

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



246125

ความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์จากใบไม้ในเขตอนุรักษณ์พืช
ป่าชายเลนและความสามารถในการสร้างสารยับยั้งรา
Alternaria brassicicola

Biodiversity of endophytic fungi from mangrove plants
and their productions of anti *Alternaria brassicicola*

อภิรดี ปิณฑนภาคย์
สุदारัตน์ สวนจิตร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2554

ความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์จากใบไม้ในเขตอนุรักษ์พืช
ป่าชายเลนและความสามารถในการสร้างสารยับยั้งรา

Alternaria brassicicola

Biodiversity of endophytic fungi from mangrove plants
and their productions of anti *Alternaria brassicicola*



อภिरดี ปิณฑนภาคย์
สุดาร์ตน์ สวนจิตร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์จากใบไม้ในเขตอนุรักษ์
พืชป่าชายเลน และความสามารถในการสร้างสารยับยั้งรา *Alternaria brassicicola* สำเร็จ
สมบูรณ์ได้ จากการที่สำนักงบประมาณแผ่นดิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ได้
จัดสรรเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2554 สนับสนุนงานวิจัยดังกล่าว คณะผู้วิจัย
ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือและครุภัณฑ์ต่างๆ ตลอดจนสถานที่ใน
การทำวิจัย และขอขอบคุณฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนงานวิจัยนี้ให้เกิดขึ้นได้

ขอขอบคุณ คุณสุติรัตน์ ปุ่นประเสริฐ นักวิทยาศาสตร์โครงการบัณฑิตศึกษา คณะ
วิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำ
วิจัย ขอขอบคุณ คุณสุพรรณษา พันธุ์ธรรม คุณพิราวรณ แสงสง่า และคุณชไมพร สังค
นักศึกษาช่วยงานวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวก
ในการปฏิบัติงานวิจัย

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยนี้คงมีประโยชน์ต่อผู้สนใจตามสมควร

อภิรดี ปิลันธนภากย์
สุตารัตน์ สนวนจิตร

กันยายน 2554

จากการสำรวจความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ ในเขตอนุรักษ์ป่าชายเลนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเก็บใบพืชชายเลน 6 ชนิดคือ ใบลำพู ใบลำแพน ใบโพธิ์ทะเล ใบพังกาหัวส้ม ดอกขาว ใบโปรงขาวและผักเบี้ยทะเล ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 – พฤษภาคม 2554 รวม 39 ตัวอย่าง สามารถแยกราเอนโดไฟท์และเก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 124 สายพันธุ์ แยกจากใบโพธิ์ทะเลและใบลำพูได้สูงสุดคือ 51 สายพันธุ์ และ 43 สายพันธุ์ ตามลำดับ พืชที่พบเอนโดไฟท์หลากหลายที่สุดคือลำพู (4.2 ชนิด/ใบ) การจัดจำแนกราทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญและลักษณะโคโลนีในเบื้องต้น พบรา 83 ชนิด จำนวน 121 สายพันธุ์ และราที่พบโครงสร้างสปอร์ไม่สมบูรณ์ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ (unclassified) 3 สายพันธุ์ ราที่ไม่พบการสร้างสปอร์ (*mycelia sterilia*) มี 56 ชนิดจากทั้งหมด 83 ชนิด (67.5%) ราในกลุ่ม *ascomycete* 3 ชนิด (4%) และ *hyphomycete* 22 ชนิด (26.5%) เอนโดไฟท์ 15 สายพันธุ์ จากจำนวน 85 สายพันธุ์ (17.6%) ที่นำมาทดสอบ สร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, 0.5x PDA หรือ LNA เมื่อทดสอบโดยวิธี dual cultures อาหาร PDA และ 0.5x PDA ให้ผลดีใกล้เคียงกัน ส่วนอาหาร LNA ให้ผลยับยั้งอ่อนเมื่อนำราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลยับยั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อดี จำนวน 10 สายพันธุ์ มาสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ พบว่ามีเพียงสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ *Phomopsis* sp. TP 121 จากใบโพธิ์ทะเลเท่านั้น ที่สามารถยับยั้ง *A. brassicicola* ได้ในระดับปานกลาง (ระยยับยั้ง 0.2-0.6 เซนติเมตร) โดยวิธี disk diffusion

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟท์ ราโรคพืช พืชชายเลน สารต้านรา สารออกฤทธิ์ชีวภาพ

ABSTRACT

246125

The endophytic fungi on leaves of mangrove plants; *Sonneratia caseolari*, *Sonneratia ovata*, *Thespesia populnea*, *Bruguiera sexangula*, *Ceriops deeandra* and *Sesuvium ortulacustum* in mangrove conserved areas in the eastern part of Thailand were collected during October 2010 - May 2011. By examining 39 leave samples, 124 strains were isolated and kept as stock cultures. Most isolates were from *T. populnea* (51 strains) and *S. caseolari* (43 strains), respectively. The highest number of fungi isolated per leaf (4.2 fungi / leaf) was from *Sonneratia caseolari*. Preliminary classification and identification of all fungi based on cultural and morphological characteristics recorded 83 different fungi and three unclassified fungi (incomplete reproduction structures). Fifty six fungi (67.5%) were mycelia sterilia. The other fungal records included 3 ascomycetes (4%) and 22 hyphomycetes. (26.5%). Screening of 85 endophytic fungi for antifungal activities against *Alternaria brassicicola* was conducted on 3 culture media (PDA, 0.5x PDA and LNA) in dual cultures. Fifteen endophytic fungi (17.6%) inhibited *A. brassicicola* on either PDA, 0.5xPDA or LNA. The similar results on PDA and 0.5x PDA were observed while the antibiosis level on LNA medium showed weak activity. Among the crude extracts from ten strong antibiosis fungi. Only one extract from endophyte *Phomopsis* sp. TP 121 which was isolated from *T populnea* inhibited *A. brassicicola* (inhibition distance 0.2-0.6 cm).

Keywords: endophytic fungi, fungal phytopathogen, mangrove plants, antifungal, bioactive compounds

สารบัญ

	หน้า
สารบัญภาพ	ข
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่1 บทนำ.....	1
บทที่2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	3
ป่าชายเลนและพืชชายเลน.....	3
รายละเอียดเกี่ยวกับ <i>Alternaria brassicicola</i>	7
ราเอนโดไฟท์และผลิตภัณฑ์จากราเอนโดไฟท์.....	8
การควบคุมโรคพืชที่มีสาเหตุจากรา.....	9
รายละเอียดงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	11
บทที่3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	13
บทที่4 ผลการทดลอง	19
บทที่5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	130
เอกสารอ้างอิง	133

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะดอกและใบของต้นลำพู (<i>Sonneratia caseolaris</i>)	4
ภาพที่ 2 ลักษณะดอกและใบของต้นลำแพน (<i>Sonneratia ovata</i>).....	4
ภาพที่ 3 ลักษณะดอกและใบของต้นพังกาหัวส้มดอกขาว (<i>Bruguiera sexangula</i>)...	5
ภาพที่ 4 ลักษณะของใบและดอกของต้นโพธิ์ทะเลโพธิ์ทะเล (<i>Thespesia populnea</i>)	5
ภาพที่ 5 ลักษณะของต้นโปรงขาว (<i>Ceriops deeandra</i>)	6
ภาพที่ 6 ลักษณะของต้นผักเบี้ย (<i>Sesuvium ortulacustum</i>)	6
ภาพที่ 7 ลักษณะของรา <i>Alternaria brassicicola</i>	7
ภาพที่ 8 ระดับของปฏิสัมพันธ์ ที่เกิดเมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ร่วมกับราโรคพืช โดยวิธี dual culture:.....	15
ภาพที่ 9 การยับยั้ง <i>Alternaria brassicicola</i> ของราเอนโดไฟท์	26
ภาพที่ 10 ระดับการยับยั้งรา <i>A. brassicicola</i> ของราเอนโดไฟท์จากลำพู ในวันที่ 4 ของการเจริญ บนอาหาร 0.5x PDA	28
ภาพที่ 11 ระดับการยับยั้ง <i>A. brassicicola</i> ของราเอนโดไฟท์จากโพธิ์ทะเล ในวันที่ 4 ของการเจริญ บนอาหาร 0.5x PDA	28
ภาพที่ 12 ระดับการยับยั้ง <i>A. brassicicola</i> ของราเอนโดไฟท์จากผักเบี้ย SE 624) ใน วันที่ 4 ของการเจริญบนอาหาร 0.5x PDA ระดับการยับยั้ง 2+	29
ภาพที่ 13 ผลของสารสกัดจาก TP 111 (40 ไมโครลิตร) ในการยับยั้ง <i>A. brassicicola</i> บนอาหาร LNA โดยวิธี disk diffusion	30
ภาพที่ 14 ลักษณะโคโลนีรา SC 01A1 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน.....	31
ภาพที่ 15 ลักษณะราและโคโลนี SC 03A1 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน...	32
ภาพที่ 16 ลักษณะโคโลนีรา SC 05A1 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน.....	33
ภาพที่ 17 ลักษณะโคโลนีรา SC 07A1 บนอาหารบนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน.....	34
ภาพที่ 18 ลักษณะโคโลนีรา SC 08A1 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน.....	35
ภาพที่ 19 ลักษณะราและโคโลนี SC 09A2 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน..	36
ภาพที่ 20 ลักษณะราและโคโลนี SC 10A3 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน...	37
ภาพที่ 21 ลักษณะโคโลนีรา SC 13A3 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน.....	38
ภาพที่ 22 ลักษณะโคโลนีรา SC 14A3 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน.....	39
ภาพที่ 23 ลักษณะราและโคโลนี SC 15A3 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ...	40
ภาพที่ 24 ลักษณะโคโลนีรา SC 16A4 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน.....	41
ภาพที่ 25 ลักษณะราและโคโลนี SC 17A4 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน..	42

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 55 ลักษณะโคโลนีรา TP 072 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน.....	72
ภาพที่ 56 ลักษณะราและโคโลนี TP 073 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน....	73
ภาพที่ 57 ลักษณะโคโลนีรา TP 091 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน.....	74
ภาพที่ 58 ลักษณะราและโคโลนี TP 092 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน...	75
ภาพที่ 59 ลักษณะราและโคโลนี TP 111 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน....	76
ภาพที่ 60 ลักษณะโคโลนีรา TP 130 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน	77
ภาพที่ 61 ลักษณะราและโคโลนี TP 131 บนอาหาร PDA และ CMA ที่เลี้ยงเป็น เวลา 14 วัน.....	78
ภาพที่ 62 ลักษณะราและโคโลนี TP 141 บนอาหาร PDA และ CMA ที่เลี้ยงเป็น เวลา 14 วัน.....	79
ภาพที่ 63 ลักษณะโคโลนีรา TP 142 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน.....	80
ภาพที่ 64 ลักษณะโคโลนีรา TP 151 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน.....	81
ภาพที่ 65 ลักษณะโคโลนีรา TP 241 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน.....	82
ภาพที่ 66 ลักษณะราและโคโลนี TP 311 บนอาหาร PDA และ CMA ที่เลี้ยงเป็น เวลา 14 วัน.....	83
ภาพที่ 67 ลักษณะโคโลนีรา TP 421 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน.....	84
ภาพที่ 68 ลักษณะโคโลนีรา TP 511 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน.....	85
ภาพที่ 69 ลักษณะโคโลนีรา TP 531 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน.....	86
ภาพที่ 70 ลักษณะโคโลนีรา TP 551 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน.....	87
ภาพที่ 71 ลักษณะราและโคโลนี TP 611 บนอาหาร PDA.....	88
ภาพที่ 72 ลักษณะโคโลนีรา TP 612 บนอาหาร PDA.....	89
ภาพที่ 73 ลักษณะโคโลนีรา TP 613 บนอาหาร PDA.....	90
ภาพที่ 74 ลักษณะโคโลนีรา TP 614 บนอาหาร PDA และYMG ที่เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....	91
ภาพที่ 75 ลักษณะราและโคโลนี TP 616 บนอาหาร PDA	92
ภาพที่ 76 ลักษณะโคโลนีรา TP 621 บนอาหาร PDA	93
ภาพที่ 77 ลักษณะราและโคโลนี TP 623 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน.....	94
ภาพที่ 78 ลักษณะราและโคโลนี TP 624 บนอาหาร PDA	95
ภาพที่ 79 ลักษณะราและโคโลนี TP 635 บนอาหาร PDA	96
ภาพที่ 80 ลักษณะราและโคโลนี TP 641 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....	97
ภาพที่ 81 ลักษณะโคโลนีรา TP 643 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน.....	98

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 82 ลักษณะโคโลนีรา TP 651 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน	99
ภาพที่ 83 ลักษณะราและโคโลนี TP 671 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน	100
ภาพที่ 84 ลักษณะราและโคโลนี TP 672 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน	101
ภาพที่ 85 ลักษณะราและโคโลนี TP 712 บนอาหาร PDA และ YMG	102
ภาพที่ 86 ลักษณะโคโลนีรา TP 713 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน	103
ภาพที่ 87 ลักษณะโคโลนีรา TP 724 บนอาหาร PDA	104
ภาพที่ 88 ลักษณะราและโคโลนี TP 725 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน	105
ภาพที่ 89 ลักษณะโคโลนีรา TP 731 บนอาหาร PDA และ CMA	106
ภาพที่ 90 ลักษณะโคโลนีรา TP 732 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน	107
ภาพที่ 91 ลักษณะราและโคโลนี Br 231 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน....	108
ภาพที่ 92 ลักษณะโคโลนีรา Br 341 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน	109
ภาพที่ 93 ลักษณะราและโคโลนี Br 421 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน....	110
ภาพที่ 94 ลักษณะโคโลนีรา Br 611 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน	111
ภาพที่ 95 ลักษณะโคโลนีรา CD 712 บนอาหาร PDA	112
ภาพที่ 96 ลักษณะราและโคโลนี CD 713 บนอาหาร PDA	113
ภาพที่ 97 ลักษณะโคโลนีรา CD 714 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน.....	114
ภาพที่ 98 ลักษณะโคโลนีรา CD 721 บนอาหาร PDA.....	115
ภาพที่ 99 ลักษณะราและโคโลนี CB 731 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน	116
ภาพที่ 100 ลักษณะโคโลนีรา CD 732 บนอาหาร PDA.....	117
ภาพที่ 101 ลักษณะราและโคโลนี CD 734 บนอาหาร PDA.....	118
ภาพที่ 102 ลักษณะโคโลนีรา CD 736 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน.....	119
ภาพที่ 103 ลักษณะราและโคโลนี SE 611 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน...	120
ภาพที่ 104 ลักษณะราและโคโลนี SE 612 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน...	121
ภาพที่ 105 ลักษณะโคโลนีรา SE 621 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน.....	122
ภาพที่ 106 ลักษณะราและโคโลนี SE 622 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน..	123
ภาพที่ 107 ลักษณะราและโคโลนี SE 623 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน...	124
ภาพที่ 108 ลักษณะโคโลนีรา SE 624 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน...	125
ภาพที่ 109 ลักษณะราและโคโลนี SE 625 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน...	126
ภาพที่ 110 ลักษณะราและโคโลนี SE 626 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน...	127
ภาพที่ 111 ลักษณะราและโคโลนี SE 627 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน...	128
ภาพที่ 112 ลักษณะโคโลนีรา SE 628 บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน.....	129

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างราเอนโดไฟท์จากพืชชายเลนและสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่รา ผลิตขึ้น.....	10
ตารางที่ 2 รายละเอียดตัวอย่างและจำนวนสายพันธุ์ราที่แยกได้.....	13
ตารางที่ 3 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 18S rRNA	17
ตารางที่ 4 คู่ไพรเมอร์ยูนิเวอร์ซัล NS1 และ NS8	17
ตารางที่ 5 ขั้นตอนของการดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์	18
ตารางที่ 6 ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์.....	20
ตารางที่ 7 การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์.....	25
ตารางที่ 8 ราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ <i>A. blassicicola</i> ใน dual culture.....	27