Aureobasidium* spp. ที่แยกได้ถูกจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *A. melanogenum* เท่านั้น ดังนั้นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงถูกนำมาประเมินเพื่อบ่งชี้ลักษณะพิเศษของแต่ละสายพันธุ์ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของลักษณะโคโลนี ทำให้สามารถจำแนกตัวอย่าง *Aureobasidium* spp. ได้ 2 กลุ่ม ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สามารถเป็นฐานข้อมูลถิ่นอาศัยเบื้องต้นของ *Aureobasidium* spp. ในประเทศไทย และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายของ *Aureobasidium* spp. ในอนาคตได้

คำสำคัญ: ความหลากหลาย, ต้นชก, ผิวใบ, ยีสต์ดำ, *Aureobasidium* spp.

Research title : Diversity of *Aureobasidium* spp. on leaf surfaces *Arenga pinnata*
Student name : Mr.Nopparat Thammathatto
Advisor : Professor Dr.Chanpen Chanchao, Ph.D.
Co-advisor : Associate Professor Dr.Sehanat Prasongsuk, Ph.D.
Department : Biology

Abstract

Aureobasidium spp. is classified as a black yeast- like fungus (*Ascomycota*) commonly found in a wide variety of environments; from plant leaves to damp indoor surfaces. Recently, this class of fungus were separated into four species which are *A. pullulans, A. melanogenum, A. namibiae* and *A. subglaciale*. This study aims to evaluate the diversity of *Aureobasidium* spp. on leaf surfaces *Arenga pinnata*. To isolate the fungus, leaf samples were cut and placed on half strength malt extract agar containing Chloramphenicol and 0.01% (w/v) Rose Bengal. The initial yeast colonies were repeatedly purified by using cross-streaking on the same medium until colony pure cultures were obtained. All isolates were classified by using the nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequencing including ITS5 and ITS4. Based on the phylogenetic analysis, they were located in *A. melanogenum* clade. Consequently, morphological characteristics were determined in order to identify specific characteristics of each. The results indicate different colony morphology which classify the fungus into 2 clades. This study then can be utilized as a part of *Aureobasidium* spp. habitat in Thailand database and can be applied to study the diversity of *Aureobasidium* spp. further

Keywords: *Aureobasidium* spp., *Arenga pinnata*, black yeast, diversity, leaf surfaces

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เรื่อง ความหลากหลายของ *Aureobasidium* spp. บนผิวใบชก สำเร็จไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการช่วยเหลือ ความอนุเคราะห์ให้ทำงานนี้สำเร็จได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่คอยให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำ ในทุกเรื่องตลอดการทำโครงการ ตลอดจนการเขียนรายงาน รวมไปถึงตรวจสอบความถูกต้องและเหมาะสมของข้อมูล

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่คอยให้ความรู้ การวางแผนดำเนินงาน และการนำเสนองาน รวมไปถึงตรวจสอบความถูกต้องและเหมาะสมของข้อมูล และคอยอำนวยความสะดวกจนโครงการสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.วิชาณี แบนคีรี ที่คอยช่วยเหลือ และให้ความรู้และเทคนิคต่าง ๆในห้องปฏิบัติการตลอดการทำโครงการ รวมไปถึงการอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ต่าง ๆ ให้สามารถทำโครงการได้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนในการทำโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิกทุกคนใน Plant Biomass Utilization Research Unit ของภาควิชาพฤกษศาตร์ที่คอยให้การสนับสนุน คำแนะนำ และคำปรึกษา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

นพรัตน์ ธรรมทัตโต

ผู้ดำเนินโครงการ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	6
บทที่ 4 ผลการศึกษา	8
บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผล	111
เอกสารอ้างอิง	13
ภาคผนวก ก	16

สารบัญตาราง

เรื่อง **หน้า**

ตารางที่ 3.1 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและ Sequencing 7

ตารางที่ 1ก ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างบริเวณโคนใบ และปลายใบ 16

สารบัญรูปภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 2.1 สัณฐานวิทยาของ *A. pullulans*	4
ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนี *Aureobasidium* spp. ที่พบกลุ่มที่ 1	8
ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนี *Aureobasidium* spp. ที่พบกลุ่มที่ 2	8
ภาพที่ 4.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Aureobasidium* spp.	10

บทที่ 1

บทนำ

Aureobasidium เป็นหนึ่งในสกุลยีสต์ดำ (black yeast) จัดอยู่ในอันดับ Dothideales มีลักษณะคล้ายกับราในสกุล Ascomycota คือการที่เซลล์มี blastospores, hyphae swollen cell และ chlamydospores (Ramos et al., 1975) ราสกุลนี้มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ โดย *Aureobasidium pullulans* เป็นสายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักและทำการศึกษามากที่สุด (Martha et al., 2013) จากการศึกษาในประเทศไทย พบ *Aureobasidium pullulans* ในอากาศบริเวณป่าสนในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดเลย และพบในบริเวณร่มรื่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Punnapayak et al., 2003) นอกจากนั้นยังพบ *Aureobasidium* spp. บริเวณผิวใบมะม่วง *Mangifera indica* อโศกน้ำ *Saraca indica* และมะขาม *Tamarindus indica* รวมไปถึงบริเวณผนังปูนซีเมนต์ในห้องน้ำและบริเวณที่มีการทาสี (Prasongsuk et al., 2005) และมีการศึกษา *Aureobasidium* บริเวณชายฝั่งของประเทศไทย ทั้งอ่าวไทยและอันดามัน พบ *Aureobasidium thailandense* บริเวณใบของมะขามเทศ *Pithecellobium dulce* โพทะเล *Thespesia populneoides* และหนามพุงดอ *Azima sarmentosa* รวมถึงพื้นผิวของหิน และพบ *Aureobasidium melanogenum* บริเวณใบพืชอีกหลายชนิด อาทิ เหงือกปลาหมอทะเล *Acanthus ilicifolius* หูกวาง *Terminalia catappa* โกงกางใบใหญ่ *Rhizophora mucronata* ชะคราม *Suaeda maritima* หนามพุงดอ *Azima sarmentosa* และประดู่บ้าน *Pterocarpus* sp. เป็นต้น รวมไปถึงพื้นผิวของหินด้วยเช่นกัน (Yanwisetpakdee et al., 2016) จะเห็นได้ว่า *Aureobasidium* มีถิ่นที่อยู่อาศัยที่หลากหลาย แต่ยังไม่มีการศึกษาครอบคลุมถึงพืชตระกูลปาล์ม (วงศ์ Arecaceae) และในบริเวณภูเขาของภาคใต้ในประเทศไทย

ชก (*Arenga pinnata*) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่จัดอยู่ในอันดับ Arecales วงศ์ Arecaceae เช่นเดียวกับปาล์ม มะพร้าว ตาวและตาล โดย มัณฑนา นวลเจริญ (2552) ได้อธิบายถึงลักษณะของชกไว้ว่า มีลำต้นตรง ขนาดใหญ่กว่าต้นตาล สูงประมาณ 15-20 เมตร ไม่แตกกิ่ง ใบเป็นแฉกคล้ายใบมะพร้าวแต่ใหญ่กว่า ดอกเป็นดอกช่อ แยกตัวผู้ตัวเมีย ช่อดอกตัวผู้ออกได้หลายครั้ง แต่ช่อดอกตัวเมียออกเพียงครั้งเดียวออกผลเพียงครั้งเดียวก็ตาย ผลเป็นพวงทะลายมีผลติดอยู่มากมาย เป็นพูตื้นสามพู เมื่ออ่อนสีเขียว พอแก่เป็นสีเหลืองแดงและน้ำตาล ไม่มีก้านผล โดยกลีบเลี้ยงติดกับช่อดอกโดยตรงและติดทนจนเป็นผล และจากการศึกษาของ Pongsattayapipat et al. (2005) พบชกในประเทศไทยเฉพาะภาคใต้

โดยจะอยู่บนเขาที่มีระดับความสูงประมาณ 200 เมตรจากระดับน้ำทะเล บริเวณจังหวัดสุราษฎร์ธานี พังงา และกระบี่

ดังนั้น การศึกษาความหลากหลายของ *Aureobasidium* spp. บนผิวใบชก จึงมีความสำคัญในการเป็นฐานข้อมูลถิ่นอาศัยในประเทศไทยของราสกุลนี้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาความหลากหลายของ *Aureobasidium* spp. ที่พบบนผิวใบชก และเป็นฐานข้อมูลถิ่นอาศัยในประเทศไทยของราสกุลนี้

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

อนุกรมวิธานของราในสกุล *Aureobasidium*

ราในสกุล *Aureobasidium* มีลักษณะคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) มีชื่อสามัญว่า “ยีสต์ดำ” หรือ “Black yeast” จัดอยู่ในอันดับ Dothideales โดย Li et al. (2015) ได้อธิบายไว้ว่า ราในสกุล *Aureobasidium* สามารถแบ่งออกได้ 3 สายพันธุ์ คือ *A. pullulans A. leucospermi* และ *A. proteae* นอกจากนี้ Peterson et al. (2013) ได้ค้นพบสายพันธุ์ใหม่ คือ *A. thailandense* จากการแยกจากผิวของไม้ในประเทศไทย ซึ่งสายพันธุ์ *A. pullulans* ยังมีความหลากหลายอยู่ภายในสายพันธุ์ ซึ่งถูกจัดจำแนกเพิ่มเติมได้อีก 4 ชนิด (Zalar et al., 2008) คือ *A. pullulans* ชนิด *pullulans* มีลักษณะสีของโคโลนีเป็นสีชมพูอ่อน สามารถเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม และมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว *A. pullulans* ชนิด *melanogenum* โคโลนีจะมีสีดำ หรือสีเขียวมะกอก *A. pullulans* ชนิด *namibiae* ถูกค้นพบในบริเวณหินอ่อนในประเทศนามิเบีย ซึ่งโคโลนีจะมีลักษณะเป็นขนหนา และ *A. pullulans* ชนิด *subglaciale* ถูกค้นพบในบริเวณที่เป็นน้ำแข็ง และน้ำทะเล ซึ่งชนิดนี้จะมีการตอบสนองที่จำเพาะต่อสภาวะที่รุนแรงในธารน้ำแข็งในอาร์กติก

ปัจจุบันในการจัดจำแนกจะใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ร่วมกับการวิเคราะห์จากวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) ทำให้สามารถจำแนกราในสกุล *Aureobasidium* ได้ดังนี้ (de Hoog et al., 1994; Gostincar et al., 2014; Thambugala et al., 2014; Yurlova et al., 1996; Zalar et al., 2008)

Division Ascomycota

Class Dothidiomycetes

Order Dothideales

Family Aureobasidiaceae

Genus *Aureobasidium*

Species *Aureobasidium pullulans*

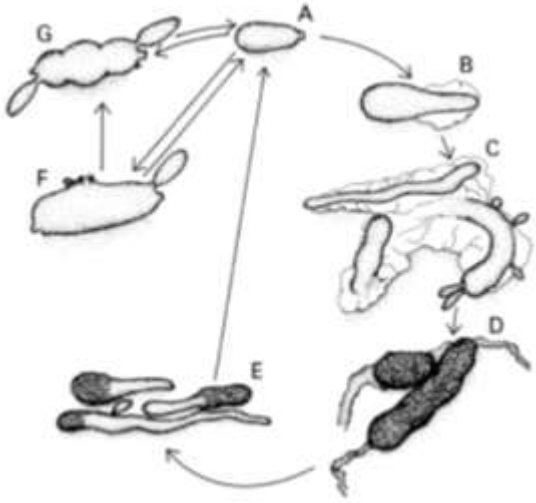
Aureobasidium melanogenum

Aureobasidium namibiae

Aureobasidium subglaciale

สัณฐานวิทยาของราในสกุล *Aureobasidium*

ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Aureobasidium* สามารถเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมได้ โดยลักษณะสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* จะเป็นลักษณะที่เป็นมาตรฐานให้กับราชนิดนี้ ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ง่าย โคโลนีจะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 35-45 มิลลิเมตรในเวลา 7 วันที่อุณหภูมิห้อง โดยลักษณะโคโลนีเรียบมีสีครีม หรือชมพูอ่อนเป็นขั้นแรก เมื่อเวลาผ่านไปโคโลนีอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้น หรือเลี่ยนเป็นสีอื่น เช่น สีเขียวมะกอก แดง เหลือง น้ำตาลอ่อน และดำ เป็นต้น มีเส้นใยเรียบสั้นๆ โปร่ง เห็นผนังกั้นชัดเจนขึ้นรอบๆ เมื่อทำการเลี้ยงนานขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเข้ม และมีผนังเซลล์หนาขึ้น เรียกว่า Chlamydospore มีการสร้าง endoconidia ด้านข้าง หรือปลายของเส้นใย (Hermanides-nijhof, 1977)



ภาพที่ 2.1 สัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* โดยการเจริญเติบโตจะเป็นขั้นตอน ดังนี้ (A) blastospore (B) germinating blastospore (C) initial hyphae (D) chlamydospore (E) germinating chlamydospore (F) swollen cell (G) septate swollen cell (Pechak and Crang, 1977)

ถิ่นที่อยู่อาศัยของราในสกุล *Aureobasidium*

A. pullulans มีแหล่งที่อยู่อาศัยที่หลากหลายในธรรมชาติ โดยส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณระหว่างแถบร้อนกับแถบขั้วโลก อย่างไรก็ตาม สามารถที่จะพบได้ในบริเวณอื่น ตั้งแต่อาร์กติกจนถึงแอฟริกา (Deshpande et al., 1992) และสามารถพบได้ในเขตขั้วโลกเหนือ (Zalar et al., 2008) จากการศึกษาที่ผ่านมาสามารถพบได้ทั้งในดิน ผลไม้ อากาศ น้ำ บริเวณผิวใบของพืช (Ramos et al., 1975) เศษฝางหญ้าแห้ง (Cooke, 1959) พื้นผิวของพลาสติก และในพื้นที่ภายในอาคาร (Prasongsuk et al., 2005) รวมไปถึงตะกอนของต้นโกงกาง น้ำทะเล ตะกอนทะเล (Wu et al., 2010) ฟองน้ำทะเล (Shigemori et al., 1998) หรือแม้แต่น้ำแข็ง น้ำเน่า อาหารแห้งและอาหารที่ถนอมด้วยเกลือ (Gostincar et al., 2014; Kogej et al., 2005)

จากการศึกษาในประเทศไทย พบในอากาศบริเวณป่าสนในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดเลย และพบในบริเวณร่มรื่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Punnapayak et al., 2003) นอกจากนั้นยังพบ *Aureobasidium* spp. บริเวณผิวใบมะม่วง *Mangifera indica* อโศกน้ำ *Saraca indica* และมะขาม *Tamarindus indica* รวมไปถึงบริเวณผนังปูนซีเมนต์ในห้องน้ำและบริเวณที่มีการทาสี (Prasongsuk et al., 2005) และมีการศึกษา *Aureobasidium* บริเวณชายฝั่งของประเทศไทย ทั้งอ่าวไทยและอันดามัน พบ *Aureobasidium thailandense* บริเวณใบของมะขามเทศ *Pithecellobium dulce* โพทะเล *Thespesia populneoides* และหนามพุงดอ *Azima sarmentosa* รวมถึงพื้นผิวของหิน และพบ *Aureobasidium melanogenum* บริเวณใบพืชอีกหลายชนิด อาทิ เหงือกปลาหมอทะเล *Acanthus ilicifolius* หูกวาง *Terminalia catappa* โกงกางใบใหญ่ *Rhizophora mucronata* ชะคราม *Suaeda maritima* หนามพุงดอ *Azima sarmentosa* และประดู่บ้าน *Pterocarpus* sp. เป็นต้น รวมไปถึงพื้นผิวของหินด้วยเช่นกัน (Yanwisetpakdee et al., 2016)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

แผนการศึกษา

ศึกษาความหลากหลายของ *Aureobasidium* ในประเทศไทย รวมถึงพื้นที่ที่จะทำการศึกษา ตลอดจนเทคนิคในห้องปฏิบัติการ

การรวบรวมตัวอย่างในการศึกษา

ทำการสำรวจต้นชกในบริเวณ ตำบลบางเตย อำเภอเมือง จังหวัดพังงา จากนั้นทำการเก็บใบชก 6 ใบแล้วตัดตัวอย่างด้วยมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดย 1 ใบจะตัด 2 บริเวณ คือ โคนใบ และปลายใบ วางตัวอย่างลงในจานเลี้ยงเชื้อ half strength malt extract agar (MEA) ที่มี Chloramphenicol (50 mg/l) และ Rose Bengal (0.01% w/v) เพื่อชะลอการเติบโตของแบคทีเรียและราที่ปนเปื้อน (Prasongsuk et al., 2005) และเก็บจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างในการศึกษา

นำจานเลี้ยงเชื้อที่ทำการรวบมาทั้งหมดบ่มในอุณหภูมิประมาน 30 องศาเซลเซียส เมื่อมีโคโลนีเกิดขึ้น ให้ทำการทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยใช้การ cross-streaking บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร half strength malt extract agar (MEA) และทำซ้ำ จนกระทั่งเกิดเป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวไปยังจานเลี้ยงเชื้อ MEA ใหม่ บ่มที่อุณหภูมิประมาน 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้น ทั้งสี รูปทรง และพื้นผิว รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงของลักษณะต่างๆ ทำการถ่ายรูปเพื่อทำการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จากนั้นนำไปทำสไลด์สดแล้วสังเกตลักษณะสำคัญของ *Aureobasidium* spp. ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และทำการถ่ายรูป

การศึกษา Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) Sequencing

นำโคโลนีที่ได้ ย้ายไปเลี้ยงใน yeast malt extract agar (YMA) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาน 30 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนไปทำวิธี phenol-chloroform (Sambrook *et al*., 1989) เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) ที่มี ITS5 และ ITS4 เป็นคู่ไพรเมอร์ (White *et al*., 1990) จำนวน 25 รอบ จากนั้นตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.1 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและ Sequencing

Target DNA region	Primer*	Sequence 5'-3'	Cycling reaction
ITS	ITS5 (F) ITS4 (R)	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	95 °C, 20 s 56 °C, 30 s 72 °C, 1 min

* F และ R มีคามหมาย forward และ reverse ตามลำดับ

จากนั้นทำการส่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอตัวอย่างไปยัง บริษัท Bioneer จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ เพื่อทำการหา sequencing ของตัวอย่าง หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบความถูกต้องด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปแกรม BLAST และทำการจัดเรียงข้อมูลด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.2.5 จากนั้นทำการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากวิธี Neighbor joining ด้วยโปรแกรม MEGA-X version 10.0.5 โดยใช้ *Selenophoma mahonia* เป็น outgroups สำหรับการเปรียบเทียบ (Yanwisetpakdee et al., 2016)

บทที่ 4

ผลการศึกษา

การศึกษาสัณฐานวิทยา

จากการสังเกตลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้นจากใบชก 6 ใบ ที่บริเวณโคน และปลายใบ พบว่ามีโคโลนีเกิดขึ้นทั้งหมด 13 ตัวอย่าง โดยเกิดจากบริเวณโคนใบ 7 ตัวอย่าง และปลายใบ 6 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1ก) ซึ่งสามารถจำแนกโคโลนีออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ลักษณะของโคโลนี มีสีชมพูเข้ม รูปร่างกลมถึงรี พื้นผิวมีลักษณะวาวคล้ายกับมีเมือก ดังภาพที่ 4.1 พบในบริเวณโคนใบ 5 ตัวอย่าง และปลายใบ 3 ตัวอย่างส่วน กลุ่มที่ 2 ลักษณะโคโลนี มีสีชมพูอ่อน รูปร่างกลม แต่มีพื้นผิวขรุขระ ไม่มีเมือก ดังภาพที่ 4.2 พบในบริเวณโคนใบ 2 ตัวอย่าง และปลายใบ 3 ตัวอย่าง โดยโคโลนีของทั้ง 2 กลุ่มไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนี

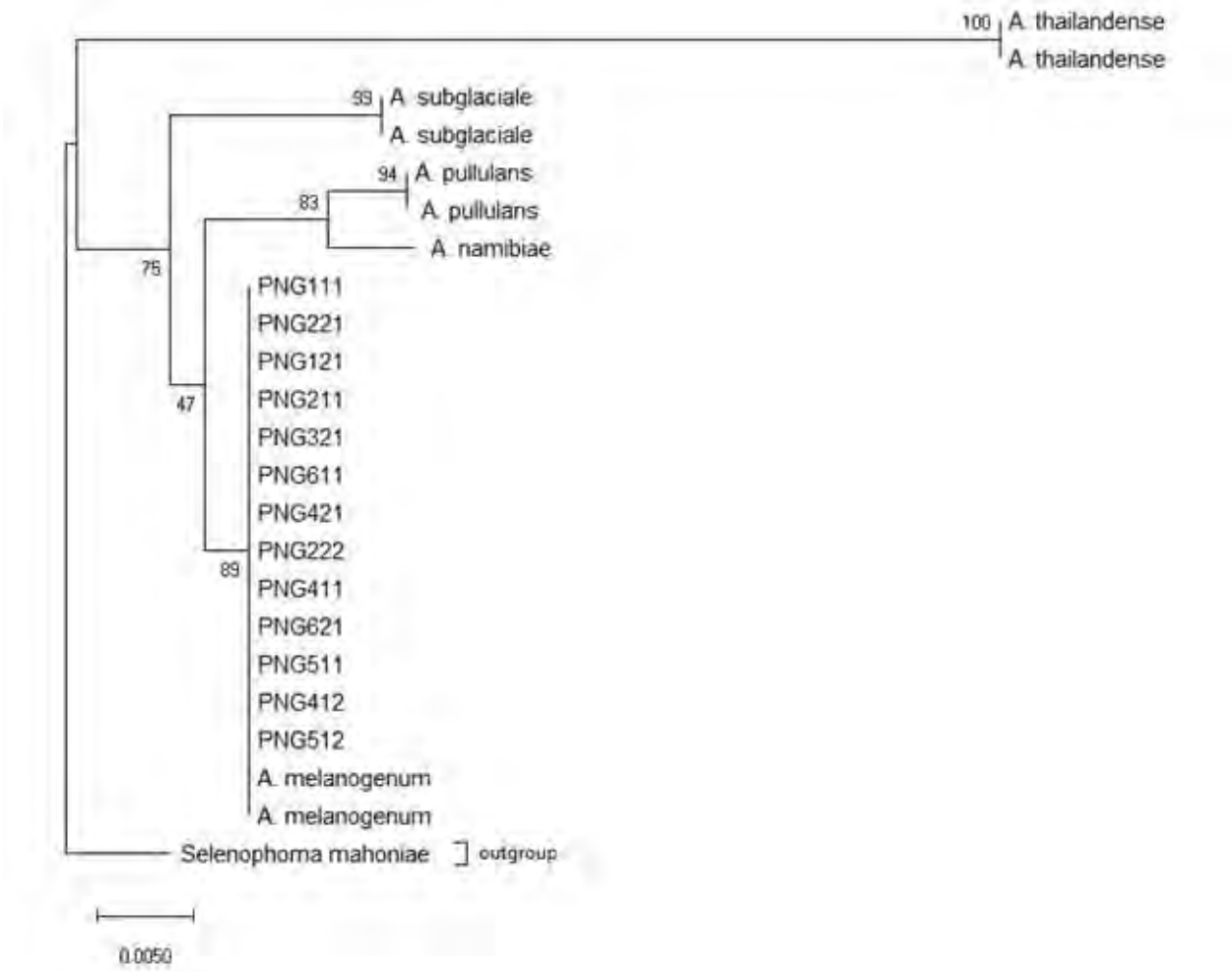
ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนี *Aureobasidium* spp. ที่พบกลุ่มที่ 1

ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนี *Aureobasidium* spp. ที่พบกลุ่มที่ 2

และเมื่อนำโคโลนีทั้ง 2 กลุ่มไปทำสไลด์สด แล้วสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า โคโลนีมี Charmydospore Blastospore และ Hyphae ทั้ง 2 กลุ่ม

การศึกษา Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) Sequencing

เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ครบทุกตัวอย่าง และเมื่อนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสก็ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 แถบ (band) ซึ่งมีขนาดตามที่คาดไว้ หลังจากนำส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ มีขนาด 510-570 คู่เบส (base pairs) และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ด้วยโปแกรม BLAST พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะในกลุ่มของ *A. melanogenum* เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA-X version 10.0.5 โดยวิธี Neighbor joining พบว่า ตัวอย่างทั้ง 13 ตัวอย่างจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *A. melanogenum* ดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Aureobasidium* spp. ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor joining

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผล

Aureobasidium ที่พบในประเทศไทยนั้นมีรายงานว่าสามารถพบได้ทั่วทุกภูมิภาคของไทย เช่น *Aureobasidium pullulans* ในอากาศบริเวณป่าสนในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดเลย และพบในบริเวณร่มรื่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Punnapayak et al., 2003) นอกจากนั้นยังพบ *Aureobasidium* spp. บริเวณผิวใบมะม่วง *Mangifera indica* อโศกน้ำ *Saraca indica* และมะขาม *Tamarindus indica* รวมไปถึงบริเวณผนังปูนซีเมนต์ในห้องน้ำและบริเวณที่มีการทาสี (Prasongsuk et al., 2005) และมีการศึกษา *Aureobasidium* บริเวณชายฝั่งของประเทศไทย ทั้งอ่าวไทยและอันดามัน พบ *Aureobasidium thailandense* บริเวณใบของมะขามเทศ *Pithecellobium dulce* โพทะเล *Thespesia populneoides* และหนามพุงดอ *Azima sarmentosa* รวมถึงพื้นผิวของหิน และพบ *Aureobasidium melanogenum* บริเวณใบพืชอีกหลายชนิด อาทิ เหงือกปลาหมอทะเล *Acanthus ilicifolius* หูกวาง *Terminalia catappa* โกงกางใบใหญ่ *Rhizophora mucronata* ชะคราม *Suaeda maritima* หนามพุงดอ *Azima sarmentosa* และประดู่บ้าน *Pterocarpus* sp. เป็นต้น รวมไปถึงพื้นผิวของหินด้วยเช่นกัน (Yanwisetpakdee et al., 2016)

จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา พบว่า เมื่อศึกษาตัวอย่างผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง สามารถสังเกต Charmydospore Blastospore และ Hyphae ได้ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของ *Aureobasidium* spp. และจากลักษณะโคโลนีมีสีชมพูเข้ม รูปร่างกลมถึงรี พื้นผิวมีลักษณะวาวคล้ายกับมีเมือก หรือมีสีชมพูอ่อน รูปร่างกลม แต่มีพื้นผิวขรุขระ ไม่มีเมือกนั้น มีลักษณะคล้ายคลึงกับของ Prasongsuk และคณะ (2005) พบว่า โคโลนีของ *Aureobasidium pullulans* มีสีชมพูอ่อนหรือครีม พื้นผิวเรียบและลื่นคล้ายมีเมือก แต่เมื่อเวลาผ่านไปโคโลนีจะกลายเป็นสีดำ และการศึกษาของ Yanwisetpakdee และคณะ (2014) พบว่า โคโลนีของ *Aureobasidium melanigenum* มีสีม่วงอมแดงเป็นจุดบริเวณกลางโคโลนี หรือสีชมพูอ่อน หรือสีครีม โดยจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนี ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบ พบว่า ตัวอย่างที่พบมีความใกล้เคียงกับ *Aureobasidium melanogenum* เนื่องจากสีของโคโลนีไม่มีการเปลี่ยนแปลง

จากการศึกษา Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) Sequencing พบว่า เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GeneBank มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะในกลุ่มของ *Aureobasidium melanogenum* และเมื่อนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี Neighbor joining ก็พบว่า *Aureobasidium* spp.ที่พบถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *Aureobasidium melanogenum* เช่นเดียวกัน ซึ่ง Yanwisetpakdee และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษา *Aureobasidum* spp. จากบริเวณชายฝั่งโดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับเบส 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS *TUB* และ *ELO* บนพื้นฐานของการวิเคราะห์สายพันธุ์ พบว่า สามารถจำแนกได้ถึง 12 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 11 และ 12 มีลักษณะโคโลนีคล้ายคลึงกับลักษณะโคโลนีที่พบ คือมี สีม่วงอมแดงเป็นจุดบริเวณกลางโคโลนี หรือสีชมพูอ่อน หรือสีครีม โดยจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนี และเมื่อศึกษาตัวอย่างในกลุ่มที่ 11 และ 12 โดยใช้การวิเคราะห์ ลำเบสเพียงตำแหน่ง ITS นั้นก็พบว่า ตัวอย่างของทั้ง 2 กลุ่ม ไม่สามารถแบ่งเป็นกลุ่มที่ 11และ12 ได้ และถูกจำแนกให้อยู่กลุ่มเดียวกันกับ *Aureobasidium melanogenum* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ *Aureobasidum* spp. ที่พบทั้งหมดจะเป็น *Aureobasidium melanogenum* อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนตัวอย่าง และการวิเคราะห์ลำดับเบสหลายตำแหน่ง มีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อนำมาใช้ในการยืนยันชนิดของ *Aureobasidum* spp. ที่พบ ซึ่งจะนำไปสู่ข้อสรุปถิ่นที่อยู่อาศัยของ *Aureobasidum* ในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

มัณฑนา นวลเจริญ. ต้นชก. สารานุกรมความหลากหลายทางชีวภาพ 6 (2552) : 49.

Cooke. W.B. 1959. An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. Mycopathologia 12: 1-45.

De Hoog, G.S. and Yurlova, N.A. 1994. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. Antonie van Leeuwenhoek 65(1): 41-54.

Deshpande, M.S., Rale, V.B., Lynch, J.M. 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. Enzyme and Microbial Technology 14(7): 514-527.

Gostincar, C., Ohm, R.A., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J., Zalar, P., Grube, M., Sun, H., Han, J., Sharma, A., Chiniquy, J., Ngan, C.Y., Lipzen, A., Barry, K., Grigoriev, I.V. and Gunde-Cimerman N. 2014. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. BMC Genomics 15: 549.

Hermanides-Nijhof, E.J. 1977. *Aureobasidium* and allied genera. Studies in Mycology 15: 141-177.

Kogej, T., Ramos, J., Plemenitas, A. and Gunde-Cimerman, N. 2005. The halophilic fungus *Hortaeawerneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. Applied and Environmental Microbiology 71(11): 6600-6605.

Li, Y., Chi, Z., Wang, G.Y., Wang, Z.P., Liu, G.L., Lee, C.F., Ma, Z.C. and Chi, Z.M. 2015. Taxonomy of *Aureobasidium* spp. and biosynthesis and regulation of their extracellular polymers. Critical Reviews in Microbiology 41(2): 228-237.

Martha, J.B. and Dennis, W.D. 2013. Biological Risk Engineering Handbook Infection Control and Decontamination. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.

Pechak, D.G. and Crang, R.E. 1977. An analysis of *Aureobasidium pullulans* developmental stages by means of scanning electron microscopy. Mycologia: 783-792.

Peterson, S.W., Manitchotpisit, P. and Leathers, T.D. 2013. *Aureobasidium thailandense* sp. nov. isolate from leavws and wooden surface. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63(Pt 2): 790-795.

Pongsattayapipat, R. and Barfod, A.S. 2005. On The Identities of Thai Sugar Palms. Palms 49(1): 5-14.

Prasongsuk, S., Sullivan, R.F., Kuhirun, M., Eveleight, D.E. and Punnapayak, H. 2005. Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21(4): 393–398.

Punnapayak, H., Sudhadham, M., Prasongsuk, S. and Pichayangkura, S. 2003. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. J Ind Microbiol Biotechnol 30(2): 89-94.

Ramos, S. and Acha, I.G. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. 1975. Transactions of the British Mycological Society 64(1): 129-135.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Springs Harbor Laboratory.

Shigemori, H., Tenma, M., Shimazaki, K. and Kobayashi, J. 1998. Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. Journal of Natural Products 61(5): 696-698.

Sivanesan, A. 1984. The Bitunicate Ascomycetes and their anamorphs. Vaduz, German: J. Cramer.

Thambugala, K.M., Ariyawansa, H.A., Li, Y.M, Boonmee, S., Hongsanan, S. Tian, Q., Singtripop, C., Bhat, D.J., Camporesi, E., Jayawardena, R., Liu, Z.Y., Xu, J.C. Chukeatirote, E. and Hyde K.D. 2014. Dothideales. Fungal diversity 68(1): 105-158.

White, T.J, Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: (Eds.): Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky J.J. and White, T.J., PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, pp. 315-322. San Diego: Academic Press.

Wu, Y.R., Luo, Z.H. and Vrijmoed, L.L. 2010. Biodegradation of anthracene and benz[a]anthracene by two Fusarium solani strains isolated from mangrove sediments. Bioresource Technology 101(24): 9666-9672.

Yanwisetpakdee, B., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Seelalan, T., White, J.F., Eveleight, D.E., Kim, S.W. and Punnapayak, H. 2016. Associations among halotolerance, osmotolerance and exopolysaccharide production of *Aureobasidium melanogenum* strains from habitats under salt stress. Pakistan Journal of Botany 48(3): 1229-1239.

Yurlova, N.A., Uijthof, J.M.J. and de Hoog, G.S. 1996. Distinction of species in *Aureobasidium* and related genera by PCR-ribotyping. Antonie van Leeuwenhoek 69(4): 323-329.

Zalar, P., Gostincar, C., de Hoog, G.S., Ursic, V., Sudhadham, M. and Gude-Cimerman, N. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. Studies in Mycology 61: 21-38.

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1ก ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างบริเวณโคนใบ และปลายใบ

ใบที่	ตำแหน่ง	ลักษณะของโคโลนี	รหัสตัวอย่าง
1	โคนใบ	สีชมพูเข้ม รูปร่างกลม พื้นผิวมีลักษณะวาวคล้ายกับมีเมือก	PNG111
	ปลายใบ	สีชมพูเข้ม รูปร่างกลมถึงรี พื้นผิวมีลักษณะวาวคล้ายกับมีเมือก	PNG121
2	โคนใบ	สีชมพูเข้ม รูปร่างรี พื้นผิวมีลักษณะวาวคล้ายกับมีเมือก	PNG211
	ปลายใบ	ชมพูอ่อน รูปร่างกลม แต่มีพื้นผิวขรุขระ ไม่มีเมือก	PNG221
	ปลายใบ	สีชมพูเข้ม รูปร่างกลมถึงรี พื้นผิวมีลักษณะวาวคล้ายกับมีเมือก	PNG222
3	ปลายใบ	ชมพูอ่อน รูปร่างกลม แต่มีพื้นผิวขรุขระ ไม่มีเมือก	PNG321
4	โคนใบ	สีชมพูเข้ม รูปร่างกลม พื้นผิวมีลักษณะวาวคล้ายกับมีเมือก	PNG411
	โคนใบ	ชมพูอ่อน รูปร่างกลม แต่มีพื้นผิวขรุขระ ไม่มีเมือก	PNG412
	ปลายใบ	ชมพูอ่อน รูปร่างกลม แต่มีพื้นผิวขรุขระ ไม่มีเมือก	PNG421
5	โคนใบ	สีชมพูเข้ม รูปร่างกลมถึงรี พื้นผิวมีลักษณะวาวคล้ายกับมีเมือก	PNG511
	โคนใบ	ชมพูอ่อน รูปร่างกลม แต่มีพื้นผิวขรุขระ ไม่มีเมือก	PNG512
6	โคนใบ	สีชมพูเข้ม รูปร่างกลมถึงรี พื้นผิวมีลักษณะวาวคล้ายกับมีเมือก	PNG611
	ปลายใบ	สีชมพูเข้ม รูปร่างกลมถึงรี พื้นผิวมีลักษณะวาวคล้ายกับมีเมือก	PNG621