

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ 3 ข้อ คือ เพื่อตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายและนิเวศวิทยาของยีสต์เอนโดไฟต์ (endophytic yeast) และยีสต์อีพิไฟต์ (epiphytic yeast) จากใบพืชเศรษฐกิจ คือข้าว อ้อยและข้าวโพดทั้งโดยวิธีที่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture-dependent method) และวิธีที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture-independent method) เพื่อผลิตกรดอินโดล-3-อะซิติก (indole-3-acetic acid, IAA) โดยคัดเลือกจากยีสต์เอนโดไฟต์และยีสต์อีพิไฟต์ที่แยกได้และศึกษาชีววิถีการสังเคราะห์ IAA ของยีสต์ที่คัดเลือกได้ และเพื่อประเมินและคัดเลือกยีสต์เอนโดไฟต์และยีสต์อีพิไฟต์ที่แยกได้มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจทั้ง 3 ชนิด

สำหรับตัวอย่างใบพืชที่ใช้ในการวิจัยความหลากหลายและนิเวศวิทยาของยีสต์เอนโดไฟต์และยีสต์อีพิไฟต์ด้วยวิธีที่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธีที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อนั้น เก็บจากพื้นที่เพาะปลูกในภาคกลางและตะวันออกเฉียงเหนือระหว่างตุลาคม 2554 ถึงเมษายน 2555 ประกอบด้วยใบข้าว 100 ตัวอย่าง จาก 11 จังหวัด ใบอ้อย 102 ตัวอย่าง จาก 13 จังหวัด และใบข้าวโพด 109 จาก 12 จังหวัด จากตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์จากใบข้าว อ้อย และข้าวโพดนั้น พบว่าในเนื้อเยื่อและผิวด้านนอกของใบพืชทั้ง 3 ชนิดมีทั้งยีสต์ แบคทีเรีย และรา โดยมีจำนวนผันแปรค่อนข้างสูง

การศึกษาความหลากหลายของยีสต์เอนโดไฟต์ด้วยการแยกยีสต์จากเนื้อเยื่อที่กำจัดเชื้อที่ผิวด้านนอกของใบข้าว อ้อย และข้าวโพด จำนวน 100, 102 และ 109 ตัวอย่าง ได้ยีสต์ 125, 149 และ 143 สายพันธุ์ ตามลำดับ จากการจัดจำแนกโดยอาศยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและไฟโลจีนีพบว่ายีสต์เอนโดไฟต์จากใบข้าว 117 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์ที่รู้จักแล้ว (known species) 23 สปีชีส์ ใน 12 สกุล ประกอบด้วย 90 สายพันธุ์ (76.9%) ในไฟลัมแอสโคไมซีตา 7 สกุล และ 27 สายพันธุ์ (23.1%) ในไฟลัมแอสโคไมซีตา 5 สกุล มี 1 สายพันธุ์เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 1 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 3 สายพันธุ์เป็นยีสต์สกุลและสปีชีส์ใหม่ และสายพันธุ์ที่เหลือเป็นรา ส่วนเอนโดไฟต์จากใบอ้อยพบว่า 100 สายพันธุ์เป็น 29 สปีชีส์ที่รู้จักแล้ว โดย 65 สายพันธุ์ (65.0%) อยู่ในแอสโคไมซีตา (10 สกุล) มี 35 สายพันธุ์ (35.0%) อยู่ในแอสโคไมซีตา (4 สกุล) ส่วน 21 สายพันธุ์เหมือนกับ 10 สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย และสายพันธุ์ที่เหลือเป็นรา สำหรับยีสต์เอนโดไฟต์จากใบข้าวโพดนั้น 120 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์ที่รู้จักแล้ว 37 สปีชีส์ โดย 90 สายพันธุ์ (75.0%) อยู่ในแอสโคไมซีตา (7 สกุล) และ 30 สายพันธุ์ (25.0%) อยู่ในแอสโคไมซีตา (5 สกุล) ส่วน 1 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ มี 3 สายพันธุ์เหมือนกับ 3 สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย และที่เหลือเป็นรา ยีสต์เอนโดไฟต์ที่พบบ่อยที่สุดในเนื้อเยื่อใบข้าว อ้อย และข้าวโพด คือ *Pseudozyma aphidis*, *Meyerozyma caribbica* และ *Pseudozyma churashimaensis* โดยมีความถี่ของการปรากฏ (frequency of occurrence) 25.0, 17.6 และ 20.0% ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาความหลากหลายของยีสต์อีพิไฟต์จากผิวใบด้วยการเพาะเชื้อจากน้ำล้างใบในงานเพาะเชื้อ พบว่าในกรณีของผิวใบข้าว 112 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 379 สายพันธุ์ เมื่อนำ 354 สายพันธุ์มาจัดจำแนก พบว่า 302 สายพันธุ์เป็นยีสต์ที่รู้จักแล้วถึง 50 สปีชีส์ ใน 18 สกุล โดย 246 สายพันธุ์ (81.5%) อยู่ในแอสโคไมซีตา 10 สกุล ส่วนอีก 56 สายพันธุ์ (18.5%) อยู่ในแอสโคไมซีตา 9 สกุล มี 21 สายพันธุ์เหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 14 สปีชีส์ ใน 4 สกุล พบ 31 สายพันธุ์ที่คาดว่าจะเป็ยีสต์สปีชีส์ใหม่ 20 สปีชีส์ ใน 8 สกุล สำหรับยีสต์อีพิไฟต์จากผิวใบอ้อย แยกยีสต์ 173 สายพันธุ์จากใบอ้อย 84 ตัวอย่าง พบว่า 87 สายพันธุ์ เป็นยีสต์สปีชีส์ที่รู้จักแล้ว โดย 61 สายพันธุ์ (35.3%) เป็นยีสต์ 24 สปีชีส์ 10 สกุล ในแอสโคไมซีตา มี 26 สายพันธุ์ (15%) เป็นยีสต์ 12 สปีชีส์ 3 สกุล ในแอสโคไมซีตา ส่วนอีก 67 สายพันธุ์อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่หรือสปีชีส์ที่รู้จักแล้วซึ่งต้องตรวจสอบเพิ่มเติม มี 20 สายพันธุ์ที่เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 12 สปีชีส์ สำหรับยีสต์อีพิไฟต์จากผิวใบข้าวโพด แยกยีสต์ได้ 284 สายพันธุ์จาก 109 ตัวอย่าง เมื่อจัดจำแนก 244 สายพันธุ์ พบว่า 151 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์ที่

รู้จักแล้ว 43 สปีชีส์ ใน 15 สกุล โดย 130 สายพันธุ์ (86.1%) อยู่ในแบล็คโอสมัยตา 10 สกุล ส่วน 21 สายพันธุ์ (13.9%) อยู่ในแอสโคมัยโคตา 5 สกุล อีก 18 สายพันธุ์เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 3 สกุล นอกจากนั้น มี

21

สายพันธุ์ที่คาดว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 16 สปีชีส์ และสายพันธุ์ที่เหลืพบว่าเป็นรา ในขณะที่การศึกษาความหลากหลายของยีสต์อ์ไฟต์ในผิวใบข้าว ใบข้าวโพด และใบอ้อย ด้วยการแยกยีสต์โดย enrichment technique จากตัวอย่างใบพืชรวม 244 ตัวอย่าง ได้ยีสต์จากใบข้าว อ้อย และข้าวโพด 156, 126 และ 159 สายพันธุ์ตามลำดับ เมื่อจัดจำแนก พบว่ายีสต์จากใบข้าว 155 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์ที่รู้จักแล้ว โดย 99 สายพันธุ์ (63.9%) เป็น 23 สปีชีส์ใน 13 สกุล ในแอสโคมัยโคตา ส่วน 56 สายพันธุ์ (36.1%) เป็น 8 สปีชีส์ 5 สกุล ในแบล็คโอสมัยโคตา ยีสต์จากใบอ้อย 146 สายพันธุ์ เป็น 23 สปีชีส์ 13 สกุล ในแอสโคมัยโคตา ในขณะที่ 46 สายพันธุ์ (31.7%) อยู่ในแบล็คโอสมัยโคตา 12 สปีชีส์ใน 6 สกุล ส่วนอีก 8 สายพันธุ์เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายและ 9 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 6 สปีชีส์ และยีสต์จากใบข้าวโพด 123 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์ที่รู้จักแล้ว โดย 81 สายพันธุ์ (65.9%) เป็น 28 สปีชีส์ 12 สกุลแอสโคมัยโคตา มี 42 สายพันธุ์ (34.1%) เป็น 10 สปีชีส์ ใน 5 สกุล ในแบล็คโอสมัยโคตา สำหรับยีสต์อ์ไฟต์ที่พบบ่อยที่สุดบนผิวใบข้าว อ้อย และข้าวโพด เมื่อแยกยีสต์ด้วยการเพาะเชื้อจากน้ำล้างใบในจานเพาะเชื้อ คือ *Pseudozyma antarctica*, *Meyerozyma caribbica* และ *Sporidiobolus pararoseus* โดยมีความถี่ที่ปรากฏ 21.8, 20.2 และ 11.3% ตามลำดับ โดย *M. caribbica* ที่พบบ่อยที่สุดในผิวใบอ้อยนี้เป็นสปีชีส์เดียวกับที่พบเมื่อแยกเชื้อโดย enrichment technique ซึ่งมีความถี่ที่ปรากฏ 12.0% ในขณะที่เมื่อแยกเชื้อโดย enrichment technique ที่สปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุดผิวใบข้าว คือ *Rhodotorula taiwanensis* (14.3%) ส่วนผิวใบข้าวโพดพบ *Kodamaea ohmeri*, *M. caribbica* และ *R. taiwanensis* โดยมีความถี่ที่ปรากฏ 7.9%

จากผลการวิจัยความหลากหลายของยีสต์เอนโดไฟต์และยีสต์อ์ไฟต์ที่ใบข้าว อ้อย และข้าวโพด โดยใช้วิธีที่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยตรงจากน้ำล้างใบว่าพบแบล็คโอสมัยซีสต์มากกว่าแอสโคมัยซีสต์ ซึ่งเหมือนกับที่รายงานในประเทศในเขตอบอุ่นของโลก อย่างไรก็ตามถ้าการแยกยีสต์ทำโดยใช้ enrichment technique ยีสต์ที่พบมากกว่ากลับเป็นแอสโคมัยซีสต์ ดังนั้นวิธีการที่ใช้แยกยีสต์มีผลต่อชนิดของยีสต์ที่ตรวจพบ นอกจากนั้นในการวิจัยครั้งนี้ได้พบและรายงานยีสต์สกุลใหม่ 1 สกุล คือ *Diutina* และสปีชีส์ใหม่ 15 สปีชีส์ประกอบด้วยสปีชีส์ในไฟลัมแบล็คโอสมัยโคตา คือ *Hannaella phyllophylla*, *Hannaella phetchabunensis*, *Hannaella siamensis*, *Occultifur tropicalis*, *Papiliotrema siamensis* และ *Pseudozyma vetiver* และสปีชีส์ในไฟลัมแอสโคมัยโคตา คือ *Diutina siamensis*, *Metschnikowia saccharicola*, *Metschnikowia lopburiensis*, *Nakazawaea siamensis*, *Wicherhamomyces siamensis*, *Wickerhamiella siamensis*, *Yamadazyma epiphylla*, *Yamadazyma phyllophylla* และ *Yamadazyma siamensis* โดยยังอยู่ในระหว่างการศึกษเพื่อเสนอเป็นสปีชีส์ใหม่อีกหลายสปีชีส์

การศึกษาความหลากหลายของยีสต์เอนโดไฟต์และยีสต์อ์ไฟต์ในใบพืชด้วยวิธีที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ large subunit rDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR และสร้าง D1/D2 library คัดเลือกโคลน (clone) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ที่แตกต่างกันในแต่ละ library ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ *HaeIII*, *HinfI* และ *CfoI* และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อระบุชนิดและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สำหรับยีสต์เอนโดไฟต์ในเนื้อเยื่อใบข้าว 46 ตัวอย่าง พบโคลนของยีสต์ 101 โคลน (5.5%) จากทั้งหมด 1,826 โคลน และจัดจำแนก phylotype ที่เป็นของยีสต์ที่รู้จักแล้ว 5 สปีชีส์ใน 4 สกุล (43.6%) คือ *Cryptococcus victoriae*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces vindobonensis*, *Meyerozyma guilliermondii* และ *Pseudozyma antarctica* และพบ phylotype ของยีสต์ที่อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 17 phylotype ที่มีความใกล้เคียงกับ *Candida metapsilosis*, *Cryptococcus foliicola*, *Cryptococcus laurentii*, *Pseudozyma abaconensis*, *Pseudozyma aphidis* และ *Trichosporon asahii* ส่วนในใบอ้อย 29 ตัวอย่าง พบโคลนของยีสต์ 224 โคลน (19.8%) จาก 1,144 โคลน และจัดจำแนก phylotype ที่เป็นของยีสต์ที่รู้จักแล้ว 3 สปีชีส์ใน 3 สกุล (76.3%) คือ *Candida palmioleophila*, *D.*

hansenii และ *Kodamaea ohmeri* และพบ phylotype ของยีสต์ที่อาจเป็นสปีชีส์ใหม่ 10 phylotype ที่ใกล้เคียงกับ 7 สปีชีส์ สำหรับเนื้อเยื่อใบข้าวโพด 35 ตัวอย่าง พบยีสต์ 285 โคลน (24.4%) จาก 1,166 โคลน และจัดจำแนก phylotype ที่เป็นของยีสต์ที่รู้จักแล้ว 6 สปีชีส์ใน 6 สกุล (33.0%) คือ *Hannaella sinensis*, *Mal. restricta*, *Pseudozyma parantarctica*, *Rhodotorula taiwanensis*, *T. asahii* และ *Yarrowia deformans* และพบ phylotype ของยีสต์ที่อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 26 phylotype ที่ใกล้เคียงกับ 5 สปีชีส์ โดย phylotype ที่พบบ่อยที่สุดในเนื้อเยื่อใบข้าว อ้อย และข้าวโพด ได้แก่ phylotype ที่มีความใกล้เคียงกับ *Cryp. foliicola* (47.5%), phylotype ของ *K. ohmeri* (43.8%) และ phylotype ที่มีความใกล้เคียงกับ *T. faecale* (30.1%) ตามลำดับ และยังพบ phylotype ของยีสต์ที่อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่มากถึง 56.4%, 32.6% และ 69.2% ของ phylotype ของยีสต์ทั้งหมดในตัวอย่างใบข้าว อ้อย และข้าวโพด ตามลำดับ ส่วนของยีสต์อีฟไฟต์จากใบข้าว (44 ตัวอย่าง) พบโคลนของยีสต์ 451 โคลน (40.2%) จาก 1,121 โคลน โดย 329 โคลน (72.9%) จัดจำแนกได้เป็นยีสต์ที่รู้จักแล้ว 9 สปีชีส์ ใน 6 สกุล คือ *Bullera japonica*, *Metschnikowia koreensis*, *Mey. guilliermondii*, *P. antarctica*, *P. aphidis*, *Sporobolomyces blumeae*, *Sporobolomyces carnicolor*, *Sporobolomyces oryzae* และ *Wickerhamomyces anomalus* สำหรับผิวด้านนอกของใบอ้อย (45 ตัวอย่าง) พบยีสต์ 426 โคลน (31.7%) จาก 1,342 โคลน โดย phylotype ส่วนใหญ่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ (410 โคลน) โดยใกล้เคียงกับยีสต์ 11 สปีชีส์ ใน 7 สกุล ได้แก่ *Cryp. flavus*, *Hannaella coprosmaensis*, *R. taiwanensis*, *Jaminala angkorensis*, *Mal. restricta*, *P. antarctica*, *P. aphidis*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Pseudozyma prolifica*, *Pseudozyma shanxiensis* และ *Sp. vermiculatus* โดยยีสต์ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Pseudozyma* สำหรับยีสต์บนผิวใบข้าวโพด (37 ตัวอย่าง) พบยีสต์ 357 โคลน (34.0%) จาก 1,049 โคลน ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่รู้จักแล้ว 12 สปีชีส์ ใน 7 สกุล จาก 98 โคลน (27.5%) ได้แก่ *Bullera derxii*, *Bullera oryzae*, *Cryptococcus flavescens*, *H. sinensis*, *J. angkorensis*, *P. antarctica*, *P. aphidis*, *P. hubeiensis*, *P. prolifica*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Sp. carnicolor* และ *Sporobolomyces odoratus* ที่เหลือส่วนใหญ่ใกล้เคียงกับยีสต์ในสกุล *Pseudozyma* เป็นที่น่าสนใจว่า phylotype ที่พบบนผิวใบพืชทั้ง 3 ชนิดส่วนใหญ่มีความใกล้เคียงกับยีสต์ในไฟลัมเบสิดิโอไมยโคตา และไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ใด ดังนั้นจึงอาจเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์สปีชีส์ใหม่ ยีสต์อีฟไฟต์สปีชีส์ที่ศึกษาโดยใช้วิธีที่ไม่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อที่พบบ่อยที่สุดในผิวใบข้าว คือ *P. antarctica* ด้วยความถี่ที่ปรากฏ 63.6% ส่วนในผิวใบอ้อยยีสต์ที่พบบ่อยอยู่ในสกุล *Pseudozyma* และในผิวใบข้าวโพดสปีชีส์ที่พบบ่อยใกล้เคียงกัน คือ *P. hubeiensis* และ *P. antarctica* ด้วยความถี่ที่ปรากฏ 24.3 และ 21.6% ตามลำดับ

การคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อการผลิตกรดอินโดล-3-แอซิดิก (IAA) จากยีสต์อีฟไฟต์และยีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกจากใบข้าว อ้อย และข้าวโพด และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิต IAA โดยวิธีศึกษาที่ละเอียดและพื้นผิวตอบสนอง รวมทั้งการศึกษาชีววิถีสังเคราะห์ IAA จากยีสต์จำนวนทั้งสิ้น 1,388 สายพันธุ์ ที่แยกจากใบข้าวจำนวน 430 สายพันธุ์ จากใบอ้อยจำนวน 605 สายพันธุ์ และจากใบข้าวโพดจำนวน 353 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหาร yeast extract peptone dextrose (YPD) broth ที่เติมแอล-ทริปโตเฟน 0.1% วิเคราะห์ปริมาณ IAA โดย colorimetric method และ HPLC พบยีสต์ 2 สายพันธุ์ สกุล *Rhodospiridium* ที่สามารถผลิต IAA ได้สูง คือ *Rh. fluviale* DMKU-CP293 ที่แยกจากผิวใบข้าวโพด และ *Rh. paludigenum* DMKU-RP301 ที่แยกจากผิวใบข้าว โดยผลิต IAA ได้เท่ากับ 141.5 และ 321.7 mg/L ตามลำดับ โดยคิดเป็น 31.9 และ 29.3 mg/g dry cell weight ตามลำดับ หลังจากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิต IAA ในฟลาสก์โดยวิธีศึกษาที่ละเอียดพบว่า *R. fluviale* DMKU-CP293 และ *Rh. paludigenum* DMKU-RP301 ผลิต IAA ได้สูงขึ้นเป็น 1,559.4 และ 1,464.7 mg/L ตามลำดับ ขณะที่เมื่อใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองโดยใช้แผนการทดลอง Box-Benhken สำหรับออกแบบการทดลอง พบว่า *Rh. fluviale* DMKU-CP293 และ *Rh. paludigenum* DMKU-RP301 ผลิต IAA ได้สูงขึ้นเป็น 2,420.2 และ 1,623.9 mg/L ตามลำดับ จากการปรับปรุงการผลิต IAA ในปริมาณที่ใหญ่มากขึ้นโดยใช้ถังหมัก พบว่า *Rh. fluviale* DMKU-CP293 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดเท่ากับ 8,930.0 mg/L โดยการหมักแบบแบตช์ในถังหมัก

ขนาด 5 ลิตร และ *Rh. paludigenum* DMKU-RP301 ผลิต IAA ได้สูงสุดเท่ากับ 2,707.9 mg/L โดยการหมักแบบ เฟด-แบตช์ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เมื่อนำส่วนใสหลังจากการผลิต IAA ของ *R. paludigenum* DMKU-RP301 มา วิเคราะห์หาสารสื่อกลางของชีววิถีสังเคราะห์โดย gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) และ HPLC พบ indole-3-pyruvic acid, indole-3-lactic acid และ indole-3-ethanol ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบ กิจกรรมเอนไซม์ tryptophan aminotransferase ดังนั้นแสดงให้เห็นว่ายีสต์ *R. paludigenum* DMKU-RP301 ผลิต IAA ผ่านทางวิถีกรดอินโดล-3-ไพรูวิก นอกจากการผลิตกรด IAA พบว่ายีสต์ *R. paludigenum* DMKU-RP301 ยังผลิตแอมโมเนีย, คาตาเลส (catalase) และไซเดอโรฟอร์ (siderophore) ซึ่งเป็นลักษณะที่สนับสนุนการเจริญของ พืชทั้งทางตรงและทางอ้อม

จากการประเมินและคัดเลือกยีสต์เอนโดไฟต์และยีสต์อีพิไฟต์ที่แยกได้มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจทั้ง 3 ชนิด รวม 10 สายพันธุ์ ประกอบด้วยราโรคข้าว (*Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium oryzae* และ *Rhizoctonia solani*) ราโรคข้าวโพด (*Bipolaris maydis*, *Bipolaris zeicola*, *Exserohilum turcicum*, *F. moniliforme* และ *Macrophomina phaseolina*) และราโรคอ้อย (*Colletotrichum falcatum* และ *F. moniliforme*) พบว่าเมื่อตรวจการยับยั้งราโรคพืชของยีสต์เอนโดไฟต์ 417 สายพันธุ์ พบว่ามียีสต์เพียง 11 สายพันธุ์ที่ยับยั้งราโรคพืชได้ ประกอบด้วย *Wickerhamomyces anomalus* 7 สายพันธุ์ และ *Kodamaea ohmeri* 4 สายพันธุ์ จากการศึกษาการยับยั้งราโรคพืชของยีสต์อีพิไฟต์ พบว่ายีสต์จาก ผักไผ่อ้อย 173 สายพันธุ์ มีเพียง 4 สายพันธุ์ที่ยับยั้งการเจริญของราโรคพืชได้ คือ *Pap. siamense* DMKU-SP85^T, *Candida* sp. DMKU-SP81, *P. alboarmeniaca* DMKU-SP290 และ *K. ohmeri* DMKU-SP45 ในขณะที่ ยีสต์อีพิไฟต์จากผักรวมข้าวและข้าวโพด 221 สายพันธุ์ พบว่ามี 37 สายพันธุ์ ใน 17 สปีชีส์ 12 สกุลที่ยับยั้งราโรคพืช ได้ในจานเพาะเชื้อ โดย *Torulaspora globosa* DMKU-RP31 และ *T. globosa* DMKU-RP35 ยับยั้งราสาเหตุโรค พืชได้ 8 ชนิด *Wickerhamomyces anomalus* DMKU-RP04 ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ 7 ชนิด *K. ohmeri* DMKU-RP06 และ *W. anomalus* DMKU-RP25 ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ 5 ชนิด ยีสต์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *W. anomalus* DMKU-CP122W, *W. anomalus* DMKU-CP127 และ *K. ohmeri* DMKU-RP34 ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ 4 ชนิด แต่ละสายพันธุ์ ของยีสต์ที่เหลืดยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้น้อยกว่า 4 ชนิด จากการทดลองนี้ยีสต์ปฏิบัติทั้ง 37 สายพันธุ์พบว่า *Candida floricola* DMKU-CP149, *Hanseniaspora guilliermondii* DMKU-CP295, *C. floricola* DMKU-CP367, *Bullera sinensis* DMKU-CP437, *W. anomalus* DMKU-RP04, *W. anomalus* DMKU-RP25, *T. globosa* DMKU-RP31, *K. ohmeri* DMKU-RP34 และ *T. globosa* DMKU-RP35 ยับยั้งราโรค พืชสูงกว่า 50% จากการศึกษาทั่วโลกควบคุมราโรคพืชของยีสต์ทั้ง 37 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ พบมียีสต์ที่ผลิตไซเดอโรฟอร์ได้ 8 สายพันธุ์ มียีสต์ที่ผลิตสารระเหยเพื่อยับยั้ง *R. solani* 7 สายพันธุ์ โดยยับยั้งได้ 57.0-73.9% มียีสต์ 33 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูคาเนสได้ในช่วง 0.5-42 mU/ และ 21 สายพันธุ์ที่ผลิตโคตินเนสในช่วง 2-249 mU/ml ความสามารถในการแข่งขันใช้สารอาหารและพื้นที่พบว่ายีสต์ 12 สายพันธุ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชสูงเมื่อมี ธาตุอาหารความเข้มข้นต่ำลง จากการทดสอบการควบคุมโรคกาบใบแห้ง (*R. solani*) ในเรือนทดลองโดยยีสต์ ปฏิบัติ 7 สายพันธุ์ (*B. sinensis* DMKU-CP437, *C. floricola* DMKU-CP149, *C. floricola* DMKU-CP367, *H. guilliermondii* DMKU-CP295, *W. anomalus* DMKU-RP25, *T. globosa* DMKU-RP31 และ *T. globosa* DMKU-RP35) พบว่าการฟั่นเซลล์แขวนลอยของยีสต์ *H. guilliermondii* DMKU-CP295 กัดการเกิดโรคกาบใบแห้ง ในข้าวได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยกัดการเกิดโรคสูงกว่า 65%

Abstract

This research project aims to investigate and analyze the diversity and ecology of endophytic and epiphytic yeasts from leaves of rice, sugarcane and corn by culture-dependent and culture-independent methods, to produce indole-3-acetic acid (IAA) by the selected promising yeast strain obtain from the screening of endophytic and epiphytic yeasts, and elucidate the biosynthetic pathway of IAA and to evaluate the efficiency to be biological control agents for rice, sugarcane and corn pathogenic fungi of endophytic and epiphytic yeasts.

To understand the diversity and ecology of endophytic and epiphytic yeasts leaves of healthy agronomic crops (rice, sugarcane and corn) were collected from their cultivation fields in the central and north-eastern parts during October 2011 to April 2012. The sample consisted of 100 rice leaf samples collected from 11 provinces, 102 sugarcane leaf samples collected from 13 provinces and 109 sugarcane leaf samples collected from 12 provinces. The number of yeasts, bacteria and fungi from leaf samples was found to vary among the samples.

Study on the endophytic yeast diversity based on culture-dependent method yeasts was carried out by isolation of yeast from the surface-sterilized leaves tissue. From 100, 102 and 109 samples of rice, sugarcane and corn leaf we obtained 125, 149 and 143 yeast strains, respectively. Identification of yeast was based on molecular taxonomy and genetic analysis revealed that 117 yeast strains from rice leaf samples were 23 known species in 12 genera. Ninety 90 strains (76.9%) were in phylum Basidiomycota (7 genera) and 27 strains (23.1%) in the phylum Ascomycota

(5 genera). One strain was identical with one undescribed species, three strains represented a novel genus and species, whereas the other strains were fungi. Of endophytic yeasts from sugarcane leaf, 100 strains were known yeast species. A total of 65 strains (65.0%) were in Basidiomycota (10 genera). Thirty-five strains were in Ascomycota (4 genera). Six strains were found to represent two novel yeast species while 21 strains were fungi. A total of 120 strains obtained from corn leaves were 37 known yeast species. Among these 90 strains (75.0%) were in Basidiomycota (7 genera) and 30 strains (25.0%) were in Ascomycota (5 genera). One strain was a new species, three strains were identical with three undescribed species and the other were fungi. The most prevalent species of endophytic yeasts from rice, sugarcane and corn leaves were *Pseudozyma aphidis*, *Meyerozyma caribbica* and *Pseudozyma churashimaensis* with 25.0, 17.6 and 20.0% frequency of occurrence, respectively.

To investigate the diversity of epiphytic yeasts in the surface of rice, sugarcane and corn leaved by culture-dependent method, yeasts were isolated from leaf surface by plating of leaf washing. A total of 379 strains were isolated from 112 rice leaf samples and 354 strains were identified. The result revealed that 302 strains were 50 known species in 18 genera. Two hundred and forty six strains (81.5%) were in Basidiomycota (10 genera) and 55 strains were in Ascomycota (9 genera). Twenty one strains were identical with 14 undescribed species in four genera. As many as 31 strains were expected to be 20 new yeast species in 8 genera. A total of 173 strains were obtained from the surface of 84 sugarcane leaf samples. Eighty seven strains were known yeast

species. Sixty one strains (35.3%) were 24 species in Basidiomycota (10 genera) and 26 strains (15%) were 12 species in genera in Ascomycota. The other 67 strains may be new or known yeast species that need more analysis. As many as 20 strains were found to represent 12 new yeast species. From the surface of corn leaves (109 samples) 284 strains were obtained and 244 strains were identified. One hundred and fifty one strains were 43 known species in 15 genera. A total of 130 strains (86.1%) were in Basidiomycota (10 genera) and 21 strains (13.9%) were in Ascomycota (5 genera). Eighteen strains were identical with undescribed yeast species in 3 genera and 21 strains were expected to be 16 new yeast species, while the other strains were fungi. Investigation of epiphytic yeasts in the surface of 244 leaf samples by using an enrichment isolation technique revealed that 156, 126 and 159 strains were obtained from rice, sugarcane and corn leaf samples, respectively.

Identification of epiphytic yeasts from rice leaf samples showed that 155 strains were known yeast species. Among the known species 99 strains (63.9%) were 23 species of 13 genera in Ascomycota. Fifty six strains (36.1%) were 8 species of 5 genera in Basidiomycota. One hundred and forty six strains of epiphytic yeast from the surface of sugarcane leaves were 23 species of 13 genera in Ascomycota and 46 strains (31.7%) were 12 species of 6 genera in Basidiomycota. The other eight strains were identical with undescribed species and nine strains were six new species. Epiphytic strains (123 strains) from the surface of corn leaves were known yeast species. Eighty one 81 strains (65.9%) were 28 species of 12 genera in Ascomycota and 42 strains (34.1%) were 10 species of 5 genera in Basidiomycota. The most prevalent species in the surface of rice, sugarcane and corn leaves, which were isolated by plating of leaf washing, were *Pseudozyma antarctica*, *Meyerozyma caribbica* and *Sporidiobolus pararoseus* at 21.8, 20.2 and 11.3% frequency of occurrence, respectively. *M. caribbica*, which was the most prevalent species in the surface of sugarcane leaf when plating of leaf washing was used, was also be the most prevalent species (12.0%) in the surface of sugarcane leaf when enrichment isolation technique was used. By using the enrichment isolation technique, the most prevalent species in the surface of rice leaf was *Rhodotorula taiwanensis* (14.3%) while *Kodamaea ohmeri* and *Meyerozyma caribbica* and *Rhodotorula taiwanensis* occurred in the surface of corn leaf at the same frequency of 7.9%.

The result of investigation of endophytic and epiphytic yeasts diversity by using culture-dependent method revealed higher number of basidiomycetous yeasts than ascomycetous yeasts were obtained same as that were reported in the other countries and areas. However, when enrichment isolation technique was used higher number of ascomycetous yeasts than basidiomycetous yeasts were detected. Therefore, our results indicated the influence of isolation methods on the obtained yeast species. Besides, one new genus viz. *Diutina* and 15 new yeast species were proposed viz. *Hannaella phyllophyla*, *Hannaella phetchabunensis*, *Hannaella siamensis*, *Occultifur tropicalis*, *Papiliotrema siamensis* and *Pseudozyma vetiver* in the phylum Basidiomycota, and *Diutina siamensis*, *Metschnikowia saccharicola*, *Metschnikowia lopburiensis*, *Nakazawaea siamensis*, *Wickerhamomyces siamensis*, *Wickerhamiella siamensis*, *Yamadazyma epiphylla*, *Yamadazyma phyllophila* and *Yamadazyma siamensis* in the phylum Ascomycota.

Moreover, various new yeast species are under characterization and will be proposed in the near future.

A culture-independent method was used to examine endophytic and epiphytic yeasts associated with rice, sugarcane and corn leaves based on PCR amplification of the D1/D2 domain of the large subunit rRNA gene, construction of D1/D2 libraries, PCR-RFLP using a single digestion with *Hae*III, *Hin*fl and *Cfo*I, sequencing and phylogenetic analysis. For the investigation of endophytic yeasts in rice, sugarcane and corn leaves, the results showed that 101 (5.5%) out of 1,826 clones from 46 rice leaf samples were yeasts. Of total yeast related phylotypes, 44 phylotypes (43.6%) were five known species in four genera viz. *Cryptococcus victoriae*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces vindobonensis*, *Meyerozyma guilliermondii* and *Pseudozyma antarctica*, together with 17 new phylotypes closest to six species. For sugarcane, 224 (19.8%) out of 1,144 clones from 29 samples were yeasts. Of total yeast related phylotypes, 171 phylotypes (76.3%) were three known species in three genera viz. *Candida palmioleophila*, *D. hansenii* and *K. ohmeri*, together with 10 new phylotypes closest seven species. In case of corn leaves, 285 (24.4%) out of 1,166 clones from 29 samples were yeasts. Of total yeast related phylotypes, 94 phylotypes (33.0%) were identified as six known species in six genera including *Hannaella sinensis*, *Mal. restricta*, *Pseudozyma parantarctica*, *Rhodotorula taiwanensis*, *T. asahii* and *Yarrowia lipolytica*, together with 26 new phylotypes closest five species. The most prevalent phylotypes in tissue of rice, sugarcane and corn leaves were new phylotypes closest to *Cryp. foliicola*, phylotypes identified as *K. ohmeri* and new phylotypes closest to *T. faecale*, respectively. Moreover, the new phylotypes were found at high frequency as 56.4%, 32.6% and 69.2% in rice, sugarcane and corn leaves, respectively.

The epiphytic yeast diversity in the leaf surface of three economic crop were also investigated by culture-independent method. For rice leaf samples (n=44), of total 1,121 clones, 451 clones (40.2%) were yeasts. Of total yeast related clones, 329 clones (72.9%) were 9 known yeast species in 6 genera viz. *Bullera japonica*, *Metschnikowia koreensis*, *Mey. guilliermondii*, *P. antarctica*, *P. aphidis*, *Sporobolomyces blumeae*, *Sporobolomyces carnicolor*, *Sporobolomyces oryzicola* and *Wickerhamomyces anomalus*. For sugarcane leaf samples (n=45), of total 1,342 clones, 426 clones (31.7%) were yeasts. Nevertheless, the majority of yeast related sequences (410 clones) were unable to be identified as known yeasts species. These were closest to 11 yeast species in seven genera viz. *Cryp. flavus*, *Hannaella coprosmaensis*, *R. taiwanensis*, *Jaminaea angkorensis*, *Mal. restricta*, *P. antarctica*, *P. aphidis*, *P. hubeiensis*, *P. prolifica*, *P. shanxiensis* and *Sp. vermiculatus*. In case of corn phyllosphere samples (n=37), of total 1,049 clones, 357 clones (34.0%) were yeasts. Of total yeast related clones, 98 clones (27.5%) were 12 known yeast species in seven genera including *B. dextrii*, *B. oryzae*, *Cryp. flavescens*, *H. sinensis*, *J. angkorensis*, *P. antarctica*, *P. aphidis*, *P. hubeiensis*, *P. prolifica*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Sp. carnicolor* and *Sporobolomyces odoratus*. The majority of yeast related sequences were closest to yeasts in genus *Pseudozyma*. Interestingly, most of the phylotypes detected in all three leaf samples were identified as yeasts in phylum Basidiomycota and were unable to identify as known yeast species, implying the representative phylotypes of the new yeast taxa. The most prevalent

yeast species in the surface of rice leaf was *P. antarctica* with 63.6% frequency of occurrence. The most prevalent genus in the surface of sugarcane leaf was *Pseudozyma*. *P. hubeiensis* and *P. antarctica* were most prevalent species in the surface corn leaf samples with 24.3% and 21.6% frequency of occurrence.

Selection of potential yeast for indole-3-acetic acid (IAA) production was carried out in epiphytic yeasts and endophytic yeasts isolated from rice leaves, sugar cane leaves and corn leaves. Optimization of IAA production by the selected yeast strains was performed using one factor at a time (OFAT) as well as response surface methodology (RSM) experimental designs. IAA biosynthetic pathway of the selected yeast isolate was also investigated. A total of 1,388 yeasts isolated from rice leaves (430 strains), sugar cane leaves (605 strains) and corn leaves (353 strains) were subjected to screening for high IAA producing yeast in yeast extract peptone dextrose (YPD) broth supplemented with 0.1% tryptophan. IAA assay was performed by colorimetric method and high-performance liquid chromatography (HPLC). As a result, two yeast strains i.e. corn phylloplane yeast *Rhodospiridium fluviale* DMKU-CP293 and rice phylloplane yeast *R. paludigenum* DMKU-RP301 were found as high IAA producers by producing 141.5 and 321.7 mg IAA/L which corresponding to 31.9 and 29.3 mg IAA/g dry cell weight respectively. Optimization of IAA production in flasks by the selected yeasts using one factor at a time (OFAT) revealed that *R. fluviale* DMKU-CP293 and *R. paludigenum* DMKU-RP301 produced 1,559.4 and 1,464.7 mg IAA/L, respectively. Respond Surface Methodology (RSM) was used to improve IAA production and Box-Benhken experimental design was employed. Results indicated that *R. fluviale* DMKU-CP293 and *R. paludigenum* DMKU-RP301 improved their IAA production to 2,420.2 and 1,623.9 mg/L, respectively. The production of IAA in batch cultivation was then scaled up in a 5-l fermenter for *R. fluviale* DMKU-CP293 and the maximum IAA of 8,930.0 mg/L was obtained whereas 2-l stirred tank fermenter was used for fed-batch cultivation of *R. paludigenum* DMKU-RP301 and the maximum IAA of 2,707.9 mg/l was obtained. To investigate on IAA biosynthetic pathway, culture broth of *R. paludigenum* DMKU-RP301 was analysed by both gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and HPLC. Indole-3-pyruvic acid, indole-3-lactic acid and indole-3-ethanol were detected in the culture broth as well as tryptophan aminotransferase activity. This therefore indicates that the yeast *R. paludigenum* DMKU-RP301 produced IAA via Indole-3-pyruvic acid pathway. In addition to IAA production, *R. paludigenum* DMKU-RP301 also showed the production of ammonia, siderophore and catalase which are both direct and indirect plant growth promoting characters.

To evaluate the efficiency of endophytic and epiphytic yeasts to be biological control agent rice, sugarcane and corn pathogenic fungi. Ten plant pathogenic fungi (PPF) including rice pathogenic fungi (*Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium oryzae* and *Rhizoctonia solani*), corn pathogenic fungi (*Bipolaris maydis*, *Bipolaris zeicola*, *Exserohilum turcicum*, *Fusarium moniliforme* and *Macrophomina phaseolina*) and sugarcane pathogenic fungi (*Colletotrichum falcatum* and *Fusarium moniliforme*) were used. By dual cultivation of 417 endophytic yeast strains and 10 PPF only 11 strains in two species (*Wickerhamomyces anomalus* and *Kodamaea ohmeri*) showed inhibition on photogenic fungi. Determination of antagonistic activity of 173 epiphytic yeast strains against 10 PPF revealed that only four yeast strains viz. *Pap. siamense* DMKU-SP85^T, *K. ohmeri*

DMKU-SP45, *Candida* sp. DMKU-SP81 and *P. alboarmeniaca* DMKU-SP290 inhibited growth of some PPF with various percentages of inhibition. The four antagonistic yeast strains produced siderophore and two enzymes (β -glucanase and chitinase). *P. alboarmeniaca* DMKU-SP290 produced volatile compounds and inhibited growth of pathogenic fungi by competition of nutrients. *Candida* sp. DMKU-SP81 and *K. ohmeri* DMKU-SP45 produced the highest β -glucanase and chitinase, respectively. A total of 221 epiphytic yeast strains from the surface of rice and corn leaves were determined for their antagonistic activity and 37 strains of 17 species in 12 genera inhibited growth of PPF. Among these *Torulaspora globosa* DMKU-RP31 and *T. globosa* DMKU-RP35 inhibited 8 PPF, *W. anomalus* DMKU-RP04 inhibited 7 PPF, *K. ohmeri* DMKU-RP06 and *W. anomalus* DMKU-RP25 inhibited 5 PPF, *W. anomalus* DMKU-CP122, *W. anomalus* DMKU-CP127 and *K. ohmeri* DMKU-RP34 inhibited 4 PPF and the others inhibited less than 4 PPF. Considering of inhibition, *Candida floricola* DMKU-CP149, *Hanseniaspora guilliermondii* DMKU-CP295, *C. floricola* DMKU-CP367, *Bullera sinensis* DMKU-CP437, *W. anomalus* DMKU-RP04, *W. anomalus* DMKU-RP25, *T. globosa* DMKU-RP31, *K. ohmeri* DMKU-RP34 and *T. globosa* DMKU-RP35 inhibited growth of PPF greater than 50%. Inhibitory mechanisms study revealed that eight antagonistic strains produced siderophore, seven strains produced volatile compounds to inhibit growth of *R. solani* by 57.0-73.9% inhibition, 34 strains produced β -glucanase in the range of 0.5-42 mU/ml and 21 strains produced chitinase in the range of 2-249 mU/ml. The result of investigation on competition of nutrient and space revealed that 12 yeast strains inhibited growth of PPF when nutrient concentration was low. Rice sheath blight disease (*R. solani*) control was tested in greenhouse by the seven antagonistic yeast strains (*Bullera sinensis* DMKU-CP437, *C. floricola* DMKU-CP149, *C. floricola* DMKU-CP367, *H. guilliermondii* DMKU-CP295, *T. globosa* DMKU-RP31, *T. globosa* DMKU-RP35 and *W. anomalus* DMKU-RP25). The result showed that cell suspension of *H. guilliermondii* DMKU-CP295 applied by spraying significantly suppressed the rice sheath blight disease by up to 65 %.