

55401203: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ: ข้าว, ยีสต์อีพีไฟต์, PCR, RFLP, ยีน LSU rRNA

กฤษรา กระจ่างทอง : การศึกษาความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบข้าวด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อ.ดร.รุจิภาญจน์ นาสนิท , ผศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา และ ดร.มณี ตันติรุ่งกิจ. 80 หน้า.

ฟิลโลสเฟียร์ (phyllosphere) หรือ ฟิลโลเพลน (phylloplane) เป็นบริเวณพื้นผิวของพืช ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์อีพีไฟต์ นอกจากนี้ยีสต์เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้บนผิวใบพืชซึ่งยีสต์เหล่านี้จะสามารถผลิตสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหรือสารควบคุมทางชีวภาพได้ และเนื่องจากข้าวเป็นอาหารหลักและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ดังนั้น การศึกษาข้อมูลความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบข้าวอาจนำมาซึ่งคุณประโยชน์ต่อการพัฒนาคุณภาพการเพาะปลูกข้าวได้ในอนาคต ปัจจุบันความก้าวหน้าทางชีววิทยาระดับโมเลกุลถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ซึ่งช่วยลดการใช้แรงงานและเวลาได้มากกว่าวิธีการดั้งเดิม ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบข้าวใน 9 จังหวัดของประเทศไทยด้วยวิธีไม่ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยใช้วิธี PCR-RFLP และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของยีน large subunit rRNA จากการศึกษาอีพีไฟต์จากตัวอย่างใบข้าวทั้งสิ้น 47 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบยีสต์ร้อยละ 39.8 ของจำนวนรีคอมบิแนนท์โคลนทั้งหมด (1,225 โคลน) สามารถระบุยีสต์ได้ 14 สปีชีส์ ใน 8 จีแนส ได้แก่จีแนส *Bullera*, *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma* และ *Wickerhamomyces* และไม่สามารถระบุยีสต์ได้แน่ชัด 13 สปีชีส์ ใน 7 จีแนส ได้แก่จีแนส *Bullera*, *Cryptococcus*, *Hannaella*, *Pseudozyma*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma* และ *Wickerhamomyces* ยีสต์ที่พบส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียอิมยซิสยีสต์ ทั้งนี้จากตัวอย่างใบข้าวส่วนใหญ่พบ *Pseudozyma antarctica* มากที่สุด (68.1%) รองลงมาคือ *Bullera japonica* (21.3%) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของอีพีไฟต์ที่ได้จากใบข้าว 47 ตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นเชื้อราระบุได้ 72 สปีชีส์ ใน 49 จีแนส (52.6%)

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1. .... 2. .... 3. ....

55401203: MAJOR: BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: RICE, EPIPHYTIC YEASTS, PCR, RFLP, LSU rRNA GENE

KULTARA KRATAITHONG: STUDY ON THE DIVERSITY OF EPIPHYTIC YEASTS ON RICE PHYLLOSPHERES BASED ON MOLECULAR BIOLOGICAL TECHNIQUES. THESIS ADVISORS: RUJIKAN NASANIT, Ph.D., ASST. PROF. BUDSARAPORN NGAMPANYA, Ph.D. AND MANEE TANTIRUNGKIJ, Dr. Eng. 80 pp.

Phyllosphere or Phylloplane, the external surface of the plant leaf, has been recognized as an important habitat for epiphytic microorganisms. Yeast is one of the microorganisms found as a phyllosphere colonizer which could promote plant growth or biocontrol activity. In Thailand, rice is an essential food and the important economic crop. Hence, to gain the information of microbial diversity involved in rice may lead to benefit for its agricultural process. Recently, the diversity of microorganisms has been determined by molecular biological methods since it requires less labors and time consumption than conventional methods. In this study, the diversity of epiphytic yeasts on rice phyllospheres collected in nine provinces in Thailand was investigated by culture-independent method using PCR-RFLP technique and the nucleotide analysis of the D1/D2 region in large subunit (LSU) rRNA gene. Nucleotide sequences of epiphytes from 47 rice leave samples were identified. Thirty-nine percent of total recombinant clones (1,225 clones) were closely related to yeasts. We found 14 species of yeasts in 8 genera including *Bullera*, *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma* and *Wickerhamomyces* and 13 undescribed species of yeasts in 7 genera including *Bullera*, *Cryptococcus*, *Hannaella*, *Pseudozyma*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma* and *Wickerhamomyces*. The majority of yeasts detected were basidiomycetous yeasts. *Pseudozyma antarctica* was commonly found in rice phylloplane samples (68.1%) followed by *Bullera japonica* (21.3%). However, most of sequences were filamentous fungi including 72 species in 49 genera (52.6%).

---

Department of Biotechnology

Graduate School, SilpakornUniversity

Student's signature .....

Academic Year 2013

Thesis Advisors' signature 1. .... 2. .... 3. ....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่ง อาจารย์ ดร.รุจิภาณูจน์ นาสนิท อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา และ ดร.มณี ตันติรุ่งกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแรงผลักดัน พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข ที่ให้ความกรุณาเป็นประธาน และศาสตราจารย์ ดร.สาวิตรี ลิ่มทอง ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการการสอบ คำแนะนำ และเอกสารความรู้ทางวิชาการเพิ่มเติมเพื่อใช้ในการค้นคว้าวิจัย และปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้ความรู้คำแนะนำในเรื่องต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณ คุณจิตพาภรณ์ ทรัพย์สมบูรณ์ คุณประไพ บางเขย และคุณนุชนาฏ เลี้ยงอำนาจ เจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์เครื่องมือ สารเคมีต่างๆ เพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณวัลพิไล พาหา และคุณศิลา ศรียา ที่ช่วยอำนวยความสะดวกติดต่อประสานงานในการดำเนินการยื่นคำร้องต่างๆ จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำเนิด กำลังใจ กำลังทรัพย์ รวมถึงแรงผลักดันต่างๆ ที่ทำให้ผู้วิจัยมีชีวิตที่ดีเสมอมา

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัยของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส สกว.) ที่มีศาสตราจารย์ ดร.สาวิตรี ลิ่มทอง เป็นหัวหน้าโครงการ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้ผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่ได้ให้ความเมตตา กรุณา และมอบสิ่งดีๆ ให้แก่ผู้วิจัยมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน