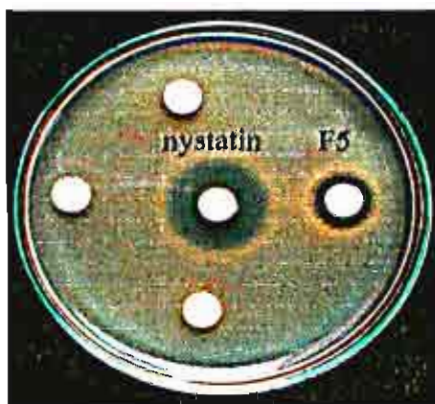


ตาราง 2.3 ผลการวัดการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SS553

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

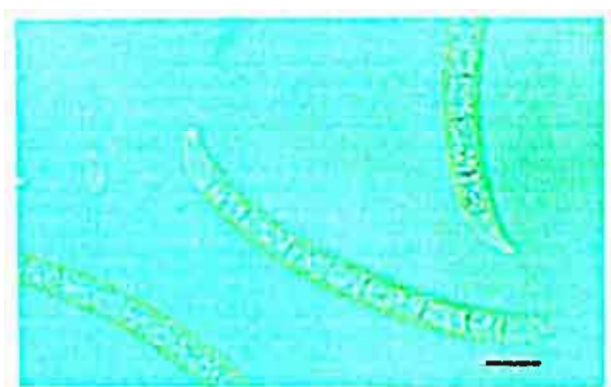
จากการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ของกล้วยทั้งหมด 820 ไอโซเลต โดยหมักในอาหารหมัก 4 ชนิด พบว่ามีเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 100 ไอโซเลต (ตาราง 2.5) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ทดสอบเฉพาะ *S. cerevisiae* EC19 และพบว่าอาหาร F3 และ F5 ทำให้เกิดวงใสมากที่สุด จากการทดลองนี้พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถทำให้เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบ *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>	<i>S. cerevisiae</i>
		Strain SS553	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.

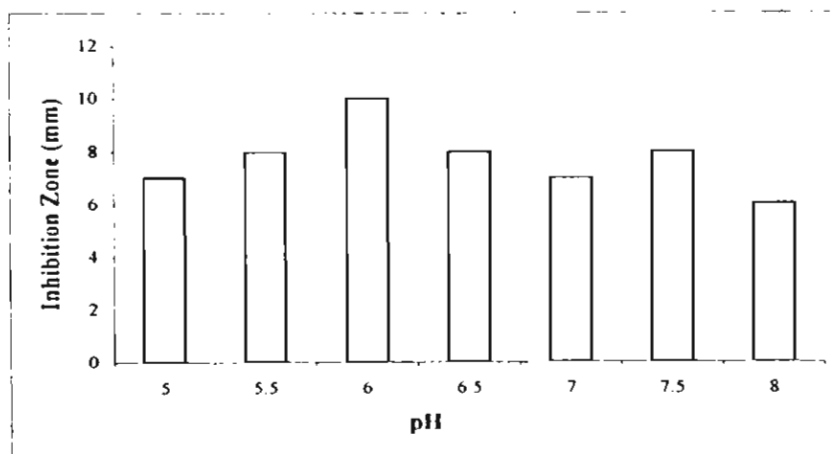
Isolated Number	Taxa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SS				<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC			
		553 (mm.)				91(mm.)			
		F1	F3	F4	F5	F1	F3	F4	F5
683	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	7.0	7.0			6.5	7.0		
694	<i>Phoma</i> sp.		7.0				7.0	7.0	
737	<i>Sagenoma</i> sp.					6.5	6.5		
744	Unknown sp.4		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.

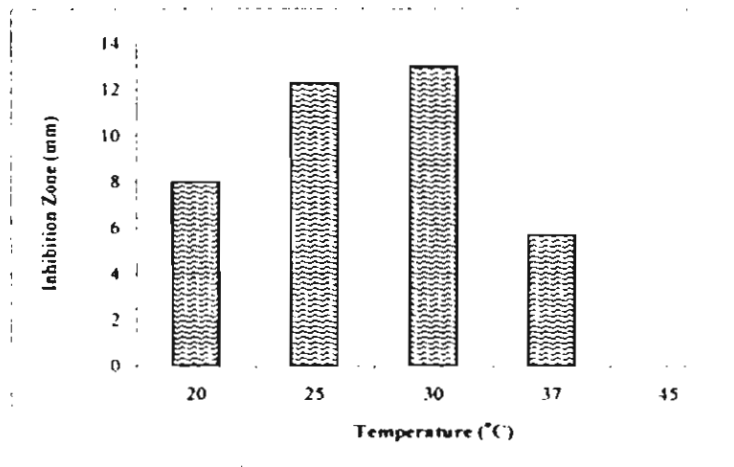
Isolated Number	Taxa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SS				<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC			
		553 (mm.)				91 (mm.)			
		F1	F3	F4	F5	F1	F3	F4	F5
1655	<i>Phoma</i> sp.						6.0		6.0
1714	<i>Sterilia mycelia</i> sp.	6.0	6.0	6.0	6.0				
1716	<i>Sterilia mycelia</i> sp.					6.0	6.0	6.0	6.0
1719	Unknown						6.5		
1723	<i>Guignardia cocoicola</i>					6.5	6.5		
1728	<i>Sterilia mycelia</i> sp.		6.0						
1732	<i>Pyricularia</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

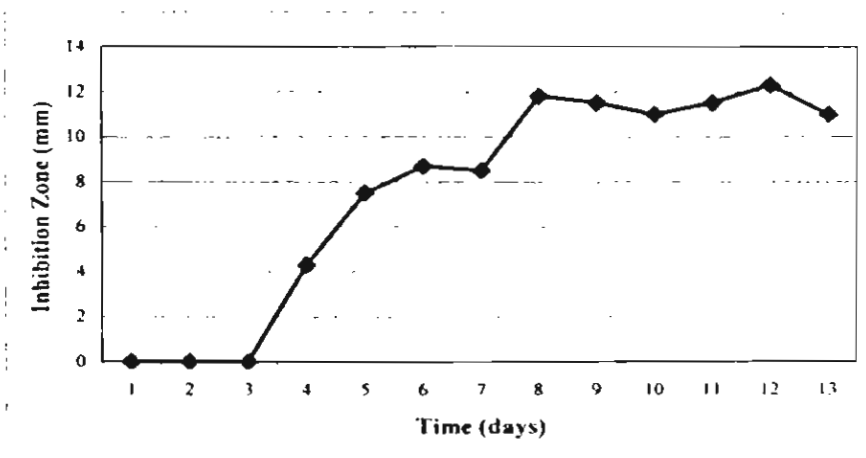
จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต้านเชื้อราของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. (CMUBE 1681) พบว่าการบ่มเชื้อราในอาหาร ที่มี pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C และระยะเวลา 8 วัน ทำให้เชื้อผลิตสาร และเกิดวงใสมากที่สุด อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกันของวงใสในการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 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.



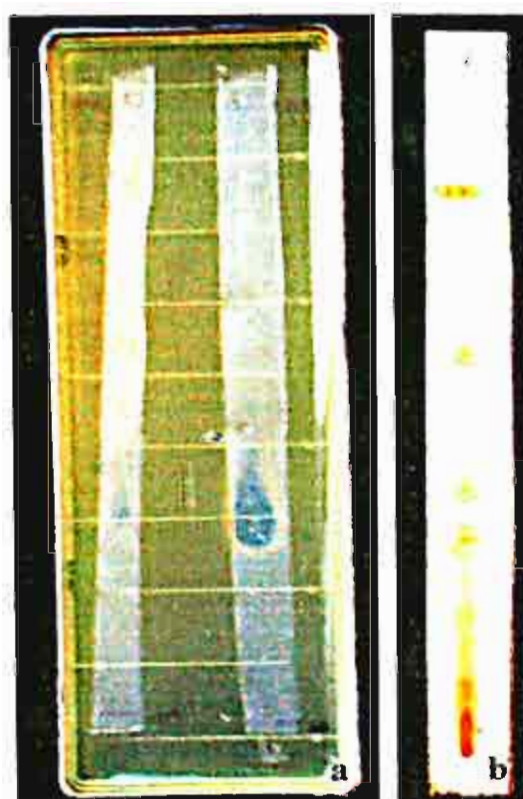
ภาพที่ 2.4 Zone of inhibition production by *Fusarium* sp. (CMUBE 1681) inhibit growth of *S. cerevisiae* EC 19 incubation with different temperatures.



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.

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด

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 inhlibition 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 *Ellisiodopsis 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 *Ellisiodopsis 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. & Selitrenmikov, 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., Dräger, 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, S. & 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* (in press).
- 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, S. & 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 offenkettiger Imide. *Liebigs Annalen der Chemie* 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 furanodiones from *Sporothrix* sp., *Discosia* sp., and *Pezizula livida*. Novel furanodiones 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 *Sporomeliella 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 Chemie* 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 Chemie* 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 arylbenzyl 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 Antibiotics* 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, W.X., 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., Gentzsch, 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 ัณพีช 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 สตรอเบอรี่ พุทรา ส้ม หอม กระเทียม งา ถั่วเหลือง ถั่วเขียว เป็นต้น

เนื่องจากเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* มีความผันแปรทางพฤติกรรมสูง 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 นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังเป็นวิธีการที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน อาศัยประสบการณ์ และวิจรณ์ญาณของผู้ทดลอง อีกทั้งลักษณะต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกนี้ยังผันแปรไปได้ ขึ้นอยู่กับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม ก่อให้เกิดความสับสนในการจำแนกและการศึกษา (Freeman *et al.*, 1993)

การทดลองในครั้งนี้จึงศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการจัดเรียงลำดับเบสของ rDNA ในส่วน ITS เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างชนิด

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การแยกเชื้อรา endophytes

ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างกล้วย ชิง และสาปเสื่อ นำตัวอย่างทั้งหมดมาล้างน้ำไหลจากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวโดยวิธี triple surface sterilization โดยจุ่มใน 75% เอทานอล เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจุ่มใน 1% sodiumhypochlorite นาน 3 นาที แล้วย้ายไปจุ่มใน 95% เอทานอล 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 และบ่มไว้เพื่อทำการสร้างสปอร์ 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* แต่ละไอโซเลตมาเลี้ยงในอาหาร 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 ตั่งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 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 ใช้ไปเปิดดูดูส่วนใสชั้นบนประมาณ 500 ถึง 750 µl ใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม phenol-chloroform-isoamyl 25:24:1 (vol/vol/vol) 500 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่น 13,000 g นาน 5 นาที ใช้ไปเปิดดูดูส่วนใสชั้นบนประมาณ 500 ถึง 750 µl 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 µL 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 µl โดยเติมสารดังนี้ 10x PCR buffer 2.5 µl, Tag DNA Polymerase 0.2 µl, 25 mM MgCl₂ 1.5 µl, 20 mM dNTP 0.3 µl, 10 mM Primer 1 µl 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 µg/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

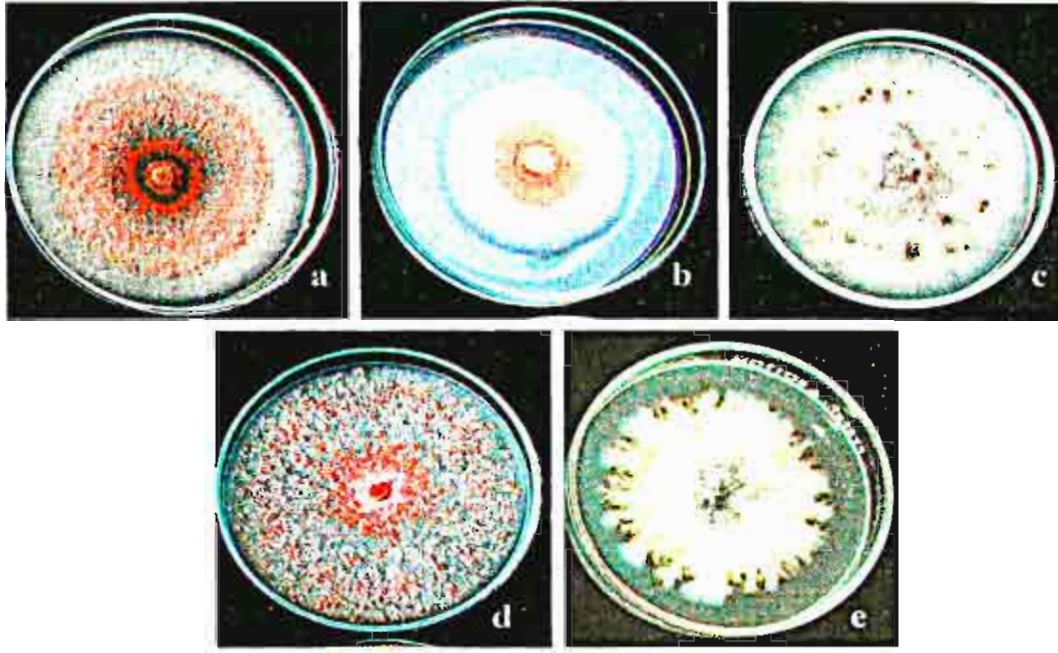
ทำการจัดเรียงลำดับเบส ในส่วน ITS1 และ ITS 2 รวมทั้ง 5.8S sequences โดยใช้ CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) และทำการค้นหาลำดับเบสใน Genbank และ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). จากนั้นทำการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้งหมดรวมทั้ง sequences จาก Genbank คือ AF272788 (*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 และการสร้างสืบนอาหารแข็ง) 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 จากการศึกษาค้นหาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *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 ไอโซเลต และเชื้อราเอนโดไฟท์ของขิง 1 ไอโซเลต 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 ไอโซเลต ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมี sequence ของเชื้อราเอนโดไฟท์ของลำไย มะม่วง และกวนอิม อย่างละ 1 ไอโซเลต ซึ่งมีค่า BS = 100% และในส่วนล่างสุดของ clade นี้ยังมี sequence จาก Genbank คือ *C. kahawae* ซึ่งมีค่า BS = 100% นอกจากนี้ยังมี sequence ของเชื้อราเอนโดไฟท์ของ *E. thymifolia* 1 ไอโซเลต 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 ไอโซเลต ตามลำดับ และยังประกอบด้วย sequence จาก Genbank คือ *C. boninense* โดยมีค่า BS = 95% Clade 4 ประกอบด้วยเอนโดไฟท์ของกล้วย 2 ไอโซเลต 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 เป็นกลุ่มหลักประกอบด้วยราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชทุกชนิด 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 ไอโซเลทจากกล้วย ส่วน Clade D ประกอบด้วยราเอนโดไฟท์จากกล้วย 3 ไอโซเลท สาปเสื่อ 1 ไอโซเลท 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

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าข้อมูลทางชีวโมเลกุลให้ผลที่สอดคล้องกับการใช้ลักษณะสัณฐานในการจำแนกชนิดของเชื้อราดังกล่าว ซึ่งการใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลร่วมกับลักษณะสัณฐานทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราดังกล่าวได้อย่างน่าเชื่อถือ Sutton (1992) ยังแนะนำว่า การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถจำแนกเชื้อรา (เช่น *Colletotrichum*) ถึงระดับสปีชีส์ได้

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 และสาปเสือ ได้เป็น 3 กลุ่ม และผลการวิเคราะห์ลำดับเบสและการศึกษาหาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมพบว่าจัดแบ่งได้ 3 กลุ่มเช่นเดียวกัน และพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีลักษณะสัณฐานเหมือนกันแต่แยกได้จากพืชต่างชนิดกัน สามารถจำแนกได้เป็นชนิดเดียวกัน จากข้อมูลนี้สามารถจำแนกถึงความหลากหลายของเชื้อราเอนโดไฟท์ในกลุ่ม *Colletotrichum* ได้จากการศึกษาพบว่ามีเชื้อรา *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>Lungas 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

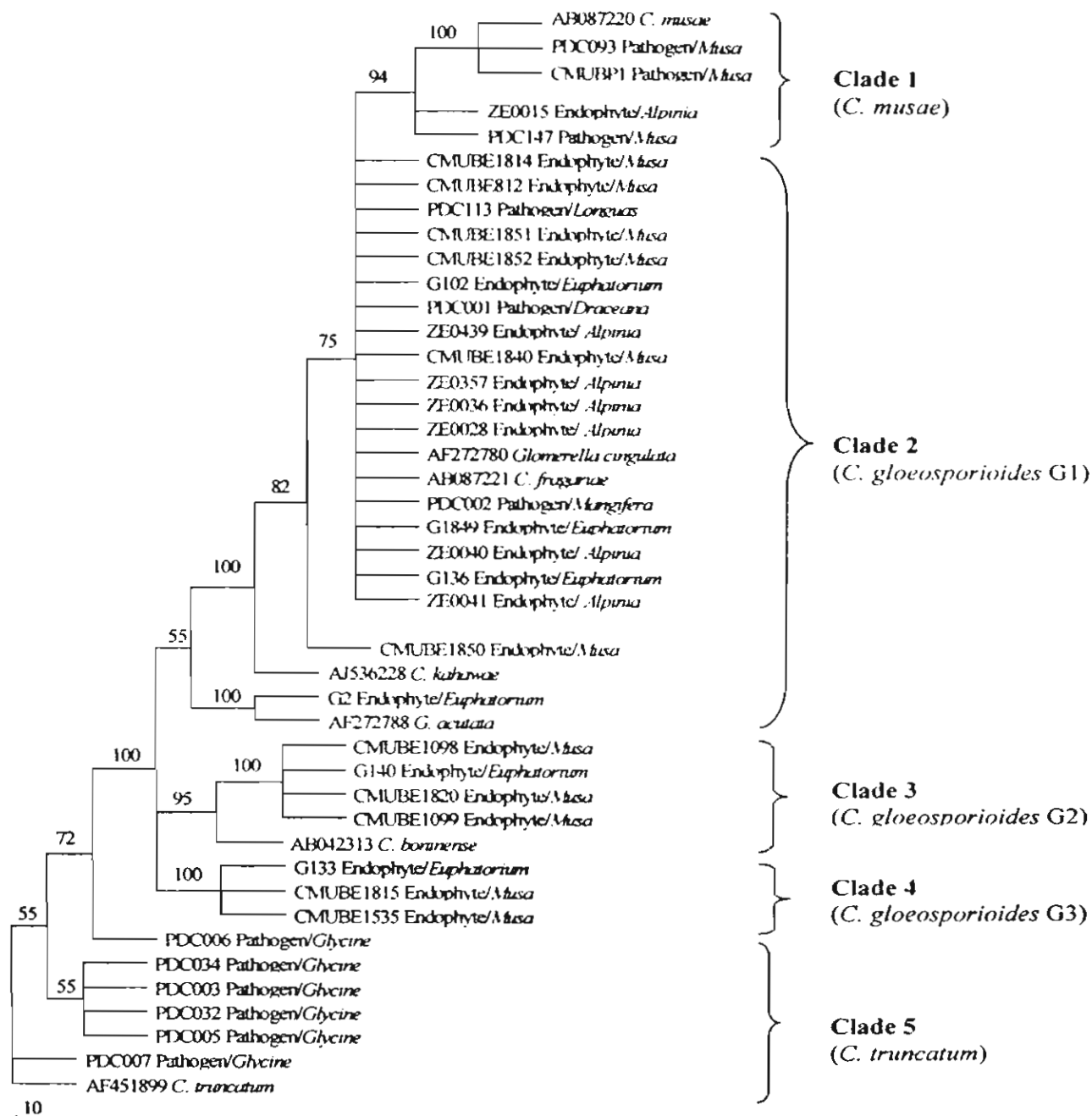
Table 3.1 (cont.)

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

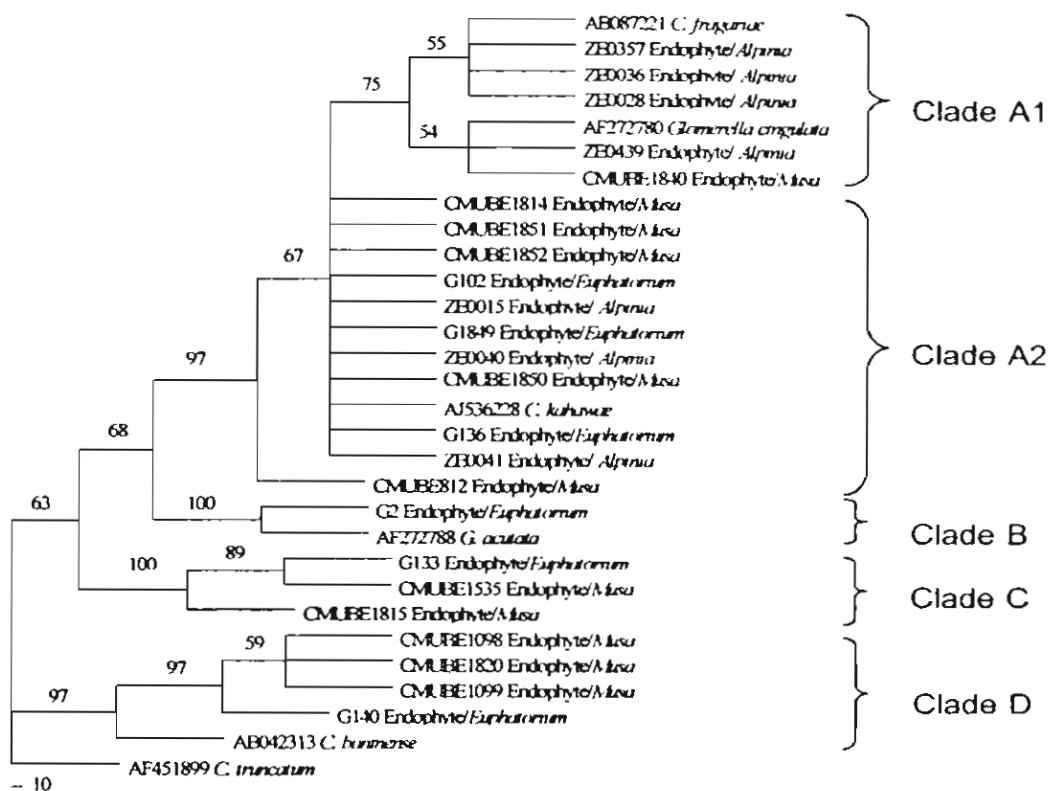
Table 3.2 Conidial size, shape and growth rate at room temperature on PDA for the morphological groups of *Colleotrichum* spp.

	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 ^a (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 priliminary 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 Switerland. *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: *Mamalian 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 reconstucting 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 *Collectutrichum* 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. ¹Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University
²Centre for Research in Fungal Diversity, Department of Ecology and Biodiversity, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong.
³Department 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 ดังนั้นการหักเหของแสง และค่าค่าความยาวคลื่นที่ใช้ด้วย

1. การนับจำนวนเซลล์

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

การหาจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้ haemocytometer

นับจำนวนเซลล์ยีสต์ในตารางใหญ่ 25 ตารางได้	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)

การแปลผลของสารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทดสอบ

วงใสที่เกิดขึ้น		การแปลผล
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

