207062

รหัสโครงการ: MRG4980073

ชื่อโครงการ: การค้นหาเชื้อราและยีน chitinase ของเชื้อราจากดินเพื่อการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา

ชื่อนักวิจัย: ดร. ทิพา อัศวรักษ์

นักวิจัยที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์ ดร.วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด

สถาบัน: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ระยะเวลาโครงการ: 1 กรกฎาคม 2549 - 1 กรกฎาคม 2551 (2 ปี)

โครงการวิจัยนี้ต้องการค้นหาเชื้อราที่สามารถเป็น antagonist ต่อเชื้อราก่อโรคพืชและค้นหายีนที่สร้างเอนไซม์ chitinase ที่มีประสิทธิภาพสูงจากเชื้อรา โดยได้นำเชื้อรา 127 isolates ที่แยกได้จาก 19 ตัวอย่างดินมาคัดกรองหาเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase พบเชื้อราจำนวน 37 isolates ที่สามารถสร้าง chitinase ได้ เมื่อนำเชื้อราที่สร้าง chitinase ทั้ง 37 isolates มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค 4 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus fumigatus* และเชื้อราที่ก่อโรคในพืช ได้แก่ *Cochliobolus heterostrophus*, *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Pythium ultimum* พบว่ามีถึง 33 isolates ที่มีผลยับยั้งเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบอย่างน้อยหนึ่งชนิดซึ่งแสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจในการนำว่าเชื้อราที่สร้าง chitinase มาใช้เป็น biological control agents จากการบ่งชี้สายพันทางอณูชีววิทยาโดยอาศัยส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA พบว่าเชื้อราเหล่านี้อยู่ใน genera *Aspergillus* และ *Trichoderma* เมื่อวิเคราะห์ chitinase activity แล้วจึงคัดเลือกเชื้อรา isolate N3-1 ซึ่งผลการบ่งชี้สายพันธุ์คล้ายคลึงกับ *Trichoderma longibrachiatum* และมี chitinase activity สูงมาใช้ในการสร้าง cDNA library และการ clone ยีน chitinase โดยได้คัดกรอง cDNA library เพื่อค้นหา clones ที่มีชิ้นส่วน chitinase cDNA ด้วย PCR-based screening โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อ conserved region ของ chitinase และ vector พบ candidates หลาย clones ซึ่งจะนำมา characterize ต่อไป และได้ใช้ primers ที่ออกแบบจาก alignment ของยีน chitinases ของ *Trichoderma* spp. ในการ amplify จาก N3-1 genomic DNA และ ligate เข้า vector แล้ว transform สู่ *Escherichia coli* DH5α พบว่าสามารถ clone ชิ้นส่วนของยีน chitinase ขนาด 1.2 kb ได้โดย sequence ของ fragment นี้มีความคล้ายคลึงสูงสุดกับ *chi*18-5 ของ *Hypocrea jecorina* โดยจะทำการ clone full length fragment ขนาด 1.5 kb ของยีนนี้ต่อไป นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสามารถของ N3-1 ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Colletotrichum* spp. และ *P. ultimum* ในพืช ซึ่งผลการทดลองเบื้องต้นแสดงให้เห็นถึงความน่าสนใจในการนำเชื้อราสายพันธุ์นี้และเชื้อราที่สร้าง chitinase มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้อีกด้วย

207062

Project Code: MRG4980073

Project Title: Identification and Characterization of Chitinase Gene from Soil Fungal Community for Biological Control

Investigator: Dr. Thipa Asvarak

Mentor: Professor Dr. Watanalai Pangred

Project Period: 1 June 2006 - 1 June 2008 (2 years)

The objectives of this research are isolation of soil fungi with antagonistic activity against fungal phytopathogens, and cloning of chitinase gene from fungal isolate of interest. Total of 127 fungal isolates, obtained from 19 soil samples, were screened for the ability to produce chitinase. From these, 37 chitinase producing isolates were assayed for antagonistic activity against four fungal test strains, including *A. fumigatus* and three phytopathogens: *Cochliobolus heterostrophus*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Pythium ultimum*. Thirty-three isolates showed the ability to inhibit or alter growth of at least one fungal test strains, suggesting potential application of chitinase producing fungi in biological control of fungal pathogens. Molecular identification based on ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA suggested that most fungal isolates belong to genera *Aspergillus* and *Trichoderma*. Based on chitinase activity and molecular identification, a fungal isolate N3-1 (high similarity to *Trichoderma longibrachiatum*) was selected for cDNA library construction and cloning of chitinase gene. To identify clones carrying cDNA of chitinase genes, the constructed cDNA library was screened by PCR-based screening method, using primers specific to conserved region of chitinases and to vector. Several candidates were obtained, and will be characterized for chitinase cDNA inserts. Primers designed based on alignment of *Trichoderma* chitinases were also used to amplify fragment of chitinase gene from N3-1 genomic DNA. Resulting fragment was ligated into vector and transformed into *Escherichia coli* DH5α. A 1.2 kb fragment of chitinase gene, whose sequence showed highest similarity to *Hypocrea jecorina* chitinase gene *chi*18-5, was obtained. A full length fragment of this gene (approximate 1.5 kb) will be cloned. In addition, N3-1 was preliminary assayed for *in vivo* antagonistic activity against *Colletotrichum* spp. and *P. ultimum*. The results suggested potential application of chitinase producing fungal isolates as biological agents against fungal phytopathogens.