

<b>Thesis Title</b>	<b>Comparative Study of the Distribution of Fungi on Aerial and Submerged Fronds of Ka Pho Deang (<i>Licuala longecalycata</i>) and Amylase and Protease Enzymes Production</b>	
<b>Author</b>	Miss Umpava Pinruan	
<b>Degree</b>	Master of Science (Biotechnology)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Assoc. Prof. Saisamorn Lumyong	Chairperson
	Prof. E.B. Gareth Jones	Member
	Prof. Kevin D. Hyde	Member

### ABSTRACT

The objectives of this study was to collect, isolate and identify ascomycetes and anamorphic fungi associated with the palm *Licuala longecalycata* in Sirindhorn Peat Swamp Forest ecosystem, Narathiwat Province, Southern Thailand. Fungal occurring on this palm were isolated into axenic culture and screened for their ability to produce the enzymes amylase and protease.

In the general survey, a total of three hundred and fifty eight fungal collections were made during six field trips in: May; June; September; November (2001), and February; and May (2002). One hundred and seventy seven collections were

identified to species level, one hundred and fifty three collections to generic level while twenty eight collections remain unidentified. A total of 147 species were identified, including 78 ascomycetes species from 50 genera (53%), 66 anamorphic fungi species from 53 genera (45%) and 3 basidiomycetes species from 3 genera (2%). The percentage of fungi occurring under on palm material under different environmental conditions was as follow: dry material supported the most fungi with 40% occurrence, wet material had 32% while the damp material supported the least number of fungi with 28% occurrence. Three tissue types were collected in this study: 1.) petioles, 2.) trunks, and 3.) leaves. The percentage occurrence of fungi on different parts of *L. longecalycata* was: petioles 61%, trunks 24%, and leaves 15%. Petioles supported the greatest number of fungi with the greater species diversity.

In the quantitative survey, one hundred and twenty four fungal collections were made from 3 field trips in: February, May, and September (2002). Eighty-nine collections were identified to species level, thirty eight collections were to generic level while seven collections remain unidentified. A total of 44 species were identified, including 25 ascomycetes from 21 genera (57%), 18 anamorphic fungi from 17 genera (41%) and 1 basidiomycete from 1 genus (2%). The percentage of fungi occurring in different habitats were as follows: dry material supported the most fungi with 41%, submerged material had 33% of species while damp material supported the least number of taxa (26%). The percentage occurrence of fungi on different tissues of *L. longecalycata* was: petioles 61%, trunks 28%, and leaves 11%. Petioles supported the greatest number of collections and diversity.

Eleven ascomycetes and 6 anamorphic fungi are new to science, while other taxa await further study. New genera are proposed for four taxa: *Flammispora*

*bioteca*, *Phruensis brunniepora*, wah 32, and wah 170. Thirteen new species have also been encountered: *Ascominuta* sp., *Astrosphaeriella* sp., *Boerlagiomyces* sp., *Caryospora* sp., *Craspedodidymum licualae*, *C. microsporum*, *C. siamense*, *Diaportae setulae*, *Dictyosporium siamense*, *Jahnula appendiculata*, *Massarina* sp., *Oxydothis* atypical and *Stachybotrys palmae*.

Fifty fungal isolates were tested for their ability to produce amylase and protease on solid agar. The results showed that six fungi (12%) yielded the greatest producing amylase production: *Didymosphaeria* sp., 4L1IV3.1, 1L2IV2.1, 3P3.1, *Cylindrocladium* sp., and *Stachybotrys* sp. Twelve species (24%) showed no activity. The greatest protease activity (12 fungi, 24%) was obtain from 2L3V1.1, 2L1IV1.2, 3L1IV4.1, 3L4V2.1, 4L1V1.1, 4L1IV3.1, 1L2IV2.1, *Wesneriomyces javanica*, *Solheimia* sp., *Cylindrocladium* sp., *Dictyochaeta ramulosestula*, and *Stachybotrys* sp. Eleven fungi (22%) showed no protease activity. Sixteen percent of fungi showed no activity for both enzymes. Four fungi (8%) showed excellent activity for both enzymes: 4L1IV3.1, 1L2IV2.1, *Cylindrocladium* sp. and *Stachybotrys* sp.

In the quantitative activity for amylase production *Stachybotrys* sp. gave the highest activity, with a yield of 463.44 U/ml. Five fungi (4L1IV3.1, 1L2IV2.1, *Solheimia* sp., *Cylindrocladium* sp., and *Didymosphaeria* sp.) gave amylase activity of greater than 300 U/ml. Two fungi yielded protease activity greater than 0.1 U/ml (4L1V1.1 and *Dictyochaeta ramulosestula*, 0.11 and 0.10 U/ml respectively). Other fungi showed protease activity at least of lower than 0.1 U/ml.

## ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การศึกษาเปรียบเทียบการกระจายตัวของเชื้อราที่พบบนบก

กับที่จมอยู่ในน้ำของป่าล้มกระพ้อแดง และการผลิตเอนไซม์

อะไมเลสและโปรตีเอส

## ผู้เขียน

นางสาวอัมพวา ปิ่นเรือน

## ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. สายสมร ถ้ายอง

ประธานกรรมการ

Prof. E.B. Gareth Jones

กรรมการ

Prof. Kevin D. Hyde

กรรมการ

## บทคัดย่อ

การศึกษาศึกษาการรบนป่าล้มกระพ้อแดง (*Licuala longecalycata*) ในป่าพรุสิรินธร จังหวัดนครราชสีมา ครั้งนี้ได้ทำการสำรวจทั่วไปและสำรวจเชิงปริมาณ ซึ่งมุ่งเน้นศึกษารานในกลุ่ม แชนโฟรบ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือการเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และการจัดจำแนก รานในกลุ่มของ Ascomycete และรานในกลุ่มของ anamorphic fungi ราที่พบบนปาล์มชนิดนี้จะถูก แยกให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ และนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและโปรตีเอส

ในการสำรวจทั่วไปนั้น ได้ทำการเก็บตัวอย่าง 6 ครั้ง คือเดือนพฤษภาคม มิถุนายน กันยายน พฤศจิกายน ในปี พ.ศ. 2544 เดือนกุมภาพันธ์ และเดือนพฤษภาคม ปี พ.ศ. 2545 พบรา จำนวน 358 collections สามารถจำแนกระดับสปีชีส์ได้ 147 collections ระดับสกุลได้ 153 collections และยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ 28 collections จากการจำแนกระดับสปีชีส์ แยกได้ เป็นราในกลุ่ม ascomycete 78 สปีชีส์ จาก 50 สกุล (50%), ราในกลุ่ม anamorphic fungi 66 สปีชีส์ จาก 53 สกุล (45%) และราในกลุ่ม basidiomycete 3 สปีชีส์ จาก 3 สกุล จำนวนราที่พบ ในแต่ละสภะนั้นแบ่งออกเป็น ส่วนที่อยู่บนพื้นดิน (แห้ง) พบ 40% ส่วนที่จมอยู่ใต้น้ำ (เปียก) พบ 32% และส่วนที่อยู่เหนือน้ำ (ชื้น) พบ 28% ในแต่ละส่วนของป่าล้มพบว่าเจอรามากที่สุดใน ส่วนก้านใบ 61% ส่วนของลำต้นพบ 24% และส่วนของใบพบ 15%.

การศึกษาเชิงปริมาณนั้นได้ทำการเก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง คือเดือนกุมภาพันธ์ พฤษภาคม และ กันยายน 2545 พบราจำนวน 124 collections สามารถจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ได้ 89 collections ระดับสกุลได้ 38 collections และยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ 7 collections ในการ ศึกษาครั้งนี้พบราในกลุ่ม ascomycete จำนวน 25 สปีชีส์ จาก 21 สกุล คิดเป็น 57% พบราใน กลุ่ม anamorphic fungi จำนวน 18 สปีชีส์ จาก 17 สกุล คิดเป็น 41% และพบราในกลุ่ม basidiomycete จำนวน 1 สปีชีส์ จาก 1 สกุล คิดเป็น 2% จำนวนราที่พบในแต่ละสภะนั้นแบ่ง ออกเป็น ส่วนที่อยู่บนพื้นดินพบ 41% เหนือน้ำ 26% และส่วนที่จมอยู่ใต้น้ำพบ 33% ในแต่ละ ส่วนของป่าล้มคือก้านใบพบ 61% ลำต้นป่าล้มพบ 28% และใบป่าล้มพบ 11%

ในการศึกษาครั้งนี้พบราชนิดใหม่ซึ่งราเหล่านี้อาจจะจำเพาะเจาะจงต่อพืช แบ่งเป็นกลุ่ม ascomycete 11 ชนิด และ anamorphic fungi 6 ชนิด ทั้งนี้พบราสกุลใหม่ 4 สกุล คือ *Flammispora bioteca*, *Phruensis brunniespora*, wah 32, และ wah 170 และราสปีชีส์ใหม่

อีก 13 ชนิด คือ *Ascominuta* sp., *Astrosphaeriella* sp., *Boerlagiomyces* sp., *Caryospora* sp., *Craspedodidymum licualae*, *C. microsporum*, *C. siamense*, *Diaportae setulae*, *Dictyosporium siamense*, *Jahnula appendiculata*, *Massarina* sp., *Oxydothis atypical* และ *Stachybotrys palmae*

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์โดยใช้ร่าจำนวน 50 เชื้อ เพื่อทดสอบในอาหารแข็ง พบว่า 6 ชนิด มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดี คือ *Didymosphaeria* sp., 4L1IV3.1, 1L2IV2.1, 3P3.1, *Cylindrocladium* sp., และ *Stachybotrys* sp. และมี 12 ชนิดที่ไม่สร้างเอนไซม์ ในส่วนของเอนไซม์โปรตีเอสพบว่า ร่า 12 ชนิด มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีคือ 2L3V1.1, 2L1IV1.2, 3L1IV4.1, 3L4V2.1, 4L1V1.1, 4L1IV3.1, 1L2IV2.1, *Wesneriomyces javanica*, *Solheimia* sp., *Cylindrocladium* sp., *Dictyochaeta ramulosestula*, และ *Stachybotrys* sp. และ 11 ชนิด ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ทั้งนี้พบว่ามีร่า 8 ชนิด (16%) ไม่มีความสามารถในการผลิตทั้งเอนไซม์อะไมเลสและโปรตีเอสและพบว่ามีร่า 4 ชนิดที่มีความสามารถในการผลิตทั้งเอนไซม์อะไมเลสและโปรตีเอส คือ 4L1IV3.1, 1L2IV2.1, *Cylindrocladium* sp. และ *Stachybotrys* sp.

ในการทดสอบหาปริมาณเอนไซม์อะไมเลส พบว่า *Stachybotrys* sp. มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงที่สุด คือ 46.3 U/ml และมีร่าอีกจำนวน 5 ชนิดที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงกว่า 30.0 U/ml คือ 4L1IV3.1, 1L2IV2.1, *Solheimia* sp., *Cylindrocladium* sp., และ *Didymosphaeria* sp. ส่วนการทดสอบหาปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสพบว่ามีร่า 2 ชนิดที่ผลิตโปรตีเอสมากกว่า 0.1 U/ml คือ 4L1V1.1 และ *Dictyochaeta ramulosestula*, (0.11 และ 0.10 U/ml ตามลำดับ)