ยงเฉียง หลิว : คุณสมบัติทางชีววิทยาเชื้อราไผ่ *Shiraia bambusicola* และการคัดหาไอโซเลตที่ให้ผลผลิตไฮโปเครลลินสูง (BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF A BAMBOO FUNGUS, *Shiraia bambusicola*, AND SCREENING FOR HYPOCRELLIN HIGH-YIELDING ISOLATES) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว, 96 หน้า.

เชื้อรา ชิราเอีย แบมบูซิโคล่า (*Shiraia bambusicola*) เป็นแหล่งของสารไฮโปเครลลินตามธรรมชาติที่สำคัญ ความรู้ทางด้านชีววิทยาของเชื้อนับเป็นพื้นฐานสำคัญที่จะช่วยอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อในช่วงระหว่างพัฒนาการและความสัมพันธ์กับไผ่ วงจรชีวิต พัฒนาการเลี้ยงเชื้อ และคัดหาไอโซเลตที่สร้างสารไฮโปเครลลิน เอ ปริมาณมาก และสภาพของการหมักที่เหมาะสม โดยแบ่งการทดลองเป็นสองส่วน ส่วนแรกเน้นการศึกษาทางด้านชีววิทยาของเชื้อ ซึ่งรวมถึงการศึกษาสัณฐานวิทยาและการเลี้ยงเชื้อ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยากระทำโดยใช้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ศึกษาการกระตุ้นการสร้างสปอร์โดยใช้ชนิดอาหาร ระยะเวลาการรับแสง และการเติมองค์ประกอบของพืชลงในอาหาร และทดลองการเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งของเชื้อ วิธีการปลูกเชื้อ และเวลาปลูกเชื้อที่แตกต่างกันบนไผ่จำนวน 4 ชนิด ผลของการศึกษาพบว่า เชื้อราสร้าง สโทรมาทา (stromata) เฉพาะบริเวณกิ่งบนของกิ่งจากปีที่ผ่านมา แต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเชื้อมีความสัมพันธ์แบบปรสิตกับไผ่ โดยเชื้อราเจริญอยู่รอบช่องว่างของกาบใบเฉพาะกับไผ่บางชนิดเท่านั้น ได้นำเสนอและวิจารณ์ถึงวงจรชีวิตของเชื้อ ผลของการศึกษายืนยันได้ว่า เชื้อสร้างถุงหุ้มสปอร์แบบ 2 ชั้น และซูโดพาราไฟซิส (pseudoparaphyses) ดังนั้นจึงควรจัดไว้ในอันดับ พลีโอสปอราเลส (pleosporales) ไม่ใช่อันดับ โดธิดีเอเลส (dothideales) การศึกษาการพัฒนาของเชื้อในระยะไม่ใช้เพศและใช้เพศ พบว่าถุงหุ้มสปอร์และแอสโคสปอร์ (ascospore) มีการพัฒนาเป็นแบบ 4 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการสร้าง แอสคัส ไพรมอร์เดียม (ascus primordium) ขั้นตอนการยืดตัวของถุงหุ้ม การสร้างแอสโคสปอร์อ่อน และการสุกแก่ของแอสโค-สปอร์ ผลของการศึกษาพบว่า วิธีแคพพิลลารี (capillary) ที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีแยกเชื้อสปอร์เดี่ยวที่ดีที่สุด และแยกเชื้อได้ทั้งหมดจำนวน 32 ไอโซเลต โดยที่ 10 ไอโซเลตได้จากสปอร์เดี่ยว 11 ไอโซเลตจากเนื้อเยื่อ สโทรมาทา และ 11 ไอโซเลตจากกลุ่มของสปอร์ แต่ไม่พบการสร้างสปอร์ภายใต้สภาพที่ใช้ในการศึกษาทุกสภาพ การปลูกและเลี้ยงเชื้อสามารถทำได้สำเร็จเฉพาะบนไผ่ ฟิลโลสแทคีส รูโบรมาจิเนทา (*Phyllostachys rubromaginata)* หลังจากฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยสปอร์ที่ยังสดใหม่ การทดลองส่วนที่สอง เพื่อคัดหาไอโซเลตที่สร้างสารไฮโปเครลลิน เอ ปริมาณมาก และสภาพการหมักที่เหมาะสม โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการสุ่มเก็บสารไฮโปเครลลินได้มาจากการศึกษาการสร้างชีวมวลและปริมาณของสารไฮโปเครลลิน เอ ของเชื้อไอโซเลตที่เป็นตัวแทน ผลของการศึกษาพบว่า

เชื้อทั้ง 32 ไอโซเลต สามารถสร้างสารไฮโปเครลลิน เอ ได้สูงสุดในช่วงวันที่ 11 ถึงวันที่ 13 ของการหมัก โดยเชื้อที่ได้จากการแยกสปอร์เดี่ยวให้ผลผลิตสารไฮโปเครลลินต่ำกว่าเชื้อที่แยกได้จากกลุ่มสปอร์หรือเนื้อเยื่อสโทรมาทามาก และเชื้อไอโซเลต GZAAS2.0629 ได้รับการคัดเลือกให้เป็นไอโซเลตที่สามารถสร้างสารไฮโปเครลลิน เอ ได้สูงสุด สภาพการหมัก ได้แก่ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน การเติมน้ำสกัดจากไผ่ ระดับความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น ปริมาณของหัวเชื้อ และอุณหภูมิที่ใช้หมัก ได้รับการคัดเลือกโดยใช้วิธีการทดลองแบบปัจจัยเดี่ยว จากนั้นจึงจัดเป็นตำรับทดลองแบบออโธโกนอล (orthogonal) เพื่อหาอัตราส่วนคาร์บอน/ไนโตรเจน และเกลืออนินทรีย์ ในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับการหมัก วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 ผลของการทดลองพบว่าการใช้อาหารเหลวที่มีส่วนผสมของ มอลโตส 3% แอมโมเนียมไนเตรต 0.001% คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 0.2% โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2% มันฝรั่ง 20% และ ผงไผ่ 1% ร่วมกับการใช้หัวเชื้อในรูปของเส้นใยบนชิ้นวุ้นขนาด 4 มม. จำนวน 4 ชิ้นในอาหารปริมาตร 250 มล. พร้อมกับการเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26 °ซ เป็นเวลา 13 วัน เป็นสภาพการหมักที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารไฮโปเครลลิน เอ โดยให้สารปริมาณ 112 มก./ล.

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช	ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ปีการศึกษา 2552	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

YONGXIANG LIU : BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF A BAMBOO FUNGUS, *Shiraia bambusicola*, AND SCREENING FOR HYPOCRELLIN HIGH-YIELDING ISOLATES. THESIS ADVISOR : SOPONE WONGKAEW, Ph.D., 96 PP.

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS/HYPOCRELLIN/SCREENING/ *Shiraia bambusicola*

Shiraia bambusicola is an important natural source of hypocrellin. Knowledge of biology of the fungus is fundamental to its conservation and effective utilization. This study attempted to reveal morphological characteristics of *S. bambusicola* during its developing process and its relationship with bamboo, elucidate its life cycle and develop a practicable strategy for artificial cultivation, and obtain high hypocrellin A (HA)-producing isolates and the optimized fermentation conditions. Two parts of experiments were conducted in this study. The first part focused on biology of *S. bambusicola* including morphological characters and artificial cultivation. Observation of the fungus was carried out by light microscopy and scanning electron microscopy. Sporulation induction was tried with media, photoperiod and plant supplement. Artificial cultivation for the fungus was performed with various inoculum types, inoculation methods and inoculation time on 4 bamboo species. From the observation, the fungal stromata were found only on top stalks of the previous year branches. Parasitic relationship of the fungus with the bamboo could not be indicated from the morphological evidence. The fungus grew around the interspace of bamboo

leaf sheaths and showed tissue specificity on leaf sheath of some bamboo species. A life cycle of *S. bambusicola* was proposed and discussed. The fungus was confirmed to have bitunicate asci with pseudoparaphyses, thus should be placed in the Pleosporales order and not in the Dothideales. Asexual and sexual developments of *S. bambusicola* were observed and found 4 stages of ascus and ascospore development were described. The 4 stages consisted of ascus primordium formation, ascus elongation, young ascospore formation, and ascospore maturation. A developed capillary method was found to be the best for obtaining single-spore isolates. Thirty two isolates were obtained from the isolation including 10 single spore isolates, 11 stromatal tissue isolates, and 11 multispore isolates. No sporulation could be found in the study conditions. The fungus was successfully inoculated and cultivated on *Phyllostachys rubromarginata* bamboo after being sprayed with fresh conidium suspension. The second part of the study was on screening for high HA-producing isolates of *S. bambusicola* and optimizing the fermentation conditions. Appropriate HA sampling time and screening procedure were elucidated by selecting representative isolates to determine their mycelial biomass and HA content. The 32 isolates were found to produce HA but its content in the single spore isolates were much lower than that of the isolates from multispore and stroma tissue during the sampling time at the 11th to 13th days of fermentation. The isolate GZAAS2.0629 was screened out as the highest HA-yielding isolate. Fermentation conditions of GZAAS2.0629 including carbon source, nitrogen source, bamboo extract addition,

initial pH of fermentation broth, inoculum amount, and fermentation temperature were screened with single factor experiments. Carbon/nitrogen ratio and inorganic salts in the fermentation broth were screened with orthogonal experiments. The data were analyzed with SPSS 13.0. The best fermentation condition for HA production was identified as using the broth containing 3% maltose, 1% NH_4NO_3, 0.001% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.2% KH_2PO_4, 20% potato and 1% bamboo powder, with inoculum amount of 4 pieces of mycelial mat (4mm diameter) per 250 ml, shaking at 120 rpm and incubation at 26°C for 13 days. Under these conditions, the HA content was 112 mg/L.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2009

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____