

สัญญาเลขที่ RMU4980030

โครงการ: การขยายผลการตรวจแยกหาเอนโดไฟต์จากต้นพืชสมุนไพรไทยพื้นบ้าน
เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบของชีวควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย
รายงานฉบับสมบูรณ์

ระยะเวลาดำเนินงาน 3 ปี คือตั้งแต่วันที่ 20 ก.ค. 2549 ถึงวันที่ 30 มิ.ย. 2552

ชื่อโครงการ การขยายผลการตรวจแยกหาเอนโดไฟต์จากต้นพืชสมุนไพรไทยพื้นบ้านเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบของชีวควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย (Screen for Endophytes from Thai Medicinal Folk Plants for the Biocontrol Agent against Pathogens of Economic Crops in Thailand)

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ชื่อ-สกุล นางสาว จีรพันธ์ วรพงษ์ ตำแหน่ง ผศ. ดร.

หน่วยงาน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ที่อยู่ ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

โทรศัพท์ 02-441-9816-20 ต่อ 1133

E-mail: tongseeworapong@gmail.com

ชื่อผู้ร่วมวิจัย นางสาวมนต์ฤดี ศรีไพโรทัย, รศ. ดร. สิทธิวัฒน์ เลิศศิริ, ดร. ปราณี อินประโคน, รศ. ดร. ไสยวิชญ์ วรวิจิตร, รศ. ดร. ครรชิต ธรรมศิริ, ศิริพร ดันดีโพธิ์พิพัฒน์, ดร. นพ. ชีรพงษ์ กระแจะจันทร์

Abstract

During 3 years of search for endophytes, an agricultural application was mainly observed, and novel bioactive compounds against drug resistant bacteria and *Pythium insidiosum*, a Pythiosis pathogen of human, were preliminary investigated from more than 1,000 endophytic strains isolated from Thai medicinal trees in Thailand. Three endophytes that are high potentially used to control a broad spectrum of plant diseases are *Muscodora albus* MFC2, *Xylaria* sp. QS4 and *Paenibacillus polymyxa* TL41. The fungus *M. albus* MFC2 was isolated from *Myristica fragrans* at Mahidol University, Salaya, Nakornprathom. A novel endophytic species of *Bipolaris thaiendophytica* JF2 with antagonistic activity of a broad spectrum of fungal plant pathogens was found from a fruit of this tree. In specific grain formula media, *M. albus* MFC2 could produce bioactive volatile organic compounds (VOCs, i.e. ethanol, isoamyl alcohol and aromadendrene) that partially to totally inhibit plant pathogens including *Alternaria* sp., *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *F. equiseti*, *Ganoderma* sp., *Geotrichum* sp., *Phytophthora parvifolia*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia* and *Sclerotinia* sp.. Importantly, *M. albus* MFC2 colonizing grains could completely control *P. ultimum* on kale, *Alternaria* disease on chili under field conditions, *F. equiseti* black spots on Hom-Thong banana, and partially control *C. gloeosporioides* anthracnose on Nam-Dok-Mai mango fruits. The high production of ethanol from *M. albus* MFC2 colonizing grains was an interesting observation for an alternative energy source. Notably, *M. albus* MFC2 induced mechanisms affecting drought tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum*). The second endophytic biocontrol agent was *Xylaria* sp. QS4, a fungal endophyte from twigs of *Quereus lauritolia* growing at Kanchanaburi campus of Mahidol University. Results of *in vitro* antagonistic test showed that *Xylaria* sp. QS4 could inhibit *Alternaria* sp., *C. capsici*, *C. gloeosporioides* and *P. ultimum*. Thoroughly mixing 15 plates of 10-day old *Xylaria* QS4 in 500 g mixture of commercial soil and field soil did not negatively affect both germination and growth of kale and lettuce seeds in outdoor conditions. In addition, the same concentration of *Xylaria* sp. strain QS4 could completely control *P. ultimum* infestation pots of kale and lettuce, but restored productions more than control pots. The last one was *Paenibacillus polymyxa* TL41, a gram positive bacterial endophyte of *Paederia foetida* that could control of *Xanthomonas campestris* on lettuce under

outdoor conditions. Additionally, *P. polymyxa* TL41 was able to inhibit *Alternaria* sp., *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *F. equiseti*, *P. palmivora* and *P. ultimum* on potato dextrose agar.

For the medicinal applications, the *Xylaria* QS4 also has antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas auriginosa*, MRSA-1302, MRSA-2, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Twenty three extracts of 10 day PDB shaking endophytic cultures had ability to inhibit growth of all those pathogens. The 15 extracts of which cultured for 10 days in stand and shaking GP both have the inhibition activity against all pathogens. Other objectives of this study were to screen endophytes having anti *P. ultimum* activity that are able to inhibit a growth of *P. insidiosum* based on a dual antagonistic test on PDA, GPA and modified PDA because Pythiosis is a life-threatening infectious disease of humans and animals that has been increasingly reported. Radical surgery is the main treatment for pythiosis since conventional antifungal drugs are ineffective. There were 24 endophytes that could inhibit *P. insidiosum* at 57-96% from a total of 49 endophytes with anti *P. ultimum* activity. These top eight endophytes were *Dothideomycete* sp. N5L4 and NAAL7, *Myrothecium* sp. RSb8, *Phyllosticta citrullina* NHL12, *Xylaria* sp. QS4, *Chaetomium* sp. RPR2, *Cladosporium cladosporioides* RRS18, and the bacterial endophyte *P. polymyxa* TL41. These data indicate that endophytes from medicinal trees are promise reservoirs to search for novel antibiotic compounds against drug-resistant bacteria and anti- *P. insidiosum* agent for a treatment of patients with pythiosis.

บทคัดย่อ

231122

ในช่วง 3 ปีของการแยกหาเอนโดไฟท์ งานวิจัยการประยุกต์ใช้ทางด้านการเกษตรถือเป็นงานหลักในการศึกษาค้นคว้าและการค้นหาสารชนิดใหม่ ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาและที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pythium insidiosum* ที่ก่อโรคพืชไร่ในคน ถือเป็นงานวิจัยเบื้องต้น จากเชื้อเอนโดไฟท์มากกว่า 1,000 สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นพืชสมุนไพรไทยพื้นบ้านในประเทศไทย เชื้อเอนโดไฟท์ 3 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงเพื่อนำไปในรูปแบบของชีวภาพควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจคือ *Muscador albus* MFC2, *Xylaria* sp. QS4 และ *Paenibacillus polymyxa* TL41 เชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* MFC2 ถูกแยกมาจากต้นจันทน์เทศที่ปลูกอยู่ ณ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม เชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่ *Bipolaris thaiendophytica* JF2 ที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืชได้หลายชนิด ก็ถูกค้นพบจากผลไม้ของต้นไม้ในสวนอาหารอุทยานพืชที่จำเพาะเชื้อ *M. albus* MFC2 สามารถสร้างก๊าซอินทรีย์ (เอทานอล ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และเอโรมาเดนตรีน) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเพียงบางส่วนถึงยับยั้งได้ทั้งหมดต่อศัตรูพืชอันได้แก่ *Alternaria* sp., *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *F. equiseti*, *Ganoderma* sp., *Geotrichum* sp., *Phytophthora palmivora*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia* and *Sclerotinia* sp. ที่สำคัญบนแปลงปลูกจำลองเชื้อ *M. albus* MFC2 ที่เจริญในสูตรธัญญาพืชดังกล่าวสามารถควบคุมเชื้อก่อโรครากเน่า *P. ultimum* ในคนหา เชื้อก่อโรคกุ้งแห้งเทียม *Alternaria* sp. ในพริก เชื้อก่อโรคจุดดำ *F. equiseti* บนกล้วยหอมทอง อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถควบคุมเพียงบางส่วนต่อเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* บนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ การค้นพบที่น่าสนใจคือผลผลิตเอทานอลในปริมาณที่สูงจากเชื้อ *M. albus* MFC2 ที่เจริญในสูตรธัญญาพืช 14 วัน เพื่อเป็นแหล่งพลังงานทดแทน เป็นที่น่าสังเกตอีกว่า *M. albus* MFC2 สามารถเหนี่ยวนำต้นมะเขือเทศให้สร้างขบวนการการทนแล้ง เชื้อราเอนโดไฟท์ชีวควบคุมตัวที่ 2 คือ *Xylaria* sp. QS4 เป็นเชื้อราเอนโดไฟท์จากกิ่งของผักหวานที่เจริญที่ วิทยาเขตกาญจนบุรี มหาวิทยาลัยมหิดล ผลการทดลองเป็นปฏิกิริยาบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคกุ้งแห้งเทียม *Alternaria* sp. เชื้อก่อโรคกุ้งแห้ง *C. capsici* เชื้อก่อโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* และเชื้อก่อโรครากเน่า *P. ultimum* ผลของการผสมเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 อายุ 10 วัน จำนวน 15 จานเลี้ยงเชื้อ กับดินจากแปลงปลูกผักจริงและดินที่ขายตามท้องตลาดปริมาณ 500 กรัม ต่อกระถางไม่มีผลต่อการงอกและการเจริญของเมล็ดคะน้าและผักกาดหอมบนแปลงปลูกจำลอง นอกจากนี้เชื้อ *Xylaria* sp. QS4 ในปริมาณดังกล่าวยังสามารถควบคุมเชื้อก่อโรครากเน่า *P. ultimum* ที่ใส่ในกระถางปลูกคะน้าและผักกาดหอมอย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำผลผลิตกลับมาได้มากกว่าชุดกระถางควบคุม เชื้อเอนโดไฟท์ชีวควบคุมตัวสุดท้ายคือ *Paenibacillus polymyxa* TL41 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์แกรมบวกของต้นเถาตุตหมูตุตหมา (*Paederia foetida*) ที่สามารถควบคุมเชื้อ *Xanthomonas campestris* บนผักกาดหอมบนแปลงปลูกจำลอง นอกจากนี้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

PDA เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *P. polymyxa* TL41 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรครากแห้งเทียม *Alternaria* sp. เชื้อก่อโรครากแห้ง *C. capsici* เชื้อก่อโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* และเชื้อก่อโรครากเน่า *P. ultimum* เชื้อก่อโรค *Fusarium* sp. เชื้อก่อโรคจุดดำบนกล้วยหอม *F. equiseti* เชื้อก่อโรครากเน่าในทุเรียน *Phytophthora parvovola* สำหรับการประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์เชื้อ *Xylaria* sp. QS4 มีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมดต่อไปนี้ *Escherichia coli*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas auruginosa*, MRSA-1302, MRSA-2, *Staphylococcus aureus* และเชื้อยีสต์ *Candida albicans* นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดของเชื้อเอนโดไฟท์อายุ 10 วัน ที่เจริญในอาหารเหลว PDB สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นทั้งหมด และสารสกัดของเชื้อเอนโดไฟท์อายุ 10 วัน ที่เจริญในอาหารเหลว Glucose Peptone สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นทั้งหมด จุดประสงค์อันหนึ่งของการศึกษานี้คือการทดสอบหาความสามารถของเชื้อเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* ว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* หรือไม่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดคือ PDA GPA และ modified PDA ด้วยวิธีการทดสอบเป็นปฏิกิริยาดังกล่าวที่สำคัญคือโรคพืชโรซิดิซิส เกิดจากเชื้อ *Pythium insidiosum* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม oomycetes โรคนี้มีความรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตที่พบได้ทั้งในคนและในสัตว์ปัจจุบันมีรายงานการพบผู้ป่วยโรคนี้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ปัญหาสำคัญของโรคพืชโรซิดิซิสคือไม่มียาที่ใช้รักษาโรค การรักษาหลักจึงต้องใช้การผ่าตัดเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ติดเชื้อออกให้หมดทำให้เกิดความพิการและอัตราการตายที่สูง ผลการทดสอบพบเชื้อเอนโดไฟท์ 49 สายพันธุ์ มีเชื้อเอนโดไฟท์ 24 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* ตั้งแต่ 57-96% เชื้อราเอนโดไฟท์เหล่านั้นได้แก่เชื้อ *Dothideomycete* sp. N5L4 และ NAAL7, *Myrothecium* sp. RSb8, *Dothideomycete* sp., *Phyllosticta citrullina* NHL12, *Xylaria* sp. QS4, *Chaetomium* sp. RPR2, *Cladosporium cladosporioides* RRS18 และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *P. polymyxa* TL41 ผลข้อมูลจากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟท์จากต้นพืชสมุนไพรเป็นแหล่งที่มีศักยภาพในการค้นหาสารชนิดใหม่ ๆ ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคมดและเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *P. insidiosum* ที่ก่อโรคพืชโรซิดิซิสในคน

Executive Summary

ที่มาและแนวคิดการสร้างผลงานวิจัยนี้ มาจากผลงานการวิจัยตั้งแต่ปี 2543 ที่ผ่านมากล่าวคือ ขณะที่ยังศึกษาต่อ ณ Montana State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ข้าพเจ้า และ Professor Dr. Gary A. Srobel สามารถแยกราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่ได้ 2 สายพันธุ์ คือ 1) ราเอนโดไฟท์ *Muscador albus* จากต้นพืช *Cinnamomum zeylanicum* (Worapong และคณะ 2001) และ 2) ราเอนโดไฟท์ *M. roseus* จากต้นพืช *Grevillea pteridifolia* (Worapong และคณะ 2002) ที่สามารถสร้างก้ำขยับยั้งการเจริญเชื้อราที่ก่อโรคมดพืช อาทิเช่น *Ustilago hordei* (Loose Smut) ของต้นข้าวมาเลย์ นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *M. albus* ยังสามารถควบคุมการเจริญของ *Rhizoctonia solani* เชื้อราที่ก่อโรคของต้น sugarbeet ได้ด้วย หลังจากข้าพเจ้าสำเร็จจากการศึกษาปริญญาเอกและกลับเข้ามารับราชการในปี 2544 ข้าพเจ้าสามารถแยกราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *Muscador albus* strain MFC2 ซึ่งเป็นเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ไทยแท้ ที่ถูกค้นพบจากต้นจันทน์เทศ ปลูก ณ สวนสมุนไพรสิริรุกชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม ที่สามารถสร้างก้ำขยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคมดพืช *Pythium ultimum* (Sopalun et al., 2008) ผลงานของการดำเนินงานเป็นเวลา 3 ปีภายใต้โครงการขยายผลการตรวจแยกหาเอนโดไฟท์จากต้นพืชสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบของชีวควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคมดพืชเศรษฐกิจในประเทศไทยมีดังนี้คือ เชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่อันได้แก่ *Bipolaris thaiendophytica* JF2 ก็ถูกค้นพบจากผลไม้ของต้นจันทน์เทศเช่นกัน ดังนั้นต้นจันทน์เทศจึงเป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจเนื่องจากเชื้อนี้ก็สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชอื่นได้แก่ *Alternaria* sp. (61%), *Colletotrichum capsici* (88%), *C. gloeosporioides* (70%), *F. equiseti* (42%), *Ganoderma* sp. (78%), *Geotrichum* sp. (75%), *Phytophthora parvovola* (84%), *P. ultimum* (69%), *Rhizoctonia* (91%) and *Sclerotinia* sp. (79%) จากเชื้อเอนโดไฟท์มากกว่า 1,000 สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นพืชสมุนไพรไทยพื้นบ้านในประเทศไทย มีเชื้อเอนโดไฟท์ 3 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงเพื่อนำไปในรูปแบบของชีวภาพควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคมดพืชเศรษฐกิจบนแปลงปลูกจำลองที่มีลักษณะใกล้เคียงกับแปลงปลูกจริง คือ *Muscador albus* MFC2, *Xylaria* sp. QS4 และ *Paenibacillus polymyxa* TL41 ในสูตรอาหารธัญญาพืชที่จำเพาะเชื้อ *M. albus* MFC2 สามารถสร้างสารระเหยอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเพียงบางส่วนถึงยับยั้งได้ทั้งหมดต่อศัตรูพืชอื่นได้แก่ *Alternaria* sp. (93.1%), *Colletotrichum capsici* (81.3%), *C. gloeosporioides* (96%), *Fusarium* sp. (93.9%), *F. equiseti* (84.8%), *Ganoderma* sp. (100%), *Geotrichum* sp. (84.3%), *Phytophthora parvovola* (100%), *P. ultimum* (100%), *Rhizoctonia* (57.2%) and *Sclerotinia* sp. (76.7%) ที่