

**Project Code:** BGJ4480024

**Project Title:** Phylogenetic relationship of endophytic fungi from wild banana in Thailand and their potential for biocontrol and antifungal antibiotic producer

**Investigator:** Saisamorn Lumyong and Wipornpan Photita, Department of Biology Faculty of Science Chiang Mai University

**E-mail Address:** [scboi009@cmu.ac.th](mailto:scboi009@cmu.ac.th), [wipornpan@hotmail.com](mailto:wipornpan@hotmail.com)

**Project Period:** 2 years

### Abstract

Two hundred and fifty isolates of endophytic fungi isolated from healthy wild banana were screened for antagonistic ability. A dual culture method was used to establish the ability of endophytic fungi to inhibit growth of banana pathogens. *Colletotrichum musae* and *Fusarium oxysporum* were used as test organisms. The endophytic fungus, *Guignardia cocoicola* CMUBE1415 had highest percent inhibition against *C. musae* (44.9%), and *F. oxysporum* (11.5%).

Eight hundred and twenty strains of endophytic fungi isolated from healthy wild banana were screened for the production of antifungal antibiotics. Four media were used for fermentation. A paper disc agar diffusion assay method was used to check the activity of resulting supernatants. Two strains of *Saccharomyces cerevisiae* strain SS 553 (wild type strain) and strain EC 19 (mutant strain that defective in certain genes required for chitin synthesis) were used as test organisms. The endophyte, *Fusarium* sp. CMUBE1681 fermented on F3, F5 media had the highest activity against strain EC 19.

Thirty-six isolates of *Colletotrichum* spp. were isolated from banana, ginger, *Eupatorium thymifolia*, soybean, longan, mango and *Draceana sanderiana*. They included endophytes from healthy plants and probable pathogens from disease lesions. Isolates were identified and grouped based on colony morphology, and size and shape of appressoria and conidia. Molecular analysis based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) including the 5.8S rDNA, indicated that the *Colletotrichum* isolates comprised five clades that paralleled the morphological groupings. Most isolates clustered

within three distinct *C. gloeosporioides* clades which potentially represented different species. *Colleotrichum musae* was positioned close to the *C. gloeosporioides* clades, while the *C. truncatum* clade was distant to the other groups. The correlation between morphological and molecular-based clustering demonstrated the genetic relationships among the isolates and species of *Colleotrichum* and indicated that ITS rDNA sequence data were potentially useful in taxonomic species determination.

**Keywords:** antagonist, antifungal agent, *Musa*, endophytes, ITS region

รหัสโครงการ: BGJ4480024

ชื่อโครงการ: ความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมและความสามารถในการป้องกันทางชีวภาพและ  
ผลิตสารต้านทานเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ในกล้วยป่า

ชื่อนักวิจัย: สายสมร ล้ายอง และ วิพรพรรณ โพธิตา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: [scboi009@cmu.ac.th](mailto:scboi009@cmu.ac.th), [wipompan@hotmail.com](mailto:wipompan@hotmail.com)

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

#### บทคัดย่อ

นำเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 250 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถเป็นปรปักษ์  
ต่อเชื้อราโรคกล้วยคือ *Colletotrichum musae* และ *Fusarium oxysporum* โดยทดสอบด้วยวิธี dual  
culture จากการทดลองพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ CMUBE1415 (*Guignardia cocoicola*) มี  
ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดมากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการ  
เจริญของเชื้อรา *Colletotrichum musae* 66.9% และ *Fusarium oxysporum* 50.6% สภาวะที่  
เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชของเชื้อราเอนโดไฟท์คือหมักในอาหาร F5 ที่มี  
mannitol และ peptone เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสม  
คือ 30 °C และ 6.5 ตามลำดับ และระยะหมักที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดคือ 11 วัน

นำเชื้อราจำนวน 820 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อรา  
โดยทำการหมักในอาหารเหลว 4 ชนิด และทดสอบโดยวิธี paper disc agar diffusion เชื้อราทดสอบ  
ที่ใช้คือ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SS 553 และ สายพันธุ์ EC 19 (สายพันธุ์ที่ทำให้  
กลายเป็นพันธุ์ซึ่งขาดยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ไคติน) จากการทดสอบพบว่าเชื้อรา *Fusarium* sp.  
CMUBE1681 ที่หมักในอาหาร F3 และ F5 มีความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อราและยับยั้งการ  
เจริญของเชื้อราทดสอบเฉพาะสายพันธุ์ EC19

เชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 36 ไอโซเลทที่แยกได้จากกล้วย (*Musa acuminata*) ขิง  
(Zingiberaceae) *Eupatorium* sp. และพืชในเขตร้อนอื่นๆ ทำการบ่งชนิดของเชื้อราทั้งหมดโดยใช้  
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล พบ 3 กลุ่มของ *Colletotrichum gloeosporioides* 1 กลุ่ม  
ของ *C. musae* และอีก 1 กลุ่มของ *C. truncatum* จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ rDNA ในส่วนของ  
The internal transcribed spacers (ITS1 และ ITS2) และ 5.8 S โดยใช้ universal primer จากนั้น

ทำการหาลำดับเบสและวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรม จากผลการทดลองพบว่าเชื้อราในกลุ่มของ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. musae* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ส่วนเชื้อราในกลุ่ม *C. truncatum* และ *C. acutatum* จะมีความต่างกันของพันธุกรรมมากกว่า จากผลการเปรียบเทียบระหว่างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถบ่งบอกได้ว่าการใช้ลำดับเบสของ ITS rDNA สามารถนำมาใช้บ่งบอกความแตกต่างระดับสปีชีส์ได้

คำหลัก: กล้วย, เชื้อปรปักษ์, สารต้านเชื้อรา, เอนโดไฟท์, ITS region,