



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมและความสามารถในการป้องกันทางชีวภาพและผลิต
สารต้านทานเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ในกล้วยป่า

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

โดย

สายสมร ล้ายอง และ วิพรพรรณ โปธิตา

กันยายน 2546



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมและความสามารถในการป้องกันทางชีวภาพและ ผลิต
สารต้านทานเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ในกล้วยป่า

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

โดย

สายสมร ล้ายอง และ วิพรพรรณ โพธิตา

กันยายน 2546

สัญญาเลขที่ BJJ4480024

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมและความสามารถในการป้องกันทางชีวภาพและ
ผลิตสารต้านทานเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ในกล้วยป่า

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

โดย

สายสมร ลำยอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
วิพรรณณ์ โทธิตา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนองค์ความรู้ใหม่ในการสร้างนักวิจัยระดับปริญญาเอก ประจำปี 2544 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) สัญญาเลขที่ BGJ4480024 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง และขอขอบคุณ Associate Professor Dr. Kevin D. Hyde, Department of Biodiversity and Ecology, the University of Hong Kong, Hong Kong, Dr. Eric C.H. McKenzie, Landcare Institute, Auckland, New Zealand, Dr. Paul W.J. Taylor และ Dr. Rebecca Ford BioMarka, Joint Centre for Crop Innovation, School of Agriculture and Food Systems, the University of Melbourne, Victoria, Australia ที่ช่วยเหลือและร่วมงานในการจำแนกชนิดของเชื้อรา และให้คำปรึกษากับนักศึกษาที่อยู่ในโครงการวิจัยนี้

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: schoi009@cmu.ac.th, 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, *Euphatorium 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. *Colletotrichum 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 *Colletotrichum* 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, wipornpan@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ

นำเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 250 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถเป็นปรปักษ์ต่อเชื้อราโรคกล้วยคือ *Colletotrichum musae* และ *Fusarium oxysporum* โดยทดสอบด้วยวิธี dual culture จากการทดลองพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ CMUBE1415 (*Guignardia cocoicola*) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดมากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum musae* 66.9% และ *Fusarium oxysporum* 50.6% สภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชของเชื้อราเอนโดไฟท์คือหมักในอาหาร F5 ที่มี mannitol และ peptone เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมคือ 30 °C และ 6.5 ตามลำดับ และระยะหมักที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดคือ 11 วัน

นำเชื้อราจำนวน 820 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อรา โดยทำการหมักในอาหารเหลว 4 ชนิด และทดสอบโดยวิธี paper disc agar diffusion เชื้อราทดสอบที่ใช้คือ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SS 553 และ สายพันธุ์ EC 19 (สายพันธุ์ที่ทำให้กลายเป็นพืชซึ่งขาดยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ไคติน) จากการทดสอบพบว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. CMUBE1681 ที่หมักในอาหาร F3 และ F5 มีความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อราและยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบเฉพาะสายพันธุ์ EC19

เชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 36 ไอโซเลทที่แยกได้จากกล้วย (*Musa acuminata*) ขิง (*Zingiberaceae*) *Eupatorium* sp. และพืชในเขตร้อนอื่นๆ ทำการบ่งชนิดของเชื้อราทั้งหมดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล พบ 3 กลุ่มของ *Colletotrichum gloeosporioides* 1 กลุ่มของ *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,

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
Abstract	ข
บทคัดย่อ	ง
สารบัญ	ฉ
บทนำ	ช
บทที่ 1	1
การศึกษาความสามารถเป็นเชื้อปรักษ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคกล้วย	
บทที่ 2	15
การศึกษาความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วย	
บทที่ 3	34
การศึกษาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> โดยอาศัยลักษณะทาง	
สัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล	
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	47
ภาคผนวก ก	48
ภาคผนวก ข	53

บทนำ

เชื้อราเอนโดไฟท์ คือ เชื้อราที่ช่วงหนึ่งหรือตลอดทั้งช่วงชีวิตอาศัยอยู่ในพืชโดยไม่ทำให้พืชแสดงอาการเป็นโรค (Wilson, 2002) คุณสมบัติหรือความคาดหวังที่จะใช้เชื้อรา endophytes ให้เป็นประโยชน์โดยเฉพาะการผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ (novel secondary metabolites) นั้นก็เนื่องจากมีรายงานจำนวนมากที่ศึกษาจากรา endophytes แล้วพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่หลากหลาย ซึ่งจะนำไปใช้ทางการแพทย์ อุตสาหกรรมและเกษตรกรรม ประโยชน์บางอย่างของสารออกฤทธิ์ที่รู้จักกันดีในตอนนี้คือ สารต่อต้านมะเร็ง สารต่อต้านเชื้อรา สารต่อต้านแบคทีเรีย สารฆ่าแมลง และ สารยับยั้งภูมิคุ้มกัน (Strobel, 2002) เชื้อราเอนโดไฟท์แยกได้จากพืชหลายชนิดในป่าดิบและป่าเบญจพรรณตลอดจนพืชจำพวกสน (Carroll *et al.*, 1977; Bertoni & Cabral, 1988; Fisher & Petrini, 1990) นอกจากนี้ยังมีรายงานหลายฉบับที่รายงานไว้ว่า เชื้อราเอนโดไฟท์สามารถพบได้ในพืชอาศัยทุกชนิดที่รวมถึงพืชบกมากกว่า 200 ชนิดและพืชน้ำอีกมากกว่า 20 วงศ์ ตัวอย่างเช่น สาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ มอส เฟิร์น gymnosperms พืชใบเลี้ยงเดี่ยว พืชสมุนไพร และ ไม้เนื้อแข็งบางชนิด (Carroll, 1988; Clay 1991; Petrini, 1991; Lodge *et al.*, 1996)

.....เนื่องจากในประเทศไทยมีความหลากหลายของชนิดพืชสูงจึงเป็นแหล่งน่าสนใจที่อาจมีราเอนโดไฟท์อีกหลายชนิดที่ยังไม่ถูกค้นพบที่จะสามารถนำมาใช้ในการผลิตสารต่อต้านเชื้อราได้ ดังนั้นจึงเป็นความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่จะศึกษาหาเอนโดไฟท์ที่อาจมีสารประกอบต่อต้านเชื้อราชนิดใหม่ ๆ ที่อาจจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1.) สืบค้นคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ที่ต้านราสาเหตุโรครกกล้วย 2 ชนิด คือ โรครกเหี่ยว (*Fusarium* sp.) และ anthracnose (*Colletotrichum musae*) 2.) คัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ของกล้วยที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ chitin synthetase และ 3.) ศึกษาหาความสัมพันธ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชที่ต่างชนิดโดยวิธี molecular technique

บทที่ 1

การศึกษาความสามารถเป็นเชื้อปรักษ์ของเชื้อราแอนโดไฟท์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคกล้วย

บทนำ

โรค Anthracnose ในกล้วยเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่สำคัญมากชนิดหนึ่งในกล้วย โดยโรคชนิดนี้จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลกล้วยในขณะที่มีการขนส่งและเก็บรักษาในห้องเย็น (Waller, 1992) ลักษณะการเกิดโรคจะเป็นรอยแผลดำเกิดขึ้นมาก่อน จากนั้นรอยแผลนี้จะขยายใหญ่และบริเวณตรงกลางของรอยแผลนี้จะเป็นรอยบุ๋มลงไป และมีลักษณะเหมือนน้ำเยิ้มอยู่ ถ้ามีการทำลายของโรคอย่างรุนแรงอาจจะเห็นสปอร์ของเชื้อราก่อโรคเจริญอยู่ เชื้อสาเหตุของโรค Anthracnose ที่เกิดกับกล้วย คือเชื้อรา *Colletotrichum musae*

ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีเพื่อลดการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวของกล้วย (Scott, 1972) ร่วมกับการจุ่มผลในน้ำร้อน (Burden, 1968) และการปรับสภาพบรรยากาศในการเก็บรักษา (Wade et al., 1993) แต่เนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุเป็นการเข้าทำลายแบบแฝง ฉะนั้นจึงไม่สามารถเห็นอาการจนกว่าผลจะสุก ดังนั้นจึงยากที่จะควบคุมการเกิดโรคได้ ปัจจุบันมีการหาวิธีการใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพมาป้องกันโรสดังกล่าว เช่น การใช้จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ มาควบคุมโรคชนิดนี้ รวมทั้งการหายาด้านเชื้อราชนิดใหม่ๆ จากจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ซึ่งเชื้อราแอนโดไฟท์ก็จัดเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีศักยภาพในการได้มาซึ่งสารต้านเชื้อราในกลุ่มใหม่ๆ ซึ่งน่าจะเป็นอีกหนทางหนึ่งในการที่จะสามารถควบคุมโรค Anthracnose

โรคเหี่ยว (*Fusarium wilt*) เป็นโรคที่สำคัญที่สุดอีกชนิดหนึ่งของกล้วย การใช้สารเคมีควบคุมโรคนี้ได้อย่างเดียวไม่ได้ผล (Stover, 1962) การใช้พันธุ์ต้านทานและลูกผสมใหม่ๆ ทดแทน พันธุ์ที่อ่อนแอ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อราแอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วย ที่มีความสามารถเป็นเชื้อปรักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคกล้วยทั้งสองชนิด เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อราแอนโดไฟท์ และเชื้อก่อโรค

การแยกเชื้อราแอนโดไฟท์

- 1) ทำการเก็บตัวอย่าง จาก 5 บริเวณ ๆ ละ 10 ต้น (ตัวอย่างแก่ 5 ต้น, ตัวอย่างอ่อน 5 ต้น) ทำการแยกเชื้อราแอนโดไฟท์ จาก 5 ส่วนของพืชคือ ใบ (vein, intervein), เส้นกลางใบ, ก้านใบ, และกาบ นำตัวอย่างทั้งหมดมาล้างน้ำไหล

- 2) ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยวิธี triple surface sterilization โดยจุ่มใน 75% เอทธานอล เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจุ่มใน 1% sodiumhypochlorite นาน 3 นาที แล้วย้ายไปจุ่มใน 95% เอทธานอล 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- 3) วางตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร 2% malt extract agar ที่ผสม Rose bengal (30 mg/l) และ chloramphenicol (50 mg/l) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1-2 สัปดาห์
- 4) เมื่อเส้นใยเจริญออกมา ทำการถ่ายเชื้อจากปลายเส้นใยลงในอาหาร corn meal agar slant และบ่มไว้เพื่อดูการสร้างสปอร์
- 5) ทำการบ่งบอกชนิดเชื้อราโดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา, สปอร์, ลักษณะโคโลนี และลักษณะอื่นๆ

การแยกเชื้อราก่อโรค

- 1) เก็บรวบรวมกล้วยที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) โดยมีเชื้อรา *Colletotrichum musae* เป็นเชื้อสาเหตุ โรคเหี่ยว (wilt, panama disease) ซึ่งมีเชื้อรา *Fusarium oxysporum* เป็นสาเหตุ



ภาพที่ 1.1 ก), ข) อาการของโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ค) เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum musae* ง), จ) อาการของโรคเหี่ยว (wilt, panama disease)

- 2) ทำการแยกเชื้อรา ตัดชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคที่ติดกับส่วนที่ไม่เป็นโรคนาน 3-5 ตาราง มิลลิเมตร จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยจุ่มใน Clorox 10% นาน 3-5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง วางตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร 2% malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1-2 สัปดาห์ ทำการบ่งบอกชนิดเชื้อราโดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา, สปอร์, ลักษณะโคโลนี และลักษณะอื่นๆ

2. การทดสอบความสามารถเป็นเชื้อปรักษ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคกล้วย ด้วยวิธี dual culture

เชื้อราเอนโดไฟท์ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 250 ไอโซเลท โดยทดลอง 5 ซ้ำในแต่ละชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ โดยนำวุ้นที่มีเส้นใย (mycelium plug) ของเชื้อราเอนโดไฟท์ และ pathogen คือ *Colletotrichum musae* และ *Fusarium oxysporum* ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm มาเลี้ยงคู่กันบนจานอาหาร PDA ในการวาง จะวาง mycelium plug ของเชื้อราทั้งสอง ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อข้างละ 2 cm จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจผลการเกิด antagonist ในวันที่ 7 โดยวัดค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา pathogen จากนั้นนำเชื้อราที่มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดไปทำการทดลองในขั้นต่อไป

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{\text{รัศมีโคโลนีของเชื้อโรคพืชในจานทดลอง}}{\text{รัศมีโคโลนีของเชื้อโรคพืชในจานควบคุม}} \times 100$$

3. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา ของเชื้อราเอนโดไฟท์

ทำการศึกษปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ ได้แก่ สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา, ชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน, pH เริ่มต้นของอาหาร, อุณหภูมิ และระยะเวลาในการหมัก

เชื้อราเอนโดไฟท์ที่นำมาศึกษาในขั้นนี้ คือ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415) โดยแยกจากกล้วยป่า ซึ่งเป็นเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคกล้วยได้ทั้งสองชนิด

3.1 การศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับผลิตสารต้านเชื้อราจากเชื้อราเอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415)

3.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415) โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-5 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารหมัก 4 ชนิด โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm เจาะบริเวณปลายเส้นใย นำไปใส่ในอาหารหมัก 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml ทำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 124 รอบ/นาที

3.1.2 การเก็บตัวอย่างสารต้านเชื้อราอย่างหยาบ (crude antifungal substance)

- 1) ทำการเก็บตัวอย่างสารต้านเชื้อราอย่างหยาบโดยเติม Ethy acetate ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ลงในขวดอาหารหมักทั้ง 4 ชนิด เขย่าทิ้งไว้ 1 คืน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 124 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 2) นำสารสกัดมาทำให้แยกชั้น เก็บส่วนบน (supernatant) ซึ่งเป็นชั้นของ ethy acetate ไปทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสาร (evaporator) โดยใช้ความดัน 250 psi และใช้อุณหภูมิ 40-44 °C โดยระเหยจนเกือบแห้ง
- 3) เก็บสารสกัดที่ได้จากข้อ 2) ไว้ที่ 4 °C เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum musae* และ *Fusarium oxysporum* ด้วยวิธี paper disc diffusion method ต่อไป

3.1.3 การทดสอบ ด้วยวิธี paper disc diffusion method

- 1) ทำการ pure plate โดยผสม conidium suspension ของเชื้อราทดสอบที่มีความเข้มข้น 10^6 / ml ผสมในอาหาร PDA 50 ml
- 2) จุ่ม paper disc ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 mm ในสารต้านเชื้อราที่สกัดได้จากการเลี้ยงในอาหารหมัก 4 ชนิด ตามข้อ 3.1.2 มาวางบนกระจกที่ปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ 30-40 นาที เพื่อให้ paper disc แห้ง
- 3) ใช้ปากคีบ (forceps) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว คีบ paper disc ที่ได้จากข้อ 2) มาวางบนจานอาหารที่ได้จากข้อ 1) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ในสารต้านเชื้อราแต่ละชนิด และใช้ nystatin เป็น positive control ส่วน negative control คือ น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อและ ethy acetate
- 4) บันทึกผลการทดลองโดยวัดค่าวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

3.2 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตสารต้านเชื้อราของเชื้อรา โดยทำการเตรียมอาหารหมัก F1 (ซึ่งเป็นอาหารหมักที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านเชื้อรา จากข้อ 3.1) ที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันคือ fructose, glucose, lactose, maltose, mannitol และ sucrose และไนโตรเจนคือ malt extract, peptone, polypeptone, soy bean meal และ yeast extract ปริมาตร 50 ml ใส่ใน 250 ml Erlenmeyer flasks ทำการปลูกเชื้อเอนโดไฟท์ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาที จากนั้นทำการวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Paper disc diffusion agar method

3.3 การศึกษาหาระดับ pH ที่เหมาะสม

เตรียมอาหาร F1 ที่มีแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2 มาทำการปรับระดับ pH เป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 โดยการเติม HCl หรือ NaOH. อย่างละ 12 flask ซึ่งมีปริมาตร flask ละ 50 มล. ปริมาตร 50 ml ใส่ใน 250 ml Erlenmeyer flasks ทำการปลุกเชื้อเอนโดไฟท์ และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาทิจากนั้นทำการวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Paper disc diffusion agar method

3.4 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา เตรียมอาหาร F1 ที่มีแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2 และระดับ pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3 ทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน (25, 30, 37, และ 45 °C) นาน 7 วัน โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาทิจากนั้นทำการวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Paper disc diffusion agar method

3.5 ระยะเวลาในการหมัก

เตรียมอาหาร F1 ที่มีแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2 ระดับ pH และที่เหมาะสมจากข้อ 3.3 ทำการบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมจากข้อ 3.4 โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาทิจำการเก็บน้ำเลี้ยงทุกวัน และทำการวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Paper disc diffusion agar method

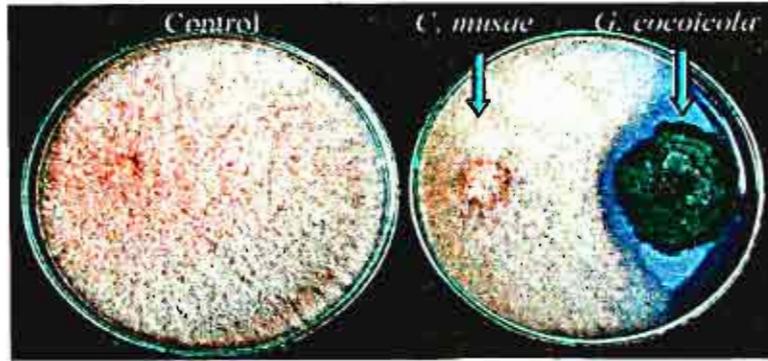
ผลการทดลอง

การทดสอบความสามารถเป็นเชื้อปรักษ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคกล้วย ด้วยวิธี dual culture

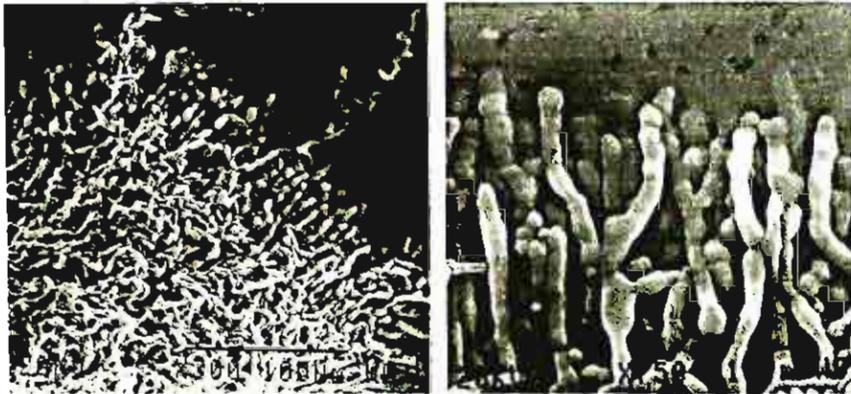
จากการทดสอบเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 250 ไอโซเลท พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 50 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบทั้งสองชนิด (Table 1.1) เชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 125 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญเฉพาะเชื้อรา *Colletotrichum musae* และไม่มีเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเฉพาะเชื้อรา *Fusarium* sp. เพียงอย่างเดียว

เชื้อราเอนโดไฟท์ *Guignardia coccoicola* (CMUBE1415) มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบทั้งสองชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดคือ 66.9% และ 50.6% ต่อเชื้อรา *Colletotrichum musae* และ *Fusarium* sp. ตามลำดับ (ภาพที่ 1.2)

ผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแอนโดไฟท์ต่อเชื้อราทดสอบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทดสอบ โดยจากการทดลอง dual culture จะพบว่าที่ปลายเส้นใยของเชื้อทดสอบมีการเจริญเข้ามา เส้นใยแตกกิ่งก้านมากและหดสั้นผิดปกติ (ภาพที่ 1.3) และจากการทดลองนี้จึงเลือกเชื้อราแอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415) ทำการทดลองขั้นต่อไป



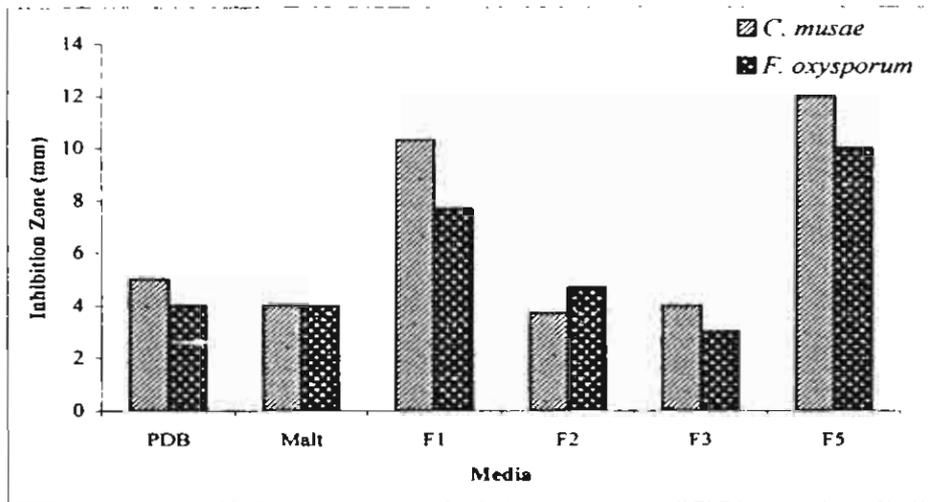
ภาพที่ 1.2 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา anthracnose *Colletotrichum musae* บนอาหาร PDA



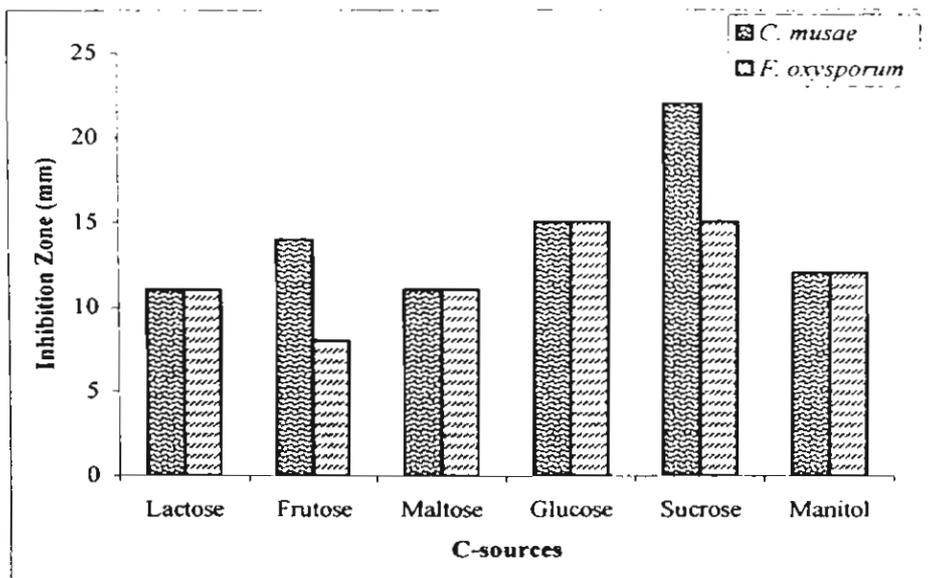
ภาพที่ 1.3 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทดสอบ ปลายเส้นใยของเชื้อทดสอบ มีการเจริญเข้ามา เส้นใยแตกกิ่งก้านมากและหดสั้นผิดปกติ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา ของเชื้อราแอนโดไฟท์

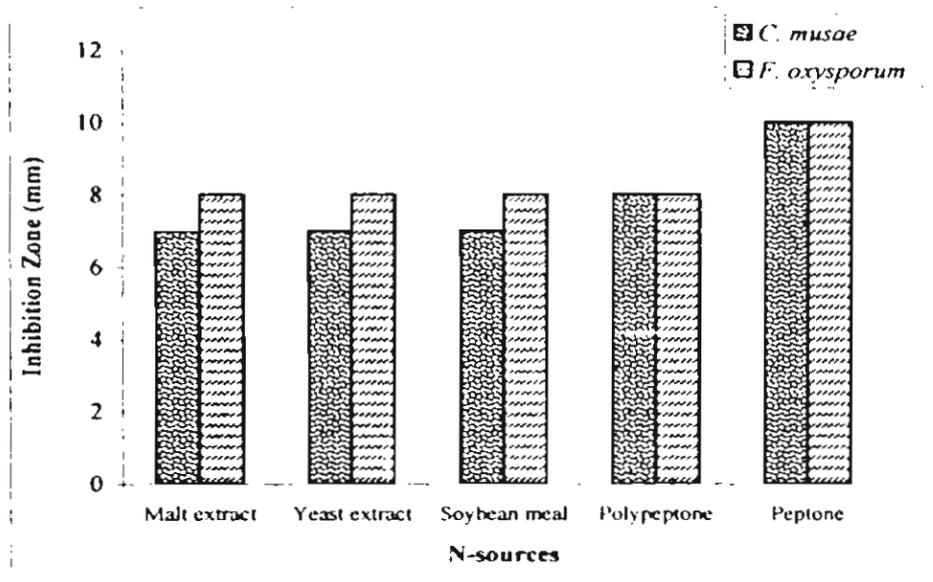
สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อราแอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415) พบว่าอาหารหมัก F5 มีผลทำให้เชื้อมีความสามารถผลิตสารต้านเชื้อรามากที่สุด (ภาพที่ 1.4) และหมักในอาหาร F5 ที่มี 3 % ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.5 % peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้เกิดวงใสยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบมากที่สุด (ภาพที่ 1.5 และ 1.6) และ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 6.5 และ 30 °C ตามลำดับ (ภาพที่ 1.7 และ 1.8) และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างสารต้านเชื้อราคือประมาณ 11 วัน (ภาพที่ 1.9)



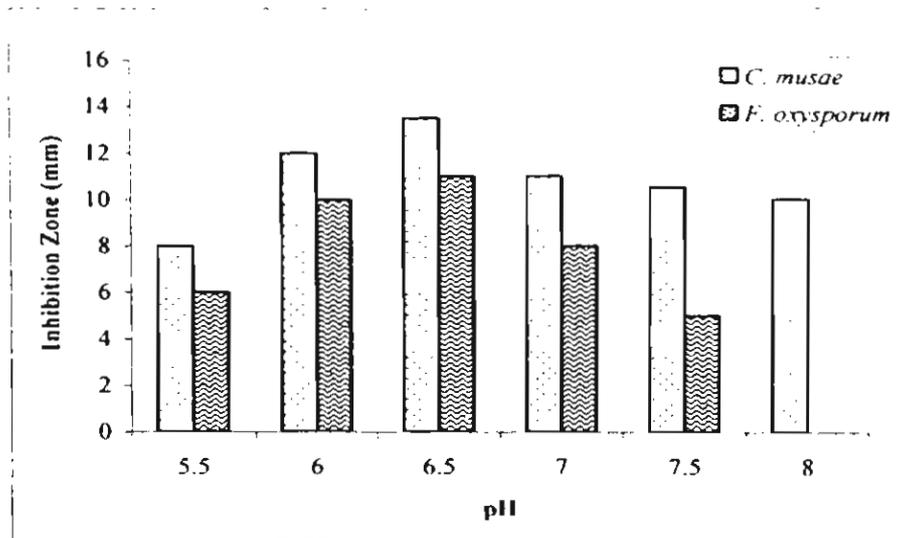
ภาพที่ 1.4 ผลของอาหารหมักที่มีผลต่อการผลิตสารต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415)



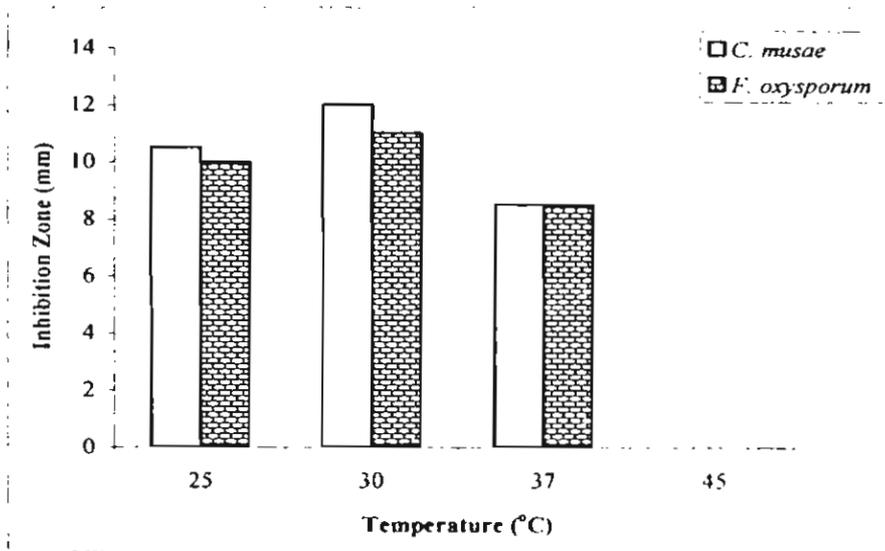
ภาพที่ 1.5 ผลของ C-sources ที่มีผลต่อการผลิตสารต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415)



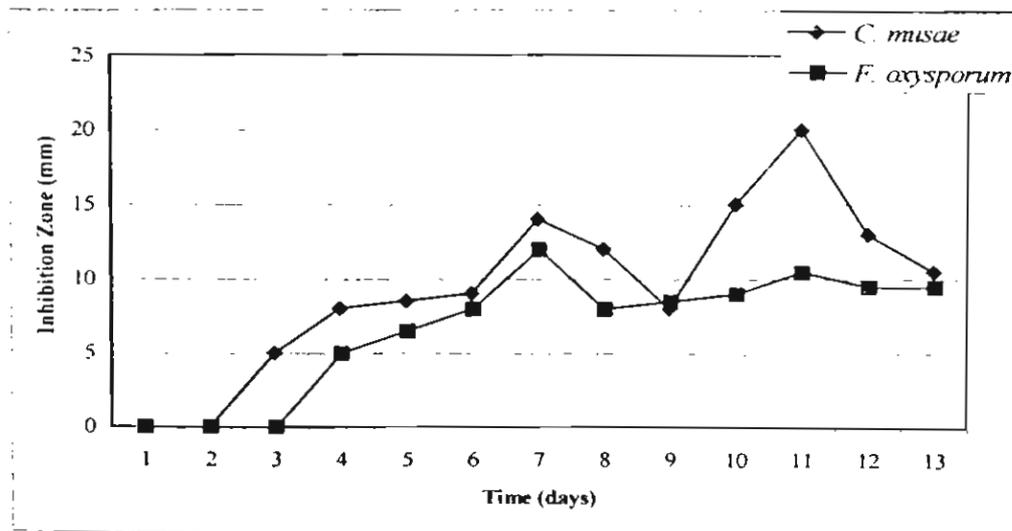
ภาพที่ 1.6 ผลของ N-sources ที่มีผลต่อการผลิตสารต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415)



ภาพที่ 1.7 ผลของ pH ที่มีผลต่อการผลิตสารต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415)



ภาพที่ 1.8 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตสารต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415)



ภาพที่ 1.9 ระยะในการบ่มเชื้อที่มีผลต่อการผลิตสารต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415)

สรุปและวิจารณ์

เชื้อราเอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* (CMUBE1415) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้งสองชนิด และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทดสอบมีผลสอดคล้องกับ

Dennis และ Webster (1971) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Guignardia cocoicola* สามารถผลิตสารต้านเชื้อราในอาหารเหลวได้ (Rodrigues *et al.*, 2000)

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ Dreyfuss และ Chapela (1995) พบว่าสาร secondary metabolites ประมาณ 4000 ชนิดผลิตจากเชื้อรา ซึ่งเชื้อราที่พบว่ามีการสร้างสารเหล่านี้มากที่สุดและเป็นที่ยอมรับกันดีคือ *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Bills และ Polishook (1992) พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์มีความสามารถผลิตสาร secondary metabolites และสามารถนำมาให้ประโยชน์ทั้งทางการแพทย์และทางการเกษตร และนอกจากเชื้อราเอนโดไฟท์ยังมี ตักยะภาพในการผลิตสารต่างๆ ที่ช่วยรักษาปัญหาด้านสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ได้ (Strobel, 2002)

เชื้อราเอนโดไฟท์มีความสามารถในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชได้ โดยจะแข่งเจริญกับเชื้อราโรคพืช หรือสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช หรือกระตุ้นให้พืชอาศัยสร้างกลไกป้องกันตัวเอง (Brown *et al.*, 2003) ซึ่งจากกลไกดังกล่าวจึงจะคาดหวังว่าเชื้อราเอนโดไฟท์จะสามารถนำมาใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีได้ โดยเฉพาะโรคพืชที่มีการเข้าทำลายแบบแฝง (Petrini, 1993).

Table 1.1 Percentage inhibition of endophytes against banana pathogens on agar plate.

Isolates (CMUBE)	Taxa	Percent inhibition	
		<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Fusarium</i> sp.
497	<i>Xylaria</i> 1	50.00	30.83
904	<i>Fusarium</i> sp.	67.75	43.75
911	Unknown 4	61.33	45.83
912	Unknown 4	59.07	28.33
915	Unknown 4	60.93	42.50
918	<i>Mycelia sterilia</i> sp. 19	65.94	36.00
943	<i>Mycelia sterilia</i> sp. 8	56.56	28.33
956	<i>Hyphomycetes</i> sp. 10	0.00	12.45
961	<i>Verticillium</i> sp.	24.61	36.67
964	<i>Phomopsis</i> sp.	69.30	45.83
969	<i>Phomopsis</i> sp.	72.40	35.00
970	<i>Phomopsis</i> sp.	69.38	64.67
971	<i>Phomopsis</i> sp.	69.03	62.91
972	<i>Phomopsis</i> sp.	70.33	56.23
975	<i>Phomopsis</i> sp.	68.33	50.94
979	<i>Xylaria</i> sp.3	51.33	18.87
982	<i>Xylaria</i> sp.5	53.00	17.74
985	<i>Xylaria</i> sp.3	53.00	35.25
988	<i>Xylaria</i> sp.9	55.00	39.62
989	<i>Xylaria</i> sp.4	56.42	31.64
991	<i>Xylaria</i> sp.1	66.79	38.91
992	<i>Xylaria</i> sp.2	57.84	37.27
996	<i>Xylaria</i> sp.1	59.10	32.36
997	<i>Xylaria</i> sp.4	62.99	41.82
998	<i>Xylaria</i> sp.1	65.67	54.18
1045	<i>Fusarium</i> sp. 4	59.70	49.82
1046	<i>Fusarium</i> sp. 4	60.90	44.00
1055	<i>Coelomycetes</i> sp. 2	62.50	39.00
1111	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	57.03	38.33
1112	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	67.97	41.67
1220	<i>Xylaria</i> sp.4	60.16	30.00
1377	<i>Cordana musae</i>	7.69	5.00
1401	<i>Coelomycetes</i> sp. 1	65.67	46.18
1402	<i>Coelomycetes</i> sp. 1	66.27	44.73
1410	<i>Coelomycetes</i> sp. 2	65.85	23.81
1415	<i>Guignardia coccoicola</i>	66.9	50.6
1417	<i>Xylaria</i> sp.3	57.54	17.14
1418	<i>Xylaria</i> sp.1	55.94	37.60
1519	<i>Deightonella torulosa</i>	55.67	29.17
1572	<i>Coelomycetes</i> sp. 2	64.67	35.00
1721	Unidentified	57.23	20.00

Table 1.1 cont.

Isolates (CMUBE)	Taxa	Percent inhibition	
		<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Fusarium</i> sp.
1719	Unidentified	58.67	26.67
1722	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.00	1.60
1730	Unidentified	65.63	45.60
1740	<i>Colletotrichum musae</i>	65.31	43.00
1745	<i>Phomopsis</i> sp. 3	62.00	46.67
1746	<i>Phoma</i> sp.	7.69	0.00
1747	<i>Phomopsis</i> sp. 2	53.67	30.83
1748	<i>Phoma</i> sp.	60.94	100.00
1749	<i>Phomopsis</i> sp. 1	65.33	51.04
1750	<i>Fusarium</i> sp.	74.69	49.00
1759	<i>Curvularia</i> sp.	67.19	29.00
1762	Unidentified	70.63	52.80
1765	<i>Xylaria</i> sp.1	7.69	4.00
1822	<i>Guignardia coccoicola</i>	59.69	38.13
1833	<i>Xylaria</i> sp.	50.15	18.13
1834	<i>Xylaria</i> sp.	55.69	-15.00
1835	<i>Xylaria</i> sp.	58.46	20.95
1837	<i>Xylaria</i> sp.	56.00	13.33
1838	<i>Xylaria</i> sp.	59.08	16.19
1839	<i>Xylaria</i> sp.	58.83	19.05
1840	<i>Xylaria</i> sp.	59.69	22.86
1842	<i>Drechslera</i> sp.	49.54	2.13
1843	<i>Xylaria</i> sp.	57.54	-1.90
1844	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	70.15	33.33
1845	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	65.85	31.43
1849	<i>Xylaria</i> sp.	64.00	48.75
1850	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	66.15	35.32
1851	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	68.92	43.83
1852	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	64.17	53.77
1856	Unidentified	0.00	0.63
1857	Unidentified	53.85	41.25
1858	Unidentified	51.38	21.25
1859	<i>Xylaria</i> sp.	55.69	44.53
1860	Unidentified	71.08	60.00
1861	Unidentified	69.23	60.00
1862	Unidentified	64.92	47.50
1864	Unidentified	64.62	49.38
1865	Unidentified	58.77	33.75
1869	Unidentified	54.46	29.38
1873	Unidentified	85.54	69.36
1888	<i>Xylaria</i> sp.	45.54	23.44
1896	<i>Xylaria</i> sp.	60.31	50.63

Table 1.1 cont.

Isolates (CMUBE)	Taxa	Percent inhibition	
		<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Fusarium</i> sp.
1866	Unidentified	59.69	31.25

บรรณานุกรม

- Bills, G.F. & Polishook, J.D. (1992). Recovery of endophytic fungi from *Chamaecyparis thyroides*. *Sydowia* 44: 1-12.
- Brown, K.B., Johnson, G.I. & Guest, D.I. (2003). Interactions between the endophytic fungi of durian (*Durio zibethinus*) and *Phytophthora palmivora*. *Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand*. p 41.
- Burden, O.J. (1968). Reduction of banana anthracnose following hot-water treatment of the green fruit. *Queensland Journal Agriculture Animal Science* 25: 135-143.
- Dennis, C. & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* I. Production of Non-Volatile Antibiotics. *Transaction of British Mycological Society* 57: 25-32.
- Dreyfuss, M.M. & Chapela, I.H. (1995). Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In: *The Discovery of Natural Productions with Therapeutic Potential* (Gullo, V.C. ed.), pp. 49-80. Butterworth-Heinemann, London.
- Petrini, O. (1993). Endophytes of *Pteridium* spp.: Some considerations for biological control. *Sydowia* 45: 330-338.
- Rodrigues, K.F., Hesse, M. & Werner, C. (2000). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal Basic Microbiology* 40: 261-267.
- Scott, K.J. (1972). Transport of banana of ambienc temoeratures using polyethylene bags. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 48: 245-254.
- Stover, R.H. (1962). Intercontinental spread of banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola* Leach). *Tropical Agriculture (Trinidad)* 29: 327-338.
- Strobel, G.A. (2002). Gifts from the rainforest. *Canadian Journal of Phytopathology* 24: 14-20.
- Wade, N.C., Kavanagh, E.E. & Scpiyah, M. (1993). Effects of modified atmosphere storage on banana postharvest disease and the control of bunch main stalk rot. *Postharvest Biological Technology* 3: 143-154.

Waller, J.M. (1992). *Colletotrichum* disease of perennial and other cash crops. In *Colletotrichum—Biology, Pathology and control* (Bailey, J.A. & Jeger, M.J. eds.), pp. 167-186. CAB International, UK.

บทที่ 2

การศึกษาความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วย

บทนำ

การสังเคราะห์ไคตินใน *Saccharomyces cerevisiae* เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ Chitin synthetase ซึ่งอยู่ที่ plasma membrane โดยจะต้องได้รับการกระตุ้นจากโปรตีน ซึ่งเป็น proteolytic enzyme ส่งผลให้เอนไซม์ chitin synthetase ทำงาน ซึ่งเอนไซม์นี้ประกอบด้วย chitin synthetase I และ chitin synthetase II จะเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการรวมกันของ N-acetylglucosamine ที่เหลือจาก UDP-N-acetylglucosamine เข้ากับสายพันธะ B(1,4) การทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสองจะทำให้เกิดการสะสมของไคตินที่ผนังบริเวณที่มีการแตกหน่อ (Rose et al., 1991)

สารปฏิชีวนะหลายตัวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และเซลล์ยีสต์ได้ โดยเฉพาะ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งส่วนใหญ่จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ ของเซลล์ สำหรับการศึกษานี้ของ Sakurai et al., (1999) ได้ศึกษาหาสารปฏิชีวนะที่มีผลต่อเอนไซม์ chitin synthetase โดยใช้เชื้อทดสอบ คือ *S. cerevisiae* สองสายพันธุ์ ที่มีความแตกต่างกันของผนังเซลล์ โดยสายพันธุ์ SS553 เป็นสายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ EC19 เป็นสายพันธุ์ที่มีความบกพร่องในการสร้างเอนไซม์ Chitin synthetase I ทำให้การสร้างผนังเซลล์ผิดปกติ พบว่า *Leptosphaeria* sp. (MCI2799) และ *Ellisiodothis inquinans* (L1558-A8) สามารถสร้างสาร AM-1, AM-2, AM-3 และ NCA-1 ที่ให้ผลยับยั้งเฉพาะสายพันธุ์ EC19 เท่านั้น ทำให้ได้สารที่มีผลต่อผนังเซลล์ยีสต์ และเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี radioactive ด้วยการติดฉลาก UDP-¹⁴C พบว่าสารที่ได้มีผลเอนไซม์ chitin synthetase จึงทำให้การสร้างผนังเซลล์ของยีสต์บกพร่องไป

Dominguez et al. (1998) ศึกษาพบว่า sordarin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งกระบวนการ cell-free translation ของเชื้อราก่อโรค เช่น *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีพบว่าอนุพันธ์ของ sordarin สามารถยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ยีสต์ได้ แต่ไม่มีผลกระทบบต่อกระบวนการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นเป้าหมายหลักในการศึกษาขั้นต้น เพื่อหาสารปฏิชีวนะที่ไปขัดขวางกระบวนการสร้างโปรตีนของเซลล์ยีสต์ และนำมาใช้รักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อราได้ เนื่องจากร่างกายของมนุษย์ไม่มีกระบวนการสังเคราะห์ไคติน

ในการทดลองนี้เพื่อคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการผลิต chitin synthetase

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

1. นำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SS553 และ EC19 มาเลี้ยงในอาหาร YEPD agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เชื้อยีสต์มา 1 ลูบ ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร YEPD broth อยู่และนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ใช้ปิเปตดูดเชื้อทุกๆ 1.5 ชั่วโมง มาวัดค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
4. นับปริมาณเซลล์ทั้งหมดโดยใช้ haemocytometer ทุกๆ 3 ชั่วโมง พร้อมกับการทำ spread plate บนอาหาร YEPD agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการนับจำนวนโคโลนี ที่ปรากฏ

การเตรียมเชื้อทดสอบ

1. นำเชื้อยีสต์ทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์ มา streak บนอาหาร YEPD agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 18-24 ชั่วโมง
2. นำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SS553 และ EC19 มาเลี้ยงในอาหาร YEPD broth เขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. เชื้อยีสต์ที่เป็นโคโลนีเดี่ยวใส่ลงในอาหารเหลว YEPD นำไปบ่มในสภาวะเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง
4. ใช้ pipette ขนาด 1 มล. ดูดเชื้อยีสต์ที่เจริญอยู่ในช่วง log phase (OD660 ~ 0.8-1.2) ปริมาณ 1.0 มล. ผสมในอาหาร YEPD agar 200 มล. ที่ยังหลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45-50 °C ให้เข้มข้น 0.5 %v/v เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้แข็งตัว

การทดสอบ primary screening antifungal antibiotics

1. ทำการเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วยบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5-7 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารหมัก 4 ชนิดคือ F1 F3 F4 และ F5 (Cheepthum *et al.*, 1999) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm เจาะบริเวณปลายเส้นใย นำไปใส่ในอาหารหมัก 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml ทำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 124 รอบ/นาที
2. การทดสอบ primary screening antifungal antibiotics โดยวิธี Paper disc diffusion method (Madigan *et al.*, 1997)
 - 2.1 นำ sterile disc 2 อัน มาจุ่มในอาหารหมักเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เตรียมได้จากข้อ 1 แล้วนำมาตากให้แห้งบนกระดาษแก้ว
 - 2.2 นำ disc ที่แห้งแล้วมาวางบนจานอาหารยีสต์ทดสอบที่เตรียมไว้จากข้อ 2 โดยมี Nystatin เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบการยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์

2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30^o C นาน 18-24 ชั่วโมง

2.4 สังเกตความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบ โดยดูกาเกิดวงใสรอบ disc ซึ่งผลการยับยั้งจะมีอยู่ 3 รูปแบบ

ตาราง 2.1 รูปแบบการยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SS 553 และ EC 19

รูปแบบการยับยั้ง เชื้อยีสต์ทดสอบ	การยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบ <i>S. cerevisiae</i>	
	SS 553	EC 19
1	-	-
2	-	+
3	+	+

2.5 ทำการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบเป็นตามรูปแบบที่ 2 หรือให้ผลการยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบสายพันธุ์ EC 19 มากที่สุด แต่มีผลการยับยั้งสายพันธุ์ SS 553 น้อยที่สุด

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อรา

1. การศึกษาหาระดับ pH ที่เหมาะสม

เตรียมอาหาร F5 ซึ่งได้ผลจากการทดลองในขั้นการคัดเลือก มาทำการปรับระดับ pH เป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 โดยการเติม HCl หรือ NaOH. อย่างละ 12 flask ซึ่งมีปริมาตร flask ละ 50 มล. ปริมาตร 50 ml ใส่ใน 250 ml Erlenmeyer flasks ทำการปลุกเชื้อเอนโดไฟท์ และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาที จากนั้นทำการวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SS 553 และ EC 19 ด้วยวิธี Paper disc diffusion agar method

2. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา เตรียมอาหาร F5 ที่มีระดับ pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3 ทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน (25, 30, 37, และ 45 °C) นาน 7 วัน โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาที จากนั้นทำการวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SS 553 และ EC 19 ด้วยวิธี Paper disc diffusion agar method

3. ระยะเวลาในการหมัก

เตรียมอาหาร F5 ที่มีระดับ pH และที่เหมาะสมจากข้อ 3.3 ทำการบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม จากข้อ 3.4 โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาที ทำการเก็บน้ำเลี้ยงทุกวัน และทำการวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SS 553 และ EC 19 ด้วยวิธี Paper disc diffusion agar method

การเตรียมสารสกัดสารยับยั้งเชื้อราโดยใช้ตัวทำละลาย ethyl acetate

1. การเตรียมเชื้อตั้งต้น *Fusarium* sp. (CMUBE1681)
2. งดสารตั้งต้นใส่ลงในอาหารเหลว F5 ให้ได้ปริมาณเชื้อตั้งต้น 1% บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 5-6 วัน
3. ตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบโดยวิธี Paper disc diffusion agar method
4. แยกเส้นใยเชื้อราออกโดยใช้กระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บน้ำเลี้ยงไว้
5. เท ethyl acetate ลงไปผสมกับน้ำเลี้ยงในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปเขย่าแรงๆ นาน 30-60 นาที ในกรวยแยก
6. จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในตู้ควั่นให้สารเกิดการแยกชั้น
7. เก็บชั้น ethyl acetate ไว้
8. ส่วนชั้นน้ำเลี้ยง นำมาสกัดด้วย ethyl acetate โดยทำซ้ำข้อ 5.5-5.7 อีก 2 ครั้ง
9. ตรวจสอบหาสารยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบที่อาจเหลือค้างอยู่โดยวิธี Paper disc diffusion agar method ถ้าไม่มีสารยับยั้งเหลือค้างอยู่ให้ทิ้งได้
10. รวบรวมชั้น ethyl acetate ที่สกัดได้ในแต่ละครั้ง ทำให้เข้มข้นด้วยวิธี evaporation ภายใต้อุณหภูมิ 40-50 °C จนเหลือประมาณ 2-3 มล. แล้วชะด้วย ethyl acetate จากนั้นดูดใส่ขวด vial ขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

การแยกสารยับยั้งเชื้อราโดยวิธี TLC

sample : สารสกัดที่ได้จากการสกัดน้ำเลี้ยงด้วย ethyl acetate

stationary phase: แผ่น TLC silica gel plate (Merck aluminium sheet, 60 F₂₅₄) ขนาด 2x20 ซม.

Mobile phase : dichloromethane (CH₂Cl₂): Methanol (MeOH) ในอัตราส่วน 97:3 % v/v

- 1 นำแผ่น silica gel plate มากำหนดจุดระยะเริ่มต้นให้ห่างจากขอบ 2 ซม. และระยะสิ้นสุดของสารละลาย mobile phase ให้ห่างจากระยะเริ่มต้น 15 ซม.
- 2 หยดสาร sample ลงบนแผ่น silica gel ที่เส้นระยะเริ่มต้น โดยหยดครั้งละ 1 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง และเว้นระยะแต่ละครั้งพอให้สารแห้งก่อนจะหยดครั้งใหม่ หลังจากหยดครบ 5 ครั้งแล้ว ทิ้งไว้ให้แห้งก่อน

- 3 นำแผ่น silica gel แต่ละอันใส่ลงในแทงค์ ที่อ้อมตัวไปด้วยสารละลาย mobile phase
- 4 ทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายซึมขึ้นจนถึงเส้นระยะสิ้นสุด จากนั้นเอาแผ่น silica gel ออก ตากให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง
- 5 แบ่งแผ่น silica gel ออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งตรวจสอบหาจุดของสารยับยั้งโดยการนำแผ่น TLC มาวางบนอาหาร YEPD agar ที่ผสมเชื้อยีสต์ทดสอบแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C หลังจากวางแผ่น silica gel นาน 1 ชั่วโมง ให้นำออก จากนั้นบ่มต่อ นาน 18-24 ชั่วโมง สังเกตวงใสที่เกิดขึ้น พร้อมทั้งวัดระยะแล้วบันทึกเป็นค่า R_f
- 6 ส่วนที่สองนำไปตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารโดยวิธี อดด้วยไอของไอโอดีน สังเกตเห็นเป็นจุดสีน้ำตาล

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคนางชนิด

ยีสต์

ได้แก่ *Candida albicans* ทำการทดสอบด้วยวิธี swab เชื้อยีสต์ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เชื้อยีสต์ลงบนอาหาร Yeast-Malt extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 18-24 ชั่วโมง
2. เชื้อยีสต์ใส่ลงอาหารเหลว Yeast-Malt extract ปริมาตร 50 มล.
3. บ่มในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง นาน 18-24 ชั่วโมง
4. ใช้ไม้สำลีจุ่มเชื้อแล้ว swab บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว วางทิ้งไว้ให้แห้ง
5. นำ disc จุ่มสารยับยั้งที่สกัดด้วย ethyl acetate ตากให้แห้งทำซ้ำ 2 ครั้ง
6. นำ disc มาวางตรงกลางจานอาหารที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C
7. ตรวจสอบผลการยับยั้งการเจริญ โดยสังเกตการเกิดวงใสรอบ disc

เชื้อแบคทีเรีย

ได้แก่ *Bacillus subtilis* *Escherichai coli* *Pseudomonas areruginosa* *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. ทำการทดสอบด้วยวิธี swab เชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เชื้อเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง
2. เชื้อเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร nutrient broth ปริมาตร 50 มล.
3. บ่มในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง นาน 18-24 ชั่วโมง
4. ใช้ไม้สำลีจุ่มลงในอาหารเหลวแล้ว swab บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว วางทิ้งไว้ให้แห้ง
5. นำ disc จุ่มสารยับยั้งที่สกัดด้วย ethyl acetate ตากให้แห้งทำซ้ำ 2 ครั้ง
6. นำ disc มาวางตรงกลางจานอาหารที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C
7. ตรวจสอบผลการยับยั้งการเจริญ โดยสังเกตการเกิดวงใสรอบ disc

ผลการทดลอง

การเจริญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ

จากการทดลองศึกษาการเจริญของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SS553 และ EC19 ในอาหาร YEPF broth โดยทำการวัดการเจริญของเชื้อที่เวลาต่างๆ ด้วยการวัดค่าความขุ่นของเชื้อที่เพิ่มขึ้น ในอาหารที่ทำการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร และการทำ spread plate บนอาหาร YEPD agar พบว่าสายพันธุ์ SS553 สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ได้โดยใช้เวลาเท่ากับสายพันธุ์ EC19 ซึ่งใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมง โดยระยะเวลาที่อยู่ในช่วง log phase ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ประมาณ 3 ชั่วโมง (ตาราง 2.2 และ 2.3)

การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ทดสอบ

ตาราง 2.2 ผลการวัดการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ EC19

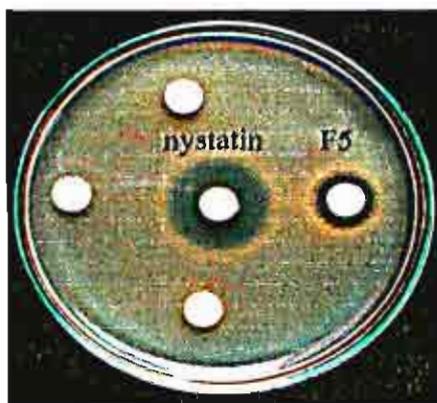
ชั่วโมง	OD ₆₆₀	Total cell	Viable cell
0	0.007	2.80 x 10 ⁶	4.60 x 10 ³
1.5	0.013		
3.0	0.018	3.45 x 10 ⁶	2.00 x 10 ⁴
4.5	0.025		
6.0	0.041	1.77 x 10 ⁶	3.17 x 10 ⁵
7.5	0.066		
9.0	0.126	1.35 x 10 ⁷	3.00 x 10 ⁶
10.5	0.262		
12.0	0.725	9.00 x 10 ⁸	6.00 x 10 ⁷
13.5	0.945		
15.0	1.412	1.10 x 10 ⁷	6.00 x 10 ⁸
16.5	1.502		
18.0	1.620	2.67 x 10 ⁸	5.31 x 10 ¹⁰
19.5	1.666		
21.0	1.717	3.40 x 10 ⁸	1.31 x 10 ¹⁴
22.5	1.738		
24.0	1.747	4.13 x 10 ⁸	1.60 x 10 ¹⁷

ตาราง 2.3 ผลการวัดการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SS553

ชั่วโมง	OD ₆₆₀	Total cell	Viable cell
0	0.013	2.10 x 10 ⁶	5.82 x 10 ⁴
1.5	0.014		
3.0	0.016	4.10 x 10 ⁶	5.70 x 10 ⁴
4.5	0.023		
6.0	0.044	2.04 x 10 ⁶	4.125 x 10 ⁵
7.5	0.067		
9.0	0.114	2.18 x 10 ⁷	4.26 x 10 ⁸
10.5	0.177		
12.0	0.651	7.86 x 10 ⁷	7.135 x 10 ⁷
13.5	-		
15.0	1.355	5.76 x 10 ⁷	5.00 x 10 ⁹
16.5	-		
18.0	1.704	9.30 x 10 ⁷	2.50 x 10 ¹²
19.5	1.763		
21.0	1.869	7.62 x 10 ⁸	3.40 x 10 ¹³
22.5	1.949		
24.0	1.910	7.24 x 10 ⁸	1.97 x 10 ¹⁴

การทดสอบ primary screening antifungal antibiotics

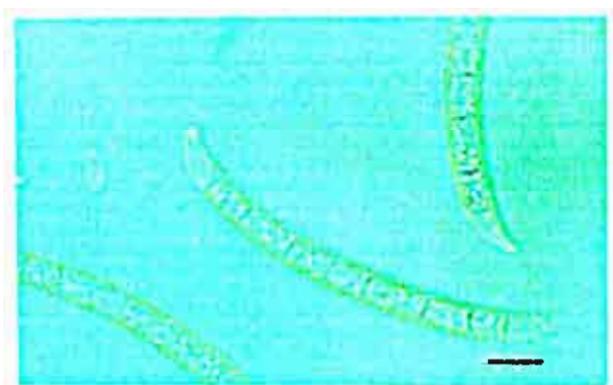
จากการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ของกล้วยทั้งหมด 820 ไอโซเลท โดยหมักในอาหารหมัก 4 ชนิด พบว่ามีเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 100 ไอโซเลท (ตาราง 2.5) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ทดสอบเฉพาะ *S. cerevisiae* EC19 และพบว่าอาหาร F3 และ F5 ทำให้เกิดวงใสมากที่สุด จากการทดลองนี้พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถทำให้เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบ *S. cerevisiae* EC19 มากที่สุดคือ *Fusarium* sp. (CMUBE1681) (ตาราง 2.4 ภาพที่ 2.1 และ 2.2) จึงพิจารณานำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 2.1 The inhibition zone of antifungal agent produced by *Fusarium* sp. (strain CMUBE1681) against *S. cerevisiae* (EC19)

ตาราง 2.4 Diameter of inhibition zone of fermentation broth produced by *Fusarium* sp. (strain CMUBE1681).

Organism	Medium	Diameter of inhibition zone (mm)	
		<i>S. cerevisiae</i> Strain SS553	<i>S. cerevisiae</i> Strain EC19
<i>Fusarium</i> sp (strain CMUBE1681)	F1	-	-
	F3	-	9
	F4	-	-
	F5	-	11



ภาพที่ 2.2 Conidia of *Fusarium* sp. (CMUBE1681). Bar = 10 μ m.

ตาราง 2.5 The inhibition zone against test organism of endophytes in different fermentation media.

Isolated Number	Taxa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SS				<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC			
		553 (mm.)				91 (mm.)			
		F1	F3	F4	F5	F1	F3	F4	F5
270	Unknown sp.4								6.0
325	Ascomycete sp.2			6.0	6.0				
341	<i>Fusarium</i> sp.5	6.5		6.0					
354	<i>Verticillium</i> sp.					6.0	6.0	6.0	6.0
373	<i>Xylaria</i> sp.3	6.5	7.0	6.0	6.5				
421	<i>Sterilia mycelia</i> sp.8	5.8		11.0					
423	<i>Sterilia mycelia</i> sp.8			15.0					
458	Unknown sp.5				6.5				
467	<i>Phoma</i> sp.				6.5				7.0
514	<i>Phoma</i> sp.		7.0			7.0	7.0	6.5	7.0
515	<i>Sterilia mycelia</i> sp.1		6.5						
516	<i>Phomopsis</i> sp.	9.0	8.0		9.0				
522	<i>Phomopsis</i> sp.				10.0				
523	<i>Phomopsis</i> sp.		15.0		20.0				
573	<i>Xylaria</i> sp.1						7.0		7.0
585	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>						7.0		
596	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	6.5	6.5	6.5					
604	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	7.0							
606	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		6.5		6.5				
616	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	6.5	6.5						
619	<i>Colletotrichum musae</i>			6.5	6.5				
623	<i>Colletotrichum musae</i>	6.5	6.5						
628	<i>Xylaria</i> sp.1					7.0			
647	<i>Xylaria</i> sp.3						6.5		
648	<i>Xylaria</i> sp.3					6.5	7.0		6.5
656	<i>Xylaria</i> sp.5	7.0	10.0			6.5	7.0	6.5	6.5
657	<i>Xylaria</i> sp.5		8.0			7.0	7.0	6.5	6.5
661	<i>Xylaria</i> sp.5					6.5	6.5		6.5
662	<i>Xylaria</i> sp.5	7.0	7.0			6.5	8.0	6.5	7.0

Table 2.5 Cont.

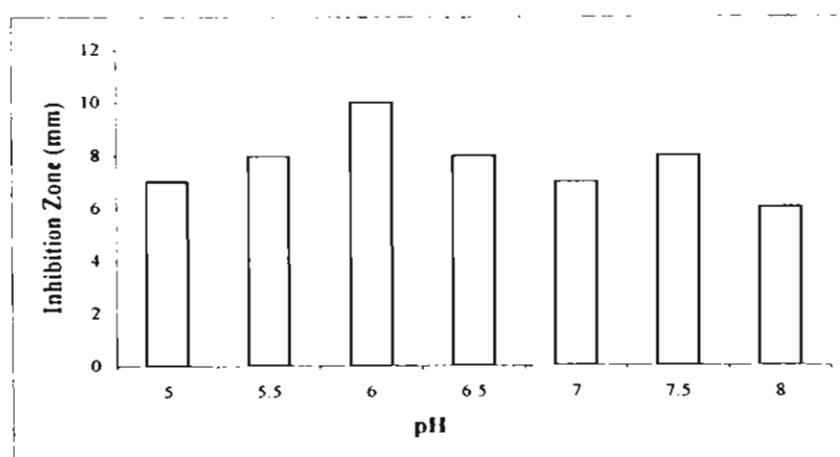
Isolated Number	Taxa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SS				<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC			
		553 (mm.)				91(mm.)			
		F1	F3	F4	F5	F1	F3	F4	F5
683	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	7.0	7.0			6.5	7.0		
694	<i>Phoma</i> sp.		7.0				7.0	7.0	
737	<i>Sagenoma</i> sp.					6.5	6.5		
744	Unknown sp.4		7.0						
746	Unknown sp.4						7.0		
747	Unknown sp.4					7.0	7.0		7.0
750	Unknown sp.4				6.5				
751	Unknown sp.4					6.5			
752	Unknown sp.4								7.0
757	<i>Fusarium</i> sp.2								15.0
758	<i>Fusarium</i> sp.2						7.0	12.0	12.0
759	<i>Fusarium</i> sp.2		10.0					10.0	12.0
760	<i>Fusarium</i> sp.2	8.0	7.0						
767	<i>Fusarium</i> sp.2						7.0		
768	<i>Fusarium</i> sp.2		8.0				8.0		
769	<i>Fusarium</i> sp.2						7.0		6.5
770	<i>Fusarium</i> sp.2						8.0		
773	<i>Fusarium</i> sp.2						8.0		
776	<i>Guignardia cocoicola</i>							7.0	
779	Unknown sp.8						7.0		7.0
787	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>					6.5	7.0		6.5
1603	<i>Colletotrichum musae</i>				7.0				
1604	<i>Xylaria</i> sp.2						6.0		
1607	Unknown sp.4						7.0	6.0	
1612	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>						7.0		
1618	<i>Guignardia cocoicola</i>	6.0	6.0	6.0	6.0				
1626	<i>Xylaria</i> sp.2						6.5	6.5	
1629	<i>Xylaria</i> sp.7						8.0		
1638	<i>Xylaria</i> sp.5						7.0		

Table 2.5 Cont.

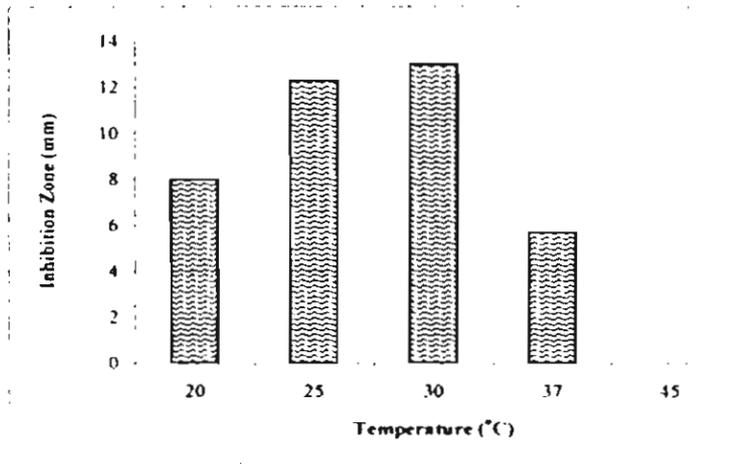
Isolated Number	Taxa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SS				<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC			
		553 (mm.)				91 (mm.)			
		F1	F3	F4	F5	F1	F3	F4	F5
1655	<i>Phoma</i> sp.					6.0			6.0
1714	<i>Sterilia mycelia</i> sp.	6.0	6.0	6.0	6.0				
1716	<i>Sterilia mycelia</i> sp.					6.0	6.0	6.0	6.0
1719	Unknown						6.5		
1723	<i>Guignardia cocoicola</i>					6.5	6.5		
1728	<i>Sterilia mycelia</i> sp.		6.0						
1732	<i>Pycularia</i> sp.					7.5	7.5	7.5	
1770	<i>Cordana musae</i>						8.0		
1781	Unknown	12.0			15.0				
1792	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>						7.0		

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อรา

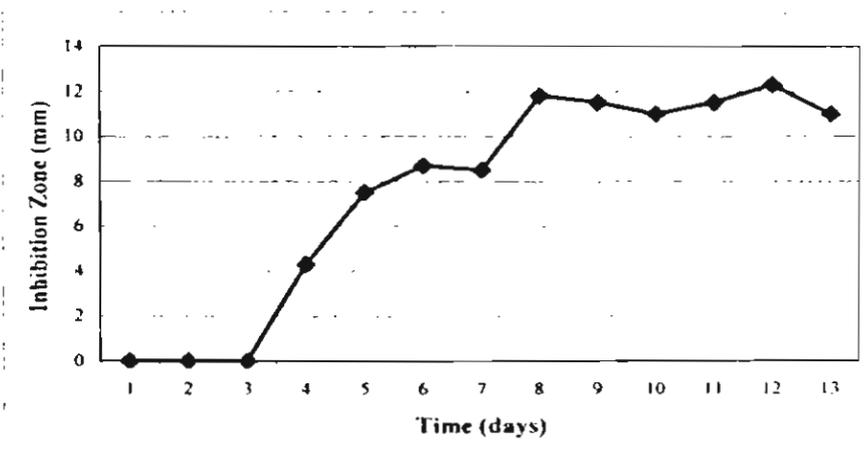
จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. (CMUBE 1681) พบว่าการบ่มเชื้อราในอาหาร ที่มี pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C และระยะเวลา 8 วัน ทำให้เชื้อผลิตสาร และเกิดวงใสมากที่สุด อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกันของวงใสในการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C และ 30 °C แต่การบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เกิดวงใสกว้างกว่า ที่อุณหภูมิ 25 °C (ภาพที่ 2.3 2.4 และ 2.5)



ภาพที่ 2.3 Zone of inhibition production by *Fusarium* sp. (CMUBE 1681) extracts inhibit growth of *S. cerevisiae* EC 19 at different pH.



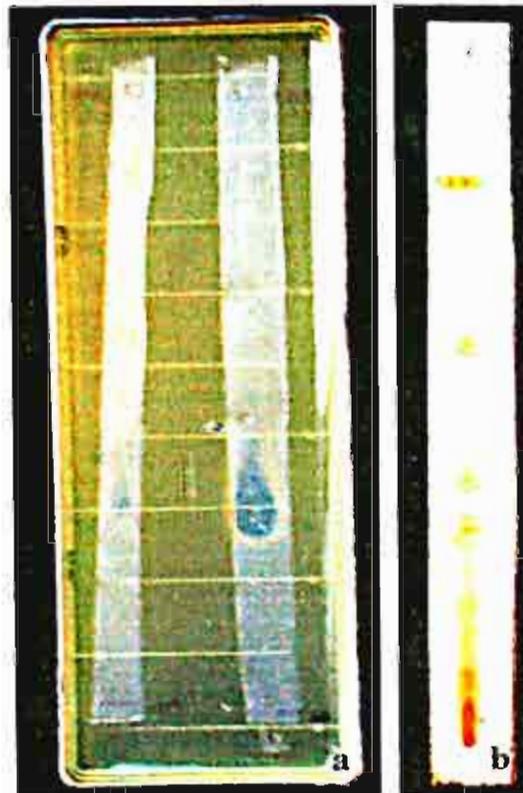
ภาพที่ 2.4 Zone of inhibition production by *Fusarium* sp. (CMUBE 1681) inhibit growth of *S. cerevisiae* EC 19 incubation with different temperatures.



ภาพที่ 2.5 Production of antifungal agents by *Fusarium* sp. (CMUBE1681) against *S. cerevisiae* EC19 over time.

การแยกสารยับยั้งเชื้อราโดยวิธี TLC

จากการทำ TLC และ bioassay plate พบว่า R_f ที่ทำให้เกิดวงใสกับเชื้อทดสอบ *S. cerevisiae* EC19 คือ $R_f = 0.67$ (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 Inhibition zone produced from extract of *Fusarium* sp. (strain CMUBE1681) against growth of *S. cereviceae* EC 19 was grown on Petri dish with on filter paper; a) inhibition zone on plate assay; b) TLC plate.

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคมบางชนิด

จากการนำสารสกัดของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. (CMUBE1681) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* *Escherichai coli* *Pseudomonas areruginosa* *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. และนอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* ได้อีกด้วย (Table 2.6)

Table 2.6 The biological activity of extract of *Fusarium* sp. (CMUBE1681) against various human pathogenic bacteria and one human pathogenic yeast.

Test organism	Diameter of inhibition zone (mm)
<i>Bacillus subtilis</i>	16
<i>Escherichai coli</i>	10
<i>Pseudomonas areruginosa</i>	15.5
<i>Salmonella</i> sp.	14.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.5
<i>Candida albicans</i>	10

สรุปและวิจารณ์

พบการผลิตสารต้านเชื้อ *S. cerevisiae* EC19 จำนวน 100 ไอโซเลทจากราเอนโดไฟท์ที่แยกกล้วย ทำการคัดเลือกเชื้อไอโซเลท CMUBE1681 มาทำการทดสอบต่อและทำการจำแนกชนิดเป็นรา *Fusarium* sp. ซึ่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อราคือ F5 ซึ่งประกอบด้วย Manitol 100g/l yeast extract 10 g/l corn meal 33 g/l และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/l pH เริ่มต้นของอาหารมีค่าประมาณ 6.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มคือ 30 °C

Bills และ Polishook (1992) พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์มีความสามารถผลิตสาร secondary metabolites และสามารถนำมาให้ประโยชน์ทั้งทางการแพทย์และทางการเกษตร และนอกจากเชื้อราเอนโดไฟท์ยังมี ศักยภาพในการผลิตสารต่างๆ ที่ช่วยรักษาปัญหาด้านสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ได้ (Strobel, 2002)

เอกสารอ้างอิง

- Andrews, J.H., Hecht, E.P. & Bashirian, S. (1985). Association between the fungus *Acremonium curvulum* and Eurasian water milfoil, *Myriophyllum spicatum*. *Canadian Journal of Botany* 60: 1216-1221.
- Awazu, N. (1995). Aureobasidins produce by *Aureobasidium pullulans* against *Candida albicans*. *Journal of Antibiotics* 48: 525-527.
- Azevedo, J.L, Maceheroni, W.Jr. & Pereire, J.O. (2000). Endophytic Microorganisms: a review an insect control and recent advances on tropical plants. *Electric Journal of Biotechnology* 3: 1-44.
- Bacon, C.W. & White, J.F. (1994). *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. CRC Press, U.S.A. 214 p.
- Cabib, E. & Bowers, B. (1995). Chitin and yeast budding localization of chitin in yeast bud scars. *Journal of Biological Chemistry* 246: 152-159.
- Cheeptham, N. (1995). Studies on antifungal antibiotics from *Ellisiodothis inquinans* L1588-A5, Masteral thesis. Department of Bioscience and Chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Japan.
- Cheeptham, N., Higasshiyama, T., Fukushi, E., Matsuura, H., Mikama, T., Yokata, A., Ichihara, A. & Tomita, F. (1999). Studies in an Antifungal Antibiotic from *Ellisiodothis ingiunans* L1588-A8. *Thai Journal of Biotechnology* 1: 37-45.
- Debono, M. & Gordee, R.S. (1992). Antibiotics That Inhibit Fungal Cell Wall Development. *Annual Review of Microbiology* 48: 471-497.

- Dreyfuss, M.M. & Chapela, I.H. (1999). Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In: *The Discovery of Natural Productions with Therapeutic Potential* (Gullo, V.C. ed.), pp. 49-80. Butterworth-Heinemann, London.
- Endo, A., Kakiki, K., Misato, T. & Endo, A. (1970). Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D. *Journal of Bacteriology* 104: 189-196.
- Falagus, M.E., McDermott, L. & Snyderman, D.R. (1997). Effect of pH on *in vitro* antimicrobial susceptibility of the *Bacteriodes fragilis* group. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 41: 2047-2049.
- Fisher, P.J., Anson, A.E. & Petrini, O. (1984a). Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. *Botanica Helvetica* 94: 249-253.
- Fisher, P.J., Anson, A.E. & Petrini, O. (1984b). Novel antibiotic activity of an endophyte *Cryptosporiopsis* sp. isolated from *Vaccinium myrtillus*. *Transactions British Mycological Society* 83: 145-148.
- Fox, F.M. (1993). Tropical fungi: their commercial potential. In: *Aspects of Tropical Mycology* (Isaac, S.J., Frankland, C., Watling, R. & Whalley, A.J.S. eds.), pp. 253-264. Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- Frankmölle, W.P., Knübel, G., Moore, R.E. & Patterson, G.M. (1992b). Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*. II. Structures of laxaphycins A, B, D and E. *The Journal Of Antibiotics* 45: 1458-1466.
- Frankmölle, W.P., Larsen, L.K., Caplan, F.R., Patterson, G.M., Knübel, G., Levine, I.A. & Moore, R.E. (1992a). Journal of Antibiotics Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*. I. Isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics* 45: 1451-1457.
- Fravel, D.R. (1988). Formulations of microorganism to control plant diseases. In: *Formulation of Microbial Biopesticides* (Burgess, H.D. ed.), pp. 186-202. Klumer, Academic Press, Dordrecht, Netherlands.
- Fujio, M. (1994). Biosynthesis of chitin synthetase. *Journal of Antibiotic* 47: 832-835.
- Gerth, K. (1995). Ratjadon: a new antifungal compound from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria) production, physio-chemical and biological properties. *The Journal Of Antibiotics* 48: 973-976.
- Ghisalberti, E.L. & Sivasithamparum, K. (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biological Biochemistry* 23: 1011-1020.
- Gow, A.L. & Selitrenmikoff, C.P. (1984). Chitin synthetase. *Current Microbiology* 11: 211-216.

- John, J., Krohn, K., Flörke, U., Aust, H.J., Draeger, S. & Schulz, B. (1999). Biologically active secondary metabolites from fungi, 12. Oidiodolactones A–F, labdane diterpene derivatives isolated from *Oidiodendron truncata*. *Journal of Natural Products* 62: 1218–1221.
- Johnston, P.R. & Jones D. (1997). Relationship among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89: 420–430.
- König, G., Wright, A.D., Draeger, S., Aust, H.J. & Schulz, B. (1999). Geniculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. *Journal of Natural Products* 62: 155–157.
- Krier, F., Revol–Junelles, A.M. & Germain, P. (1998). Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology* 50: 539–563.
- Krohn, K., Bahramsari, R., Flörke, U., Ludewig, K., Kliche–Spory, C., Michel, A., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B. & Antus, S. (1997b). Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, -- circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry* 45: 313–320.
- Krohn, K., Beckmann, K., Flörke, U., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B., Bringmann, G. & Busemann, S. (1997a). Biologically active metabolites from fungi, 9. New palmarumycins CP_{4a} und CP₄ from *Coniothyrium palmarum*: structure elucidation, crystal structure analysis and determination of the absolute configuration by CD–calculations. *Tetrahedron* 53: 3101–3110.
- Krohn, K., Biele, C., Drogies, K.H., Steingröver, K., Aust, H.J., Draeger, & Schulz, B. (2002). Biologically active metabolites from fungi, 18. Fusidilactones, a new group of polycyclic lactones from an endophyte, *Fusidium* sp. *European Journal of Organic Chemistry* (inpress).
- Krohn, K., Flörke, U., John, M., Root, N., Steingröver, K., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S., Simonyi, M. & Zsila, F. (2001a). Biologically active metabolites from fungi. Part 16: New preussomerins J, K and L from an endophytic fungus: structure elucidation, crystal structure analysis and determination of absolute configuration by CD calculation. *Tetrahedron* 57: 4343–4348.
- Krohn, K., Flörke, U., Rao, Meneni Srinivasa, Steingröver, K., Aust, H.J., Draeger, & Schulz, B. (2001b). Metabolites from fungi 15. New isocoumarins from an endophytic fungus isolated from the Canadian thistle *Cirsium arvense*. *Natural Products* 15: 353–361.

- Krohn, K., Franke, C., Jones, P., Aust, H.J., Draeger, S. & Schulz, B. (1992a). Isolierung, Synthese und biologische Wirkung von Coniothyriomycin sowie Synthese und Biotestung analoger offen kettinger Imide. *Liebigs Annalen der Chemis* 1992: 789-798.
- Krohn, K., John, M., Aust, H.J., Draeger, S. & Schulz, B. (1999b). Biologically active metabolites from fungi, 13. Stemphytriol, a new perylene derivative from *Monodictys fluctuata*. *Natural Products Letters* 14: 31-34.
- Krohn, K., Ludewig, K., Draeger, S., Aust, H.J., & Schulz, B. (1994a). Biologically active metabolites from fungi. 3. Sporothriolide, discosiolide, and 4-*epi*-ethisolide—new fuofurandiones from *Sporothrix* sp., *Discosia* sp., and *Pezizula livida*. Novel furafuranones from fungi. *Journal of Antibiotics* 46: 113-118
- Krohn, K., Ludewig, K., Jones, P., Düring, D. Aust, H.J., Draeger, S. & Schulz, B. (1992b). Biologically active metabolites from fungi. 2 An antifungal and herbicidal lanostane lactone from *Sporomiella australis*. *Natural Products* 1: 29-32.
- Krohn, K., Michel, A., Flörke, U., Aust, H.J., Draeger, S. & Schulz, B. (1994b). Palmarumycins CP₁-CP₄ from *Coniothyrium palmarum*: Isolation, Structure Elucidation and Biological Activity. *Liebigs Annalen der Chemis* 1994: 1093-1097.
- Krohn, K., Michel, A., Flörke, U., Aust, H.J., Draeger, S. & Schulz, B. (1994c). Palmarumycins CP₁-CP₁₆ from *Coniothyrium* sp.: Isolation, Structure Elucidation and Biological Activity. *Liebigs Annalen der Chemis* 1994: 1099-1108.
- Krohn, K., Michel, A., Römer, E., Flörke, U., Aust, H.J., Draeger, S. & Schulz, B. (1996). Biologically active metabolites from fungi 6: Phomosines A–C. Two new biaryl ethers and one new arybenzyl ether from *Phomopsis* sp. *Natural Products Letters* 8: 43-48.
- Kunze, B., Jansen, R., Sasse, F., Höfle, G. & Reichenbach, H. (1995). Chondramides A approximately D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *The Journal of Antibiotic* 48: 1262-1266.
- Li, J.Y., Harper, J.K., Grant, D.M., Tombe, B.O., Bashyal, B., Hess, W.M. & Strobel, G.A. (2001). Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochemistry* 56: 463-468.
- Liu, C.H., Zou, W.X., Lu, H. & Tan, R.X. (2001). Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology* 88: 277-282.
- Lu, H., Zou, WX., Meng, J.C., Hu, J. & Tan, R.X. (2000). New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungi in *Artemisia annua*. *Plant Science* 151: 67-73.

- Mandeel, Q., Al-Laith, A. & Mohsen, L. (1999). Survey of *Fusarium* species in an arid environment of Bahrain. V. Antimicrobial activity of some local and international *Fusarium* species. *Pharmaceutical–Biology* 37: 181-187.
- Matta, A. (1971). Microbial penetration and immunization of uncongenial host plants. *Annual Review of Phytopathology* 9: 387-410.
- Möller, C., Weber, G. & Dreyfuss, M.M. (1996). Intraspecific diversity in the fungal species *Chaunopycins alba*: implications of microbial screening programs. *Journal of Indonesian Microbiology* 17: 359-372.
- Monaghan, R.L., Polihook, J., Pecore, V.J., Bills, G.F., Nallin–Omstead, M. & Streicher, S.L. (1995). Discovery of novel secondary metabolites from fungi—is it really a random walk through a random forest? *Canadian Journal of Botany* 73: (Supplement), S925-S931.
- Nisbet, L.J. & Fox, M.F. (1991). The importance of microbial diversity to biotechnology. In: *The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its Role in Sustainable Agriculture* (Hawksworth, D.L. ed.), pp. 229-244. CAB International: Wallingford, UK.
- Nobel, H.M., Langley, D., Sedebottom, P.J., Lane, S.J., & Fisher, P.J. (1991). An echinocandin from an endophytic *Cryptosporiopsis* sp. and *Pezicula* sp. in *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Mycological Research* 95: 1439-1440.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. & Hyde, K.D. (2001). Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, in Thailand. *Mycological Research* 105: 1508-1513.
- Redman, R.S., Dunigan, D.D. & Rodriguez, R.J. (2001). Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* 151: 705-716.
- Schardl, C.L., Chung, K.R., Penny, D. & Siegel, M.R. (1997). Co–evolution by common descent of fungal symbionts (*Epichloa* spp.) and grass hosts. *Molecular Biological Environment* 14: 133-143.
- Schulz, B., Sucker, J., Aust, H.J., Krohn, K. Ludewig, K., Jones, P.G. & Döring, D. (1995). Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezicula* species. *Mycological Research* 99: 1007-1015.
- Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Durán, A. & Cabib, E. (1991). The function of chitin synthase–2 and synthase–3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Journal of Cell Biology* 114: 111-123.
- Singh, D.V., Aggarwal, R. & Srivastava, K.D. (2003). The antagonism by *Chaetomium globosum* against spot blotch of wheat caused by *Drechslera sorokiniana*.

- Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand.* p 32.
- Strobel, G.A. (2002). Gifts from the rainforest. *Canadian Journal of Phytopathology* 24: 14-20.
- Strobel, G.A., Torczynski, R. & Bollon, A. (1997). *Acremonium* sp. a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science* 128: 97-108.
- Sutton, B.C. (1980). *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, UK.
- Tan, R. & Zou, W. (2001). Endophyte: a rich source of functional metabolites. *Natural Products Reports* 18: 448-459.
- Tanner, W., Gentsch, M., Immervoll, T., Scheinost, A. & Strahl-Bolsinger, S. (1995). Fungal glycoproteins and their biosynthetic pathway as potential targets for antifungal agents. *Acta Biochimica Polonica* 42: 505-508.
- Tkacz, J.S. (2000). Polyketide and peptide products of endophytic fungi: variations on two biosynthetic themes of secondary metabolism. In *Microbial Endophytes* (Bacon, C.W. & Whire, J.F. eds.), pp. 263-294. Marcel Dekker, New York.
- Trenin, A.S., Tolstykh, I.V., Terekhova, L.P., Zonkova, V.A., Makarova, M.O., Gladkikh, E.G., bychkova, O.P., Katrukha, G.S. & Dudnix, Yu. V. (2000). Hypolipidemic action of antibiotic 86/88 (enniatinB) in hepatoblastoma G2 cell culture. *Antibiotiki i khimioterapiya* 45: 6-9.
- Wheeler, M.H., Stipanovic, R.D. & Puckhaber, L.S. (1999). Phytotoxicity of equisetin and epi-equisetin isolated from *Fusarium equiseti* and *F. palliduroseum*. *Mycological Research* 103: 967-973.
- Wildman, H.G. (1997). Potential of Tropical Microfungi Within the Pharmaceutical Industry. 29-46, (Hyde K.D. ed.). Biodiversity of tropical microfungi, Hong Kong University Press, Hong Kong.

บทที่ 3

การศึกษาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล

บทนำ

เชื้อราในสกุล *Colletotrichum* เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคในพืชที่สำคัญหลายชนิด เช่น ธัญพืช ผัก และผลไม้ เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้ทั่วโลก โดยเฉพาะเขตร้อนและกึ่งร้อน (Bailey *et al.*, 1993) สามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกการเจริญเติบโต เป็นสาเหตุของโรคสำคัญหลังการเก็บเกี่ยวในพืชหลายชนิด เนื่องจากลักษณะการเข้าทำลายแฝง (latent infection) ซึ่งจะแสดงอาการของโรคเมื่อผลผลิตอ่อนแอหรือสุกแล้วเท่านั้น ทำให้ยากต่อการวางแผนป้องกัน กำจัด ก่อให้เกิดการสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมากในแต่ละปี (Munaut *et al.*, 1998) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum* ในพืชหลายชนิด เช่น มะม่วง มะละกอ ขนุน ชมพู ฝรั่ง เงาะ สตรอเบอร์รี่ พุทรา ส้ม หอม กระเทียม งา ถั่วเหลือง ถั่วเขียว เป็นต้น

เนื่องจากเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง มีพืชอาศัยกว้าง (wide host range) และพืชอาศัยชนิดหนึ่งๆ ถูกเข้าทำลายเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ได้หลายสปีชีส์ ประกอบกับในปัจจุบันยังมีความรู้เกี่ยวกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในกลุ่มนี้น้อย (Manner *et al.*, 1992) ข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการวางแผนป้องกัน กำจัด การกักกันโรค (quarantine) และการคัดพันธุ์ต้านทานโรคของนักปรับปรุงพันธุ์เป็นอย่างมาก

การจำแนกเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* มักพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย (host specificity) ความสามารถทำให้เกิดโรคในพืชทดสอบ (differential cultivar) และรูปแบบการเป็นปรสิต (mode of parasitism) (Sutton, 1992; Sherriff *et al.*, 1994) แต่หลักเกณฑ์ดังกล่าวยังไม่สามารถใช้จำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ได้ดีพอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชื้อราบางสปีชีส์ เช่น *C. gleosporioides*, *C. dematium* และ *C. lindemuthianum* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความผันแปรสูง (Sutton, 1992) บางลักษณะที่ตรวจพบไม่สามารถจำแนกได้ว่าอยู่สปีชีส์ใด บางลักษณะเมื่อทำการจัดจำแนกแล้วสามารถจัดได้หลายสปีชีส์ เนื่องจากมีลักษณะคาบเกี่ยวระหว่างสปีชีส์ นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังเป็นวิธีการที่ยังยาก ใช้เวลานาน อาศัยประสบการณ์ และวิจรรณญาณของผู้ทดลอง อีกทั้งลักษณะต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกนี้ยังผันแปรไปได้ ขึ้นอยู่กับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม ก่อให้เกิดความสับสนในการจำแนกและการศึกษา (Freeman *et al.*, 1993)

การทดลองในครั้งนี้จึงศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการจัดเรียงลำดับเบสของ rDNA ในส่วน ITS เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างชนิด

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การแยกรา endophytes

ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างกล้วย ชิง และสาปเสื่อ นำตัวอย่างทั้งหมดมาล้างน้ำไหลจากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวโดยวิธี triple surface sterilization โดยจุ่มใน 75% เอทธานอล เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจุ่มใน 1% sodiumhypochlorite นาน 3 นาที แล้วย้ายไปจุ่มใน 95% เอทธานอล 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร 2% malt extract agar ที่ผสม Rose bengal (30 mg/l) และ chloramphenicol (50 mg/l) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1-2 สัปดาห์ เมื่อเส้นใยเจริญออกมา ทำการถ่ายเชื้อจากปลายเส้นใยลงในอาหาร corn meal agar slant และบ่มไว้เพื่อดูการสร้างสปอร์ ทำการบ่งบอกชนิดเชื้อราโดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สปอร์ ลักษณะโคโลนี และลักษณะอื่นๆ

การบ่งบอกชนิดเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการบ่งบอกชนิดเชื้อรา *Colletotrichum* ปลูกเชื้อในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากนั้นทำการบ่งบอกและแบ่งกลุ่มของเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น สีและลักษณะโคโลนี ขนาดและรูปร่างของสปอร์ ลักษณะ appressoria จากนั้นศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อราโดยเปรียบเทียบการเจริญในอาหารและอุณหภูมิที่ต่างกัน โดยทำการปลูกเชื้อในอาหาร Malt extract agar (MA) และ Richard's V8 medium (RV8) บ่มที่อุณหภูมิต่างกันคือ 20 25 และ 30 °C นาน 7 วัน

การสกัด DNA

ทำการแยกเชื้อราเป็นสปอร์เดี่ยว (single spore) จากนั้นนำเชื้อรา *Colletotrichum* แต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ใน flask ขนาด 250 มิลลิเมตรโดยบ่มที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ 120 รอบ/นาที นาน 3-5 วัน ทำการเก็บเส้นใยของเชื้อราโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยใช้ buncher funnel และ vacuum pump ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วหลายๆ ครั้ง จนแน่ใจว่าเส้นใยสะอาดไม่มีอาหารปนอยู่ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาสกัด DNA ในขั้นต่อไป

นำเส้นใยเชื้อราที่เก็บไว้มาซึ่งประมาณ 0.5 กรัม สกัด DNA นำเส้นใยใส่ลงในโถงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมนิโตรเจนเหลวลงในโถงเพื่อให้เส้นใยแข็งตัว ทำการบดเส้นใยจนละเอียดเป็นผง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนตัวอย่างเริ่มหลอมละลาย จากนั้นเติม CTAB เพื่อสกัด DNA คนให้เส้น

ใยและสารละลายเข้ากัน ใช้ไปเปิดดูของเหลวถ่ายใส่ในหลอดใส่สารขนาดเล็ก (eppendorf tube) แล้วนำไปอุ่น ใน water bath ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 13,000 g นาน 5 นาที ใช้ไปเปิดดูส่วนใสชั้นบนประมาณ 500 ถึง 750 μ l ใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม phenol-chloroform-isoamyl 25:24:1 (vol/vol/vol) 500 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่น 13,000 g นาน 5 นาที ใช้ไปเปิดดูส่วนใสชั้นบนประมาณ 500 ถึง 750 μ l ใส่ในหลอดใหม่ ทำการตกตะกอน DNA โดยเติม แอลกอฮอล์ (100% เก็บที่ -20 °C) ปริมาตร 2.5 เท่า และบ่มที่ -20 °C นาน 30 นาที นำไปปั่น 13,000 g นาน 10 นาที ค่อยๆ เทของเหลวทิ้ง ทำให้ DNA แห้งโดยใช้สูญญากาศ ทำการละลาย DNA โดยเติม TE buffer (pH 8.0) 50 μ L และ RNase 5 units นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที เพื่อทำลาย RNA ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA โดยใช้ Lamda DNA marker เปรียบเทียบปริมาณ DNA ดูค่าดูดกลืนแสงที่ 260 nm

การเพิ่มปริมาณ DNA (Polymerase chain reaction)

ทำการเพิ่มปริมาณ rDNA ในส่วน The internal transcribed spacer (ITS) region 1 และ 2 รวมทั้ง 5.8S โดยใช้ Primers ITS4 and ITS5 (White *et al.*, 1990) โดยใช้เครื่อง PTC-200 thermocycler (MT Research Inc., USA) PCR ที่ใช้ปริมาตร 25 μ l โดยเติมสารดังนี้ 10x PCR buffer 2.5 μ l, Tag DNA Polymerase 0.2 μ l, 25 mM MgCl₂ 1.5 μ l, 20 mM dNTP 0.3 μ l, 10 mM Primer 1 μ l และ DNA 50 ng ทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบโดยกำหนดเวลาและอุณหภูมิแต่ละขั้นตอนดังนี้

Denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที

annealing ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 1 นาที

extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที

นำผลผลิตจาก PCR ที่ได้นำไปตรวจสอบหาแถบ DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis บน agarose gel (1.4%) จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจดูใต้ UV

Cloning และ sequencing

ทำการตัดเจลที่เกิดแถบของ PCR ที่ผ่าน electrophoresis บน agarose gel (1.4%) นำไปใส่ในหลอด eppendorf จากนั้นทำการย่อยสลายเจลและทำให้ DNA บริสุทธิ์ โดยใช้ Concert Rapid Gel Extraction System (Gibco BRL, Life Technologies, Australia) นำ DNA ที่บริสุทธิ์มา ligate เข้าสู่ pGEM-T Easy vector (Promega, USA.) และทำการ transform เข้าไปใน *Escherichia coli* JM109 (Promega, USA.) โดยวิธี heat shock (45 °C นาน 50 วินาที) นำเชื้อ *Escherichia coli* JM109 ที่ผ่านการ clone ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB-Ampicillin (100 μ g/ml) บ่มที่ 37 °C ในที่มืด ข้ามคืน ทำการเลือกโคโลนีที่มีการ insert ของ DNA โดยทำ PCR ด้วย M13 primer จากนั้นไปเลี้ยง

ในอาหารเหลว LB-Ampicillin (100 µg/ml) แล้วบ่มที่ 37 °C ในที่มีดขำคินบนเครื่องเขย่า ทำการสกัดพลาสมิด DNA ด้วยวิธี alkaline lysis (Sambrook *et al.*, 1989) ทำการตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Perkin Elmer-Applied Biosystems, USA.) และทำการอ่านโดยใช้เครื่อง ABI 377 automated DNA sequencer.

Sequence analysis

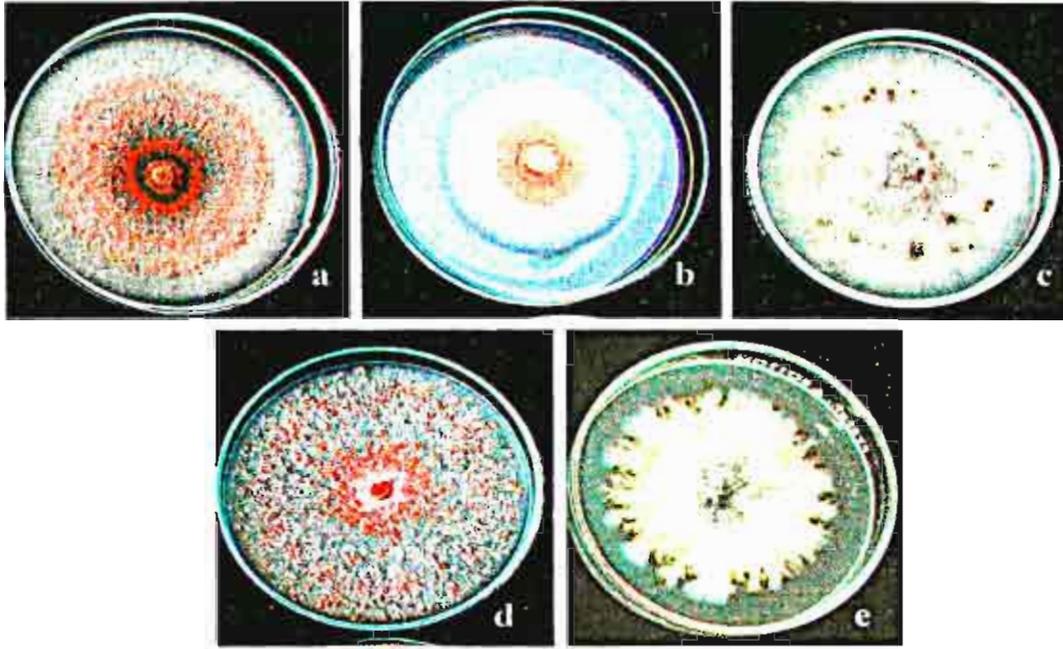
ทำการจัดเรียงลำดับเบส ในส่วน ITS1 และ ITS 2 รวมทั้ง 5.8S sequences โดยใช้ CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) และทำการค้นหาลำดับเบสใน Genbank และ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). จากนั้นทำการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้งหมดรวมทั้ง sequences จาก Genbank คือ AF272788 (*Glomerella acutata*) AF272780 (*G. cingulata*) AB042313 (*C. boninense*) AB087221 (*C. fragariae*) AJ536228 (*C. kahawae*) AB087220 (*C. musae*) และ AF451899 (*C. truncatum*) และมี *Colletotrichum truncatum* (AF451899) เป็น outgroup โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0b8 (Swofford, 2001) วิเคราะห์โดยวิธี Parsimony (heuristic search options with 1000 replications of random stepwise sequences addition and tree-bisection-reconnection (TBR) branch swapping) และ neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) Jukes-Cantor (one-parameter) (Jukes & Cantor, 1969) และ K2P (two-parameter) (Kimura, 1980).

ผลการทดลอง

การเปรียบเทียบโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการเปรียบเทียบและบ่งบอกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* ที่แยกได้จากกล้วย พืชตระกูลของ และ สาบเสือ โดยแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (ตาราง 3.1) ที่มีลักษณะต่างกันโดยอาศัยลักษณะของโคโลนี (สี เส้นใย และการสร้างสปีบนอาหารแข็ง) และลักษณะของสปอร์ และ appresoria และเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้าย *Colletotrichum gloeosporioides* และสามารถแบ่งได้เป็นสามกลุ่ม (ตาราง 3.2, 3.3)

จากการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลทที่บ่มในอาหารที่ต่างกัน และบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* จะเจริญได้ดีที่สุดเมื่อบ่มที่ 25 °C แต่พบว่าอัตราการเจริญไม่มีความต่างกันเมื่อเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิด (MA และ RV8 media)



ภาพที่ 3.1 Colonies of *Colletotrichum* species on PDA; a) *C. gloeosporioides* group 1; b) *C. gloeosporioides* group 2; c) *C. gloeosporioides* group 3; d) *C. musae*; e) *C. truncatum*.

Sequence analysis of the ribosomal DNA spacer sequence (ITS)

ลำดับเบสของ ITS1 และ ITS2 regions รวมทั้ง 5.8S rDNA ทั้งหมดมีขนาด 581–620 bp จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* โดยการวิเคราะห์แบบ parsimony และ distance (neighbor-joining) พบว่า tree topology ที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองไม่ต่างกัน การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้งหมด สามารถแบ่งได้เป็น 5 clade (ภาพที่ 3.2) และมีค่า bootstrap support (BS) 72-100% Clade1 ประกอบด้วย sequence จาก Genbank คือ *C. musae* และเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคลำไย 3 ไอโซเลท และเชื้อราเอนโดไฟท์ของขิง 1 ไอโซเลท ซึ่งมีค่า BS = 94% Clade ถัดลงมาประกอบด้วย *Colletotrichum* หลายชนิด โดย Clade 2 ประกอบด้วย 4 sequence จาก Genbank และเอนโดไฟท์จากกล้วย ขิง และ *E. thymifolia* จำนวน 6, 6 และ 4 ไอโซเลท ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมี sequence ของเชื้อก่อโรคของลำไย มะม่วง และกวนอิม อย่างละ 1 ไอโซเลท ซึ่งมีค่า BS = 100% และในส่วนล่างสุดของ clade นี้ยังมี sequence จาก Genbank คือ *C. kahawae* ซึ่งมีค่า BS = 100% นอกจากนี้ยังมี sequence ของเชื้อราเอนโดไฟท์ของ *E. thymifolia* 1 ไอโซเลท และ sequence จาก Genbank คือ *Glomerella acutata* อยู่ใน clade เช่นเดียวกัน แต่มีค่า BS ที่ต่ำมาก คือ 55%

Clade 3 ประกอบด้วยเอนโดไฟท์ของกล้วย และ *E. thymifolia* จำนวน 3 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ และยังประกอบด้วย sequence จาก Genbank คือ *C. boninense* โดยมีค่า BS = 95% Clade 4 ประกอบด้วยเอนโดไฟท์ของกล้วย 2 ไอโซเลท และ เอนโดไฟท์ของ *E. thymifolia* 1 ไอโซ

เลข ใน Clade 5 มี sequence จาก Genbank คือ *C. truncatum* และ sequence ของเชื้อราโรคกล้วย
เหลือง 6 ไอโซเลท

neighbor-joining tree แสดงความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลทต่างๆ ในสกุล
Colletotrichum ที่แยกได้จากพืชต่างชนิดกัน (ภาพที่ 3.3) และสามารถแบ่งเชื้อราทั้งหมดได้เป็น 4
กลุ่ม และมีค่า bootstrap support (BS) 97–100%. Clade A เป็นกลุ่มหลักประกอบด้วยราเอนโดไฟท์
ที่แยกได้จากพืชทุกชนิด ประกอบด้วยราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วย พืชวงศ์ขิง และสาปเสื่อ
จำนวน 5, 7 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ ใน Clade A สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย (A1 และ A2)
Clade A1 ประกอบด้วย 2 ไอโซเลท จาก GenBank (*G. cingulata* และ *C. fagariae*) 4 ไอโซเลท
จากพืชวงศ์ขิง และ 1 ไอโซเลทจากกล้วย โดยมี 75% BS ส่วนในกลุ่ม A2 ประกอบด้วย 5 ไอโซเลท
จากกล้วย 3 ไอโซเลทจากพืชวงศ์ขิง และ 3 ไอโซเลทจากสาปเสื่อ *C. kahawae* จาก GenBank
และ 1 ไอโซเลทจากกล้วยอยู่ส่วนฐานของกลุ่มนี้ (65% BS) Clade B ประกอบด้วย 1 ไอโซเลทจาก
GenBank คือ *G. acutata* และ 1 ไอโซเลทจากสาปเสื่อ (100% BS) Clade C ประกอบด้วย 1 ไอ
โซเลทจากกล้วย ส่วน Clade D ประกอบด้วยราเอนโดไฟท์จากกล้วย 3 ไอโซเลท สาปเสื่อ 1 ไอโซ
เลท และ *C. boninense* (GenBank) 1 ไอโซเลท (97% BS)

สรุปและวิจารณ์

การจำแนกชนิดรา *Colletotrichum* โดยใช้ลักษณะสัณฐานและข้อมูลทางชีวโมเลกุล

การศึกษาโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 36 ไอโซเลท
และการศึกษาโดยอาศัย sequence ในส่วน ITS สามารถแยกเชื้อราได้เป็น 5 กลุ่ม คือ *C. musae*
group; *C. gloeosporioides* Groups 1; 2 และ 3 และ *C. truncatum* และนอกจากนี้ข้อมูลของการ
sequence มีความสอดคล้องกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา โดยสามารถจัดกลุ่มได้เหมือนกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าข้อมูลทางชีวโมเลกุลให้ผลที่สอดคล้องกับการใช้
ลักษณะสัณฐานในการจำแนกชนิดของเชื้อราดังกล่าว ซึ่งการใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลร่วมกับลักษณะ
สัณฐานทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราดังกล่าวได้อย่างน่าเชื่อถือ Sutton (1992) ยังแนะนำว่า
การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถจำแนกเชื้อรา (เช่น *Colletotrichum*) ถึง
ระดับสปีชีส์ได้

ความหลากหลายของเชื้อรา *Colletotrichum*

Colletotrichum เป็นราเอนโดไฟท์ที่พบในพืชหลายชนิด (Dreyfuss and Petrini, 1984;
Fisher and Petrini, 1987; 1990; Brown et al., 1998; Umali et al., 1999; Fröhlich et al., 2000;
Taylor et al., 1999, Photita et al., 2001; Bussaban et al., 2001) และ *Colletotrichum*
gloeosporioides พบว่าเป็นราเอนโดไฟท์ที่พบบ่อยมากในพืชเขตร้อน (Guo et al., 2000;

Bussaban *et al.*, 2001; Photita *et al.*, 2001) แต่อย่างไรก็ตามยังมีความสับสนว่าเป็นสปีชีส์เดียวกันหรือไม่

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วย พืชวงศ์ขิง และสาปเสื่อ ได้เป็น 3 กลุ่ม และผลการวิเคราะห์ลำดับเบสและการศึกษาหาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมพบว่าจัดแบ่งได้ 3 กลุ่มเช่นเดียวกัน และพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีลักษณะสัณฐานเหมือนกันแต่แยกได้จากพืชต่างชนิดกัน สามารถจำแนกได้เป็นชนิดเดียวกัน จากข้อมูลนี้สามารถจำแนกถึงความหลากหลายของเชื้อราเอนโดไฟท์ในกลุ่ม *Colletotrichum* ได้จากการศึกษาพบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เป็นเอนโดไฟท์อย่างน้อย 3 สปีชีส์

Table 1 Isolates representing each of the morphological groups of *Colletotrichum* from Chiang Mai, Thailand used in this study and their host.

Isolate no.	Host	Endophyte/Pathogen	GenBank Acc.#
<i>C. musae</i>			
CMUBP-1	<i>Musa acuminata</i>	Pathogen	AY266401
PDC 093	<i>Musa acuminata</i>	Pathogen	AY266397
PDC147	<i>Musa acuminata</i>	Pathogen	AY266399
<i>C. gloeosporioides</i> Group1			
CMUBE 1814	<i>Musa acuminata</i>	Endophyte	AY266378
CMUBE 1850-2	<i>Musa acuminata</i>	Endophyte	AY266395
CMUBE 1840	<i>Musa acuminata</i>	Endophyte	AY266388
CMUBE 1851	<i>Musa acuminata</i>	Endophyte	AY266391
CMUBE 1852	<i>Musa acuminata</i>	Endophyte	AY266392
G 2	<i>Eupatorium thymifolia</i>	Endophyte	AY266405
G133	<i>Eupatorium thymifolia</i>	Endophyte	AY266402
G 136	<i>Eupatorium thymifolia</i>	Endophyte	AY266382
G1849	<i>Eupatorium thymifolia</i>	Endophyte	AY266383
CMUZE 0028	<i>Alpinia malaccensis</i>	Endophyte	AY266385
CMUZE 0439	<i>Alpinia malaccensis</i>	Endophyte	AY266389
CMUZE 0040	<i>Alpinia malaccensis</i>	Endophyte	AY266381
PDC 001	<i>Draceana sanderiana</i>	Pathogen	AY266380
PDC 002	<i>Mangifera indica</i>	Pathogen	AY266390
PDC 113	<i>Lunguas galanga</i>	Pathogen	AY266394
<i>C. gloeosporioides</i> Group2			
CMUBE 1098	<i>Musa acuminata</i>	Endophyte	AY266374
CMUBE 1099	<i>Musa acuminata</i>	Endophyte	AY266376
CMUBE 1820	<i>Musa acuminata</i>	Endophyte	AY266377
G 102	<i>Eupatorium thymifolia</i>	Endophyte	AY266393
G 140	<i>Eupatorium thymifolia</i>	Endophyte	AY266375
<i>C. gloeosporioides</i> Group3			
CMUBE 812	<i>Musa acuminata</i>	Endophyte	AY266400
CMUBE 1535	<i>Musa acuminata</i>	Endophyte	AY266403
CMUBE 1815	<i>Musa acuminata</i>	Endophyte	AY266404
CMUZE 0015	<i>Alpinia malaccensis</i>	Endophyte	AY266398
CMUZE 0036	<i>Alpinia malaccensis</i>	Endophyte	AY266387
CMUZE 0357	<i>Alpinia malaccensis</i>	Endophyte	AY266369
CMUZE 0041	<i>Alpinia malaccensis</i>	Endophyte	AY266379
<i>C. truncatum</i>			
PDC 003	<i>Glycine max</i>	Pathogen	AY266371
PDC 005	<i>Glycine max</i>	Pathogen	AY266386
PDC 006	<i>Glycine max</i>	Pathogen	AY266384

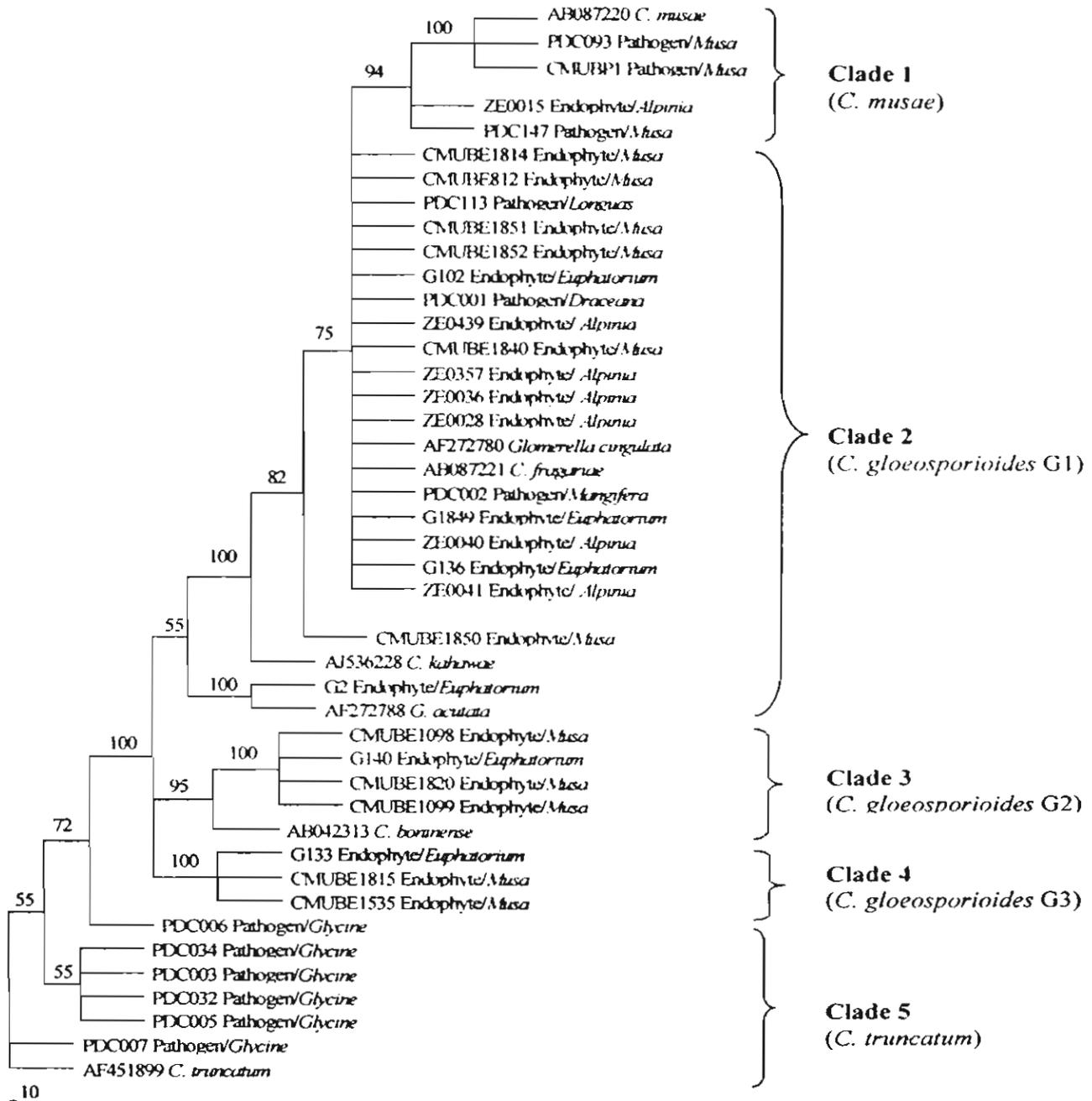
Table 3.1 (cont.)

Isolate no.	Host	Endophyte/Pathogen	GenBank Acc.#
PDC 007	<i>Glycine max</i>	Pathogen	AY266372
PDC 032	<i>Glycine max</i>	Pathogen	AY266370
PDC 034	<i>Glycine max</i>	Pathogen	AY266368

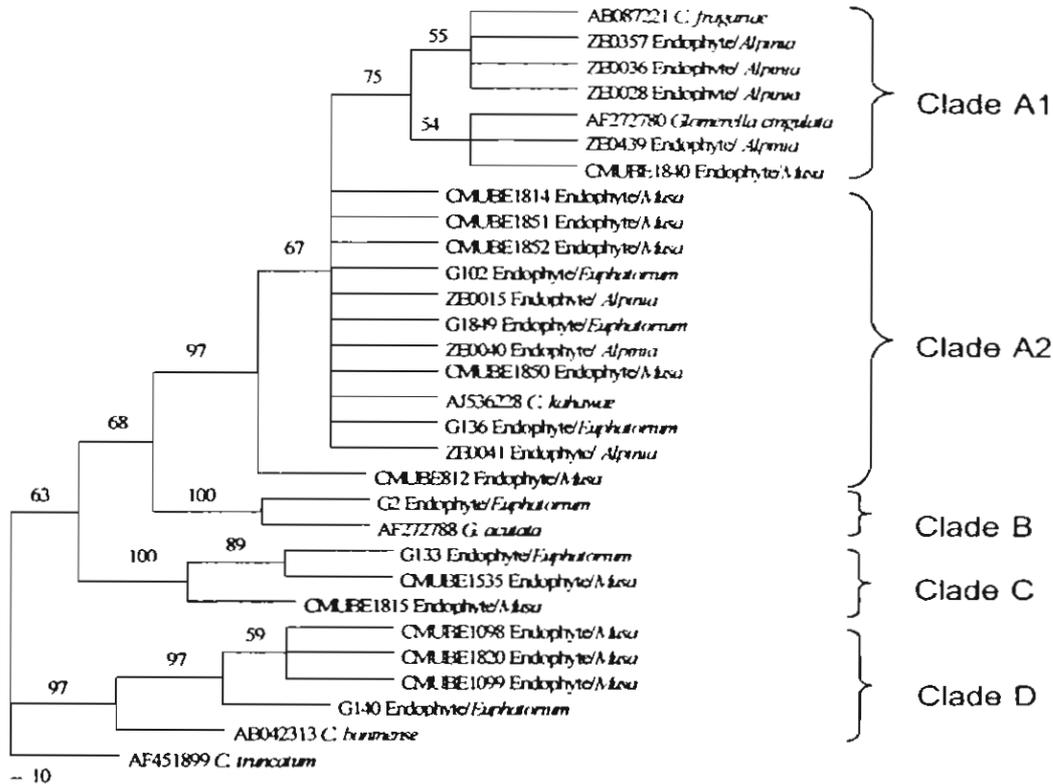
Table 3.2 Conidial size, shape and growth rate at room temperature on PDA for the morphological groups of *Colleotrichum* spp.

	Conidial shape	Length (μm)			Width (μm)			Growth rate on PDA (mm d^{-1}) (S.E.)		
		Min.	Max.	Mean (S.E.)	Min.	Max.	Mean (S.E.)	20°C	25°C	30°C
<i>C. gloeosporioides</i> group 1	Cylindrical	12	20	16.1 ^b (0.6)	3	6	4.6 ^b (0.1)	8.6 (0.2)	11.4 (0.1)	11.6 (0.1)
<i>C. gloeosporioides</i> group 2	Cylindrical	12	16	14.3 ^b (0.3)	6	8	6.1 ^d (0.2)	7.4 (0.2)	9.3 (0.2)	7.4 (0.2)
<i>C. gloeosporioides</i> group 3	Cylindrical	12	24	20.9 ^c (0.6)	6	10	8.4 ^e (0.2)	6.5 (0.2)	8.4 (0.2)	9.9 (0.3)
<i>C. musae</i>	Elliptical or cylindrical	12	20	14.1 ^a (0.3)	4	10	5.7 ^c (0.1)	11.6 (0.4)	12.6 (0.1)	12.5 (0.2)
<i>C. truncatum</i>	Falcate	20	31	23.1 ^d (0.3)	3	4	3.8 ^a (0.2)	5.7 (0.1)	7.1 (0.2)	8.2 (0.2)

*The mean difference is significant at the 0.01 level.



ภาพที่ 3.2 Parsimonious tree obtained by heuristic search in a phylogenetic analysis of ITS1, ITS2 including rDNA sequences data from *Colletotrichum* from various hosts, as well as reference isolates. Bootstrap confidence levels, based on 1000 resamples are given at the appropriate.



ภาพที่ 3.3 Consensus tree based on neighbor-joining analysis of ITS1, ITS2 including rDNA sequences, illustrating the relationships among endophytic *Colletotrichum* isolates from various hosts with references taxa. Bootstrap confidence levels, based on 1000 resamples are given at the appropriate.

บรรณานุกรม

- Brown, K.B., Hyde, K.D. & Guest, D.I. (1998). Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. *Fungal Diversity* 1: 27–51.
- Bussaban, B. Lumyong, S., Lumyong, P. McKenzie, E.H.C. & Hyde K.D. (2001). Endophytic fungi from *Amomum siamense*. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 1-6.
- Dreyfuss, M. & Petrini, O. (1984). Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants. *Botanica Helvetica* 94: 33–40.
- Fisher, P.J. & Petrini, O. (1987). Location of fungal endophytes in tissue of *Suaeda fruticosa*: A preliminary study. *Transaction of British Mycological Society* 89: 246-249.

- Fisher, P.J. & Petrini, O. (1990). A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England and Switzerland. *Mycological Research* 94: 313-319.
- Freeman, S. & Rodriguez, R.J. (1993). Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a non-pathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260: 75-78.
- Fröhlich, J., Hyde, K.D. & Petrini, O. (2000). Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 104: 1202-1212.
- Gunnell, P.S. & Gubler, W.D. (1992). Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic of strawberry. *Mycology* 84: 157-165.
- Guo, L.D., Hyde, K.D. & Liew, E.C.Y. (2000). Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* 147: 617-630.
- Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432.
- Jukes, T.H. & Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In: *Mammalian protein metabolism* (Munro, H.N. ed.), pp. 21-132. Academic Press, New York.
- Kabore, B.K., Couture, L., Dostaler, D. & Bernier, L. (2001). Phonetic variability of *Colletotrichum graminicola* in sorghum. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 138-145.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Liu, B., Guerber, J.C. & Cornell, J.C. (2002). Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Colletotrichum* species using a 1Kb nitron of glutamine synthetase gene (GS) and 200 bp intron of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase gene (GPDH). *Phytopathology* 92: 548.
- Mordue, J.E.M. (1971). *Colletotrichum gloeosporioides*. *CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria* 315: 1-2.
- Munaut, F., Hamaide, N.R. & Maraite, H. (2001). Molecular and Morphological characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* from native Mexican *Stylosanthes* species. *Plant pathology* 50: 1-15.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. & Hyde, K.D. (2001). Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuninata*) at Doi Suthep Pui national Park. *Mycological Research* 105: 1508-1513.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biological Evolution* 4: 406-425.

- Sambrook, L., Fritsch E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbour laboratory Press: Cold Spring Harbour, NY).
- Sherriff, C., Whelan, M.J., Arnold, G.M., LaFay, J.F., Brygoo, Y., & Bailey, J. (1994). Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology* 18: 121-138.
- Sutton, B.C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. 1-26. In *Colletotrichum* biology, phytogetic and control. Edes. Bailey, J.A. & Jeger, M.J. CAB International, Wallingford, UK.
- Swofford, D.L. (2001). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods) ver 4.0 4a4b. Sinauer Associates, Sunderland, Masschusetts, U.S.A.
- Taylor, J.E., Hyde, K.D. & Jones, E.B.G. (1999). Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist* 142: 335-346.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improveing the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Umali, T.E., Quimio, T.H. & Hyde, K.D. (1999). Endophytic fungi in leaves of *Bambusa tuldooides*. *Fungal Science* 14: 11-18.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols* (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.H. Sninsky & T.J. White, eds.), pp. 315-322. Academic Press, San Diego.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

Submitted papers

1. Photita W., Taylor P.W.J., Ford R., Lumyong P., McKenzie E.H.C., Hyde KD. and Lumyong S. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. (Submitted to Mycological Research)

การเสนอผลงานในที่ประชุม

1. Photita W., Lumyong S., Hyde K.D., Lumyong P., Ford R. and Taylor P.W.J. 2002. Identification of *Collectotrichum* base on ITS rDNA and morphology. The 3rd Asia-Pacific Mycological Conference of Biodiversity and Biotechnology (AMC 2002) 4-8 November 2002, Yunnan University, Kunming, China.
2. Photita W., Hyde K.D., Lumyong P. and Lumyong S. 2003. Potential of endophytic fungi and their antifungal activity. The 3st FEMS Congress of European Microbiologists 29 June – 3 July 2003, Ljubljana, Slovenia.

Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand.

W. Photita¹, P.W.J. Taylor², R. Ford², S. Lumyong^{1*}, P. Lumyong³, E.H.C. McKenzie⁴, and K.D. Hyde⁵

¹Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

²BioMarka, Joint Centre for Crop Innovation, School of Agriculture and Food Systems, the University of Melbourne, Victoria, Australia 3010.

³Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

⁴Landcare Research, Private Bag 92170, Auckland, New Zealand

⁵Centre for Research in Fungal Diversity, Department of Ecology & Biodiversity, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong.

*e-mail scboi009@chiangmai.ac.th

Abstract

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. *Colletotrichum 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 *Colletotrichum* and indicated that ITS rDNA sequence data were potentially useful in taxonomic species determination

1. **Wipornpan Photita**. Tel: +66 53 943346 ext. 1532; Fax: +66 53 892259; e-mail: wipornpan@hotmail.com
2. **Potential of endophytic fungi and their antifungal activity**
3. W. Photita¹, K. D. Hyde², P. Lumyong³ and S. Lumyong¹
4. ¹*Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University*
²*Centre for Research in Fungal Diversity, Department of Ecology and Biodiversity, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong.*
³*Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50200.*
5. Fungi from *Musa acuminata* has been studied in Thailand including endophytic, pathogenic and saprobic fungi. 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 established 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%).
6. Keywords: antagonist, endophytes.
7. Microbial diversity
8. Poster presentation preferred

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

Nystatin

Nystatin	0.05	g
N,N-dimethylformamind	4.0	g

ละลายให้เข้ากัน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บใส่ขวดฝาเกลียวไว้ในตู้เย็น

การศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์

1. การวัดความขุ่นของเซลล์

เป็นการวัดออกมาในรูปของค่าวัดการดูดกลืนแสง โดยอาศัยความสามารถในการกระจายแสงของเซลล์ยีสต์ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันมากในแง่ที่ไม่ต้องการความถูกต้องมาก ถ้าความเข้มข้นของเซลล์มาก จะทำให้ความเข้มข้นของแสงที่ผ่านออกมามีค่าต่ำลง หรือค่าการดูดกลืนแสงมีค่ามาก แต่วิธีการนี้ก็ยังมีข้อเสีย คือ แสงที่ไปตกบนเครื่องรับนั้นประกอบด้วยแสงที่ถูกกระจายและไม่ถูกกระจายโดยเซลล์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพเครื่องวัดด้วย อีกทั้งความสามารถในการกระจายแสงของเซลล์นั้นก็ขึ้นอยู่กับพารามิเตอร์หลายอย่าง ได้แก่ จำนวน ขนาด และรูปร่างของเซลล์ ดัชนีการหักเหของแสง และค่าค่าความยาวคลื่นที่ใช้ด้วย

1. การนับจำนวนเซลล์

โดยการใช้ haemocytometer และอาศัยกล้องจุลทรรศน์เพิ่ม เมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นกรอบสี่เหลี่ยม ซึ่งจะนับช่องเล็กๆ ภายในกรอบสี่เหลี่ยม แล้วคำนวณเป็นจำนวนเซลล์ต่อปริมาตร แต่ค่าที่ได้มักมีความผิดพลาดเนื่องจากยากแก่การควบคุม เพราะการนับเป็นการนับด้วยสายตาของผู้ทดลอง และทำการสุ่มตัวอย่างเซลล์มานับ ดังนั้นค่าที่ได้ย่อมมีความผิดพลาด โดยในการนับจึงให้เซลล์ที่มีการแตกหน่อและยังไม่มีมีการแยกของเซลล์ลูกและเซลล์แม่เป็นหนึ่งเสมอ

การหาจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้ haemocytometer

นับจำนวนเซลล์ยีสต์ในตารางใหญ่ 25 ตารางใต้	X	เซลล์
เนื้อที่ในตารางใหญ่และตาราง	<u>16</u>	ตารางมิลลิเมตร
	400	
ดังนั้น <u>25x16</u> ตารางมิลลิเมตร มียีสต์	X	เซลล์
400		
ใน 1 ตารางมิลลิเมตร มียีสต์	<u>Xx1x400</u>	เซลล์
	25x16	

media มีความลึก	0.02	เซลล์
ใน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มียีสต์	$\frac{X \times 1 \times 400}{25 \times 16 \times 0.02}$	เซลล์
ใน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร มียีสต์	$\frac{X \times 1 \times 400 \times 10^3}{25 \times 16 \times 0.02}$	เซลล์

2. Dilution plate count

เป็นการนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (viable cell) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการเจือจางเชื้อด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยความเจือจางที่เหมาะสม ควรมีโคโลนีของเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 30-300 โคโลนี ปกติจะทำให้มีความเจือจางเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ (tenfold serial dilution)

การแปรผลของสารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทดสอบ

วงใสที่เกิดขึ้น		การแปรผล
EC19 (wild type)	SS553 (mutant type)	
+	-	มีผลต่อกระบวนการสร้างโคคินที่ผนังเซลล์
+	+	มีผลต่อกระบวนการสร้างโคคินที่ผนังเซลล์ และมีผลต่อการทำงานส่วนอื่นในเซลล์ด้วย
-	+	ไม่มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ แต่มีผลต่อการทำงานส่วนอื่นในเซลล์
-	-	ไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบได้

หมายเหตุ: + หมายถึง เชื้อสามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบได้โดยปรากฏวงใสขึ้น
 หมายถึง เชื้อไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ทดสอบได้โดยไม่ปรากฏวงใสขึ้น

Stains and Examination Solutions

Various chemical preparation were used in the examination of fungal specimens during the current research. These included: Indian Ink, KOH, Lactophenol, Melzer's Reagent.

Indian Ink was used infrequently, but was found to be useful when observing gelatinous appendages of ascospores in some species.

Potassium Hydroxide (KOH) was routinely used in the rehydration of ascomycetes, especially the apothecial ascomycetes. 3%, 5% and 10% KOH was used.

Lactophenol was used routinely in the preparation of semipermanent slides.

Lactophenol

Phenol (pure crystals)	20.0 g
Lactic acid (S.G. 1.21)	20.0 g
Glycerol	40.0 g
Water	20.0 ml

Melzer's Reagent was used in the examination of Ascomycetes. Frequently colour-change reaction occur in Melzer's reagent. The amyloid reaction of apical pore, is often of taxonomic importance.

Melzer's Reagent

Chloral Hydrate	100.0 g
Potassium Iodide	5.0 g
Iodine	1.5 g
Distilled Water	1000 ml

Assay medium

Yeast extract	10 g
Polypeptone	20 g
Glucose	20 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml

Fermentation media

F1) Fructose 3%
 Soybean meal 0.5%
 KH_2PO_4 0.1%
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%
 CaCl_2 0.01% pH 6.0

F3) Glucose 0.3%
 Glycerol 0.2%
 Polypeptone 0.2%
 Yeast extract 0.3%
 KH_2PO_4 9 g
 NaCl 0.2%
 CaCO_3 0.3% pH 6.0

F4) Sucrose 80 g
 Yeast extract 1 g
 corn meal 50 g
 Distilled water 1000 ml

F5) Mannitol 100 g
 Yeast extract 10 g
 corn meal 33 g
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g
 Distilled water 1000 ml

V-8 juice medium

Tomato juice 200 ml

Add distilled water to 1 l and adjust to pH 6.0

Malt extract medium

Malt extract	2.0%
Peptone	0.5%
Distilled water	
pH	6.0

