บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG4680003

T156837

ชื่อโครงการ : การตรวจแยกหาเอนโดไฟท์จากต้นพืชที่เจริญอยู่ในป่าเขตร้อนชื้นและต้นพืชสมุนไพรพื้นบ้าน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบของชีววิธีควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย : ดร. จีรพันธ์ วรพงษ์ โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล
วิทยาเขตศาลายา ถนน พุทธมณฑลสาย 4 นครปฐม 73170
โทรศัพท์ 0-2889-3944 0-2889-3991-92 ต่อ 214 หรือ 0 โทรสาร 02-889-3955

E-mail Address : jeerapunw@yahoo.com หรือ stjwr@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 ปี กรกฎาคม 2546-กรกฎาคม 2547

บทคัดย่อ : ผลจากการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างพืช 36 ชนิดจากสวนสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม สามารถแยกเชื้อเอนโดไฟท์ได้เป็นจำนวน 305 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ในขณะที่สามารถแยกเชื้อเอนโดไฟท์ได้เป็นจำนวน 99 สายพันธุ์บริสุทธิ์จากตัวอย่างพืช 13 ชนิดที่นำมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจำนวน 22 สายพันธุ์บริสุทธิ์ จากกิ่งของต้นอบเชยที่นำมาจากจังหวัดนครนายก จากเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 426 สายพันธุ์บริสุทธิ์ พบว่ามีเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 64 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Pythium ultimum* ผลจากการจำแนกของเชื้อราเอนโดไฟท์บางสายพันธุ์ด้วยลักษณะของสปอร์ที่เชื้อราสร้างและใช้วิธีทางชีวโมเลกุลคือการจำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ ITS1&2/5.8S พบว่าบางสายพันธุ์คือ *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., และ *Fusarium* sp. นอกจากนี้ยังตรวจพบว่ามี เชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ไฟเทสได้และสามารถสร้างสารทุติยภูมิยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. ultimum* คือราเอนโดไฟท์ *Guignardia* sp. สายพันธุ์ QL8 จากการวิจัยก่อนหน้านี้ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบของชีววิธีควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทยคือราเอนโดไฟท์ *Muscodor albus* สายพันธุ์ MFC2 ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่เป็นก๊าซยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. ultimum* จากการทดสอบการก่อให้เกิดโรคกับคะน้าพบว่าราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *Muscodor albus* MFC2 ที่ความเข้มข้น 6.1 x 10^6-3.9-4.1 x 10^9 cell/ml มีประสิทธิภาพมากในการช่วยการเจริญเติบโตของคะน้าในสภาวะที่ไม่มีเชื้อก่อโรค ในสภาวะที่มีเชื้อก่อโรครากเน่า *P. ultimum* ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *Muscodor albus* MFC2 สามารถช่วยการเจริญเติบโตและควบคุมการก่อโรครากเน่า *P. ultimum*ที่ความเข้มข้น 3.8-4.3 x 10^6-8.6-9.2 x 10^8 cell/ml โดยสังเกตจากเบอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดคะน้า และต้นคะน้าที่เจริญได้ดีเท่ากับคะน้าชุดควบคุมที่ปลูกในสภาวะปกติ นอกเหนือจากการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. ultimum* มีเชื้อราเอนโดไฟท์อีก 2 สายพันธุ์คือ DSB6 และ CC3 ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค *Candida albicans* เชื้อราเอนโดไฟท์ DSB6 เป็นเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้น (*Derris scandens*) นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ DSB6 ยัง

สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิยับยั้ง *Plasmodium falciparum* สายพันธุ์ดื้อยา K1 ที่ EC50 ด้วยความเข้มข้น 68 µg/ml. จากการจำแนกเชื้อราด้วยการตรวจหาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1&2/5.8S พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ DSB6 คือเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ของวงษ์ *Montagnula* ด้วยระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS1&2/5.8S ที่ 85% กับ *M. opulenta* (AF383966) ส่วนเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่ 2 คือ เชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ CC3 ที่แยกได้จากต้นอบเชย สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. ultimum* และเชื้อก่อโรค *Candida albicans* จากการจำแนกเชื้อราด้วยการตรวจหาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1&2/5.8S พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ CC3 คือเชื้อรา *Phaeoacremonium* sp. ด้วยระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS1&2/5.8S ที่ 97.5% กับ *P. angustius* (AF266651) ผลการแยกเอนโดไฟท์ที่น่าสนใจคือมีความสามารถสร้างเอ็นไซม์ไฟเทสจำนวน 14 สายพันธุ์ เชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ CL8 ที่แยกได้จากใบของต้นอบเชยและ สามารถสร้างเอนไซม์ไฟเทสได้ที่อุณหภูมิ 25^{0}C และ 30^{0}C บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PSM ที่ความเป็นกรด 6.0 และ เชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ VTL7 ที่แยกได้จากใบของต้นคนทีสอทะเล สามารถสร้างเอนไซม์ไฟเทสได้ที่อุณหภูมิ 37^{0}C บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PSM ที่ความเป็นกรดเท่ากับ 6 จากการจำแนกเชื้อราด้วยการตรวจหาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1&2/5.8S พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ CL8 คือ *Nemania bipapillata* ด้วยระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS1&2/5.8S ที่ 99.80% กับ *N. bipapillata* (AJ390429) และเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ VTL7 คือ *Phomopsis* sp. ด้วยระดับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS1&2/5.8S ที่ 96.93% กับ *Phomopsis oryzae* (AF079777)

คำหลัก : เอนโดไฟท์ ชีววิธีควบคุม สารทุติยภูมิ พืชสมุนไพรพื้นบ้านไทย เอนไซม์ไฟเทส

Three hundred and five strains of endophytes were isolated from thirty-six plant species growing at the Sireerukachart Garden, Salaya Campus, Mahidol University, Nakornprathom while ninety-nine of fungal endophytes were found from thirteen trees growing in Prachoapkeereekhan. In addition, twenty-two fungal isolates were found from the branches of *Cinnamomum* sp. in Nakornayok. There are sixty-four fungal isolates in total that produce secondary metabolite inhibiting *P. ultimum*, a root rot disease. To identify endophytes that have biological activity, we use both classical classification and ITS/5.8S sequence analysis. Some of them are *Pestalotiopsis* sp., *Guignardia* sp., *Curvularia* sp. and *Fusarium* sp.. The endophytic QL8 or *Guignardia* sp. produces not only secondary metabolite inhibiting *P. ultimum*, but also phytase enzyme on Phytase Screening Medium (PSM). Endophytic fungus that potentially to be applied as the biocontrol agent is a *Muscodor albus* MFC2, isolated from *Myristica fragrant*. *M. albus* MFC2 can produce bioactive volatile compounds that can very well inhibit *P. ultimum* growth. The result of pathogenicity test against kale germination and growth showed that at concentration of $6.1x10^6$ and $3.9\text{-}4.1x10^9$ cell/ml did not affect kale germination, but promote the growth of kale in either with *P. ultimum* infection or without *P. ultimum* infection at $3.8\text{-}4.3x10^6$ and $8.6\text{-}9.2x10^8$ cell/ml. Other than inhibiting *P. ultimum* growth, there were two strains of endophytic fungi, DSB6 and CC3, which can produce bioactive metabolites retarding the growth of *Candida albicans*. The fungal strains DSB6 and CC3 were isolated from *Derris scandens* and *Cinnamomum* sp., respectively. In addition, DSB6's secondary metabolite crude extract is able to stop the growth of resistant *Plasmodium falciparum* strain K1 at EC50 68 μg/ml. High similarities of ITS1-5.8S-ITS2 sequences showed that the isolate DSCB6 could be a novel species of *Montagnula* since it is taxonomically related to *Montagnula opulenta* (AF383966) only 85% similarity while CC3 should be classified as *Phaeoacremonium angustius* (AF266651) by virtue of 97.5% similarity. Interestingly, there were about fourteen phytase producers of all fungal endophytic isolates. The strain CL8 isolated from leaves of *Cinnamomum* sp. can produce phytase on PSM at 25°C and 30°C, at pH 6 while the strain VTL7 isolated from leaves of *Vitex trifolia* can produce phytase on PSM at 37°C, at pH 6. Based on the comparison of ITS1&2 and 5.8S rRNA nucleotide sequences, the strain CL8 should be classified as *Nemania bipapillata* with 99.80% similarity of *N. bipapillata* (AJ390429) whereas the strain VTL7 should be classified as *Phomopsis oryzae* with 96.93% similarity of *P. oryzae* (AF079777).