

รหัสโครงการ: TRG5280003

ชื่อโครงการ: ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (*Pyricularia* spp.) และการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

ชื่อนักวิจัย: บุญสม บุษบรรณ และสายสมร ลำยอง
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: bussaban@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาความหลากหลายของราสาเหตุโรคไหม้ในข้าวและพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่นๆ โดยการเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการไหม้ 33 ตัวอย่าง จากพืชเศรษฐกิจและวัชพืช (ข้าว ผักปลาบ พืชวงศ์ขิง พืชวงศ์คล้า หนุ่ยแพงโกล่า กกและหญ้าวัชพืช) ที่ปลูกหรือเจริญในบริเวณภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำปาง ลำพูน และนครสวรรค์ และภาคตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ จังหวัดนครนายก หลังจากพิสูจน์โรคตาม Koch's postulates และบ่งบอกชนิดของราสาเหตุโรคโดยใช้ลักษณะสัณฐานและวิธีทางอนุชีววิทยา พบว่าราสาเหตุโรคไหม้ทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Pyricularia* ซึ่งมีลักษณะสัณฐานของโคนิเดียที่หลากหลายขึ้นอยู่กับกลุ่มพืชอาศัย และบ่งบอกชนิดได้ถึงระดับสปีชีส์ (*P. caricis* พบในกกวัชพืช *P. costina*, *P. zingiberis* และ *Pyricularia* sp. พบในพืชวงศ์ขิง *P. sphaerulata* พบในผักปลาบ *Pyricularia* sp. พบในพืชวงศ์คล้า) ยกเว้น *P. grisea* และ *P. oryzae* ที่พบในข้าว หนุ่ยแพงโกล่า และหญ้าวัชพืชต่างๆ ที่อยู่ในบริเวณนาข้าวหรือบริเวณอื่นมีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกันมาก เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ rDNA-ITS, actin, β -tubulin และ calmodulin โดยใช้ *Dactylaria* sp. BS296 เป็น outgroup และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วย maximum parsimony (MP, heuristic search options: tree-bisection-reconnection-branch swapping, random stepwise sequences addition) และ distance (NJ, neighbor-joining: Kimura two-parameter distance measurement) พบว่า *P. grisea* และ *P. oryzae* เป็นราที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดโดยมีบรรพบุรุษร่วมกัน (bootstrap support 100%) และการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลจากทั้งสี่ยีนส์นี้สามารถระบุสปีชีส์ของราที่แยกได้จากข้าว (BS305, BS314) หญ้าวัชพืชในนาข้าว (BS310, BS311) และหนุ่ยแพงโกล่าที่ปลูกใกล้บริเวณนาข้าว (BS290) ว่าเป็น *P. oryzae* และราที่แยกได้จากหญ้าวัชพืชในสวนอนุบาลพันธุ์ไม้ (BS316) และบริเวณข้างทาง (BS279, BS281) คือ *P. grisea* และ *Pyricularia* sp. (CE) ตามลำดับ สำหรับ *Pyricularia* สปีชีส์อื่นๆ ที่มีความแตกต่างของลักษณะสัณฐานอย่างชัดเจนไปจากราที่พบในข้าว เช่นที่พบในกกวัชพืชและพืชวงศ์ขิง มีความสัมพันธ์ที่ห่างไกลจาก *P. grisea* และ *P. oryzae* โดยใน phylogenetic trees ที่สร้างจากยีนส์ทั้งสี่ในการศึกษาครั้งนี้โดยวิธี MP และ NJ มีค่า bootstrap support แต่ละ clade สูงถึง 100% สอดคล้องกับการระบุชนิดของ *Pyricularia* ดังกล่าวโดยใช้ลักษณะสัณฐาน

จากการคัดกรองราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (กระเจียว: *Curcuma ecomata*, กระเจียวขาว: *Cu. parviflora*, กระชาย: *Boesenbergia pandurata*, กระทือ: *Zingiber zerumbet*, กุ๊ก: *Amomum siamense*, ขมิ้นขาว: *Cu. mangga*, ข่า: *Alpinia galanga*, ข่าป่า: *Al. malaccensis*, บันไดสวรรค์ดอกสีส้ม: *Costus curvibracteatus*, ปุดคางคก: *Etlingera litteralis*, ไม้: *Bambusa* sp., ไพล: *Z. cassumunar*, พืชสกุลกระชาย: *Boesenbergia* sp., พืชสกุลข่า: *Alpinia* sp., และมหาหงส์: *Hedychium coronarium*) จำนวน 51 ไอโซเลท โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ glucose soybean meal broth (F1), malt extract corn starch broth (F2), glucose soybean oil peptone (F3), potato dextrose galangal powder broth (F4) และ potato dextrose broth (F5) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวา ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน จากนั้นกรองแยกส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำแห้งและละลายด้วย 10% DMSO เตรียมเป็นสารสกัดหยาบ และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pyricularia costina* BS193, *P. oryzae* BS265, *P. oryzae* BS267, *P. oryzae* BS285, *P. sphaerulata* BS151, *Pyricularia* sp. BS191, *Pyricularia* sp. BS279 และ *Pyricularia* sp. BS286 ด้วยวิธี agar well diffusion และใช้ 10% DMSO และ 20 mg/ml benomyl เป็นสารควบคุม พบว่าราเอนโดไฟท์ 82% และ 35% ของจำนวนที่คัดกรองสร้างสารต้าน *Pyricularia* ได้อย่างน้อยหนึ่งสายพันธุ์ โดยยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคได้มากกว่า 15% และ 30% ตามลำดับ และการคัดกรองด้วยการเลี้ยงราเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลทในอาหารทั้ง 5 ชนิดนั้นทำให้เพิ่มโอกาสในการสร้างสารต้านเชื้อราได้ ดังเช่น *Pestalotiopsis maculiformans* PDB151 ที่เลี้ยงใน F2 (17–65%) และ F4 (26–39%) สร้างสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใหม่ได้ดีกว่าที่เลี้ยงในอาหารชนิดอื่น (13–39%) และสารสกัดหยาบที่ได้จาก F2 (113 mg/ml) และ F4 (161 mg/ml) ยังพบสัญญาณโปรตรอนของกลุ่มสารที่น่าสนใจมากกว่าการเลี้ยงในอาหารชนิดอื่น ดังนั้นจึงเลือกราเอนโดไฟท์ชนิดนี้มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณใน F2 และ F4 เพื่อสกัดแยกและระบุชนิดของสารด้วยวิธี chromatography และ spectroscopy ต่างๆ พบว่าแยกสารได้ 6 ชนิด ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ phenol 1 ชนิด (tyrosol) และสารอนุพันธ์ของ lactones 5 ชนิด (pestalotin, dehydropestalotin, hydroxypestalotin, oxysporone และอนุพันธ์ของ lactones ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างมาก่อน) โดยสารหลักที่พบคือ pestalotin (22–39% yield) ซึ่งยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ได้และมีความเป็นพิษต่ำต่อไรแดงซึ่งเป็นแมลงศัตรูต้นข้าว นอกจากนี้ pestalotin มีแนวโน้มในการยับยั้งการเข้าสู่กระบวนการแบ่งตัวของเซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดมนุษย์ NCI-H1299 โดยที่ 72 ชั่วโมงหลังการทดสอบ เซลล์ที่ได้รับสารนี้มีค่าดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์แบบไมโทซิส (3.01%) ต่ำกว่าในเซลล์กลุ่มควบคุม (7.66%) และนิวเคลียสของเซลล์ที่ได้รับสารนี้มีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม จากผลการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเป็นแหล่งที่มีศักยภาพของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์และเกษตรกรรม

คำหลัก : เอนโดไฟท์, สารออกฤทธิ์ชีวภาพ, *Pyricularia*, โรคใหม่ของข้าว

Project Code : TRG5280003

Project Title : Diversity of Blast Fungi (*Pyricularia* spp.) and Antifungal Production from Endophytic Fungi Isolated from Some Monocots

Investigator : Boonsom Bussaban and Saisamorn Lumyong
Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

E-mail Address : bussaban@hotmail.com

Project Period : 2 years

Abstract

The present study was aimed to investigate the biodiversity of blast fungi in rice and other monocots. Thirty three samples with blast symptoms were collected from economic plants and weeds (commelina, rice, grass weeds, Maranthaceae, pangola grass, sedges and Zingiberaceae) growing in northern (Chiang Rai, Chiang Mai, Payao, Lampang, Lumphun and Nakhon Sawan provinces) and eastern (Nakhonnayok province) Thailand and diagnosis of the causal agents were carried according to Koch's potulates. Blast fungi of various hosts collected in the present study were identified as *Pyricularia* which diverse in morphological characteristic of conidia (*P. caricis*: sedges, *P. costina*, *P. zingiberis* and *Pyricularia* sp.: Zingiberaceae, *P. sphaerulata*: commelina, *Pyricularia* sp.: Maranthaceae). *Pyricularia grisea* and *P. oryzae* (rice, pangola and other grasses) were very similar in conidial characteristics and multilocus phylogenetic analysis based on rDNA-ITS, actin, β -tubulin and calmodulin genes performing with *Dactylaria* sp. BS296 as outgroup, parsimony (MP, heuristic search options: tree-bisection-reconnection-branch swapping, random stepwise sequences addition) and distance (NJ, neighbor-joining: Kimura two-parameter distance measurement) criteria, disclosed a monophyletic group (bootstrap support 100%). The combined analysis of the four gene regions also showed that blast fungi isolated from rice (BS305, BS314), grass weeds in rice field (BS310, BS311) and pangola growing close to rice field (BS290) are *P. oryzae*, while fungal strains isolated from grass weeds in plant nursery (BS316) and road-side (BS279, BS281) are *P. grisea* and *Pyricularia* sp. (CE), respectively. The group consisting of other *Pyricularia* species (e.g., found in sedges and Zingiberaceae) were related distantly to the monophyletic group of *P. grisea* and *P. oryzae*. The phylogenetic trees constructed from the four genes again correlated the groups of each morphologically identified *Pyricularia* species with 100% bootstrap support in MP and NJ analyses.

The present study was also aimed to screen for antifungal activity of endophytic fungi isolated from some monocots (*Alpinia galanga*, *Al. malaccensis*, *Alpinia* sp., *Amomum siamense*, *Bambusa* sp., *Boesenbergia pandurata*, *Boesenbergia* sp., *Costus curvibracteatus*, *Curcuma ecomata*, *Cu. mangga*, *Cu. parviflora*, *Etingera litteralis*, *Hedychium coronarium*, *Zingiber cassumunar* and *Z. zerumbet*) and to evaluate active compounds isolated from the selected potent strains. Fifty one endophytic fungi were grown in five fermentation media (glucose soybean meal broth: F1, malt extract corn starch broth: F2, glucose soybean oil peptone: F3, potato dextrose galangal powder broth: F4 and potato dextrose broth: F5) and incubated on a reciprocal shaker at room temperature for 7 days. The crude extracts from fermentation broths were tested for antifungal activity against 8 strains of blast fungi, *Pyricularia costina* BS193, *P. oryzae* BS265, *P. oryzae* BS267, *P. oryzae* BS285, *P. sphaerulata* BS151, *Pyricularia* sp. BS191, *Pyricularia* sp. BS279 and *Pyricularia* sp. BS286, by the agar well diffusion method (10% DMSO and 20 mg/ml benomyl were used as negative and positive control, respectively). Up to 82% and 35% of crude extracts obtained from endophytic fungi displayed more than 15% and 30% inhibition at least one strains of *Pyricularia*. Culture of each endophytic fungal strain in different fermentation media increased production of active compounds against tested *Pyricularia*, e.g., *Pestalotiopsis maculiformans* PDB151 cultured in F2 (17–65%) and F4 (26–39%) produced active compounds to inhibit growth of blast fungi better than cultured in other media (13–39%). The results revealed that crude extracts of endophytic fungi *P. maculiformans* PDB151 from F2 and F4 were most inhibited blast fungi and showed interesting ¹H NMR spectra. Therefore, bioactive compounds produced by this strain in both media were then extracted, purified and identified using chromatography and spectroscopy. The crude extracts of *P. maculiformans* PDB151 upon chromatographic separation, afforded six compounds, 1 phenol derivative (tyrosol) and 5 lactone derivatives pestalotin, dehydro-pestalotin, hydroxypestalotin, oxysporone and unknown structure of lactone derivative). Pestalotin was the major compound (22–39% yield) which displayed antifungal activity against *P. oryzae*, with a weak cytotoxicity against zooplankton *Moina macrocopa*. This compound also tended to inhibit cell division process of human lung cancer cell line, NCI-H1299, as the evidences of cells treated with this compound (3.01%) had lower mitotic index than cells in control (7.66%) and abnormal (bean-shape) nuclei in treated cells. These results indicated that endophytic fungi from monocotyledonous plants are a potential source of bioactive compounds that may useful in pharmaceuticals and agriculture.

Keywords : Endophytes, bioactive compounds, *Pyricularia*, rice blast