



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการขยายผลการตรวจแยกหาเอนโดไฟท์จากต้นพืช
สมุนไพรไทยพื้นบ้านเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบ
ของชีวควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจใน
ประเทศไทย

โดย ผศ. ดร. จีรพันธ์ วรพงษ์

30 มิถุนายน 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการขยายผลการตรวจแยกหาเอนโดไฟท์จากต้นพืช
สมุนไพรไทยพื้นบ้านเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบ
ของชีวควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจใน
ประเทศไทย

ผศ. ดร. จีรพันธ์ วรพงษ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
Abstract	1
บทคัดย่อ	2
Executive Summary	3
บทบาทของเอนโดไฟท์ <i>Muscodor albus</i> MFC2 กับต้นกล้วยมะเขือเทศภายใต้สภาวะความเครียด	6
การประยุกต์ใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ <i>Muscodor albus</i> MFC2 ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>C. capsic</i> และ <i>Alternaria</i> sp. ในพริก	28
การควบคุมโรครากเน่าในคะน้าและผักกาดหอมโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ <i>Xylaria</i> sp. QS4 จากต้นผักหวาน	38
การศึกษาหาเชื้อเอนโดไฟท์เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ <i>Xanthomonas campestris</i> ในต้นผักกาดหอม	46
การควบคุมเชื้อก่อโรคพืชโออิชิสในคน <i>Pythium insidiosum</i> โดยใช้สารทุติยภูมิที่สกัดจากเชื้อเอนโดไฟท์	50
กิตติกรรมประกาศ	57
เอกสารอ้างอิง	57
ผลิตผลของโครงการวิจัย	60
รางวัล	
การผลิตนักศึกษา	
ผลงานวิจัยที่จะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (In preparation)	
ภาคผนวก	62
<i>Bipolaris thaiendophytica</i> anam. sp. nov., an endophyte from a fruit of <i>Myristica fragrans</i>	63
Biogases produced by <i>Muscodor albus</i> MFC2 and its potential application for control <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	72
SCREENING OF ENDOPHYTIC FUNGI WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITIES FROM MEDICINAL PLANTS	82
A novel strain of bacterial endophyte <i>Paenibacillus polymyxa</i> TL41 isolated from <i>Paederia foetida</i> and its potential to control <i>Xanthomonas campestris</i> on lettuce	88
Growth Inhibition of the Pathogenic Oomycete <i>Pythium insidiosum</i> by Secondary Metabolite Crude Extract from Endophytes	96

สัญญาเลขที่ RMU4980030

โครงการ: การขยายผลการตรวจแยกหาเอนโดไฟท์จากต้นพืชสมุนไพรไทยพื้นบ้าน
เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบของชีวควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย
รายงานฉบับสมบูรณ์

ระยะเวลาดำเนินงาน 3 ปี คือตั้งแต่วันที่ 20 ก.ค. 2549 ถึงวันที่ 30 มิ.ย. 2552

ชื่อโครงการ การขยายผลการตรวจแยกหาเอนโดไฟท์จากต้นพืชสมุนไพรไทยพื้นบ้านเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบของชีวควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย (Screen for Endophytes from Thai Medicinal Folk Plants for the Biocontrol Agent against Pathogens of Economic Crops in Thailand)

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ชื่อ-สกุล นางสาว จีรพันธ์ วรพงษ์ ตำแหน่ง ผศ. ดร.

หน่วยงาน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ที่อยู่ ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

โทรศัพท์ 02-441-9816-20 ต่อ 1133

E-mail: tongseeworapong@gmail.com

ชื่อผู้ร่วมวิจัย นางสาวมนต์ฤดี ศรีไพโรทัย, รศ. ดร. สิทธิวัฒน์ เลิศศิริ, ดร. ปราณี อินประโคน, รศ. ดร. ไสยวิชญ์ วรวิจิตร, รศ. ดร. ครรชิต ธรรมศิริ, ศิริพร ดันติโพธิ์พัฒน์, ดร. นพ. ชีรพงษ์ กระแจะจันทร์

Abstract

During 3 years of search for endophytes, an agricultural application was mainly observed, and novel bioactive compounds against drug resistant bacteria and *Pythium insidiosum*, a Pythiosis pathogen of human, were preliminary investigated from more than 1,000 endophytic strains isolated from Thai medicinal trees in Thailand. Three endophytes that are high potentially used to control a broad spectrum of plant diseases are *Muscodor albus* MFC2, *Xylaria* sp. QS4 and *Paenibacillus polymyxa* TL41. The fungus *M. albus* MFC2 was isolated from *Myristica fragrans* at Mahidol University, Salaya, Nakornprathom. A novel endophytic species of *Bipolaris thaiendophytica* JF2 with antagonistic activity of a broad spectrum of fungal plant pathogens was found from a fruit of this tree. In specific grain formula media, *M. albus* MFC2 could produce bioactive volatile organic compounds (VOCs, i.e. ethanol, isoamyl alcohol and aromadendrene) that partially to totally inhibit plant pathogens including *Alternaria* sp., *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *F. equiseti*, *Ganoderma* sp., *Geotrichum* sp., *Phytophthora parmvola*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia* and *Sclerotinia* sp.. Importantly, *M. albus* MFC2 colonizing grains could completely control *P. ultimum* on kale, *Alternaria* disease on chili under field conditions, *F. equiseti* black spots on Hom-Thong banana, and partially control *C. gloeosporioides* anthracnose on Nam-Dok-Mai mango fruits. The high production of ethanol from *M. albus* MFC2 colonizing grains was an interesting observation for an alternative energy source. Notably, *M. albus* MFC2 induced mechanisms affecting drought tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum*). The second endophytic biocontrol agent was *Xylaria* sp. QS4, a fungal endophyte from twigs of *Quereus lauritolia* growing at Kanchanabury campus of Mahidol University. Results of *in vitro* antagonistic test showed that *Xylaria* sp. QS4 could inhibit *Alternaria* sp., *C. capsici*, *C. gloeosporioides* and *P. ultimum*. Thoroughly mixing 15 plates of 10-day old *Xylaria* QS4 in 500 g mixture of commercial soil and field soil did not negatively affect both germination and growth of kale and lettuce seeds in outdoor conditions. In addition, the same concentration of *Xylaria* sp. strain QS4 could completely control *P. ultimum* infestation pots of kale and lettuce, but restored productions more than control pots. The last one was *Paenibacillus polymyxa* TL41, a gram positive bacterial endophyte of *Paederia foetida* that could control of *Xanthomonas campestris* on lettuce under

outdoor conditions. Additionally, *P. polymyxa* TL41 was able to inhibit *Alternaria* sp., *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *F. equiseti*, *P. palmivora* and *P. ultimum* on potato dextrose agar.

บทคัดย่อ

PDA เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *P. polymyxa* TL41 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคกุ้งแห้งเทียม *Alternaria* sp. เชื้อก่อโรคกุ้งแห้ง *C. capsici* เชื้อก่อโรคแอนแทรกโนส *C. gloeosporioides* และเชื้อก่อโรครากเน่า *P. ultimum* เชื้อก่อโรค *Fusarium* sp. เชื้อก่อโรคจุดดำบนกล้วยหอม *F. equiseti* เชื้อก่อโรครากเน่าในทุเรียน *Phytophthora palmivola* สำหรับการประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์เชื้อ *Xylaria* sp. QS4 มีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมดต่อไปนี้ *Escherichia coli*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas auruginosa*, MRSA-1302, MRSA-2, *Staphylococcus aureus* และเชื้อยีสต์ *Candida albicans* นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดของเชื้อเอนโดไฟท์อายุ 10 วัน ที่เจริญในอาหารเหลว PDB สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นทั้งหมด และสารสกัดของเชื้อเอนโดไฟท์อายุ 10 วัน ที่เจริญในอาหารเหลว Glucose Peptone สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นทั้งหมด จุดประสงค์อันหนึ่งของการศึกษานี้คือการทดสอบหาความสามารถของเชื้อเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* ว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* หรือไม่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดคือ PDA GPA และ modified PDA ด้วยวิธีการทดสอบเป็นปฏิกิริยาด้วยเหตุผลที่สำคัญคือโรคฟิโรโอซิส เกิดจากเชื้อ *Pythium insidiosum* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม oomycetes โรคนี้มีความรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตที่พบได้ทั้งในคนและในสัตว์ปัจจุบันมีรายงานการพบผู้ป่วยโรคนี้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ปัญหาสำคัญของโรคฟิโรโอซิสคือไม่มียาที่รักษาโรค การรักษาหลักจึงต้องใช้การผ่าตัดเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ติดเชื้อออกให้หมดทำให้เกิดความพิการและอัตราการตายที่สูง ผลการทดสอบพบเชื้อเอนโดไฟท์ 49 สายพันธุ์ มีเชื้อเอนโดไฟท์ 24 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* ตั้งแต่ 57-96% เชื้อราเอนโดไฟท์เหล่านั้นได้แก่เชื้อ *Dothideomycete* sp. N5L4 และ NAAL7, *Myrothecium* sp. RSb8, *Dothideomycete* sp., *Phyllosticta citrullina* NHL12, *Xylaria* sp. QS4, *Chaetomium* sp. RPR2, *Cladosporium cladosporioides* RRS18 และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *P. polymyxa* TL41 ผลข้อมูลจากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟท์จากต้นพืชสมุนไพรเป็นแหล่งที่มีศักยภาพในการค้นหาสารชนิดใหม่ ๆ ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคและที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* ที่ก่อโรคฟิโรโอซิสในคน

Executive Summary

ที่มาและแนวคิดการสร้างสรรผลงานวิจัยนี้ มาจากผลงานการวิจัยตั้งแต่ปี 2543 ที่ผ่านมากล่าวคือ ขณะที่ศึกษาต่อ ณ Montana State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ข้าพเจ้า และ Professor Dr. Gary A. Srobel สามารถแยกราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่ได้ 2 สายพันธุ์ คือ 1) ราเอนโดไฟท์ *Muscodor albus* จากต้นพืช *Cinnamomum zeylanicum* (Worapong และคณะ 2001) และ 2) ราเอนโดไฟท์ *M. roseus* จากต้นพืช *Grevillea pteridifolia* (Worapong และคณะ 2002) ที่สามารถสร้างก๊าซยับยั้งการเจริญเชื้อราที่ก่อโรคกับพืช อาทิเช่น *Ustilago hordei* (Loose Smut) ของต้นข้าวบาเลย์ นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *M. albus* ยังสามารถควบคุมการเจริญของ *Rhizoctonia solani* เชื้อราที่ก่อโรคของต้น sugarbeet ได้ด้วย หลังจากข้าพเจ้าสำเร็จจากการศึกษาปริญญาเอกและกลับเข้ามารับราชการในปี 2544 ข้าพเจ้าสามารถแยกราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *Muscodor albus* strain MFC2 ซึ่งเป็นเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ไทยแท้ ที่ถูกค้นพบจากต้นจันทน์เทศ ปลูก ณ สวนสมุนไพรสิริรุกชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม ที่สามารถสร้างก๊าซอินทรีย์ชีวภาพมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราที่ก่อโรครากเน่า *Pythium ultimum* (Sopalun et al., 2008) ผลงานของการดำเนินงานเป็นเวลา 3 ปีภายใต้โครงการการขยายผลการตรวจแยกหาเอนโดไฟท์จากต้นพืชสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบของชีวควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทยมีดังนี้คือ เชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่นี้ได้แก่ *Bipolaris thaiendophytica* JF2 ก็ถูกค้นพบจากผลไม้ของต้นจันทน์เทศเช่นกัน ดังนั้นต้นจันทน์เทศจึงเป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจเนื่องจากเชื้อนี้สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชอื่นได้แก่ *Alternaria* sp. (61%), *Colletotrichum capsici* (88%), *C. gloeosporioides* (70%), *F. equiseti* (42%), *Ganoderma* sp. (78%), *Geotrichum* sp. (75%), *Phytophthora palmivola* (84%), *P. ultimum* (69%), *Rhizoctonia* (91%) and *Sclerotinia* sp. (79%) จากเชื้อเอนโดไฟท์มากกว่า 1,000 สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นพืชสมุนไพรไทยพื้นบ้านในประเทศไทย มีเชื้อเอนโดไฟท์ 3 สายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงเพื่อนำไปในรูปแบบของชีวภาพควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคกับพืชเศรษฐกิจบนแปลงปลูกจำลองที่มีลักษณะใกล้เคียงกับแปลงปลูกจริง คือ *Muscodor albus* MFC2, *Xylaria* sp. QS4 และ *Paenibacillus polymyxa* TL41 ในสูตรอาหารธัญญาพืชที่จำเพาะเชื้อ *M. albus* MFC2 สามารถสร้างสารระเหยอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเพียงบางส่วนถึงยับยั้งได้ทั้งหมดต่อศัตรูพืชอื่นได้แก่ *Alternaria* sp. (93.1%), *Colletotrichum capsici* (81.3%), *C. gloeosporioides* (96%), *Fusarium* sp. (93.9%), *F. equiseti* (84.8%), *Ganoderma* sp. (100%), *Geotrichum* sp. (84.3%), *Phytophthora palmivola* (100%), *P. ultimum* (100%), *Rhizoctonia* (57.2%) and

Sclerotinia sp. (76.7%) ที่สำคัญเชื้อ *M. albus* MFC2 ที่เจริญในสูตรธัญญาพีชดังกล่าวสามารถสร้างก๊าซอินทรีย์เอทานอล ไอโซเอมิลลอสและออกซอล และโอมาเดนตรีน ที่มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อก่อโรครากเน่า *P. ultimum* ในคะน้า เชื้อก่อโรคกุ้งแห้งเทียม *Alternaria* sp. ในพริกบนแปลงปลูกจำลองเชื้อก่อโรคจุดดำ *F. equiseti* บนกล้วยหอมทอง อย่างมีประสิทธิภาพ และก๊าซอินทรีย์ ดังกล่าวยังสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* บนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ไม่ได้เพียงบางส่วน นอกจากนี้ผลของการวิเคราะห์ GC-MS ยังแสดงให้เห็นว่า *M. albus* MFC2 ที่เจริญในสูตรธัญญาพีช 14 วัน สามารถสร้างก๊าซชีวภาพได้จำนวน 37 ชนิด เช่น แอลกอฮอล์ 4 ชนิด เอสเทอร์ 10 ชนิด และ เอทานอล เป็นก๊าซชีวภาพที่เชื้อรา *M. albus* MFC2 สร้างได้เป็นปริมาณมากที่สุด การค้นพบความสามารถของเชื้อรา *M. albus* MFC2 ดังกล่าวสามารถนำมาเป็นแนวทางขยายผลในการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตร ให้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทนเอทานอลในอนาคต เป็นที่น่าสังเกตอีกว่า *M. albus* MFC2 สามารถเหี่ยวนาต้นมะเขือเทศให้สร้างรากขนอ่อนเป็นจำนวนมาก ซึ่งปรากฏการดังกล่าวเป็นกระบวนการที่พืชปรับตัวให้ทันแล้ง ในขณะที่ข้าพเจ้าและผู้ช่วยวิจัยสามารถพัฒนาหัวเชื้อ *M. albus* MFC2 ที่เจริญในสูตรธัญญาพีชให้อยู่ในรูปอัดเม็ดดังกล่าวอย่างแนบและพร้อมที่จะจดอนุสิทธิบัตร เชื้อราเอนโดไฟท์ชีวควบคุมตัวที่ 2 คือ *Xylaria* sp. QS4 เป็นเชื้อราเอนโดไฟท์จากกิ่งของผักหวานที่เจริญที่ วิทยาลัยเกษตรกรรมบุรีรัมย์มหาวิทยาลัยมหิดล ผลการทดลองเป็นปฏิสัมพันธ์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคกุ้งแห้งเทียม *Alternaria* sp. 52% เชื้อก่อโรคกุ้งแห้ง *C. capsici* 33.3% เชื้อก่อโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* 32.5% และเชื้อก่อโรครากเน่า *P. ultimum* 89% ผลของการผสมเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 อายุ 10 วัน จำนวน 15 จานเลี้ยงเชื้อ กับดินจากแปลงปลูกผักจริงและดินที่ขายตามท้องตลาดปริมาณ 500 กรัม ต่อกระถางไม่มีผลต่อการงอกและการเจริญของเมล็ดคะน้าและผักกาดหอมบนแปลงปลูกจำลอง นอกจากนี้เชื้อ *Xylaria* sp. QS4 ในปริมาณดังกล่าวยังสามารถควบคุมเชื้อก่อโรครากเน่า *P. ultimum* ที่ใส่ในกระถางปลูกคะน้าและผักกาดหอมอย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำผลผลิตกลับมาได้มากกว่าชุดกระถางควบคุม ขณะนี้ น.ส. อติษฐ ซึ่งเป็นนักศึกษาปริญญาโทภายใต้การดูแลของ ดร. ปราณี อินทโคน และข้าพเจ้าสามารถแยกได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรครากเน่าและจำแนกได้ว่าเป็นสารชนิดใด เชื้อเอนโดไฟท์ชีวควบคุมตัวสุดท้ายคือ *Paenibacillus polymyxa* TL41 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์แกรมบวกของต้นเถาตุตหมุดุดหมา (*Paederia foetida*) ที่สามารถควบคุมเชื้อ *Xanthomonas campestris* บนผักกาดหอมบนแปลงปลูกจำลอง นอกจากนี้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *P. polymyxa* TL41 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคกุ้งแห้งเทียม *Alternaria* sp. 54% เชื้อก่อโรคกุ้งแห้ง *C. capsici* 28% เชื้อก่อโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* 90% และเชื้อก่อโรครากเน่า *P. ultimum* 100% เชื้อก่อโรค *Fusarium* sp. 53% เชื้อก่อโรคจุดดำบนกล้วยหอม *F. equiseti* 63% เชื้อก่อโรครากเน่าในทุเรียน *Phytophthora palmivora* 68% หัวข้อโครงการงานเรื่องการประยุกต์ใช้เชื้อเอนโดไฟท์ *Paenibacillus polymyxa* TL41 เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคเน่าดำ (*Xanthomonas campestris*) ในต้นผักกาดหอม ได้รับรางวัลนวัตกรรมแห่งประเทศไทย เป็นลำดับที่ 2 จากกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ และ บริษัท ปตท. เคมีคอล จำกัด (มหาชน) ในการประกวด โครงการรางวัลนวัตกรรมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 8 (2551) ระหว่างวันที่ 3-5 ตุลาคม 2551 นอกจากนี้ข้าพเจ้าได้รับเชิญให้ไปเสนอผลงานวิจัยในหัวข้อ “*Paenibacillus polymyxa* strain TL41, a bacterial endophyte of *Paederia foetida* and its potential use for control of *Xanthomonas campestris* on lettuce” ณ การประชุม The 8th International Plant Growth Promoting Rhizobacteria Workshop โรงแรม Embassy Suite Hotel Downtown เมือง Portland, มลรัฐ Oregon, ประเทศ สหรัฐอเมริกา ตั้งแต่วันที่ 18 พ.ค. 2552 – 22 พ.ค. 2552 สร้างความประทับใจให้กับนักวิทยาศาสตร์จากทุกทวีป รวมทั้งจากบริษัท AgraQuest, Breyer, AMS solution for the soil เนื่องจากเชื้อ *Paenibacillus polymyxa* strain TL41 เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ใหม่ที่ยังไม่มีข้อมูลศึกษาเกี่ยวกับเชื้อชนิดนี้มากนักก็ทั้งเชื้อนี้สามารถสร้างสปอร์ได้ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่จำเป็นในการนำไปผลิตเพื่อการค้าเหมือนกับเชื้อ *Bacillus* สำหรับการประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์เชื้อ *Xylaria* sp. QS4 มีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมดต่อไปใน *Escherichia coli*, *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas auriginosa*, MRSA-1302, MRSA-2, *Staphylococcus aureus* และเชื้อยีสต์ *Candida albicans* นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดของเชื้อเอนโดไฟท์อายุ 10 วัน ที่เจริญในอาหารเหลว PDB สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นทั้งหมด และสารสกัดของเชื้อเอนโดไฟท์อายุ 10 วัน ที่เจริญในอาหารเหลว Glucose Peptone สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นทั้งหมด จุดประสงค์อันหนึ่งของการศึกษานี้คือการทดสอบ

หาความสามารถของเชื้อเอนโดไฟต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* ว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* หรือไม่นับอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดคือ PDA GPA และ modified PDA ด้วยวิธีการทดสอบเป็นปฏิบัติการด้วยเหตุผลที่สำคัญคือโรคพรีโอซิส เกิดจากเชื้อ *Pythium insidiosum* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม oomycetes โรคนี้มีความรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตที่พบได้ทั้งในคนและในสัตว์ปัจจุบันมีรายงานการพบผู้ป่วยโรคนี้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ปัญหาสำคัญของโรคพรีโอซิสคือไม่มียาที่ใช้รักษาโรค การรักษาหลักจึงต้องใช้การผ่าตัดเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ติดเชื้อออกให้หมดทำให้เกิดความพิการและอัตราการตายที่สูง ผลการทดสอบพบเชื้อเอนโดไฟต์ 49 สายพันธุ์ มีเชื้อเอนโดไฟต์ 24 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* ตั้งแต่ 57-96% เชื้อราเอนโดไฟต์เหล่านั้นได้แก่เชื้อ *Dothideomycete* sp. N5L4 (97%), *Myrothecium* sp. RSb8 (96%), *Dothideomycete* sp. NAAL7 (90%), *Phyllosticta citrullina* NHL12 (82%), *Xylaria* sp. QS4 (74%), *Chaetomium* sp. RPR2 (74%), *Cladosporium cladosporioides* RRS18 (70%) และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ *P. polymyxa* TL41 (95%) ผลข้อมูลจากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟต์จากต้นพืชสมุนไพรเป็นแหล่งที่มีศักยภาพในการค้นหาสารชนิดใหม่ ๆ ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาและที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Pythium insidiosum* ที่ก่อโรคพรีโอซิสในคน

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราเอนโดไฟต์เป็นเชื้อราสมุนไพรเนื่องจากเชื้อเหล่านี้สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่ ยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช เชื้อ *Pythium insidiosum* ที่ก่อโรคพรีโอซิสในคน และเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยา

บทบาทของเอนโดไฟท์ *Muscodor albus* MFC2 กับต้นกล้วยมะเขือเทศภายใต้สภาวะความเครียด

Roles of endophytic *Muscodor albus* MFC2 on *Lycopersicon esculentum* seedling under stress conditions

ศรัญญา ถิ่นสุข¹ มนต์ฤดี ศรีไทรทรัพย์¹ สิทธิรักษ์ รอยตระกูล² อรุณขุ ลิลาพร² และ จีรพันธ์ วรพงษ์¹

¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

²ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) 113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถ.พหลโยธิน

ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสรีรวิทยาของต้นมะเขือเทศ ในสภาวะที่ไม่รดน้ำเปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกับ เชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 เช่น น้ำหนักของต้นพืช ความสูงของต้นพืช ความยาวของราก การเหี่ยวของใบ และต้นพืช
2. เพื่อเปรียบเทียบระดับของเอนไซม์ peroxidase และ vacuolar ATPase ที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งของต้นมะเขือเทศ
3. เพื่อศึกษาตรวจสอบตำแหน่งของเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ที่เข้าไป colonized ในต้นมะเขือเทศ

บทนำ

ในรอบหลายปีที่ผ่านมา ภัยพิบัติธรรมชาติที่เกิดขึ้นบนโลกใบนี้ซึ่งเป็นผลมาจากปรากฏการณ์โลกร้อน ไม่ว่าจะเป็น แผ่นดินไหว คลื่นยักษ์สึนามิ พายุถล่ม น้ำท่วม ไฟป่า และภัยแล้ง ซึ่งภัยพิบัติที่เกิดขึ้นนั้นนอกจากจะมีทุกรูปแบบแล้ว ยังมีความรุนแรงมากกว่าเดิม แลในหลายภูมิภาคต้องเผชิญหน้ากับความเลวร้ายอย่างที่ไม่เคยคาดคิดมาก่อน ภัยแล้งเป็นภัยธรรมชาติอันเกิดจากการมีฝนตกน้อยหรือฝนไม่ตกต้องตามฤดูกาลทำให้เกิดสภาวะการขาดแคลนน้ำ ทั้งด้านน้ำอุปโภค บริโภคและน้ำเพื่อการเกษตรซึ่งเป็นสาเหตุให้พืชพรรณต่างๆ ได้รับผลกระทบ ทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโตผลผลิตไม่ สมบูรณ์เกิดความเสียหายทั้งทางด้านเศรษฐกิจและสังคม สำหรับภัยแล้งในประเทศไทยส่วนใหญ่เกิดจากฝนแล้งและทิ้งช่วง ซึ่งฝนแล้งเป็นภาวะปริมาณฝนตกน้อยกว่าปกติหรือฝนไม่ตกต้องตามฤดูกาล ซึ่งอาจเกิดขึ้นเฉพาะท้องถิ่นหรือบางบริเวณ แต่บางครั้งก็อาจครอบคลุมพื้นที่กว้างเกือบทั่วประเทศ ซึ่งประเทศไทยนั้นเป็นประเทศที่ส่งออกสินค้าเกษตรและผลิตภัณฑ์ แปรรูปทางการเกษตรที่สำคัญในตลาดโลก แต่ในช่วงที่ผ่านมา ผลผลิตสินค้าเกษตรของประเทศลดลงมาก เช่น ในปี 2548 ที่ ผ่านมา การผลิตภาคเกษตรได้รับผลกระทบจากหลายปัจจัย ทำให้เกิดปัญหา Supply Shock ในภาคเกษตร โดยบางปัจจัย เป็นผลสืบเนื่องมาตั้งแต่ปลายปี 2547 อาทิ ปัญหาภัยแล้งที่ค่อนข้างรุนแรงและมีแนวโน้มที่จะทวีความรุนแรงขึ้นเป็นลำดับ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าภัยแล้งมีผลกระทบโดยตรงต่อการลดลงทั้งปริมาณและคุณภาพ ทั้งยังทำให้เกิดโรคต่างๆ ในผลผลิต ทางด้านการเกษตร และมีผลกระทบทางอ้อม ได้แก่ การทิ้งร้างที่ดินทำกิน การอพยพละทิ้งถิ่นที่อยู่อาศัยไปหางานทำใน เมือง ซึ่งได้ก่อให้เกิดปัญหาทั้งทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และวัฒนธรรม ตามมาอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษา ว่าพืชเหล่านั้นสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่แห้งแล้งได้อย่างไร

มะเขือเทศเป็นพืชทางการเกษตรที่สำคัญอย่างหนึ่ง ในปี 2550 มูลค่าของผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศสูงถึง 445 ล้านบาทต่อปี พื้นที่ปลูกผืนไร่ระหว่าง 52,000-71,000 ล้านไร่ อยู่ในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่ อาศัยน้ำฝน เนื่องจากมะเขือเทศเป็นพืชที่ต้องการน้ำสม่ำเสมอ และไม่สามารถทนอยู่ในสภาวะที่แห้งแล้งได้ (Hsiao, 1973) ตั้งแต่เริ่มปลูกไปจนถึงผลเริ่มแก่ ดังนั้นปริมาณน้ำที่เหมาะสมจะมีผลการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ ซึ่งต้นจะแข็งแรง คุณภาพดีและติดผลมาก มะเขือเทศ เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่ง ซึ่งมีผู้นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลาย สามารถนำไปประกอบอาหารได้หลายชนิด เป็นพืชผักที่มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยเฉพาะวิตามินเอและวิตามินซี ในปัจจุบัน ได้มีการผลิตสำหรับส่งโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อแปรรูปในแบบต่างๆ เช่น น้ำมะเขือเทศ และซอสมะเขือเทศ เป็นต้น ดังนั้น ความต้องการของตลาดมะเขือเทศจึงมีอยู่ตลอดทั้งปี แต่ในบางฤดูมะเขือเทศมีปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการของ ตลาด เนื่องจากมะเขือเทศจะเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูงในช่วงที่มีอุณหภูมิและความชื้นของอากาศที่เหมาะสม จาก สภาพของพื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่ที่มีความแห้งแล้งซึ่งเป็นผลมาจากสภาวะโลกร้อนนั้น ทำให้มะเขือเทศเจริญเติบโตไม่ดีให้ ผลผลิตต่ำ ส่งผลให้มะเขือเทศในตลาดมีราคาที่สูงมากส่งผลกระทบต่อเกษตรกรที่ต้องเพิ่มต้นทุนในการดูแลและส่งผลให้ ผู้บริโภคมีค่าครองชีพที่สูงขึ้น ซึ่งมีผลกระทบต่อสภาพเศรษฐกิจของประเทศชาติด้วย

จากข้อมูลเบื้องต้น หากสามารถตอบปัญหาการอยู่ร่วมกันของเชื้อราเอนโดไฟท์และพืชเจ้าบ้านว่า เชื้อราเอนโดไฟท์นั้น สามารถเอื้อประโยชน์ให้กับพืชเจ้าบ้านอย่างไรในแง่ของการสร้างสารทุติยภูมิปกป้องพืชเจ้าบ้าน ในส่วนของการทนแล้งได้มี

การศึกษากันมากในเชื้อราในกลุ่มของไมโครไรซา แต่การศึกษาในเรื่องของเชื้อเอนโดไฟท์ต่อการทนแล้งยังมีน้อยมาก ดังนั้นองค์ความรู้จากงานวิจัยชิ้นนี้จะทำให้เข้าใจปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อเอนโดไฟท์และพืช ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเกษตรต่อไป

การตรวจเอกสาร

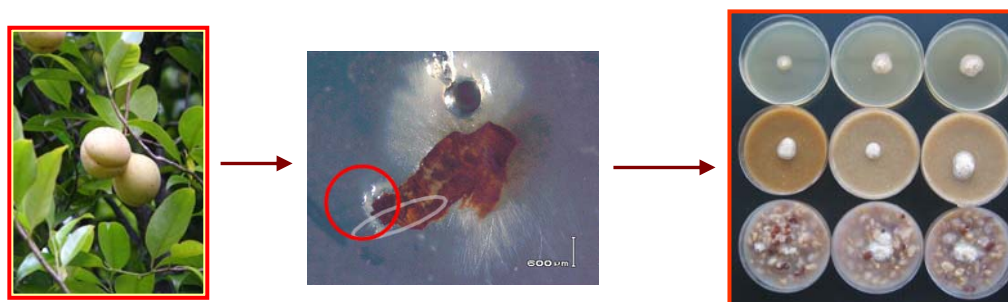
เชื้อเอนโดไฟท์ (Endophyte)

เชื้อเอนโดไฟท์ คือจุลินทรีย์ อันได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา และ สเตรปโตมัยซิส ซึ่งเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชบริเวณใบ ลำต้น และ กิ่ง เป็นต้น โดยที่ไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคต่อต้นพืชที่ราเอนโดไฟท์เหล่านั้นอาศัย ดังนั้นเชื้อราเอนโดไฟท์จึงเป็นแหล่งสำคัญอีกแหล่งหนึ่งที่นักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่ให้ความสนใจเพื่อแยกหาสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำมาใช้ประโยชน์โดยมุ่งเน้นทางด้านการแพทย์เพื่อเป็นยารักษาโรค รวมถึงการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรมโดยใช้ในการควบคุมศัตรูพืชที่ก่อโรคซึ่งเป็นการควบคุมทางชีวภาพ จากผลงานการวิจัยโดย ผศ. ดร. จีรพันธ์ วรพงษ์ และ Professor Dr. Gary A. Strobel แห่ง Montana State University ที่ผ่านมา สามารถแยกราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ 1) ราเอนโดไฟท์ *Muscodora albus* จากต้นพืช *Cinnamomum zeylanicum* (Worapong และคณะ, 2001) และ 2) ราเอนโดไฟท์ *M. roseus* จากต้นพืช *Grevillea pteridifolia* (Worapong และคณะ, 2002) ที่สามารถสร้างก๊าซยับยั้งการเจริญเชื้อราที่ก่อโรคร่วมกับพืช อาทิเช่น *Ustilago hordei* (Loose Smut) ของต้นข้าวบาเลย์ นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *M. albus* ยังสามารถควบคุมการเจริญของ *Rhizoctonia solani* เชื้อราที่ก่อโรคของต้น sugarbeet ได้ด้วย ปี 2003-2004 Dr. Strobel และ นักศึกษาปริญญาโท Eva Grimme (Grimme และคณะ 2004) ได้ทดลองนำเชื้อ *M. albus* และ *M. roseus* ไปใช้กับการป้องกันโรคร่วมกับต้น sugar beet และ ต้นเก๊กฮวย หรือต้นเบญจมาศ (*Chrysanthemum*) ผลปรากฏว่าได้ผลดีมาก และในขณะเดียวกัน Dr. Strobel ได้ส่งเชื้อ *M. albus* ไปให้ Dr. Julien Mercier และ Dr. Jorge I. Jimenez (2004) ที่บริษัท AgraQuest, Inc. เมือง Davis มลรัฐ California (AgraQuest is a biotechnology company that focuses on discovering, developing, manufacturing and marketing effective, safe and environmentally friendly natural pest management products for the agricultural, institutional and home markets., <http://www.agraquest.com>) เพื่อทำการทดสอบใช้เชื้อดังกล่าวกับการป้องกันแอปเปิ้ลและพืช จากเชื้อก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวเช่น *Penicillium expansum*; *Botrytis cinerea*; *Monilinia fructicola* จากผลการทดลองปรากฏว่าก๊าซที่สร้างจากเชื้อ *M. albus* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวไรย์ สามารถฆ่าเชื้อ *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Monilinia*, *Penicillium* and *Rhizopus* บนผลแอปเปิ้ล พืช พร้อมทั้งข้อสรุปที่ดีคือเชื้อ *M. albus* สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ดังกล่าวเนื่องจากเชื้อ *M. albus* ไม่สามารถผลิตสปอร์ที่จะแพร่กระจายไปยังผลไม่ได้และที่สำคัญ ตัวเชื้อเชื้อ *M. albus* ก็ไม่ได้สัมผัสกับผลไม้โดยตรงด้วย และในปีถัดไป Dr. Julien Mercier และ Dr. Denise C. Manker (2005) ได้ตีพิมพ์เรื่องการนำเชื้อ *M. albus* ไปใช้ควบคุมโรค Damping off ที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* กับต้นบรอกเคอรี่ ปี 2549 US-EPA (United States Environmental Protection Agency) ได้ให้การยอมรับในการใช้ เชื้อ *M. albus* ในการเกษตร ปัจจุบันบริษัท AgraQuest ได้นำออกขายแล้ว (Strobel, 2006)

สำหรับเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นสายพันธุ์ไทยที่แยกได้จากต้นจันทน์เทศที่ปลูกในสวนสิริรุกชาติ มหาวิทยาลัยวิทยาเขตศลาสา ในปี พ.ศ. 2548 (รูปที่ 1, Sopalun และคณะ, 2003) ผลจากการวิจัยในช่วงแรกแสดงให้เห็นว่าก๊าซจากเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่าในคะน้า กระตุ้นการเจริญของต้นคะน้าและไม่ก่อโรคใดๆกับต้นคะน้าตั้งแต่การงอกจนถึงการเก็บเกี่ยว (Worapong และ Strobel, 2008) ในปี พ.ศ. 2549 โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนต่อเนื่องจาก สกว. และสกอ จำนวน 1,200,000 บาท (400,000 บาทต่อปี) มีระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี ตั้งแต่ 20 ก.ค. 2549 ถึง 2552 เพื่อทำการวิจัยขยายผลการประยุกต์ใช้เชื้อเอนโดไฟท์ *M. albus* MFC2 และแยกเชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์อื่นๆ ที่เหมาะสมในการควบคุมโรคพืชต่างๆ

จากข้อมูลเบื้องต้นที่ ผศ. ดร. จีรพันธ์ วรพงษ์ สังเกตจากการทดลองในหัวข้อ "Biocontrol of a root rot of kale by *Muscodora albus* strain MFC2" และได้ผลการทดลองเบื้องต้นเพิ่มเติมว่า ต้นคะน้าในกระถางที่มีการผสมเชื้อ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 มีแนวโน้มที่จะทนแล้งได้ดี ไม่แสดงอาการเหี่ยวถึงแม้จะไม่ได้รับน้ำเป็นเวลานาน 2 วัน เปรียบเทียบกับต้นคะน้าที่ไม่ผสมเชื้อ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ดังแสดงในรูปที่ 2. ดังนั้น วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ต่อกลไกการทนแล้งในพืชเจ้าบ้านต้นมะเขือเทศ ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยศึกษาการตอบสนองของต้นมะเขือเทศต่อการทนแล้งด้วยการศึกษา

สรีระวิทยาและระดับของเอนไซม์ภายในรากต้นมะเขือเทศที่เจริญในดินร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 เปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศกลุ่มควบคุมเมื่ออยู่ในภาวะขาดน้ำ



รูปที่ 1. แสดงลักษณะเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* MFC2 ซึ่งเป็นจุลชีพที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของต้นจันทน์เทศ (Sopalun และคณะ, 2003) เป็นเชื้อราที่ดีที่ไม่ก่อโรคให้กับต้นพืชเจ้าบ้าน และแสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อ *M. albus* MFC2 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 2. แสดงลักษณะของต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รดน้ำ 2 วัน; กระถางที่ 1 เป็นต้นมะเขือเทศปลูกในดินที่ผสมเชื้อราก่อโรครากเน่า *Pythium ultimum* ต้นพืชมีอาการใบเหี่ยว, กระถางที่ 2 เป็นต้นมะเขือเทศปลูกในดินที่ผสมเชื้อราก่อโรครากเน่า *Pythium ultimum* และเชื้อ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ต้นมะเขือเทศปลูกได้ดีไม่มีอาการเหี่ยว, กระถางที่ 3 เป็นต้นมะเขือเทศปลูกในดินที่ผสมเชื้อ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ต้นมะเขือเทศปลูกได้ดีไม่มีอาการเหี่ยว, และกระถางที่ 4 เป็นต้นมะเขือเทศปลูกในดินธรรมดา ต้นมะเขือเทศมีอาการใบเหี่ยว

นอกจากนี้งานวิจัยยังมุ่งศึกษาเพื่อยืนยันว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 สามารถที่จะเข้าไปเจริญในต้นมะเขือเทศโดยเฉพาะภายในรากได้หรือไม่ ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปใช้ในการประยุกต์ใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการฟื้นฟูปรับปรุงสภาพดินเพื่อการเพาะปลูกพืชต่อไป ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้อาจนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจในขบวนการทนแล้งของพืชเจ้าบ้านได้ว่า เชื้อราเอนโดไฟท์มีส่วนช่วยให้พืชเจ้าบ้านสามารถที่จะทนแล้งได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อไปสำหรับเป็นแนวทางในการปรับปรุงเพื่อใช้ในการควบคุมทางชีววิธีและนำไปประยุกต์ใช้ตลอดจนพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยให้พืชผลทางการเกษตรสามารถทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งหรือในการปรับปรุงสภาพของดินที่ใช้ในการเพาะปลูก นอกจากนี้สามารถที่นำผลการวิจัยที่ได้มาขยายผลต่อไปในพืชชนิดอื่นๆ อาทิเช่น ข้าว ซึ่งเป็นสินค้าทางการเกษตรกรรมส่งออกสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยเป็นอันดับหนึ่งและมีแนวโน้มที่จะมีราคาสูงขึ้นเรื่อย ๆ แต่พื้นที่เพาะปลูกกับปริมาณที่เพาะปลูกได้กลับน้อยลงเนื่องจากสภาวะแห้งแล้งที่ได้กล่าวมาข้างต้น เพื่อประโยชน์ทางการเกษตรกรรมซึ่งเป็นอาชีพหลักของประชากรไทยและสามารถนำไปใช้ได้จริงต่อไปในอนาคต

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill., Solanaceae)

มะเขือเทศ จัดเป็นพืชผักที่มีความสำคัญที่ทั้งในแง่ผักอุตสาหกรรมและบริโภคสด มะเขือเทศ เป็นพืชชนิดหนึ่งที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหาร มะเขือเทศขนาดปานกลางจะมีปริมาณวิตามินซีครึ่งหนึ่งของส้มโอทั้งผล มะเขือเทศหนึ่งผลจะมีวิตามินเอ

1 ใน 3 ของวิตามินเอที่ร่างกายต้องการในหนึ่งวัน นอกจากนี้ มะเขือเทศยังมีโปแตสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และแร่ธาตุอื่นๆ อีกหลายชนิด ปริมาณการส่งออกมะเขือเทศสดและผลเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี มะเขือเทศที่ปลูกในปัจจุบัน แบ่งได้เป็น มะเขือเทศรับประทานผลสด และมะเขือเทศอุตสาหกรรม เพื่อส่งโรงงานทำผลิตภัณฑ์มะเขือเทศแปรรูป เช่น มะเขือเทศเข้มข้น (paste) ซอสมะเขือเทศ

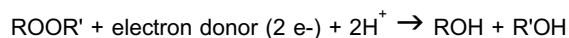
พื้นที่ปลูกมะเขือเทศอุตสาหกรรม 27,195 ไร่ มะเขือเทศรับประทานสด 28,209 ไร่ (พ.ศ.2540 / 2541) พันธุ์ที่ส่งเสริมมะเขือเทศอุตสาหกรรม พันธุ์เบต้า เดต้า TW 4 มะเขือเทศรับประทานสด พันธุ์สีดาทิพย์ต้นทุนการผลิต/ไร่ 7,750 บาท/ไร่ (พ.ศ. 2539) พื้นที่ส่งเสริมการปลูกมะเขือเทศอุตสาหกรรม มีพื้นที่เหมาะสมเชิงธุรกิจในจังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย หนองคาย สกลนคร นครพนม และกาฬสินธุ์ พื้นที่ปลูกที่สำคัญ จังหวัด บุรีรัมย์ อุดรธานี สุรินทร์ และตาก ส่วนการปลูกมะเขือเทศรับประทานสด มีพื้นที่ปลูกเชิงธุรกิจที่สำคัญในจังหวัด นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี เชียงใหม่ เชียงราย และนครราชสีมา พื้นที่ปลูกที่สำคัญ จังหวัด ลำปาง และลพบุรี

ในปีพ.ศ. 2539-40 ผลผลิตเฉลี่ยของมะเขือเทศอุตสาหกรรม 3,956 กก./ไร่ มะเขือเทศรับประทานสด 2,047 ไร่ มะเขือเทศรับประทานสด 40,649.64 ตัน ปริมาณที่ใช้ในประเทศของมะเขือเทศอุตสาหกรรม 171,815.7 ตัน ราคาที่เกษตรกรขายได้ของมะเขือเทศอุตสาหกรรม 1-1.6 บาท/กก. ส่วนปีพ.ศ. 2540-41 ผลผลิตรวมทั้งประเทศของมะเขือเทศอุตสาหกรรม 107,572 ไร่ มะเขือเทศรับประทานสด 57,735 ไร่ ในปีพ.ศ. 2541มะเขือเทศรับประทานสด 11-16 บาท/กก. การส่งออกมะเขือเทศสด ปริมาณ 1,170 ตัน มูลค่า 9.4 ล้านบาท มะเขือเทศอุตสาหกรรม ปริมาณ 9,834 ตัน มูลค่า 234 ล้านบาท ประโยชน์และสรรพคุณทางยาในผลมะเขือเทศคือสารจำพวก แคโรทีนอยด์ ชื่อไลโคปีน (Lycopene) ซึ่งเป็นสารสีแดง และวิตามินหลายชนิด เช่น วิตามิน บี 1 บี 2 วิตามิน เค โดยเฉพาะวิตามิน เอ และวิตามิน ซี มีในปริมาณสูง มีกลดมาลิก กรดซิตริก ซึ่งให้รสเปรี้ยว และมีกลูตามิก (Glutamic) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนช่วยเพิ่มรสชาติให้อาหาร นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารเบต้า - แคโรทีน และแร่ธาตุหลายชนิด เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก เป็นต้น ผลมีรสเปรี้ยว ช่วยดับกระหาย ทำให้เจริญอาหาร บำรุงและกระตุ้นกระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต ให้ทำงานได้ดีด้วยช่วยขับพิษและสิ่งคั่งค้างในร่างกายเป็นยาระบายอ่อนๆ และเหมาะที่จะเป็นอาหารสำหรับคนเป็นโรคหัวใจ วัณโรค ไทฟอยด์ ให้อักเสบ และเยื่อตาอักเสบ โดยรับประทานผลสด ผู้ที่รับประทานมะเขือเทศเป็นประจำ จะช่วยลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งในลำไส้ และมะเร็งต่อมลูกหมาก นอกจากนี้ยังนำช่วยเป็นยารักษาโรคผิวหนังที่โดนแดดเผาโดยใช้ใบตำให้ละเอียดทาบริเวณที่เป็น ส่วนราก ลำต้น และใบแก่นำมาต้มกับน้ำรับประทานช่วยแก้อาการปวดฟัน น้ำมะเขือเทศพอกหน้า หรืออาจจะมะเขือเทศสุกผ่านบาง ๆ แปะบนใบหน้า จะช่วยให้ผิวหนังอ่อนนุ่มช่วยรักษาสิว สิวหน้าผากให้เต่งตึง มะเขือเทศยังช่วยแต่งรสอาหารให้มีรสเปรี้ยว และนำมาประกอบอาหารต่าง ๆ มากมาย เช่น สลัด ยำต่าง ๆ รสเปรี้ยวหวาน ข้าวผัด ส้มตำ ซุป ต้มยำ ซอสมะเขือเทศ ทำเป็นเครื่องดื่ม คือ น้ำมะเขือเทศ หรืออาจจะรับประทานสด นอกจากนี้ยังใช้แต่งอาหารให้มีสีแดง เช่น ซอสมะเขือเทศ

เอนไซม์ Peroxidase และ ATPase

Peroxidase

Peroxidases (EC number 1.11.1.x) เป็นกลุ่มใหญ่ของเอนไซม์ รูปแบบของปฏิกิริยาของเอนไซม์ peroxidase



สารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์นี้คือ hydrogen peroxide (H_2O_2) บางเอนไซม์สามารถเกิดปฏิกิริยากับ organic hydroperoxides นอกจากนั้น ยังสามารถเกิดปฏิกิริยากับ lipid peroxides เอนไซม์ peroxidases สามารถสะสม heme ซึ่งเป็น cofactor ใน active sites หรือในส่วน redox-active cysteine หรือ selenocysteine ธรรมชาติของ electron donor ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของเอนไซม์

สภาวะความเครียดของต้นพืชที่เกิดจากความแห้งแล้ง ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ของพืชไม่ว่าจะเป็นทางตรงหรือทางอ้อม ในรูปของ activated oxygen species (AOS) ตัวอย่างเช่น superoxide radicals และ H_2O_2 (Mittler และ Zilinskas, 1994) โดย Superoxide จะกลายเป็น H_2O_2 อย่างรวดเร็วโดยการกระตุ้นของ superoxide dismutase (SOD) (Slooten และคณะ, 1995) โดยที่ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นนี้ สามารถถูกขจัดออกจากเซลล์ผ่าน peroxidases ที่พบทั่วทั้งเซลล์

ATPase

เอนไซม์ ATPases เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ catalyze พวกรวม decomposition ของ adenosine triphosphate (ATP) ให้เป็น adenosine diphosphate (ADP) และไอออนอิสระของ phosphate ปฏิกิริยานี้จะเรียกว่าปฏิกิริยา dephosphorylation ซึ่ง

ปฏิกิริยานี้จะปลดปล่อยพลังงานที่สามารถช่วยขับเคลื่อนปฏิกิริยาเคมีอื่น ๆ ภายในเซลล์ ขบวนการนี้เป็นที่รู้จักกันในสิ่งมีชีวิต บางส่วนของเอนไซม์เป็น integral membrane proteins (anchored within biological membranes) และช่วยให้สารเคลื่อนที่ผ่าน membrane ที่เรียกว่า transmembrane ATPases โดยที่การส่งผ่านโมเลกุลน้ำตาล กรดอะมิโน และโมเลกุลของสารอินทรีย์อื่น ๆ ภายในเซลล์จะขึ้นกับความเข้มข้นของเกรเดียนต์ซึ่งจะเกิดควบคู่กันระหว่างการส่งออกและการรับเข้าของไอออน: Protons (H^+ ATPase)

ATP เป็นนิวคลีโอไทด์ที่มีหน้าที่สำคัญหลายอย่างภายในเซลล์ เช่น เป็นพลังงานหลักของเซลล์ ที่ใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ ATP เป็นหนึ่งในโมโนเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ RNA ภายหลังจากที่เปลี่ยนเป็น deoxyATP (dATP) DNA นอกจากนั้น ATP ยังช่วยควบคุมกลไกทางชีวเคมีหลายอย่างในเซลล์ เมื่อกลุ่มของ phosphate 3 ตัวของ ATP ถูกกำจัดออกไปผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส จะได้พลังงานอิสระปล่อยออกมาซึ่งปริมาณพลังงานอิสระที่ถูกปล่อยออกมานั้นขึ้นอยู่กับปฏิกิริยานั้น ๆ

$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$ ADP คือ adenosine diphosphate และ P_i คือ inorganic phosphate

สรีรวิทยาความเค้น (Stress physiology)

สรีรวิทยาความเค้น เป็นสาขาวิชาที่สำคัญของสรีรวิทยาด้านสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับพืชและสัตว์ตอบสนองต่อสภาพสิ่งแวดล้อมอย่างไรที่เปลี่ยนแปลงมีนัยสำคัญจากสิ่งมีชีวิตที่ได้รับผลที่ดีที่สุด ซึ่งเป็นคำถามหรือความรู้ที่กว้าง ๆ สำหรับสิ่งมีชีวิตโดยรวม ความรู้ในด้านนี้มีส่วนในการทำให้เข้าใจอะไรเป็นปัจจัยจำกัดในการแพร่กระจายของพืช การศึกษาค้นคว้าและวิจัยความรู้ในด้านนี้จะเกี่ยวกับสภาพแวดล้อมที่ลำบากแล้วจำกัดผลิตผลทางการเกษตร

ศัพท์เทคนิคในสรีรวิทยาด้านความเค้นมีความแตกต่างกันมาก คำที่ใช้โดยทั่วไปมีดังนี้

ความต้านทานในความเค้น หรือ Stress resistance: ความสามารถที่จะทนทานต่อความเค้นที่มาจากภายนอก

การหลบหลีกในความเค้น หรือ Stress avoidance: ความสามารถที่จะป้องกันต่อความเค้นที่มาจากภายนอกที่สร้างขึ้นเท่ากับความเค้นภายในพืช

การทนทานในความเค้น หรือ Stress tolerance: ความสามารถที่จะทนทานต่อความเค้นภายในที่ชักนำ โดยความเค้นที่มาจากภายนอก

ตารางแสดงความเค้นทางสิ่งแวดล้อมหลักที่พืชอาจได้รับ

ความเค้น	ตัวอย่าง
อุณหภูมิสูง	ความร้อน
อุณหภูมิต่ำ	ความหนาวเย็น, น้ำค้าง
น้ำมากเกินไป	น้ำท่วม
ขาดน้ำ	แห้งแล้ง, ความเป็นไปได้ของน้ำค้าง
ความเค็ม	เกลือ หรือ NaCl
รังสี	แสงที่เห็นได้, อัลตราไวโอเลต
สารเคมี	สารกำจัดศัตรูพืช, โลหะหนัก, มลพิษทางอากาศ
สิ่งมีชีวิต	เชื้อโรค, การแข่งขัน

การตอบสนองในด้านการเผาผลาญและด้านสรีรวิทยา

พืชสามารถตอบสนองต่อความเค้นในหลาย ๆ ทาง พืชอาจหลบหลีกผลกระทบของความเค้นโดยทำให้การเจริญเติบโตสิ้นสุดสมบูรณ์ในช่วงช่วงที่มีความเค้นน้อยที่สุดหรือพืชอาจจะทนรับความเสียหายถ้าความเค้นนั้นมีอยู่และพืชไม่สามารถจะสู้ได้ ไม่เช่นนั้นทางเลือกโดยเฉพาะในการเผาผลาญอาจทำให้พืชสามารถหลีกเลี่ยงหรือทนทานต่อการกระทบของความเค้นได้

ชีวิตของพืชโบราณได้กำเนิดในสภาพแวดล้อมของน้ำที่มีอยู่มากมาย ชีวิตบนบกได้ก่อกำเนิดเมื่อสาหร่ายที่ห่อหุ้มน้ำเริ่มรวมตัวกันเป็นกลุ่มทางชีวภาพที่อยู่รูปแบบแห้งแล้งประมาณ 400 ล้านปีล่วงมาแล้ว ปรากฏการณ์ส่งเสริมให้การเจริญเติบโตเป็นไปอย่างรวดเร็วมากและมีความหลากหลายทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม นิสัยทางบกของพืชได้เปิดโอกาสให้เป็นรูปแบบใหม่ของปัจจัยที่จำกัดในการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์นั้นคือ น้ำที่จะหาได้ความเค้นในด้านน้ำเป็นความเค้นทางสิ่งแวดล้อมที่พบบ่อยที่สุดโดยพืชที่กำลังเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ สภาพแห้งแล้งเป็นปกติมากกว่าน้ำท่วมซึ่ง

เกิดขึ้นเสมอ ๆ โดยการที่ไม่มีน้ำในดิน เนื่องจากฝนมาล่าหรือฝนทิ้งช่วง แต่ที่ได้น้ำเพียงพอไม่ขาดไม่เกิน ความเค็มและบางครั้งก็อุณหภูมิต่ำอาจจะชักนำให้เกิดความเค็มในดินน้ำขึ้นได้แม้ว่าดินนั้นจะไม่แห้งแล้ง (Hsiao และคณะ, 1976) ซึ่งส่งผลกระทบต่าง ๆ ตามมา เช่น การยับยั้งการเจริญเติบโตโดย ความยาวที่ลดลง มวลชีวภาพที่ลดลง การลดลงในมวลชีวภาพของยอดมากกว่าในราก เป็นผลมาจากการลดลงในปริมาณของเซลล์ อัตราที่เห็นได้ชัดอีกอย่างคือการเหี่ยวเฉา ใบซีดและแห้ง การหลุดร่วงจะเห็นในพืชบางชนิด ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการสะสมออสโมไลต์ ภายใต้อิทธิพลของน้ำและแสง และเกิดการยับยั้งในการแลกเปลี่ยนแก๊สและการสังเคราะห์แสง

ตารางแสดงผลกระทบของความเค็มในด้านน้ำบนความเป็นไปได้ของน้ำในใบและอัตราที่เกี่ยวพันกับการสังเคราะห์แสง รวมทั้งการคายน้ำในมะเขือเทศ (Bauer และคณะ, 1997)

ช่วงของความแห้งแล้ง(วัน)	ความเป็นไปได้ของน้ำในใบ (MP _a)	การสังเคราะห์แสง (ค่าที่เกี่ยวข้องกับ 0 วัน เป็นหน่วยเปรียบเทียบ)	การคายน้ำ
0	- 0.6	100	100
8	- 1.2	95	84
11	- 1.5	78	65
12	- 1.8	52	21
การกลับให้น้ำอีก	- 0.8	93	74

นอกจากนี้อาจเกิดการออกดอกก่อนกำหนดและผลิตผลมีขนาดเล็กในถั่วและมะเขือเทศ ซึ่งอาจเป็นแผนการของพืชสำหรับการมีชีวิตรอดและการรักษาน้ำของพืชให้คงอยู่สืบไป ความเค็มในดินน้ำยังเป็นสาเหตุในการลดปริมาณจุลินทรีย์ในบริเวณรอบ ๆ ราก เกิดการลดในการสังเคราะห์โปรตีน ตลอดจนการลดลงของการขนย้ายและการดึงดูดแร่ธาตุอาหาร โดยกระบวนการนี้อาจเป็นเพราะผลกระทบที่แข่งขันกันของ Na⁺ และ Cl⁻

ผลกระทบทางชีวเคมีในกลไกของการป้องกันและความเป็นพิษ

การตอบสนองทางรูปร่างและสรีรวิทยาของพืชต่อความหลากหลายในประเภทของความเค็มได้ปรับเปลี่ยนในระดับชีวเคมีและโมเลกุล การตอบสนองเหล่านี้มีเป้าหมายไปในแนวทางป้องกันพืชที่จะช่วยให้ต่อต้านความเค็มด้วยอาศัยรูปแบบในการตอบสนองของโมเลกุลที่จะทำให้พืชไม่แสดงความผิดปกติใดใดในด้านรูปร่างหรือสรีรวิทยา (Bauer และคณะ, 1997)

การทำให้เนื้อเยื่อห่อหุ้มแตก

เนื้อเยื่อห่อหุ้มเซลล์และองค์ประกอบของเซลล์เป็นเป้าหมายของการทำลายโดยความเค็มต่อสิ่งที่มีชีวิตหลายประเภทด้วยกันได้แก่ มลพิษทางอากาศ โลหะหนัก อุณหภูมิ ฯลฯ การทำให้เนื้อเยื่อแตกอาจจะเป็นผลกระทบขั้นแรกของความเค็ม หรือผลที่จะเกิดตามมาในความผิดปกติของบางโมเลกุล ซึ่งเป็นผลในการแตกสลายและการไม่เกาะจับติดของเนื้อเยื่อห่อหุ้ม การแตกสลายของเนื้อเยื่อห่อหุ้มเซลล์อาจเป็นสาเหตุของความหลากหลายในผลกระทบต่อสรีรวิทยาของเซลล์ การหดตัวของเซลล์และเนื้อเยื่อของใบตายเป็นผลกระทบในความเสียหายของเนื้อเยื่อห่อหุ้มเด่นที่สุด

การชักนำโปรตีนจำเพาะ

พืชบ่อยครั้งที่ผลิตโปรตีนใหม่ในการตอบสนองต่อความเค็มทางสิ่งมีชีวิตถือว่าการให้สัญญาณและการตอบสนองต่อการป้องกันปัจจัยบางประการที่ปกติแล้วจะชักนำโปรตีนในการตอบสนองต่อความเค็มดังนี้

ตารางแสดงความเค้นในการชักนำโปรตีนและเปปไทด์ในพืช

โปรตีน (เปปไทด์)	ความเค้นที่ชักนำ
Acquaporins	ความแห้งแล้ง
โปรตีนต่อต้านจุดเยือกแข็ง	อุณหภูมิต่ำ
โปรตีน BN28 (ในพืช <i>Brassica napus</i>)	อุณหภูมิต่ำ
Dehydrins	ความแห้งแล้ง, อุณหภูมิต่ำ, ความเค้นและแอบซิซิก อะซิด
โปรตีนที่มีความร้อนทำให้หยุดนิ่ง (HSPs)	อุณหภูมิสูง
Osmotin และสารคล้าย Osmotin	ความเค็ม, การเป็นแผล, แอบซิซิก อะซิด, เอธิลีน ฯลฯ
Phytochelutins	โลหะหนัก

ความเสียหายที่ชักนำด้วยอนุมูลอิสระ-ออกซี

สารก่อกำเนิดอนุมูลอิสระและความเสียหายที่จะตามมาต่อส่วนประกอบของเซลล์ดูเหมือนว่าจะเป็นเหตุการณ์ที่สำคัญที่สุดระหว่างความเค้นในสิ่งที่มีชีวิต อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดเป็นชนิดของออกซิเจนที่มีปฏิกิริยาหรือ Reactive Oxygen Species (ROS) หรือชนิดกึ่งกลางของออกซิเจนที่มีปฏิกิริยาหรือ Reactive Oxygen Intermediates (ROI) เช่น Superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) และ Hydroxy free radical ($OH^{\cdot}$) และความเป็นพิษต่อพืชของ H_2O_2 ด้วยเหมือนกัน สำหรับ ROI จะเป็นพิษสูงมากและสามารถทำความเสียหายได้อย่างรุนแรงต่อส่วนประกอบของเซลล์ อนุมูลอิสระเหล่านี้ อาจจะเป็นสาเหตุของการเพิ่มออกซิเจนในส่วนประกอบของเนื้อเยื่อห่อหุ้มด้วยเหมือนกัน นอกจากนี้จะกระทบกระเทือนต่อโมเลกุลของสิ่งมีชีวิต เช่น น้ำย่อยโปรตีน นิวคลีอิด อะซิด ฯลฯ การผลิต ROI ปกติแล้วจะเพิ่มขึ้นระหว่างสภาวะที่มีความเค้น พืชมีกลไกการป้องกันที่ดีที่เก็บกวาดอนุมูลอิสระเหล่านี้ออกไปซึ่งประกอบด้วยสารต่อต้านอนุมูลอิสระ หรือ Antioxidants ได้แก่ สาร Ascorbate, Glutathione และน้ำย่อยอีกหลายชนิด ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD), Ascorbate peroxidase, Ascorbate reductase และ Glutathione reductase สารเหล่านี้และน้ำย่อยเหล่านี้ถูกชักนำระหว่างเกิดความเค้น การชักนำจะเห็นได้ชัดในพืชชนิดที่ทนทานต่อความเค้นมากกว่าในพืชที่อ่อนแอ

สำหรับ Superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) ได้ผลิตขึ้นเมื่อประจุลบถูกขับออกจากระบบแสง I หรือ Photosystem I (PSI) เข้ายึดโดยโมเลกุลของออกซิเจนแทนที่โดย Ferredoxin สถานะการณแบบนี้สร้างขึ้นเมื่อการแยกย่อย CO_2 ถูกลดลงและกลับไปเข้าข้างของ Ferredoxin และ NADPH ถูกจำกัด ประจุลบถูกขับออกจาก PSI ที่ไม่สามารถจะจับหน่วยรองรับปกติของมัน Ferredoxin ในสภาวะการณเช่นนั้น Superoxide anion เป็นปฏิกิริยาอย่างสูงไปทางส่วนประกอบของเซลล์และถ้าไม่เผาผลาญมันอาจชักนำความเป็นพิษในพืช ประจุลบจะไม่เปลี่ยนรูปสารเผาผลาญที่เป็นพิษค่อนข้างเล็กน้อย หรือ H_2O_2 โดยน้ำย่อย Superoxide dismutase สำหรับ Hydrogen peroxide จะไม่แสดงคุณสมบัติของอนุมูลอิสระและเป็นตัวกลางอนุมูลออกซิเจนที่คงสภาพมากที่สุด อย่างไรก็ตามมันเป็นตัวกระทำต่อหน่วยพันธุกรรมที่มีกำลังที่เป็นสาเหตุให้ออกซิเจนที่คงสภาพมากที่สุด อย่างไรก็ตามมันเป็นตัวกระทำต่อหน่วยพันธุกรรมที่มีกำลังที่เป็นสาเหตุให้ออกซิเจนที่มีกิจกรรมสูงใน Peroxisomes อย่างไรก็ตาม น้ำย่อยจะขาดไปหรือมีกิจกรรมน้อยมากในไซโตโซล, ไมโทคอนเรีย และโคลโรพลาส กลไกที่มีประสิทธิภาพมากกว่าในการเสื่อมสลายของ H_2O_2 ในส่วนประกอบของเซลล์เหล่านี้ผ่านวงจร Ascorbate-glutathione ในวงจรนี้ H_2O_2 ลดรูปเป็นน้ำโดยน้ำย่อย Ascorbate peroxidase การผลิต Monodehydroascorbate จาก Ascorbate สำหรับ Monodehydroascorbate ถูกลดรูปกลับไปเป็น Ascorbate โดยน้ำย่อย Monodehydroascorbate reductase ที่ใช้ NADH หรือ NADPH เป็นหน่วยให้อิเล็กตรอนภายใต้ข้อจำกัดที่ให้ NAD(P)H อนุมูลอิสระ Monodehydroascorbate จะไม่เปลี่ยนไปเป็น Ascorbate และ Dehydroascorbate สำหรับ Dehydroascorbate จะเปลี่ยนไปเป็น Ascorbate โดย Reduced glutathione ในการนำย่อย Dehydroascorbate reductase สาร Oxidised glutathione ถูกลดไปเป็น Reduced glutathione โดยน้ำย่อย Glutathione reductase ในการมี NADPH เป็นหน่วยลดรูป ด้วยเหตุนี้สารเผาผลาญ Ascorbate และ Glutathione และน้ำย่อยเกี่ยวข้องในวงจร Ascorbate-glutathione ที่สำคัญในการเก็บกวาดอนุมูลอิสระ วงจร Ascorbate-glutathione เป็นที่ทราบกันอีกชื่อหนึ่งคือ Asada-Halliwel cycle ตามชื่อของผู้ค้นพบ

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาเปรียบเทียบสรีรวิทยาของต้นมะเขือเทศ ในสภาวะที่ไม่รดน้ำเปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศที่ปลูก

ร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2

การเตรียมเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2

- 1) เลี้ยงเชื้อ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 เป็นระยะเวลา 10 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 25°C
- 2) ขูดเชื้อ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ผสมกับทรายในอัตราส่วน ทราย 500 กรัม ต่อเชื้อ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 จำนวน 10 plates

ชุดการทดลอง

ทรีตเมนต์การทดสอบบทบาทของเชื้อ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ที่ช่วยในการทนแล้ง โดยใช้สายพันธุ์ มะเขือเทศลูกผสม “F₁ สีดา 50”

1. ชุดควบคุม จะมีส่วนผสมของทราย+เมล็ดมะเขือเทศและรดน้ำปกติทุกวัน
2. ชุดที่ 2 จะมีส่วนผสมของทราย+เมล็ดมะเขือเทศ และรดน้ำปกติทุกวันจนต้นมะเขือเทศมีอายุ 13 วัน แล้วจึงรดน้ำวันเว้นวันหรือวัน 2-3 วัน ต่ออีก 8 วัน จนต้นมะเขือเทศมีอายุ 22 วัน
3. ชุดที่ 3 จะมีส่วนผสมของทราย+เมล็ดมะเขือเทศ+เชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 และรดน้ำปกติทุกวัน
4. ชุดที่ 4 จะมีส่วนผสมของทราย+เมล็ดมะเขือเทศ+เชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 และรดน้ำปกติทุกวันจนต้นมะเขือเทศมีอายุ 13 วัน แล้วจึงรดน้ำวันเว้นวันหรือวัน 2-3 วัน ต่ออีก 8 วัน จนต้นมะเขือเทศมีอายุ 22 วัน

ตารางที่ 1 แสดงการรดน้ำและการเก็บตัวอย่างของต้นมะเขือเทศในแต่ละวัน

ตารางที่ 1.1 แสดงการรดน้ำและการเก็บตัวอย่างของต้นมะเขือเทศในแต่ละวัน ชุดการทดลองที่ 1

ทรีตเมนต์	อายุของต้นมะเขือเทศ (วัน)									
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. ชุดควบคุม(เมล็ดมะเขือเทศ)รดน้ำทุกวัน	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2. (เมล็ดมะเขือเทศ)ไม่ได้รดน้ำทุกวัน	✓	×	✓	×	✓	×	✓	×	✓	×
3. (เมล็ดมะเขือเทศ+MFC2)รดน้ำทุกวัน	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4. (เมล็ดมะเขือเทศ+MFC2)ไม่ได้รดน้ำทุกวัน	✓	×	✓	×	✓	×	✓	×	✓	×

ตารางที่ 1.2 แสดงการรดน้ำและการเก็บตัวอย่างของต้นมะเขือเทศในแต่ละวัน ชุดการทดลองที่ 2

ทรีตเมนต์	อายุของต้นมะเขือเทศ (วัน)									
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. ชุดควบคุม(เมล็ดมะเขือเทศ)รดน้ำทุกวัน	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2. (เมล็ดมะเขือเทศ)ไม่ได้รดน้ำทุกวัน	✓	×	×	×	✓	×	×	✓	×	×
3. (เมล็ดมะเขือเทศ+MFC2)รดน้ำทุกวัน	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4. (เมล็ดมะเขือเทศ+MFC2)ไม่ได้รดน้ำทุกวัน	✓	×	×	×	✓	×	×	✓	×	×

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ ✓ หมายถึง มีการรดน้ำ และสัญลักษณ์ × หมายถึง ไม่มีการรดน้ำ

ในวันที่ 13 เริ่มเก็บตัวอย่าง โดยการเก็บตัวอย่างต้นมะเขือเทศทุกๆ ทรีตเมนต์ เก็บทุกวันของแต่ละวันเป็นประจำ โดยเก็บตัวอย่างต้นมะเขือเทศประมาณ 100 มิลลิกรัม (35-40 ต้น) โดยล้างทรายออกแล้วบันทึกผลข้อมูลทางสถิติทางวิทยาศาสตร์อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว และเก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อทำการทดลองต่อไป

การเปรียบเทียบสรีรวิทยาของต้นมะเขือเทศ

เปอร์เซ็นต์การออก

นับจำนวนต้นมะเขือเทศที่งอกรวมของทรีตเมนต์ที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นทรีตเมนต์ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ *M. albus* MFC2 ลงไป เปรียบเทียบการงอกกับทรีตเมนต์ที่ 3 และ 4 ซึ่งเป็นทรีตเมนต์ที่ใส่เชื้อ *M. albus* MFC2 ลงไป นับจำนวนรวมแล้วนำไปคำนวณเทียบกับ 100 เพื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

วัดความยาวของราก ใช้ไม้บรรทัดวัดความยาวของราก แล้วบันทึกผลการทดลอง

วัดความสูงของลำต้น ใช้ไม้บรรทัดวัดความสูงของลำต้น แล้วบันทึกผลการทดลอง

ชั่งน้ำหนัก ชั่งน้ำหนักรวมของตัวอย่างต้นมะเขือเทศ แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ยต่อต้น บันทึกผลการทดลอง

การเปรียบเทียบระดับของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งของต้นมะเขือเทศ

การสกัดโปรตีน

นำเซลล์ที่เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส 100 mg มาบดด้วย Micropestle เติมน้ำละลายผสมของ 0.1 M Tris-HCl pH 7, 2 mM EDTA, 4 mM DTT และ polyvinylpyrrolidone (PVPP) 30 มิลลิกรัม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปแช่ใน Sonicator นาน 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เก็บส่วนน้ำใส

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

ปิเปตตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรลงในภาชนะหลอด โดยทำซ้ำ 4 ซ้ำ เติมน้ำละลายผสมที่ประกอบด้วย 0.2% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.4% tartaric acid solution : 20% Na_2CO_3 : 0.8 N NaOH : 10 % SDS : nanopure ในอัตราส่วน 1 : 1 : 2 : 2 : 2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร/หลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent (เตรียมจาก Folin-Ciocalteu phenol reagent : nanopure อัตราส่วน 1 : 5) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปอ่านค่าด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้ Bovine serum albumin ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

การหากิจกรรมเอนไซม์

1) Peroxidase activity

ปิเปตตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรลงในภาชนะหลอด โดยทำซ้ำ 4 ซ้ำ เติมน้ำ Substrate solution (0.174 mM H_2O_2 , 2.358 mM Guaiacol และ buffer (pH 5.0, 7.0, 10.0)) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร/หลอด นำไปอ่านค่าด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตรทุก 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที ทำซ้ำโดยเปลี่ยน pH ของ Substrate solution วิเคราะห์หา Peroxidase activity โดยนำค่าที่อ่านได้จาก Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร หากกิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase ที่มีความแตกต่างของ pH โดยคิดเป็นยูนิตต่อไมโครกรัมโปรตีน

2) ATPase activity

ปิเปตตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร ลงในภาชนะหลอด โดยทำซ้ำ 4 ซ้ำ เติมน้ำ Substrate solution (3 mM ATP, 0.2 mM Ammonium molybdate, 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, เติมน้ำ 100 mM KNO_3 หรือ nanopure และปรับปริมาตรด้วย 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.5)) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลอด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วจึงเติมน้ำ colour reagent (8.5 mM Ammonium molybdate, 1.62 mM Malachite green, 200 mM perchloric acid และ 0.06% Tween 20 ปรับปริมาตรด้วย nanopure) 200 ไมโครลิตร/หลอด นำไปอ่านค่าด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร หากกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase activity โดยนำค่าที่อ่านได้จาก Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มาวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยคิดเป็นยูนิตต่อไมโครกรัมโปรตีน

การศึกษาเพื่อตรวจสอบตำแหน่งของเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ที่เข้าไป colonized ในต้นมะเขือเทศ

การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ water agar plate

วิธีการแยกเอนโดไฟท์จากต้นพืช โดยย่อคือ นำชิ้นส่วนของกิ่งไม้และใบไม้ขนาด 1-5 ซม. มาทำให้ปราศจากเชื้อโดยแช่ในแอลกอฮอล์ 70 % นาน 2 นาที, แช่ในสารละลาย 10 % Sodium hypochloride นาน 3 นาที, ล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นาน 2 นาที และ ซับให้แห้งบนกระดาษกรองปราศจากเชื้อ แล้วตัดชิ้นส่วนของพืชให้มีขนาดเล็กที่สุด (1-2 มม.) ด้วยมีดปราศจากเชื้อ แล้ววางชิ้นส่วนที่ได้ลงบน water agar plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C สังเกตและบันทึกผลทุกวัน แยกเอนโดไฟท์ให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตัดปลายเส้นใย (Hyphal tip technique: Strobel และคณะ, 1996) และนำสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงต่อบน potato dextrose agar (PDA) plate ดูความบริสุทธิ์ของเอนโดไฟท์บน PDA โดยสังเกตจากลักษณะโคโลนีที่สร้างจากสปอร์เดี่ยว (Single Spore Culture)

การทดสอบหาเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ในต้นมะเขือเทศด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

ทำการทดสอบหาเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ในต้นมะเขือเทศในระดับยีนด้วยการทำ PCR

การสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคที่ประยุกต์จากวิธีของ White และคณะ (1990) โดยบดต้นมะเขือเทศใน Liquid Nitrogen และละลายใน Lysis Buffer แล้วตกตะกอนโปรตีนและไขมันด้วย Isomyl Alcohol:Chloroform ในอัตราส่วน 1:24 แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% alcohol

การทำ PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อราด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน ITS4 และยีน ITS5 ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 (White และคณะ, 1990) ซึ่งในหนึ่งปฏิกิริยามีปริมาตรสารรวม 50 ไมโครลิตร จะประกอบด้วย 10X Taq Buffer with 15mM MgCl₂, 5X Enhancer, 2U Taq polymerase (Finnzymes), 10mM dNTP, 25µM Primer และ DNA 1 ไมโครลิตร ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 4 ขั้นตอนคือ Initial Denaturation ที่ 96 องศาเซลเซียส 2 นาที, Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที, Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที โดยทำการเพิ่มจำนวนทั้งหมด 30 cycles และ Final Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที (Kong และคณะ, 2003) จากนั้นทำการวิเคราะห์ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis แล้วยืนยันผลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information หรือ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

การศึกษาเปรียบเทียบสรีระวิทยาของต้นมะเขือเทศ ในสภาวะที่ไม่รดน้ำเปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกับ เชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2

การเปรียบเทียบสรีระวิทยาของต้นมะเขือเทศ

เปอร์เซ็นต์การงอกของต้นมะเขือเทศ

จากผลการทดลอง ต้นมะเขือเทศที่ปลูกในทรายที่มีการผสมเชื้อ *M. albus* MFC2 นั้น ให้เปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงกว่าต้นมะเขือเทศที่ปลูกในทรายที่ไม่มีการผสมเชื้อ *M. albus* MFC2 ทั้งชุดการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่ 2 ดังแสดงในตารางที่ 2 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า เชื้อ *M. albus* MFC2 สามารถช่วยให้เมล็ดมะเขือเทศมีเปอร์เซ็นต์การงอกเป็นต้นกล้าที่เพิ่มสูงขึ้น อาจจะเป็นไปได้ที่ เชื้อ *M. albus* MFC2 สามารถส่งสัญญาณช่วยกระตุ้นให้เมล็ดมะเขือเทศมีอัตราการงอกที่เพิ่มสูงขึ้น หรืออาจจะเป็นไปได้ที่ เชื้อ *M. albus* MFC2 ไปช่วยในเรื่องของการออกฤทธิ์กำจัดเชื้ออื่น ๆ ที่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ดมะเขือเทศที่มีอยู่ในทราย จึงช่วยให้เมล็ดมะเขือเทศมีอัตราการงอกเป็นต้นกล้าที่สูงขึ้นกว่าเดิม ถึงแม้ว่า เปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นจะไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของต้นมะเขือเทศ

ชุดการทดลอง	อัตราการงอก	
	ต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกับเชื้อ <i>M. albus</i> MFC2	ต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ <i>M. albus</i> MFC2
1	82.20%	78.80%
2	93.20%	92.80%

หมายเหตุ: อัตราการงอกของต้นมะเขือเทศคำนวณจากต้นมะเขือเทศทั้งหมด 1,000 ต้น

ความยาวของรากและความสูงของลำต้นของต้นมะเขือเทศ

ชุดการทดลองที่ 2 ตัวอย่างต้นมะเขือเทศในวันที่ 10 ของการทดลอง ต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 และอยู่ในสภาวะที่ขาดน้ำนั้นมีความยาวของรากที่สั้นกว่าและแตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 3

RA= รากต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

RC= รากต้นมะเขือเทศ + MFC2+ รดน้ำทุกวัน

SA= ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

SC= ต้นมะเขือเทศ + MFC2+ รดน้ำทุกวัน

RB= รากต้นมะเขือเทศ + รดน้ำวันเว้นวัน

RD= รากต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้นวัน

SB= ต้นมะเขือเทศ +รดน้ำวันเว้นวัน

SD= ต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้นวัน

SC และ SD มีขนาดของลำต้นที่สูงกว่า SA และ SB ตามลำดับ และในช่วงแรกของการทดลอง ช่วงวันที่ 1– 8 RA มีขนาดความยาวของรากที่ยาวที่สุด รองลงมาคือ RC และ RD และ RB ตามลำดับ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 นั้นเมื่ออยู่สภาวะที่มีการรดน้ำทุกวันหรืออยู่ในสภาวะที่ขาดน้ำนั้นจะมีขนาดความสูงของลำต้น สูงกว่าต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *M. albus* MFC2

นั้นมีประสิทธิภาพที่ช่วยให้ต้นกล้ามะเขือเทศมีการเจริญเติบโตมากกว่า ในส่วนของความยาวรากนั้น ต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 แต่อยู่ในสภาวะที่รดน้ำทุกวันนั้น มีขนาดความยาวของรากที่ยาวที่สุด และระบบรากสมบูรณ์ที่สุด รองลงมาคือ ต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 ในสภาวะที่มีการรดน้ำทุกวัน และตามมด้วย ต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 ในสภาวะที่มีการรดน้ำวันเว้นวันตามลำดับ ส่วนต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 ในสภาวะเครียดขาดน้ำ จะมีขนาดความยาวของรากที่สั้นที่สุด แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *M. albus* MFC2 มีส่วนช่วยให้ต้นพืชมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อ *M. albus* MFC2 นี้ส่งสัญญาณไปกระตุ้นให้พืชมีการตอบสนองทางสรีรวิทยาเพื่อเป็นกลไกหนึ่งซึ่งช่วยให้พืชหลีกเลี่ยงสภาวะแห้งแล้ง กราฟรูปที่ 3 และ 4 แสดงความยาวของรากและความสูงของต้นกล้ามะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์เป็นเวลา 10 วัน ในแต่ละชุดการทดลอง จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า ต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกันเชื้อ *M. albus* MFC2 มีขนาดของรากที่ยาวและลำต้นที่สูงกว่าต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 ทั้งในสภาวะรดน้ำทุกวันและสภาวะที่ขาดน้ำ ผลการทดลองบ่งชี้ว่า เชื้อ *M. albus* MFC2 นี้มีผลต่อการช่วยให้ต้นมะเขือเทศสามารถเจริญอยู่ในสภาวะที่แห้งแล้งได้ แต่จะด้วยกลไกใดนั้น ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงความยาวของรากและความสูงของลำต้นของต้นมะเขือเทศ

ตารางที่ 3.1 แสดงความยาวของรากและความสูงของลำต้นของต้นมะเขือเทศ ชุดการทดลองที่ 1

วัน ¹	ทรีตเมนต์							
	1		2		3		4	
	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น
1	3.25±0.39a	5.85±0.13a	1.93±0.21b	6.06±0.26a	2.93±0.17a	5.92±0.22a	2.85±0.21a	6.24±0.13a
2	3.51±0.25a	6.59±0.24bc	2.20±0.24b	5.75±0.23a	2.48±0.20b	6.13±0.16ab	2.88±0.29ab	6.84±0.22c
3	3.78±0.26a	4.61±0.34ab	2.38±0.19b	3.89±0.34a	3.32±0.22ac	4.48±0.30ab	2.79±0.13bc	4.86±0.34a
4	3.80±0.30a	4.56±0.34a	2.69±0.21b	4.40±0.41a	3.47±0.17a	4.98±0.34a	3.52±0.21a	4.62±0.37a
5	2.80±0.15a	5.36±0.33a	2.02±0.08b	5.73±0.15a	3.16±0.14c	8.11±0.20b	2.40±0.09d	7.63±0.13b
6	3.42±0.24bc	5.76±0.14a	2.53±0.20a	4.20±0.10b	3.83±0.27c	7.21±0.19c	3.09±0.13ab	6.90±0.15cd
7	4.54±0.33b	6.24±0.11bc	3.74±0.46ab	5.47±0.14a	3.11±0.23a	6.13±0.23ab	2.74±0.29a	6.85±0.39c
8	4.72±0.26a	6.55±0.15a	2.91±0.33b	5.59±0.14b	2.77±0.19b	6.87±0.21a	3.33±0.26b	6.94±0.15a
9	4.65±0.40a	5.90±0.29a	3.79±0.27a	5.95±0.26a	4.02±0.27a	6.70±0.28b	3.85±0.26a	6.47±0.20ab
10	4.23±0.40ac	6.33±0.19a	3.08±0.24b	5.018±0.15b	5.29±0.42c	6.45±0.13a	4.18±0.36ad	6.34±0.16a

หมายเหตุ : วัน¹ คือ วันที่เริ่มทำการทดลองจนต้น

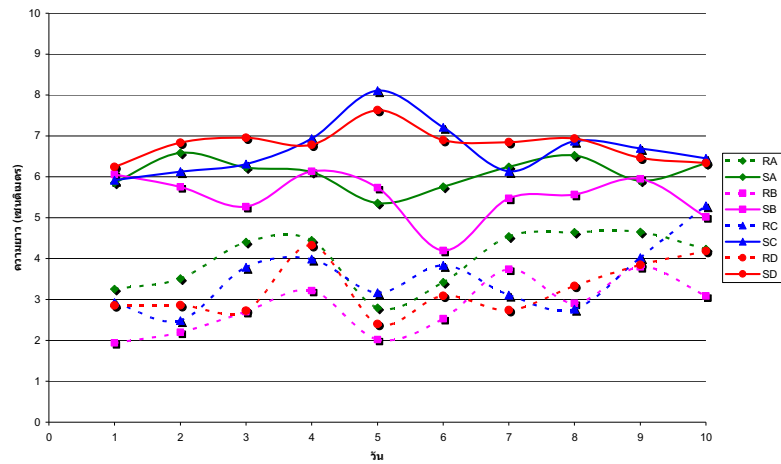
ตารางที่ 3.2 แสดงความยาวของรากและความสูงของลำต้นของต้นมะเขือเทศ ชุดการทดลองที่ 2

วัน ¹	ทรีตเมนต์							
	1		2		3		4	
	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก	ลำต้น
1	3.78±0.37a	6.47±0.19a	2.36±0.21b	5.99±0.26ab	2.70±0.24b	5.61±0.32b	2.92±0.31b	6.09±0.21ab
2	2.47±0.56a	5.22±0.21a	2.04±0.22a	6.09±0.28b	3.69±0.43a	6.69±0.16b	2.84±0.28ab	6.20±0.20b
3	4.41±0.40a	6.57±0.17a	2.53±0.17b	6.21±0.12a	3.32±0.30b	6.34±0.23a	3.29±0.32b	6.29±0.28a
4	2.86±0.30a	5.76±0.35a	2.65±0.33a	6.44±0.27a	4.16±0.33b	6.19±0.23a	3.17±0.46ab	6.37±0.15a
5	3.38±0.20ab	4.81±0.18a	3.53±0.27ab	4.92±0.29a	3.04±0.24a	5.83±0.20b	3.78±0.27b	4.76±0.14a
6	3.91±0.25a	5.89±0.36a	3.62±0.42a	5.58±0.25a	3.34±0.29a	6.54±0.19b	3.59±0.41a	6.30±0.13a
7	4.68±0.37a	5.63±0.21a	3.28±0.23b	5.77±0.20a	3.59±0.24b	6.67±0.12b	3.07±0.251b	6.25±0.27a
8	3.77±0.29a	4.94±0.24a	3.49±0.38a	4.74±0.12a	3.39±0.30a	5.64±0.16b	5.29±0.38b	5.48±0.11c
9	3.88±0.30ab	6.07±0.25a	3.30±0.21b	5.23±0.20a	4.29±0.27a	6.35±0.15b	4.18±0.24a	6.48±0.15b
10	6.14±0.30a	5.88±0.16a	4.46±0.22b	5.77±0.28a	6.28±0.23a	5.50±0.16b	6.07±0.37a	6.40±0.21b

หมายเหตุ : วัน¹ คือ วันที่เริ่มทำการทดลองจนต้น ประมวลผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Version 11.5 ใช้วิธี ANOVA และ LSD Test

ค่าที่ได้ คือ ค่า mean±S.D. และ significant ที่ $p < 0.05$

รูปที่ 3. กราฟแสดงความยาวของรากและความสูงของต้นกล้ามะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 1



หมายเหตุ:

RA= รากต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

RB= รากต้นมะเขือเทศ +รดน้ำวันเว้นวัน

RC= รากต้นมะเขือเทศ +MFC2+ รดน้ำทุกวัน

RD= รากต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้นวัน

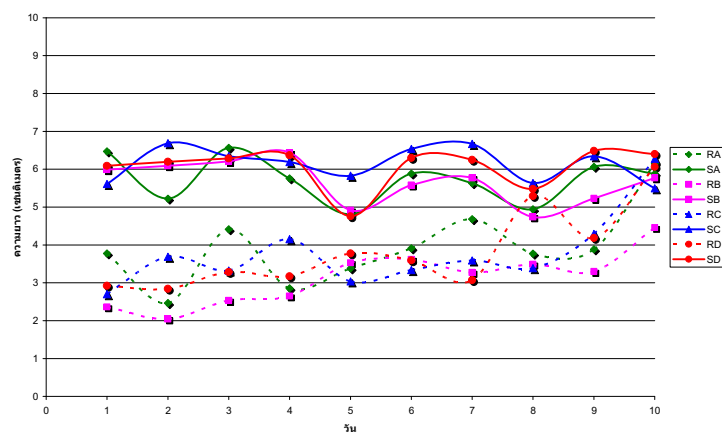
SA= ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

SB= ต้นมะเขือเทศ +รดน้ำวันเว้นวัน

SC= ต้นมะเขือเทศ +MFC2+ รดน้ำทุกวัน

SD= ต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้นวัน

รูปที่ 4. กราฟแสดงความยาวของรากและความสูงของต้นกลั้มะเขือเทศในแต่ละทริตเมนต์เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 2



หมายเหตุ:

RA = รากต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

RB = รากต้นมะเขือเทศ +รดน้ำวันเว้น2-3วัน

RC = รากต้นมะเขือเทศ +MFC2+ รดน้ำทุกวัน

RD = รากต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้น2-3วัน

SA = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

SB = ต้นมะเขือเทศ +รดน้ำวันเว้น2-3วัน

SC= ต้นมะเขือเทศ +MFC2+ รดน้ำทุกวัน

SD = ต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้น2-3วัน

น้ำหนักรีดต่อตันของต้นกล้วยมะเขือเทศ

ช่วงวันที่ 1-4 ต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 มีค่าน้ำหนักรีดต่อตันที่สูงกว่าต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 แต่เมื่อเวลาผ่านไปตั้งแต่วันที่ 5 ต้นต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 มีค่าน้ำหนักรีดต่อตันที่สูงกว่าต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 จากกราฟในรูปที่ 5 ทั้ง W3 และ W4 มีน้ำหนักรีดต่อตันที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และชุด W2 เป็นต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 และยังคงอยู่ในสภาวะความเครียดคือ ขาดน้ำ ทำให้น้ำหนักรีดต่อตัน หลังจากวันที่ 4 มีน้ำหนักรีดน้อยลงเรื่อย ๆ และน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับชุดอื่น ๆ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า เมื่ออยู่ในสภาวะความเครียด คือขาดน้ำ เชื้อ *M. albus* MFC2 ช่วยให้ต้นมะเขือเทศมีน้ำหนักรีดต่อตันที่สูงกว่าชุดการทดลองต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 โดยในรูปที่ 5 W1 W2 และ W3 ต้นมะเขือเทศมีค่าน้ำหนักรีดใกล้เคียงกัน แต่ W2 ต้นมะเขือเทศมีค่าน้ำหนักรีดต่อตันน้อยที่สุด จากผลการทดลองสรุปได้ว่า เมื่ออยู่ในสภาวะความเครียด คือขาดน้ำ เชื้อ *M. albus* MFC2 ช่วยให้ต้นมะเขือเทศเจริญเติบโตต่อไปได้ ทำให้น้ำหนักรีดต่อตันที่สูงกว่าต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 ดังแสดงในตารางที่ 4 รูปที่ 14 และ 15 ซึ่งกลไกที่เชื้อ *M. albus* MFC2 ช่วยให้พืชเจริญเติบโตได้อย่างปกติในสภาวะแห้งแล้งยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักรีดต่อตันของต้นกล้วยมะเขือเทศ

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักรีดต่อตันของต้นกล้วยมะเขือเทศ ชุดการทดลองที่ 1

วัน ¹	ทรีตเมนต์			
	1	2	3	4
1	52.63	51.67	32.00	31.82
2	60.00	59.38	52.78	46.25
3	70.62	60.59	41.76	54.76
4	71.25	61.76	54.76	58.89
5	71.00	51.74	60.00	56.00
6	69.52	54.78	83.48	78.57
7	66.00	61.67	62.78	65.00
8	65.45	48.10	81.67	81.82
9	81.05	57.78	62.00	77.14
10	75.24	44.85	79.54	53.67

ตารางที่ 4.2 แสดงน้ำหนักรีดต่อตันของต้นกล้วยมะเขือเทศ ชุดการทดลองที่ 2

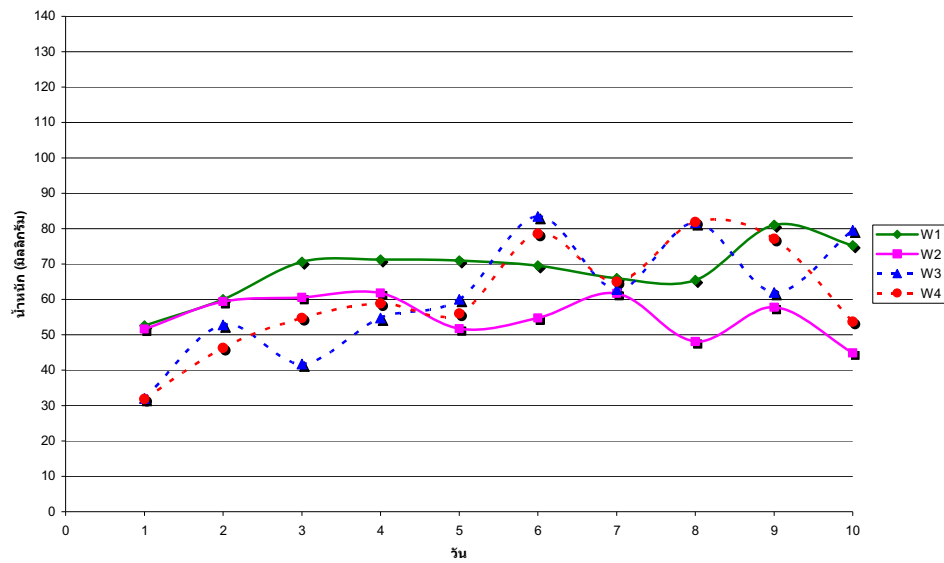
วัน ¹	ทรีตเมนต์			
	1	2	3	4
1	76.36	74.00	50.00	62.86
2	57.50	42.86	57.14	51.67
3	72.50	64.44	75.38	60.00
4	84.00	69.09	61.25	76.00
5	83.00	79.00	78.00	88.00
6	92.73	82.50	83.64	94.00
7	102.50	83.33	100.71	86.67
8	107.00	94.00	128.00	123.00
9	115.71	88.00	107.00	103.64
10	128.39	90.67	124.33	122.00

หมายเหตุ : ¹ วัน คือ วันที่เริ่มทำการทดลองรดน้ำ

น้ำหนักรีดต่อตันของต้นกล้วยมะเขือเทศ แสดงในหน่วยมิลลิกรัม

น้ำหนักรีดที่แสดงอาจมีค่าเพิ่มลดไม่เป็นไปตามทฤษฎีที่ต้องเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากมีการเจริญเติบโตนั้น เป็นผลมาจากตัวอย่างที่นำมาทำการวัดการเจริญเติบโตมาจากการสุ่มตัวอย่าง

รูปที่ 5. กราฟแสดงน้ำหนักเฉลี่ยของต้นกล้ามะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 1



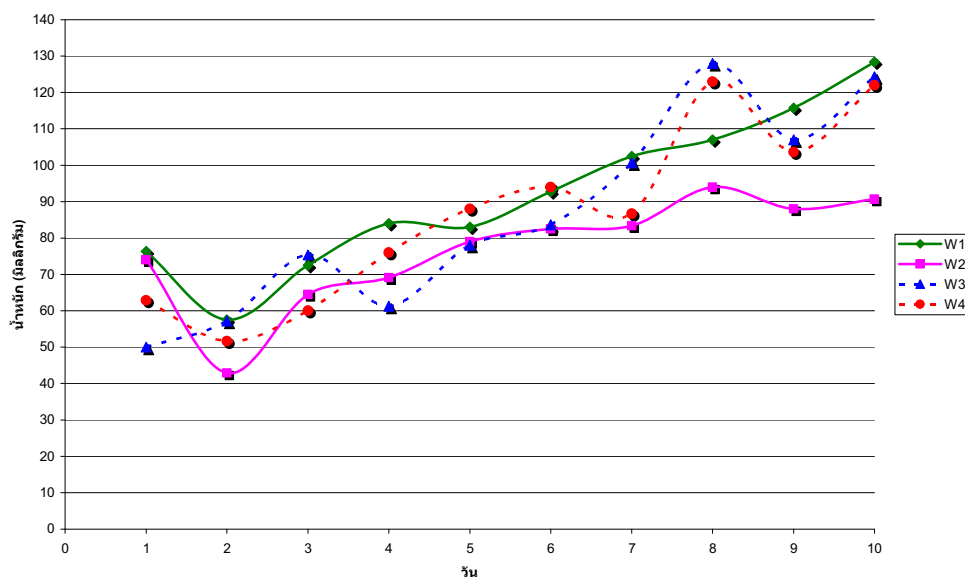
หมายเหตุ: W1 = รากต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

W3 = รากต้นมะเขือเทศ +MFC2+ รดน้ำทุกวัน

W2 = รากต้นมะเขือเทศ +รดน้ำวันเว้นวัน

W4 = รากต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้นวัน

รูปที่ 6. กราฟแสดงน้ำหนักเฉลี่ยของต้นกล้ามะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 2



หมายเหตุ: W1 = รากต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

W3 = รากต้นมะเขือเทศ +MFC2+ รดน้ำทุกวัน

W2 = รากต้นมะเขือเทศ +รดน้ำวันเว้น2-3วัน

W4 = รากต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้น2-3วัน

การเปรียบเทียบระดับของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งของต้นมะเขือเทศ

การเปรียบเทียบระดับกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ในส่วนลำต้นของต้นกล่ำมะเขือเทศ

การเปรียบเทียบระดับ peroxidase pH 5 ในส่วนลำต้นของต้นกล่ำมะเขือเทศ

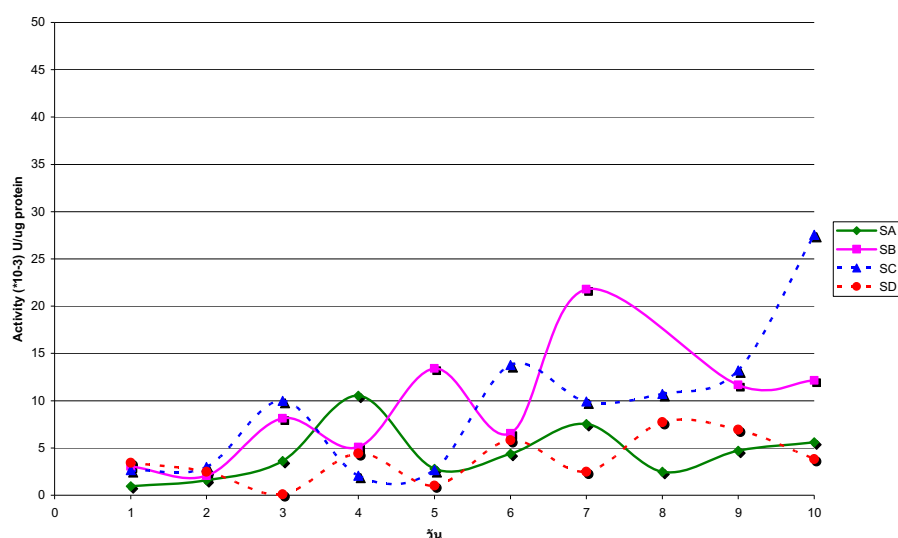
ชุดการทดลองที่ 1 ซึ่ง SA และ SC มี peroxidase activity เพิ่มขึ้นในวันที่ 3 เร็วกว่า activity ของ SA (ชุดควบคุม) และ SD เป็นเวลา 1 วัน อีกทั้ง SB และ SC มีแนวโน้มผลการทดลองของ peroxidase activity ที่ pH 5 เหมือนกัน คือเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในขณะที่ SA และ SD มีแนวโน้มผลการทดลองต่อ peroxidase activity ที่ pH 5 ค่อนข้างจะคงที่ อยู่ในช่วง 0-10 ($\square 10^{-3}$) U/ μ g protein ในขณะที่ SB มีแนวโน้มของ peroxidase activity ที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ และสูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ ในชุดการทดลองเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 7

ชุดการทดลองที่ 2 ในรูปที่ 8 SA มีแนวโน้มของผลการทดลอง peroxidase activity ที่ pH 5 ที่ค่อนข้างจะคงที่เหมือนชุดการทดลองที่ 1 ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ในขณะที่ SB มีแนวโน้มของ peroxidase activity ที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เช่นเดียวกับที่พบในชุดการทดลองที่ 1 ในวันที่ 3 SC และ SD มีแนวโน้มของ peroxidase activity ที่ pH 5 ไปในทางเดียวกัน คือ มี peroxidase activity เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และสูงกว่า SA และ SB ซึ่งทั้ง SC และ SD ของชุดการทดลองที่ 2 ต่างจากชุดการทดลองที่ 1 คือ มี peroxidase activity ที่ pH 5 สูงกว่าชุดการทดลองที่ 1 เป็น 2 เท่า แต่ SC มีแนวโน้มให้ผลการทดลองในชุดการทดลองที่ 2 ไปในทางเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 แต่ต่างกันเพียง activity เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 17 ซึ่งชุดการทดลองที่ 2 มีการเพิ่มความเครียดให้กับต้นมะเขือเทศมากขึ้นกว่าชุดการทดลองที่ 1 จากผลการทดลอง พบว่าในชุดการทดลองที่ 2 ชุด SA SB และ SC ให้ผลเหมือนชุดการทดลองที่ 1 แต่ SD นั้นมีค่า peroxidase activity ที่ pH 5 สูงกว่าชุดการทดลองที่ 1 และสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ซึ่งอาจจะมีความเป็นไปได้ที่ เมื่อต้นมะเขือเทศมีความเครียดเพิ่มมากขึ้น เชื้อ MFC2 นี้ก็จะส่งเสริมให้ peroxidase activity ที่ pH 5 เพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ SD มีแนวโน้มของผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกับกับ SA คือ มีค่า peroxidase activity เพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 3-4 และเพิ่มสูงขึ้นอีกในช่วงวันที่ 8-9 โดยใน SD มีค่า peroxidase activity สูงกว่า SA เล็กน้อย ในทำนองเดียวกัน SB มีแนวโน้มของผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกับกับ SC คือ มีค่า peroxidase activity เพิ่มขึ้นในวันที่ 6 และเพิ่มสูงขึ้นสูงสุดในวันที่ 9 โดยใน SC มีค่า peroxidase activity สูงกว่า SB ดังแสดงในรูปที่ 8

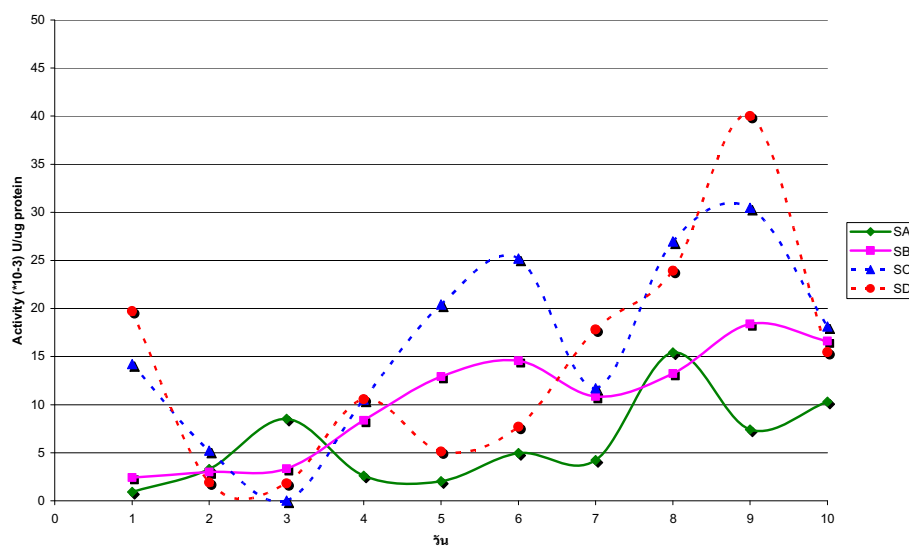
จากผลการทดลองโดยพิจารณาจากการทดลองชุดที่ 2 จะเห็นได้ว่า ต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 จะมีค่า Peroxidase activity เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เชื้อ *M. albus* MFC2 อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณให้ต้นมะเขือเทศมีระดับกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ซึ่งจะมีส่วนช่วยให้พืชลด H_2O_2 ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยมีกลไกที่ช่วยในการเสื่อมสลายของ H_2O_2 ในส่วนประกอบของเซลล์ผ่านวงจร Ascorbate-glutathione โดยในวงจรนี้ H_2O_2 ลดรูปเป็นน้ำและน้ำย่อยโดยน้ำย่อย Ascorbate peroxidase ซึ่ง Reactive Oxygen Species (ROS) หรือ ชนิดกึ่งกลางของออกซิเจนที่มีปฏิกิริยาหรือ Reactive Oxygen Intermediates (ROI) เช่น Superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) และ Hydroxy free radical ($OH^{\cdot}$) และความเป็นพิษต่อพืชของ H_2O_2 ด้วยเหมือนกัน สำหรับ ROI จะเป็นพิษสูงมากและสามารถทำลายเซลล์ได้อย่างรุนแรง ต่อส่วนประกอบของเซลล์ อนุมูลอิสระเหล่านี้จะเป็นสาเหตุของการเพิ่มออกซิเจนในส่วนประกอบของเนื้อเยื่อหุ้มด้วยเหมือนกัน นอกจากนี้จะกระทบกระเทือนต่อโมเลกุลของสิ่งมีชีวิต เช่น น้ำย่อยโปรตีน นิวคลีโอไทด์ อะซิด ฯลฯ การผลิต ROI ปกติแล้วจะเพิ่มขึ้นระหว่างสภาวะที่มีความเครียด พืชมีกลไกการป้องกันที่ดีที่เก็บกวาดอนุมูลอิสระเหล่านี้ออกไปซึ่งประกอบด้วยสารต่อต้านอนุมูลอิสระหรือ Antioxidants ได้แก่สาร Ascorbate, Glutathione และน้ำย่อยอีกหลายชนิดได้แก่ Superoxide dismutase (SOD), Ascorbate peroxidase, Ascorbate reductase และ Glutathione reductase สารเหล่านี้ถูกชักนำระหว่างเกิดความเครียด จากการทดลองพบว่าต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 จะเกิดการชักนำอย่างเห็นได้ชัดแสดงว่าเชื้อนี้อาจจะมีผลให้พืชเกิดความทนทานต่อความเครียด เนื่องจาก สารเหล่านี้ถูกชักนำระหว่างเกิดความเครียด การชักนำจะเห็นได้ชัดในพืชชนิดที่ทนทานต่อความเครียดมากกว่าในพืชที่อ่อนแอ

รูปที่ 7. กราฟแสดงค่า peroxidase pH 5 เอนไซม์แอคทีวิตีของต้นกล้วยมะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์ เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 1



หมายเหตุ: SA = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม) SB = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำวันเว้นวัน
 SC = ต้นมะเขือเทศ + MFC2+ รดน้ำทุกวัน SD = ต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้นวัน

รูปที่ 8. กราฟแสดงค่า peroxidase pH 5 เอนไซม์แอคทีวิตีของต้นกล้วยมะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์ เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 2

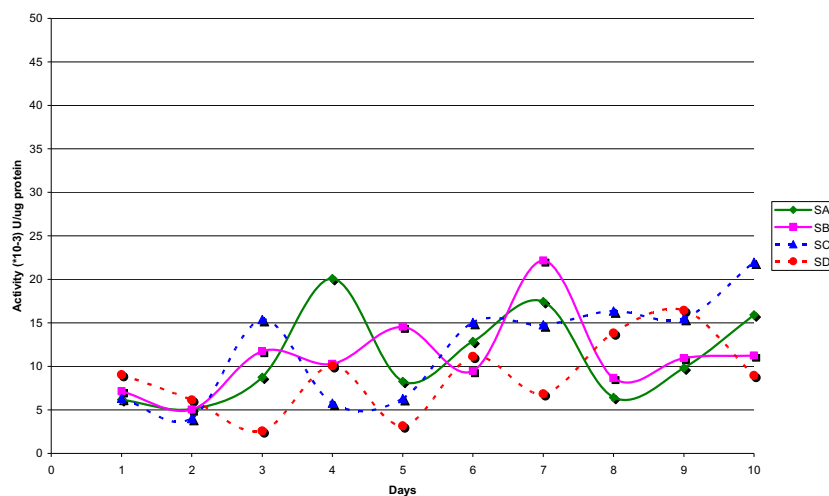


หมายเหตุ: SA = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม) SB = ต้นมะเขือเทศ +รดน้ำวันเว้น2-3วัน
 SC = ต้นมะเขือเทศ + MFC2+ รดน้ำทุกวัน SD = ต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้น2-3วัน

การเปรียบเทียบระดับ peroxidase pH 7 ในส่วนลำต้นของต้นกล้วยมะเขือเทศ

ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 นั้น SB SC และ SD ให้ผลการทดลองที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ มี peroxidase activity ที่ pH 7 ที่สูงขึ้นเรื่อย ๆ อย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ SA มีแนวโน้มของผลการทดลอง peroxidase activity ที่ pH 7 ที่ค่อนข้างจะคงที่ และอาจจะมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนในชุดการทดลองที่ 2 SD มีค่า peroxidase activity ที่ pH 7 สูงกว่าชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งอาจจะมีความเป็นไปได้ เมื่อต้นมะเขือเทศมีความเครียดเพิ่มมากขึ้น เชื้อ MFC2 นี้จะส่งสัญญาณกระตุ้นช่วยให้พืช มี peroxidase activity ที่ pH 7 เพิ่มสูงขึ้นด้วย ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 10

รูปที่ 9. กราฟแสดงค่า peroxidase pH 7 เอนไซม์แอคติวิตีของต้นกล้วยมะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์ เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 1



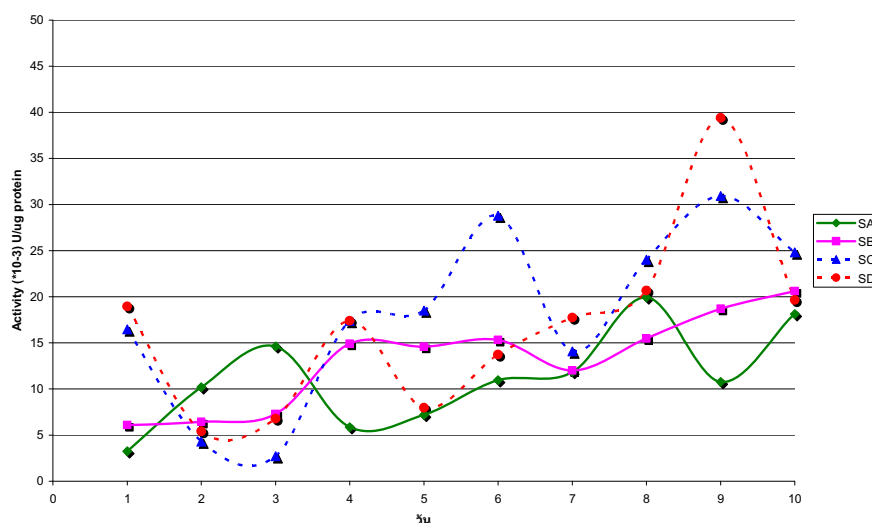
หมายเหตุ: SA = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

SB = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำวันเว้นวัน

SC = ต้นมะเขือเทศ +MFC2+ รดน้ำทุกวัน

SD = ต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้นวัน

รูปที่ 10. กราฟแสดงค่า peroxidase pH 7 เอนไซม์แอคติวิตีของต้นกล้วยมะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์ เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 2



หมายเหตุ: SA = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

SB = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำวันเว้น 2 – 3 วัน

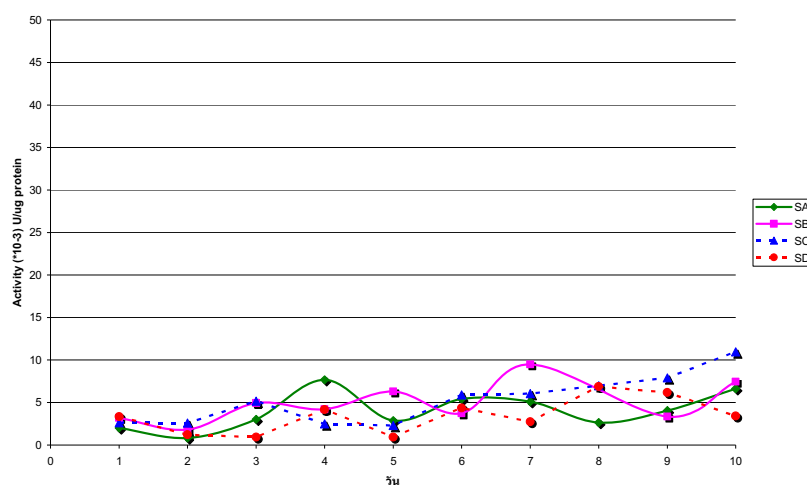
SC = ต้นมะเขือเทศ +MFC2+ รดน้ำทุกวัน

SD = ต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้น 2 – 3 วัน

การเปรียบเทียบระดับ peroxidase pH 10 ในส่วนลำต้นของต้นกล้วยมะเขือเทศ

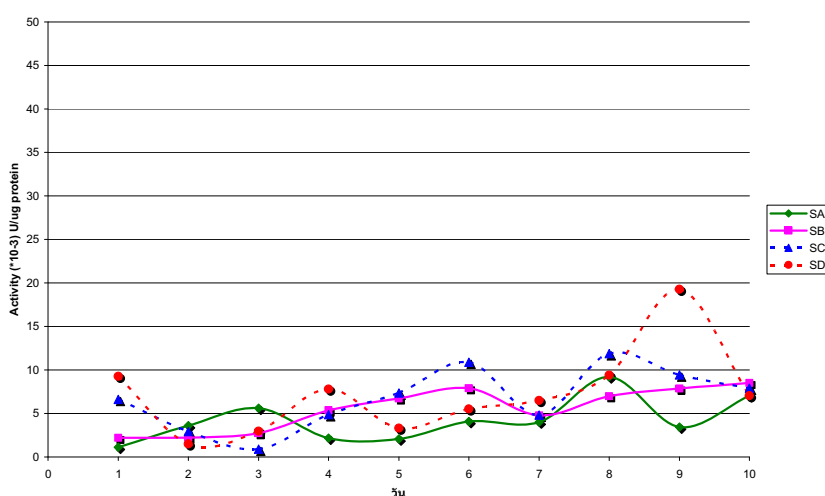
ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ให้ผลไปในแนวเดียวกันคือ ทั้ง SA SB SC และ SD มี peroxidase activity ที่ pH 10 ค่อนข้างคงที่อยู่ในช่วง 0-10 ($\times 10^{-3}$) U/ μ g protein แต่จากกราฟแสดงผลของชุดการทดลองที่ 2 SC และ SD มี peroxidase activity ที่ pH 10 สูงขึ้นกว่าชุดการทดลองที่ 1 อาจจะเนื่องมาจาก SD ในชุดการทดลองที่ 2 มีการเพิ่มความเครียดให้ต้นมะเขือเทศเพิ่มมากขึ้นกว่าชุดการทดลองที่ 1 เมื่อพืชเครียดมากกว่าเดิมจากที่ peroxidase activity ที่ pH 10 ทำงานที่เยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์ทำงานได้ระดับหนึ่งแต่พอมีความเครียดเพิ่มมากขึ้นทำให้ activity ที่บริเวณนี้เพิ่มสูงขึ้น ในส่วนของ SC นั้น เชื่อ MFC2 ก็อาจจะไปเพิ่มความเครียดให้กับต้นมะเขือเทศเช่นกันจึงทำให้ activity ที่บริเวณนี้เพิ่มสูงขึ้นทั้งใน SC และ SD ดังแสดงในรูปที่ 11 และรูปที่ 12 เพื่อการมีส่วนช่วยให้พืชลด H_2O_2 ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

รูปที่ 11. กราฟแสดงค่า peroxidase pH 10 เอนไซม์แอคติวิตีของต้นกล้วยมะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์ เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 1



หมายเหตุ: SA = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม) SB = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำวันเว้นวัน
SC = ต้นมะเขือเทศ + MFC2 + รดน้ำทุกวัน SD = ต้นมะเขือเทศ + MFC2 + รดน้ำวันเว้นวัน

รูปที่ 12 กราฟแสดงค่า peroxidase pH 10 เอนไซม์แอคติวิตีของต้นกล้วยมะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์ เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 2



หมายเหตุ: SA = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม) SB = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำวันเว้น 2-3 วัน
SC = ต้นมะเขือเทศ + MFC2 + รดน้ำทุกวัน SD = ต้นมะเขือเทศ + MFC2 + รดน้ำวันเว้น 2-3 วัน

การเปรียบเทียบระดับกิจกรรมเอนไซม์ ATPase ในส่วนลำต้นของต้นกล้ามะเขือเทศ

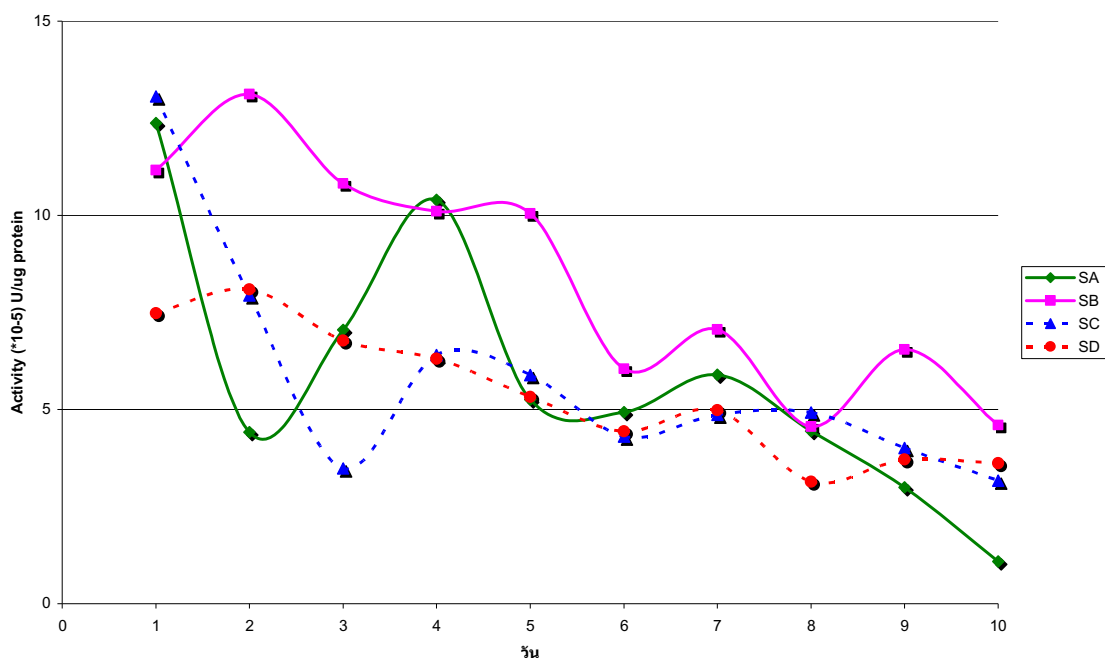
การเปรียบเทียบระดับ ATPase ที่ $-KNO_3$ ในส่วนลำต้นของต้นกล้ามะเขือเทศ

จากกราฟแสดงผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า ทั้งชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีแนวโน้มของผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน คือ neutral ATPase activity นั้น มีค่าลดลงทุกชุดการทดลอง ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ที่ neutral ATPase activity นั้นเป็น activity ของ ATPase ที่ เยื่อหุ้มเซลล์ จะทำงานน้อยลงเนื่องจากว่า

1. เซลล์ของต้นมะเขือเทศไม่ต้องการใช้ ATPase activity ที่บริเวณ membrane เพื่อปั๊มสารเข้าหรือออกภายในเซลล์เพื่อรักษาการใช้พลังงานและสภาพของเซลล์
2. เซลล์ของต้นมะเขือเทศ ใช้ ATPase activity ที่บริเวณ membrane เพื่อปั๊มสารที่ไม่ต้องการเข้า vacuole ได้ง่ายกว่าที่จะ ปั๊มสารเข้าออกเซลล์ จึงส่งสารที่ไม่ต้องการนั้นเก็บใน vacuole มากกว่าที่จะส่งออกนอกเซลล์ทำให้ activity ของ ATPase บริเวณนี้มีค่าลดลงเรื่อย ๆ

นอกจากนั้น จากกราฟจะเห็นได้ว่า ทั้งชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ของ SB มีค่า neutral ATPase activity ที่สูงกว่าชุดอื่น ๆ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ที่ SB พืชอยู่ในสภาวะเครียดมากกว่าชุดอื่น ๆ จึงมี activity ของ ATPase ที่บริเวณนี้สูงกว่าชุดอื่น ๆ และเมื่อเทียบกับ SD พืชก็อยู่ในสภาวะที่เครียดเช่นกัน แต่ไม่มี activity ของ ATPase ที่บริเวณนี้สูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 13 และ 14 ซึ่งอาจจะเป็นไปได้อีกเช่นเดียวกันว่า เชื้อ MFC2 อาจจะไปช่วยกระตุ้นพืชให้มีความสามารถในการทนทานต่อสภาวะความเครียดในส่วนอื่น ๆ เพื่อให้พืชสามารถอยู่รอดได้ โดยที่ ATPase activity ที่บริเวณนี้ไม่ต้องเพิ่มสูงขึ้นนั่นเอง

รูปที่ 13. กราฟแสดงค่า ATPase ที่ $-KNO_3$ เอนไซม์แอคทีวิตีของต้นกล้ามะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์ เป็นเวลา 10 วันภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 1



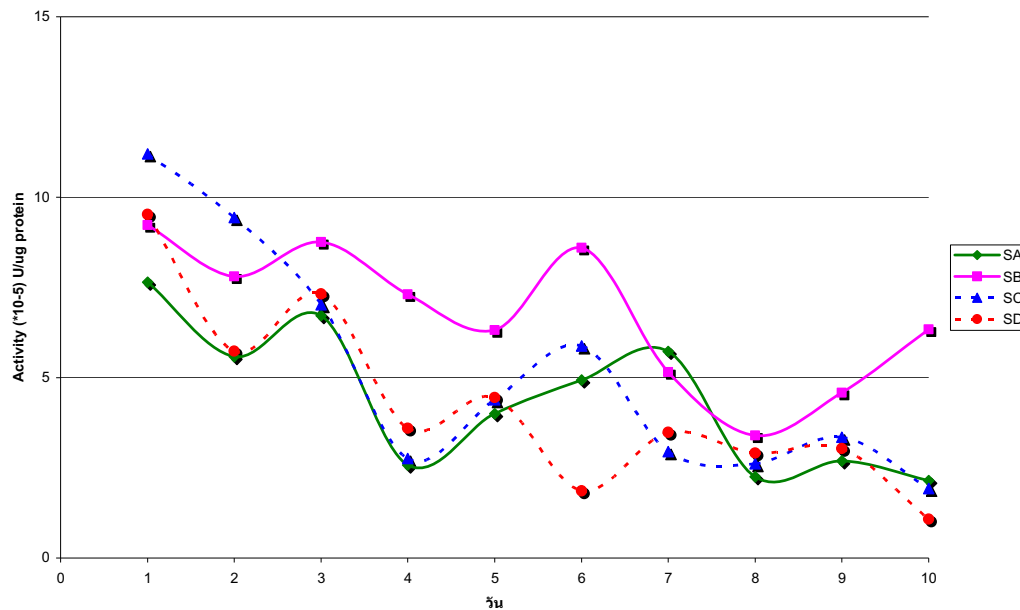
หมายเหตุ: SA = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

SC = ต้นมะเขือเทศ + MFC2+ รดน้ำทุกวัน

SB = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำวันเว้นวัน

SD = ต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้นวัน

รูปที่ 14. กราฟแสดงค่า ATPase ที่ $-KNO_3$ เอนไซม์แอคทีวิตีของต้นกล้ามะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 2



หมายเหตุ: SA = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม) SB = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำวันเว้นวัน 2-3 วัน
 SC = ต้นมะเขือเทศ + MFC2 + รดน้ำทุกวัน SD = ต้นมะเขือเทศ + MFC2 + รดน้ำวันเว้นวัน 2-3 วัน

การเปรียบเทียบระดับ ATPase ที่ $+KNO_3$ ในส่วนลำต้นของต้นกล้ามะเขือเทศ

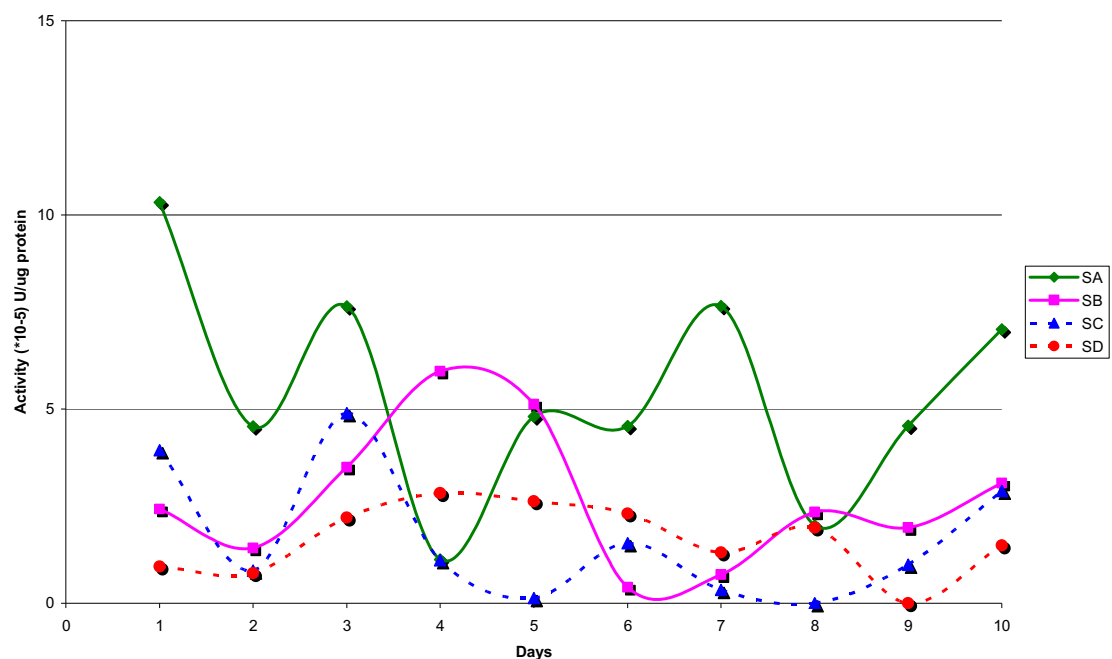
ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 SA มีค่า acid ATPase activity ที่สูงกว่าชุดอื่น ๆ และเมื่อเปรียบเทียบชุดการทดลองที่ 1 SA และ SC มี acid ATPase activity ที่เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 3 และมีแนวโน้มที่จะลดลงเรื่อย ๆ สำหรับ SC แต่ SA นั้นมีค่า ลดลงและเพิ่มขึ้นสลับไปมา แต่ชุดการทดลองที่ 2 SA และ SC มี acid ATPase activity ที่เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 2 และมีแนวโน้มที่จะลดลงเรื่อย ๆ สำหรับ SC แต่ SA นั้นมีค่า ลดลงและเพิ่มขึ้นสลับไปมาเช่นกัน ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ ชุดการทดลองที่ 2 พืชมีความเครียดมากกว่าชุดการทดลองที่ 1 ทำให้พืชถูกกระตุ้นให้มี acid ATPase activity ที่เร็วกว่านั่นเอง ดังแสดงในรูปที่ 15 และ 16 นอกจากนั้น SD และ SB มี acid ATPase activity ที่เพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 4 และมีแนวโน้มที่จะลดลงเรื่อย ๆ แต่ระดับของเอนไซม์แอคทีวิตีก็จะขึ้นลง ทั้งชุดการทดลองที่ 1 และ 2

การศึกษาเพื่อตรวจสอบตำแหน่งของเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* สายพันธุ์ MFC2 ที่เข้าไป colonized ในต้นมะเขือเทศ

จากผลการทดลอง ทั้งวิธี Conventional isolation method และ Molecular method นั้นไม่พบเชื้อ *M. albus* MFC2 ในทุกชุดการทดลอง แต่วิธี Conventional isolation method พบโคโลนีของเชื้อชนิดอื่น เมื่อสังเกตลักษณะโคโลนี และลักษณะของสปอร์ พบว่าเป็นเชื้อ *Collectotricum* sp. ในชุด 1, 2 และ 3 คือต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 ในสภาวะรดน้ำปกติ ต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 ในสภาวะขาดน้ำ และ ต้นมะเขือเทศที่ปลูกร่วมกับเชื้อ *M. albus* MFC2 ในสภาวะรดน้ำปกติ ตามลำดับ ซึ่งมีรายงานในวารสารนานาชาติว่าเชื้อ *Collectotricum* sp. นี้เป็น seed born ของเมล็ดมะเขือเทศ และด้วยวิธี Molecular method ไม่สามารถ ทำ PCR และทำการ Run Agarose Gel Electrophoresis แล้วพบเชื้อจุลชีพใด ๆ ในทุกชุดการทดลอง จากผลการทดลองนี้ ทำให้สรุปได้เพียงแค่ว่า ไม่พบเชื้อ *M. albus* MFC2 ที่เราใส่ผสมกับทรายเมื่อปลูกต้นมะเขือเทศ ซึ่งเป็นผลดีกับการทดลองคือ ทราบว่าเชื้อ *M. albus* MFC2 สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ และไม่ได้เข้าไป colonize ในต้นมะเขือเทศ เนื่องจากเชื้อ *M. albus* MFC2 นั้นเป็นเชื้อราเอนโดไฟท์ ไม่ใช่เชื้อ ไมคอร์ไรซา ที่จะต้อง colonize ในต้นพืชถึงจะสามารถกระตุ้นการตอบสนองของต้นพืชได้ ข้อดีคือเพิ่มความน่าเชื่อถือให้กับผู้บริโภคทั้งยังเป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจต่อผู้ค้าคือไม่มีการต่อหัวเชื้อ

รูปที่ 15. กราฟแสดงค่า ATPase ที่ $+KNO_3$ เอนไซม์แอคทีวิตีของต้นกล้ามะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์ เป็นเวลา

10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่



1

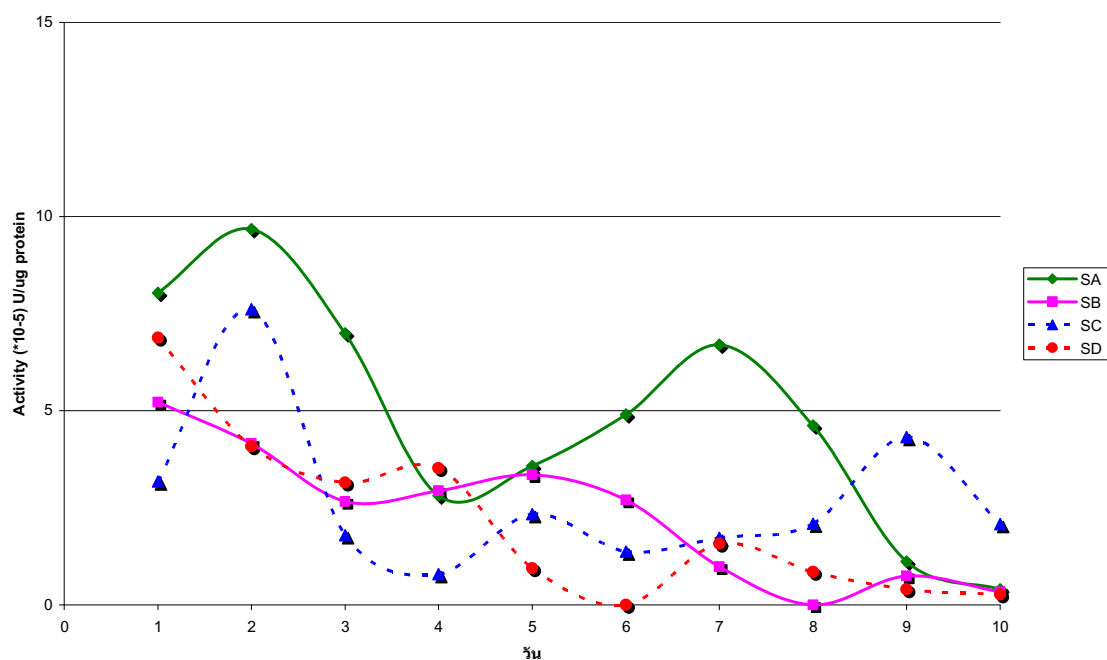
หมายเหตุ: SA = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

SB = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำวันเว้นวัน

SC = ต้นมะเขือเทศ +MFC2+ รดน้ำทุกวัน

SD = ต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้นวัน

รูปที่ 16. กราฟแสดงค่า ATPase ที่ +KNO₃ เอนไซม์แอคติวิตีของต้นกล้ามมะเขือเทศในแต่ละทรีตเมนต์ เป็นเวลา 10 วัน ภายใต้สภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียด ชุดการทดลองที่ 2



หมายเหตุ: SA = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำทุกวัน (ชุดควบคุม)

SB = ต้นมะเขือเทศ + รดน้ำวันเว้น 2 – 3 วัน

SC = ต้นมะเขือเทศ +MFC2+ รดน้ำทุกวัน

SD = ต้นมะเขือเทศ + MFC2+รดน้ำวันเว้น 2 – 3 วัน

บทสรุป

จากผลการศึกษาทดลองเปรียบเทียบความยาวของรากต้นกล้ามะเขือเทศพบว่า ชุดการทดลองเมล็ดมะเขือเทศที่ปลูกผสมกับเชื้อเอนโดไฟท์ *M. albus* MFC2 ในทรายภายใต้สภาวะขาดน้ำและภายใต้สภาวะปกติ มีค่าทางสถิติความยาวของรากที่ยาวกว่าชุดการทดลองเมล็ดมะเขือเทศที่ปลูกในทรายภายใต้สภาวะขาดน้ำ สำหรับการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ทำการวัดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase และ ATPase จากผลการศึกษาพบว่า ชุดการทดลองเมล็ดมะเขือเทศที่ปลูกผสมกับเชื้อเอนโดไฟท์ *M. albus* MFC2 มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ที่สูงกว่าชุดควบคุมเมล็ดมะเขือเทศที่ปลูกในทรายภายใต้สภาวะปกติและภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยที่ชุดการทดลองเมล็ดมะเขือเทศที่ปลูกผสมกับเชื้อเอนโดไฟท์ *M. albus* MFC2 ในทรายภายใต้สภาวะขาดน้ำ มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ที่สูงที่สุดในขณะที่ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase นั้นมีค่าลดลงทั้งในเยื่อหุ้มเซลล์และแวคิวโอล ทุกชุดการทดลอง นอกจากนั้น ผลการศึกษาหาตำแหน่งของเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* MFC2 ที่จะเข้าไป colonized ในรากของต้นมะเขือเทศ โดยใช้ conventional isolation method และ molecular technique นั้น ไม่พบ *M. albus* MFC2 ในต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 3 สัปดาห์ แต่กลับพบเชื้อราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* spp. ในต้นกล้ามะเขือเทศ โดยสรุปผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้คือ เชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* MFC2 อาจจะมีผลต่อลักษณะทางกายภาพของรากต้นมะเขือเทศ ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่มีผลต่อการทนแล้งโดยกระตุ้นพืชหลักถึงความเค็มในช่วงระยะแรกของการเจริญเติบโต และยังมีผลต่อระดับกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase แต่ไม่มีผลต่อระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase สำหรับความทนทานในความเค็ม จากความรู้ที่ได้นี้ อาจยังไม่สามารถตอบโจทย์ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราเอนโดไฟท์กับพืชเจ้าบ้านภายใต้สภาวะความแห้งแล้งได้อย่างครอบคลุม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การประยุกต์ใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* MFC2 ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา

Colletotrichum gloeosporioides, *C. capsici* และ *Alternaria* sp. ในพริก

Application of *M. albus* MFC2 for control *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici* and *Alternaria* sp. in
Capsicum sp.

รัชฎา บัวสด¹ มนต์ฤดี ศรีไทรทรัพย์¹ ไสยวิษณุ วรวิจิตร² และ จีรพันธ์ วรพงษ์¹

¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

²โรงงานเส้นหมี่ซอเอง อ. สามพราน จ. นครปฐม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาสูตรการผสม Modified Rice Starch (MRS) ร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici* และ เชื้อรา *Alternaria* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (in vitro)
2. เพื่อศึกษาหาสูตรการผสม Modified Rice Starch (MRS) ร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสในวัตถุดิบพืชที่ 1 ในโรงเรือนเพาะชำ

บทนำ

พริก เป็นพืชในตระกูล Solanaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Capsicum frutescens* L. ชื่อภาษาอังกฤษว่า Chilli peppers, chilli, chile หรือ chilli มาจากคำ ภาษาสเปน ว่า chile โดยส่วนมากแล้ว ชื่อเหล่านี้มักหมายถึง พริกที่มีขนาดเล็ก ส่วนพริกขนาดใหญ่ที่มีรสอ่อนกว่าจะเรียกว่า Bell Pepper ในสหรัฐอเมริกา Pepper ในประเทศอังกฤษและไอร์แลนด์, capsicum ในประเทศอินเดียกับบอสเนีย และ Paprika ในประเทศทวีปยุโรปหลายประเทศ พริกชนิดต่างๆ มีต้นกำเนิดมาจากทวีปอเมริกา ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีปลูกกันในหลายประเทศทั่วโลก เพราะพริกเป็นเครื่องเทศที่สำคัญชนิดหนึ่ง และยังมีคุณสมบัติเป็นยาสมุนไพรด้วยเช่นกัน เนื่องจากพริกมี วิตามินซี สูง เป็นแหล่งของกรด ascorbic ซึ่งสารเหล่านี้ ช่วยขยายเส้นโลหิตในลำไส้และกระเพาะอาหารเพื่อให้อุดซึมอาหารดีขึ้น ช่วยร่างกายขับถ่าย ของเสียและนำธาตุอาหารไปยังเนื้อเยื่อของร่างกาย (tissue) นอกจากนี้สาร Capsaicin ที่ นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และผลิตภัณฑ์รักษาโรค ในอเมริกามีผลิตภัณฑ์จำหน่ายในชื่อ Cayenne สำหรับฆ่าเชื้อแบคทีเรียในกระเพาะอาหาร สาร Capsaicin ยังมีคุณสมบัติทำให้เกิดรสเผ็ด ลดความเจ็บปวดของกล้ามเนื้อ หัวไหล่ แขน บั้นเอว และส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย สำหรับคนไทยโดยส่วนใหญ่นิยมนำพริกมารับประทานสดและนำมาประกอบอาหารหลายชนิด หรืออาจนำมาตากแห้งอาหารให้มีสีส้มสวยงามนำรับประทานมากขึ้น จึงนับได้ว่าพริกเป็นผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่นับวันจะทวีความต้องการเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่ในปัจจุบันนี้พบว่าพริกที่เกษตรกรปลูกไว้ ให้ผลผลิตน้อยลง สาเหตุเกิดจากพริกที่เกษตรกรปลูกไว้ได้ถูกโรคต่างๆ เข้าคุกคามรวมถึงโรคกุ้งแห้งและกุ้งแห้งเทียมด้วย ซึ่งโรคกุ้งแห้งและกุ้งแห้งเทียมที่พบนั้นได้สร้างความเสียหายอย่างมากให้กับสวนพริกเกษตรกรอินทรีย์ของนายจรัส จำเริญ เกษตรกร ตำบลบ้านจาน อำเภอพุทธไธสง จังหวัดบุรีรัมย์ เป็นอย่างมาก ซึ่งอาการของโรคจะปรากฏในพริกที่เริ่มสุก พริกที่เป็นโรคใบจะเป็นแผลหรือจุดดำ ส่วนผลพริกจะมีจุดดำน้ำ แผลบวมเล็กลงเล็กน้อย ต่อมาแผลจะขยายเป็นวงรี เป็นวงซ้อนกันเป็นชั้นๆ เมื่อความชื้นสูงจะเห็นเป็นเมือกเยิ้มสีส้มอ่อน โรคนี้สามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ได้ ดังนั้นเมื่อนำเมล็ดพันธุ์ที่ติดโรคไปปลูก ผลผลิตก็ติดโรคและเกิดการแพร่ระบาดต่อไป

การแพร่ระบาดพบมากในระหว่างที่ผลผลิตกำลังเจริญเติบโต ในสภาพที่มีอากาศชื้นหรือฝนตกชุก เพราะเชื้อราจะขยายตัวรวดเร็วทำให้ผลพริกเน่าติดต่อกันอย่างรวดเร็ว การป้องกันและกำจัดโรค สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้เมล็ดพันธุ์จากผลที่ไม่เป็นโรค ไม่ปลูกพืชในแหล่งที่เคยเป็นโรคมามาก่อน และเมื่อพริกเริ่มติดผล ควรพ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืชเป็นระยะๆ หมั่นปลูกพืชอื่นหมุนเวียน การใส่ปุ๋ยขาวและปุ๋ยอินทรีย์ในแปลงปลูกจะทำให้พริกต้านทานโรคได้ดี และการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อรา การใช้สารเคมีเป็นวิธีการที่สามารถลดความเสียหายจากโรคนี้ได้อย่างรวดเร็ว แต่ต้องใช้ให้เหมาะสมจึงจะเกิดประสิทธิภาพนอกจากนี้ยังพบว่าสารเคมีที่ใช้มีราคาแพงและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม



รูปที่ 1. แสดงรูปพริกชนิดต่างๆ ที่เก็บมาจากไร่ของเกษตรกรจรัส ต.บ้านจาน อ.พุนนัง จ.บุรีรัมย์ ภาพ A) พริกสวยยาว , ภาพ B) พริกหยวกขาว, ภาพC) พริกชี้หนู, ภาพ D) พริกยาวสวยใบหงิก

จากผลงานการวิจัยโดยดร. จีรพันธ์ วรพงษ์ และ Professor Dr. Gary A. Strobel แห่ง Montana State University ที่ผ่านมา สามารถแยกราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ 1) ราเอนโดไฟท์ *Muscador albus* จากต้นพืช *Cinnamomum zeylanicum* (Worapong และคณะ 2001) และ 2) ราเอนโดไฟท์ *M. roseus* จากต้นพืช *Grevillea pteridifolia* (Worapong และคณะ 2002) ที่สามารถสร้างก๊ายยบยั้งการเจริญเชื้อราที่ก่อโรคกับพืช อาทิเช่น *Ustilago hordei* (Loose Smut) ของต้นข้าวบาเลย์ นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ *M. albus* ยังสามารถควบคุมการเจริญของ *Rhizoctonia solani* เชื้อราที่ก่อโรคของต้น sugarbeet ได้ด้วย ปี 2003-2004 Dr. Strobel และ นักศึกษาปริญญาโท Eva Grimme (Grimme และคณะ 2004) ได้ทดลองนำเชื้อ *M. albus* และ *M. roseus* ไปใช้กับการป้องกันโรคกับต้น sugar beet และ ต้นเก๊กฮวย หรือต้นเบญจมาศ (*Chrysanthemum*) ผลปรากฏว่าได้ผลดีมาก และในขณะเดียวกัน Dr. Strobel ได้ส่งเชื้อ *M. albus* ไปให้ Dr. Julien Mercier และ Dr. Jorge I. Jimenez (2004) ที่บริษัท AgraQuest, Inc. เมือง Davis มลรัฐ California (AgraQuest is a biotechnology company that focuses on discovering, developing, manufacturing and marketing effective, safe and environmentally friendly natural pest management products for the agricultural, institutional and home markets., <http://www.agraquest.com>) เพื่อทำการทดสอบใช้เชื้อดังกล่าวกับการป้องกันแอปเปิ้ล พืช จากเชื้อก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวเช่น *Penicillium expansum*; *Botrytis cinerea*; *Monilinia fructicola* จากผลการทดลอง ปรากฏว่าก๊ายยบยั้งการสร้างจากเชื้อ *M. albus* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวไรย์ สามารถฆ่าเชื้อ *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Monilinia*, *Penicillium* and *Rhizopus* บนผลแอปเปิ้ล พืช พร้อมทั้งข้อสรุปที่ดีกว่าเชื้อ *M. albus* สามารถนำไปประยุกต์ใช้ ประโยชน์ดังกล่าวเนื่องจากเชื้อ *M. albus* ไม่สามารถผลิตสปอร์ที่จะแพร่กระจายไปยังผลไม้ได้และที่สำคัญ ตัวเชื้อเชื้อ *M. albus* ก็ไม่ได้สัมผัสกับผลไม้โดยตรงด้วย และในปีถัดไป Dr. Julien Mercier และ Dr. Denise C. Manker (2005) ได้ตีพิมพ์ เรื่องการนำเชื้อ *M. albus* ไปใช้ควบคุมโรค Damping off ที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* กับต้นบรอกเคอร์รี่ ปี 2549 US-EPA (United States Environmental Protection Agency) ได้ให้การยอมรับในการใช้ เชื้อ *M. albus* ในการเกษตร ปัจจุบันบริษัท AgraQuest ได้นำออกขายแล้ว (Strobel, 2006) Dr. Julien Mercier และ Dr. Jorge I. Jimenez (2004) ที่ บริษัท AgraQuest, Inc. เมือง Davis มลรัฐ California (AgraQuest is a biotechnology company that focuses on discovering, developing, manufacturing and marketing effective, safe and environmentally friendly natural pest management products for the agricultural, institutional and home markets., <http://www.agraquest.com>) เพื่อทำการ ทดสอบใช้เชื้อดังกล่าวกับการป้องกันแอปเปิ้ล พืช จากเชื้อก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวเช่น *Penicillium expansum*; *Botrytis cinerea*; *Monilinia fructicola* จากผลการทดลองปรากฏว่าก๊ายยบยั้งการสร้างจากเชื้อ *M. albus* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวไรย์ สามารถฆ่า

เชื้อ *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Monilinia*, *Penicillium* and *Rhizopus* บนผลแอปเปิ้ล พีช พร้อมทั้งข้อสรุปที่ดีกว่าเชื้อ *M. albus* สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ดังกล่าวเนื่องจากเชื้อ *M. albus* ไม่สามารถผลิตสปอร์ที่จะแพร่กระจายไปยังผลไม้ได้และที่สำคัญ ตัวเชื้อเชื้อ *M. albus* ก็ไม่ได้สัมผัสกับผลไม้โดยตรงด้วย และในปีถัดไป Dr. Julien Mercier และ Dr. Denise C. Manker (2005) ได้ตีพิมพ์เรื่องการนำเชื้อ *M. albus* ไปใช้ควบคุมโรค Damping off ที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* กับต้นบรอกเคอรี่ ปี 2549 US-EPA (United States Environmental Protection Agency) ได้ให้การยอมรับในการใช้ เชื้อ *M. albus* ในการเกษตร ปัจจุบันบริษัท AgraQuest ได้นำออกขายแล้ว (Strobel, 2006) ล่าสุด Worapong and Strobel (2008) ได้ตีพิมพ์ว่าเชื้อ *M. albus* MFC2 ซึ่งสายพันธุ์ที่แยกได้จากประเทศไทย (Sopalun et al., 2003) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ควบคุมโรครากเน่าในคะน้าได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงเสนอชีววิธี โดยการนำจุลินทรีย์ชีวภาพ (Biocontrol agent) โดยใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสและโรคกุ้งแห้งของพริกใน ห้องปฏิบัติการ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการวิจัยนี้ในอนาคตคือ องค์ความรู้ใหม่ที่จะยืนยันความสามารถของก๊าซหรือสารทุติยภูมิที่สร้างโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 มีฤทธิ์ยับยั้งโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ โรคกุ้งแห้งเทียมที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. อันเป็นแนวทางในการศึกษาและวิจัยขยายผลหาสูตรอาหารต่าง ๆ ที่ยังคงความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 ในการยับยั้งโรคอื่นๆ เช่น ที่เป็นปัญหาสำคัญในการปลูกต้นพริกในโรงเรือนเพาะชำจำลองเพื่อนำไปใช้ได้จริงในสวนผัก และเกษตรกรผู้ปลูกมีทางเลือกใหม่ในการลด ละ เลิก การใช้วัตถุที่มีพิษพวกสารเคมีจากยาฆ่าแมลงทางการเกษตรเพื่อผู้บริโภคได้รับโรคผักปลอดสารพิษ นอกจากนี้ยังช่วยประเทศชาติประหยัดเงินตราลดดุลการค้าในการสั่งซื้อและนำเข้าวัตถุมีพิษทางการเกษตรและปุ๋ยเคมี ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการทดสอบแบบ *in vitro* บนอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด โดยวิธี Antagonistic test ซึ่งจะทำการทดสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสและโรคกุ้งแห้งเทียมที่ดีที่สุด และในกรณีที่จะใช้ป้องกันโรคนี้ที่สามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ *M. albus* strain MFC2 จะถูกนำไปทดสอบกับพืชโดยตรงโดยใส่เชื้อลงไปในการถาง พร้อมกับเมล็ดพันธุ์พริกและเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสและโรคกุ้งแห้งเทียมเทียม

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การเตรียมหัวเชื้อ (inoculums) มีวิธีดังนี้

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
2. นำ stock ของเชื้อ *M. albus* strain MFC2 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำหรับเป็นหัวเชื้อ inoculums เลี้ยงนาน 10 วัน
3. เมื่อเชื้อ *M. albus* strain MFC2 มีอายุครบ 10 วันแล้ว ให้ตัดชิ้นวันที่มีเชื้อ *M. albus* strain MFC2 มาวางคว่ำลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

การเตรียมอาหาร 3 สูตร

1. เตรียมข้าวฟ่าง ข้างกลิ้ง รำ ในอัตราส่วน 70:30:10
2. นำอัตราส่วนทั้งหมดไปปั่นผสมกันรวมกันและบรรจุในขวดขนาด 100 ml. โดยแบ่งออกเป็นอาหาร 3 สูตร ซึ่งประกอบด้วย
 1. MRS1 (F2*50 g + Modified rice starch 50 g)
 2. MRS2 (F2*40 g + Modified rice starch 60 g)
 3. MRS3 (F2*60 g + Modified rice starch 40 g)

F2* หมายถึง ข้าวฟ่าง:ข้างกลิ้ง:รำ:น้ำ ใน อัตราส่วน 70:30:10:10 ผสมกับแป้งละลายข้า (Modified rice starch)

3. เติมน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 20 ml แล้วนำไปเข้าเครื่อง Autoclave 2 ครั้ง

การทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อก่อโรคของเชื้อ *M. albus* strain MFC2 ในการยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides*, *C. capsici* และเชื้อรา *Alternaria* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA

1. นำเชื้อ *M.albus* MFC2 ที่มีอายุครบ 10 วันมาใส่ในอาหาร 3 สูตร โดยใช้อัตราส่วน 1 ขวด: ปริมาตรเชื้อ MFC2 50 จุล จากนั้นก็นำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ทำการตัดอาหารเลี้ยงเชื้อPDA ออกครั้งหนึ่งแล้ว และทิ้งไว้นาน 10 และ 14 วัน

2. เมื่อครบ 10 และ 14 วันแล้ว ให้นำเชื้อก่อโรคซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *C.gloeosporioides* , *C.capsici* และ เชื้อ *Alternaria* sp. มาวางไว้อีกด้านหนึ่งของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

3. จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 7 วัน สังเกต และบันทึกผลการ % inhibition ทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อโรคแอนแทรคโนสและโรคกุ้งแห้งเทียม บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เวลา 3, 5 และ 7 วัน การบันทึกผล

ทำการเปรียบเทียบและคำนวณเป็น % inhibition คือ วัดรัศมีการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมเปรียบเทียบกับชุด Dual antagonistic test แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ตามสูตร $\% inhibition = (R_1 - R_2) / R_1 \times 100$ โดยที่

R1 คือรัศมีการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เป็นชุดควบคุม

R2 คือรัศมีการเจริญของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีเชื้อเอนโดไฟท์ *M. Albus* และสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร

4. ทำการทดสอบ Viability tests

4.1 นำโคโลนีของเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิด คือ *C. gloeosporioid*, *C. capsici* และ *Alternaria* sp. ที่ไม่มี การเจริญเติบโตไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใหม่ จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 7 วัน

4.2 ทำการสังเกต และบันทึกผลการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคทั้ง 3 ชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยสังเกตว่า ถ้าโคโลนีของเชื้อก่อโรคไม่มีการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถสรุปได้ว่า เชื้อ *M.albus* MFC2 สามารถฆ่า (kill) เชื้อราก่อโรคนั้นๆ ได้จริง แต่หากว่าโคโลนีของเชื้อราก่อโรคมีการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถสรุปได้ว่า เชื้อ *M. albus* MFC2 สามารถยับยั้ง (inhibit) เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้

4.3 ในขั้นนี้เราจะได้เชื้อราก่อโรคแอนที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุดบนอาหารเลี้ยงสูตรที่ดีที่สุดจากทั้งหมด 3 สูตร ไปทำการทดลองต่อ

5. ทำการทดสอบ inoculum concentration test

5.1 ทำการเลี้ยงเชื้อราก่อโรคที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุดบนอาหารเลี้ยงสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 4 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วทำการขีดผิวหน้าของโคโลนีของเชื้อราก่อโรคจำนวน 3 plates ลงบนน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

5.2 จากนั้นนำสปอร์ของโคโลนีของเชื้อก่อโรคที่ได้ไปส่องกับเครื่อง Hemacytometer เพื่อทำการนับจำนวนสปอร์ และนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสต่อไป โดยความเข้มข้นของเชื้อราก่อโรคที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการผสมกับเมล็ดพริกเพื่อลงแปลงเพาะปลูกต่อไป

6. การทดสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค (ในที่นี้คือเชื้อ *Alternaria* sp.) ในพริกที่ปลูกในกระถาง

6.1 การเตรียมดินผสมดินระหว่างดินทั่วไปในแปลงปลูกกับดินที่จำหน่ายเป็นถุง (ดินก้ามปู) อัตราส่วน 2:1 ใส่ในกระถางขนาด 7x23 นิ้ว กระถางละ 3 กิโลกรัม โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 7 ชุด (แต่ละชุดทำ 5 ซ้ำ) ดังต่อไปนี้

ชุดที่	ประกอบด้วย
1	เมล็ดพริก 20 เมล็ด + ดิน 3 Kg (ชุดควบคุม)
2	เมล็ดพริก 20 เมล็ด + ดิน 3 Kg + อาหารสูตร MRS1 + เชื้อ <i>Alternaria</i> sp.
3	เมล็ดพริก 20 เมล็ด + ดิน 3 Kg + อาหารสูตร MRS2 + เชื้อ <i>Alternaria</i> sp.
4	เมล็ดพริก 20 เมล็ด + ดิน 3 Kg + อาหารสูตร MRS3 + เชื้อ <i>Alternaria</i> sp.
5	เมล็ดพริก 20 เมล็ด + ดิน 3 Kg + อาหารสูตร MRS2
6	เมล็ดพริก 20 เมล็ด + ดิน 3 Kg + อาหารสูตร MRS2 ที่ไม่มีเชื้อ MFC2
7	เมล็ดพริก 20 เมล็ด + ดิน 3 Kg + เชื้อ <i>Alternaria</i> sp.

หมายเหตุ สูตรที่ 1 MRS1 (F2*50 g + Modified rice starch 50 g)

สูตรที่ 2 MRS2 (F2*40 g + Modified rice starch 60 g) สูตรที่ 3 MRS3 (F2*60 g + Modified rice starch 40 g)

F2* หมายถึง ข้าวฟ่าง:ข้างกลิ้ง:ร่าน้ำ ใน อัตราส่วน 70:30:10:10 ผสมกับแป้งละลายข้า (Modified rice starch)

6.2 การเตรียมเมล็ด นำเมล็ดพันธุ์พริกไปแช่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทั้งไว้นาน 1 คืนเพื่อเป็นการคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่สามบูรณ์สำหรับไปลงแปลงปลูกจำลอง โดยหลักการเลือกเมล็ดพันธุ์จะเลือกเมล็ดพันธุ์ที่จมลงใต้น้ำบีกเกอร์ เนื่องจากเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ ส่วนเมล็ดพันธุ์ที่จมน้ำจะไม่ถูกเลือกเนื่องจากเป็นเมล็ดที่ฟ่อถ้าจะไม่ปลูกจะไม่สามารถโตได้แช่เมล็ดพันธุ์ค่น้ำและผักกาดหอม ในน้ำกลั่น 5 นาที คัดเฉพาะเมล็ดที่จมน้ำ

6.3) การปลูก ใช้เมล็ดพันธุ์พริกกระถางละ 20 เมล็ด ในกระถางขนาด 7x23 นิ้ว ทำการรดน้ำ 150 มล. วันเว้นวัน และใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 25 : 5 : 5 ทุก ๆ 1 สัปดาห์

7. ทำการบันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของต้นพริกทุก 2, 4, 8 และ 10 สัปดาห์

โดยบันทึกความยาวราก ความสูงลำต้นและน้ำหนัก และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละชุดการทดลองกับชุดควบคุม โดยจะนำแต่ละค่าในทุกซ้ำมาหาค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วยวิธี Fisher's LSD multiple-comparison test

ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติของสูตรอาหารของเชื้อ *M. albus* MFC2 เพื่อใช้ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค จากผลการทดลองสูตรอาหารต่างๆที่นำมาเลี้ยงจะมีผลต่อการโตของเชื้อ *M. albus* MFC2 ในลักษณะที่ต่างกัน คือ -สูตร MRS1 พบว่าเชื้อรา *M. albus* MFC2 มีการเจริญเติบโตได้ดี โดยเส้นใยของเชื้อราฟูพอง และพบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ทั่วทั้งขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ

-สูตร MRS2 พบว่าเชื้อรา *M. albus* MFC2 มีการเจริญเติบโตได้ดี โดยเส้นใยของเชื้อราฟูพอง แต่พบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้ทั่วทั้งขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ

-สูตร MRS3 พบว่าเชื้อรา *M. albus* MFC2 มีการเจริญเติบโตได้ไม่ค่อยดีดี โดยเส้นใยของเชื้อราฟูพอง และพบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ทั่วทั้งขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตอนที่ 2 การทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อก่อโรคของเชื้อเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 ในการยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides*, *C. capsici* และ เชื้อรา *Alternaria* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA

จากผลการทดลองการทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อก่อโรคของเชื้อเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 ในการยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides*, *C. capsici* และ เชื้อรา *Alternaria* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อรา *M. albus* strain MFC2 ที่ทิ้งไว้ 14 วัน ในสูตรอาหาร MRS2 ซึ่งทำการสังเกตเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ 7 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Alternaria* sp. สูงที่สุด เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่มีเชื้อรา *M. albus* strain MFC2 ที่ทิ้งไว้ 10 วัน ในสูตรอาหารต่างๆ เนื่องจากในเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิดพบว่าเชื้อ *Alternaria* sp. มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici*

ตอนที่ 3 การทดสอบ Viability tests บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 1. แสดงการทดสอบ Viability tests ของเชื้อ *Alternaria* sp. วันที่ผสมเชื้อรา *M. albus* strain MFC2กับสูตร MRS2และเลี้ยงไว้ใน plates นาน 10 วัน

Pathogen <i>C. gloeosporioides</i>	MRS2	
	โต	ไม่โต
Plates ที่ 1	✓	
Plates ที่ 2	✓	
Plates ที่ 3	✓	
Plates ที่ 4		✓
Plates ที่ 5		✓
Plates ที่ 6		✓
Plates ที่ 7	✓	
Plates ที่ 8	✓	
Plates ที่ 9	✓	
Plates ที่ 10		✓

ตารางที่ 2. แสดงการทดสอบ Viability tests ของเชื้อ *Alternaria* sp. ที่ผสมเชื้อรา *M. albus* strain MFC2 กับสูตร MRS2 และเลี้ยงไว้ใน plates นาน 14 วัน

Pathogen <i>Alternaria</i> sp.	MRS2	
	โต	ไม่โต
Plates ที่ 1	✓	
Plates ที่ 2		✓
Plates ที่ 3	✓	
Plates ที่ 4		✓
Plates ที่ 5		✓
Plates ที่ 6	✓	
Plates ที่ 7		✓
Plates ที่ 8		✓
Plates ที่ 9		✓
Plates ที่ 10		✓

จากผลการทดลองการทดสอบ Viability tests บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อนำเชื้อ *Alternaria* sp. ที่ไม่มีการเจริญเติบโตในสูตรอาหาร MRS2 มาทดสอบ Viability tests โดยทำการเปรียบเทียบผลของเชื้อรา *M. albus* strain MFC2 ที่ทิ้งไว้ 10 และ 14 วัน ในสูตรอาหารเดียวกัน พบว่าเชื้อรา *M. albus* strain MFC2 ที่ทิ้งไว้ 14 วันไม่มีการเจริญเติบโตบนอาหาร PDA จำนวน 7 plates จาก 10 plates ในขณะที่เชื้อรา *M. albus* strain MFC2 ที่ทิ้งไว้ 10 วันไม่มีการเจริญเติบโตบนอาหาร PDA จำนวน 4 plates จาก 10 plates ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าเชื้อรา *M. albus* MFC2 ที่ทิ้งไว้ 14 บนอาหารสูตร MRS2 สามารถฆ่าเชื้อราก่อโรคกึ่งแห้งที่เกิดจากเชื้อ *Alternaria* sp. ได้ดีกว่าเชื้อรา *M. albus* strain MFC2 ที่ทิ้งไว้ 10 วัน เนื่องจากมีจำนวน Plates ของเชื้อที่ไม่มีการเจริญเติบโตมากกว่า

ตอนที่ 4 การทดสอบ inoculum concentration test

จากผลการทดลองการทดสอบ inoculum concentration test พบว่าเมื่อทำการหาค่าความเข้มข้นของเชื้อรา *Alternaria* sp. และมาส่งกับเครื่อง Hemacytometer เพื่อทำการนับจำนวนสปอร์ และคำนวณออกมาเป็นความเข้มข้นของเชื้อก่อโรคเพื่อจะนำไปใช้ต่อการลงแปลงเพาะปลูกจำลอง พบว่าเมื่อค่าความเข้มข้นของเชื้อ *Alternaria* sp. ที่คำนวณได้ เท่ากับ 10^6 cfu/ml โดยใช้เชื้อ *Alternaria* sp. จำนวนทั้งสิ้น 3 Plates

ตอนที่ 5 การทดสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 ในการยับยั้งเชื้อรา ก่อ โรค ในพริก ที่ปลูกในกระถาง

เมื่อทำการปลูกพริกได้ 2 สัปดาห์ และ 4-6 สัปดาห์พบว่าในแต่ละชุดการทดลองให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 จากผลการทดลองการทดสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพริกที่ปลูกในกระถาง โดยดูจากเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของต้นพริกอายุ 2, 4 และ 6 สัปดาห์ หลังจากการปลูก พบว่าพริกอายุ 2 สัปดาห์ในชุดการทดลองที่ 1 และ 7 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด และในชุดการทดลองที่ 4 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำที่สุด แต่หลังจากพริกอายุได้ 4 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองที่มีการใส่สูตรอาหาร MRS1, MRS2 และ MRS3 มีเปอร์เซ็นต์การงอกเพิ่มขึ้น ขณะที่ชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 0% เนื่องจากไม่มีการงอกเพิ่มขึ้นมาอีกในสัปดาห์ที่ 4 โดยจะพบว่าชุดการทดลองที่ 2 คือ สูตร MRS2 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด และชุดที่ 7 คือชุด Negative Control ให้เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำสุด จากผลการทดลองข้างต้น จึงกล่าวได้ว่า สูตรอาหารที่ให้เปอร์เซ็นต์การงอกดีสุดคือ MRS1> MRS2>MRS3 เรียงจากมากสุดไปน้อยที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3

เมื่อทำการวัดค่า pH ของดินที่ทำการปลูก พบว่าดินในกระถางของชุดที่ 1-3 มีค่า pH= 7 ส่วนดินในกระถางของชุดที่ 4-7 มีค่า pH= 8

ตารางที่ 3. แสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพริก หลังจากการปลูก 2 สัปดาห์ และ 4-6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	% germination หลังจากการปลูก 2 สัปดาห์	% germination หลังจากการปลูก 4-6 สัปดาห์
1	70%	70%
2	42%	70%
3	46%	67%
4	36%	59%
5	47%	56%
6	43%	56%
7	48%	43%

เมื่อทำการถอนต้นพริกที่งอกออกมาในสัปดาห์ที่ 2, 4 และ 6 สัปดาห์มาทำการวัดความยาวรากและความสูงของ ลำต้น พบว่าความยาวของรากต้นพริกในอายุ 2 สัปดาห์ของชุดควบคุมมีค่ามากที่สุดและแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ โดยจะพบว่าความยาวของรากตั้งแต่ชุดการทดลองที่ 3-7 นั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความยาวของลำต้นนั้น พบว่าชุด Negative Control มีความสูงลำต้นมากที่สุดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่ 5 และ 6 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ความสูงของลำต้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4. แสดงความยาวของรากและความสูงของต้นพริก สัปดาห์ที่ 2 หลังจากปลูก

Treatment	Length of pulled root (cm)	Height from tip to stem base (cm)
1	3.24±0.11a	2.67±0.07a
2	2.94±0.13b	2.62±0.09a
3	2.59±0.13c	1.84±0.09c
4	2.32±0.11c	1.82±0.08c
5	2.49±0.13c	2.91±0.15e
6	2.50±0.12c	2.96±0.08e
7	2.58±0.13c	3.04±0.06e

หมายเหตุ ค่า ± คือค่า standard errors

จากผลการทดลองการวัดความยาวรากและความสูงของลำต้นของพริกหลังจากปลูกได้ 4 สัปดาห์ พบว่าความยาวของรากต้นพริกในสูตร MRS1 และ MRS2 มีค่าเทียบเท่ากับชุดควบคุม นั่นคือ ความยาวของรากในทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในชุดการทดลองที่ 4 – 7 มีความยาวของรากเท่ากัน ส่วนความยาวของลำต้นนั้น พบว่าทุกชุดการทดลองมีความสูงของลำต้นแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5. แสดงความยาวของรากและความสูงของต้นพริก สัปดาห์ที่ 4 หลังจากปลูก

Treatment	Length of pulled root (cm)	Height from tip to stem base (cm)
1	3.24±0.11a	2.67±0.07a
2	3.19±0.14a	8.00±0.21b
3	3.30±0.12a	8.30±0.12b
4	2.09±0.22b	7.09±0.22b
5	2.34±0.13b	7.34±0.13b
6	2.36±0.13b	7.36±0.13b
7	2.83±0.23b	7.83±0.23b

หมายเหตุ ค่า ± คือค่า standard errors

จากผลการทดลองการวัดความยาวรากและความสูงของลำต้นของพริกหลังจากปลูกได้ 6 สัปดาห์ พบว่าความยาวของรากต้นพริกในสูตร MRS1 และ MRS2 มีค่าเทียบเท่ากับชุดควบคุม นั่นคือ ความยาวของรากในทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในชุดการทดลองที่ 4 และ 5 มีความยาวของรากเท่ากัน นั่นคือไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 6 และ 7 ส่วนความยาวของลำต้นนั้น พบว่าในชุดการทดลองที่ 1-4 , 7 มีความสูงของลำต้นเท่ากัน นั่นคือไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สถิติ เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 5 และ 6 ดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 2

ตารางที่ 6. แสดงความยาวของรากและความสูงของต้นพริก สัปดาห์ที่ 6 หลังจากปลูก

Treatment	Length of pulled root (cm)	Height from tip to stem base (cm)
1	6.20±0.27a	9.45±0.23a
2	6.10±0.27a	8.59±0.21a
3	6.39±0.29a	9.02±0.27a
4	4.66±0.29b	8.02±0.29a
5	4.24±0.36d	7.47±0.30b
6	4.08±0.33c	7.04±0.25b
7	3.35±0.30c	8.86±0.5a

หมายเหตุ ค่า ± คือค่า standard errors



รูปที่ 2. แสดงพริกอายุ 6 สัปดาห์ บนซ้าย : ชุดควบคุม / สูตร MRS1 / สูตร MRS2 / สูตร MRS3

ล่างซ้าย : สูตร MRS3 ที่ไม่ใส่เชื้อราก่อโรค / สูตร MRS3 ที่ไม่ใส่เชื้อราก่อโรคและเชื้อMFC2 / Negative Control

เมื่อนำการทดลองทั้ง 7 ชุดการทดลอง จำนวน 5 ซ้ำมาทำการเปรียบเทียบความสูงและจำนวนใบในพริกอายุ 10 สัปดาห์ พบว่าได้ผลดังรูปที่ 3 คือ ต้นพริกในกระถางชุดที่มีสูตร MRS1 และกระถางที่ใส่สูตร MRS2 ต้นพริกมีความสูงมากที่สุด



รูปที่ 3 แสดงพริกอายุ 10 สัปดาห์ บนซ้าย : ชุดควบคุม / สูตร MRS1 / สูตร MRS2 / สูตร MRS3

ล่างซ้าย : สูตร MRS3 ที่ไม่ใส่เชื้อราก่อโรค / สูตร MRS3 ที่ไม่ใส่เชื้อราก่อโรคและเชื้อMFC2 / Negative Control

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 อายุ 10 และ 14 วัน ที่ทำการผสมกับแป้งละลายข้าวและสูตร F2 ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน 3 สูตรคือ MRS1, MRS2 และ MRS3 เพื่อในการควบคุมเชื้อก่อโรคแอนแทรกโนสในพริกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบประกอบด้วย *C. gloeosporioides*, *C capsici* และ *Alternaria* sp. ที่แยกได้จากต้นพริก ผลการทดลองที่ได้พบว่าเชื้อ *M. albus* strain MFC2 บนอาหารสูตร MRS2 ที่ทิ้งไว้ 14 วัน ซึ่งมีส่วนประกอบคือ แป้งละลายข้าว 40 ต่อสูตร F2 ที่มีเชื้อเอนโดไฟท์ *M. albus* MFC2 ในปริมาณ 60 กรัม ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Alternaria* sp. สูงที่สุด โดยดูจากการที่โคโลนีของเชื้อ *Alternaria* sp. ที่เลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Alternaria* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จากนั้นผู้ทำการวิจัยจึงได้นำผลการทดลองที่ได้จากตอนต้นมาทดสอบ Viability tests เพื่อดูว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 ที่ทิ้งไว้ 14 วัน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือสามารถฆ่าเชื้อ *Alternaria* sp. ได้ โดยทำการนำเอาโคโลนีของเชื้อ *Alternaria* sp. ที่ไม่มีการเจริญเติบโต ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใหม่ และสังเกตว่าโคโลนีนั้น ๆ มีการเจริญเติบโตหรือไม่ ซึ่งจากการทดลอง พบว่าโคโลนีที่ย้ายมาไม่มีการเจริญเติบโต จึงสามารถสรุปได้ว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 สามารถฆ่าเชื้อ *Alternaria* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากจำนวน plates ของเชื้อ *Alternaria* sp. ที่ไม่เจริญเติบโตในเชื้อรา *M. albus* strain MFC2 ที่ทิ้งไว้ 14 วันมีจำนวน plates ของเชื้อ *Alternaria* sp. ที่ไม่เจริญเติบโตมากกว่าในเชื้อรา *M. albus* strain MFC2 ที่ทิ้งไว้ 10 วัน ในอาหารสูตรเดียวกัน เมื่อทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ *Alternaria* sp. เพื่อนำไปใช้ผสมกับเมล็ดพริกเพื่อลงแปลงเพาะปลูกจำลอง และจากการนับจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Alternaria* sp. จำนวน 3 Plates และคำนวณหาความเข้มข้น พบว่าได้ความเข้มข้นของเชื้อ *Alternaria* sp. เท่ากับ 10^6 cfu/ml จากผลการทดลองการทดสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 ในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. ในพริกที่ปลูกในกระถาง พบว่าผลการทดลองที่ได้คือ พริกอายุ 2 สัปดาห์ ชุดควบคุม และชุด Negative control ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด

จากนั้นผู้ทำการวิจัยได้นำผลการทดลองจาก 3 ตอน ข้างต้น มาใช้กับแปลงเพาะปลูกจำลองโดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 7 ชุด ดังนี้ 1. ชุดควบคุม 2. สูตร MRS1 3. สูตร MRS2 4. สูตร MRS3 5. สูตร MRS3 ที่ไม่ใส่เชื้อราก่อโรค 6. สูตร MRS3 ที่ไม่ใส่เชื้อราก่อโรคและเชื้อ MFC2 7. Negative Control ผลการทดลองหลังจากปลูกได้ 2 สัปดาห์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของต้นพริกในชุดควบคุมให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด และชุดการทดลองที่ 4 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำที่สุด แต่หลังจากปลูกพริกได้ 4 สัปดาห์ พบว่าในชุดการทดลองอื่นๆ มีเปอร์เซ็นต์การงอกเพิ่มขึ้น ขณะที่ชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 0% เนื่องจากไม่มีการเจริญเติบโตของพริก โดยจะพบว่าชุดการทดลองที่ 2 คือ สูตร MRS2 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และชุดที่ 7 คือชุด Negative Control ให้เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำสุด ทำให้สรุปได้ว่าสูตรที่ให้เปอร์เซ็นต์การงอกดีสุดคือ $MRS1 > MRS2 > MRS3$ เรียงจากดีสุดไปต่ำที่สุด สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเป็นว่าสูตรอาหารดังกล่าวประกอบด้วย ข้าวฟ่าง, ข้าวกล้อง และรำ ที่ใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับเลี้ยงเชื้อ *M.albus* MFC2 เนื่องจากข้าวฟ่างจะช่วยให้การรุกรานเพื่อให้ออกซิเจนกับเชื้อ *M.albus* MFC2 ส่วนข้าวกล้องและรำเป็นแหล่ง Carbon Source และวิตามินช่วยให้เชื้อ *M.albus* MFC2 เจริญเติบโตได้ดีขึ้น ดังนั้นการใส่แบ่งละลายข้าวในอัตราส่วนที่น้อยกว่าสูตรอาหาร จะช่วยให้เชื้อ *M.albus* MFC2 มีพื้นที่ในการเจริญเติบโตมากขึ้นเนื่องจากมีปริมาณอาหารให้เชื้อได้มากขึ้น ส่วนในกรณีที่มีการใส่แบ่งในปริมาณที่มากกว่าสูตรอาหารจะทำให้แบ่งอัดตัวกันแน่น และมีพื้นที่ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *M.albus* MFC2 น้อยลงจึงส่งผลทำให้ต้นพริกโตช้าและลำต้นแคระแกรนกว่าสูตรอื่นที่มีปริมาณแบ่งน้อยกว่า (MRS3) จากผลการทดลองข้างต้นทำให้สรุปได้ว่าสูตรอาหารที่ใช้ และเชื้อ *M.albus* MFC2 ที่ใส่ลงไปไม่มีผลกับการเจริญเติบโตของต้นพริกเนื่องจากต้นพริกสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ หากแต่พบว่าเชื้อ *M.albus* MFC2 ที่ผสมลงไปไม่ได้ช่วยให้ต้นพริกโตเร็วขึ้น เนื่องจากพบว่าในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการเจริญเติบโต พบว่าชุดการทดลองที่ 1 และ 7 ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ แต่จะพบว่าหลังจาก 4 สัปดาห์ของการปลูกนั้น ต้นพริกที่มีเชื้อ *M.albus* MFC2 มีเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเทียบเท่ากับชุดควบคุม และชุด Negative Control ให้เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าพริกที่โตนั้นมีลำต้นอวบ และแข็งแรงกว่าชุดควบคุม ใบสีเขียวเข้มและไม่เป็นโรค เช่น ใบหงิก ใบเหลือง ดังที่พบในชุด Negative Control จึงอาจกล่าวได้ว่าการใส่เชื้อรา *M.albus* MFC2 นั้นทำให้ต้นพริกโตช้ากว่าปกติแต่กลับทำให้ต้นพริกมีความสมบูรณ์มากกว่าชุดควบคุม โดยจะพบว่าพริกอายุตั้งแต่ 6 สัปดาห์ ขึ้นไปในสูตร MRS1 และ MRS2 สามารถเจริญเติบโตได้ทันชุดควบคุม และพบว่าลำต้นของต้นพริกอวบ แข็งแรง และใบมีสีเขียวสดและมีปริมาณใบกว่าชุดควบคุมอีกด้วย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อ *M.albus* strain MFC2 สามารถฆ่าเชื้อราก่อโรคกุ่มแห่งที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ทั้งบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและบนแปลงเพาะปลูกจำลองได้

อุปสรรคที่เกิดจากการทำการทดลองคือเกิดการ contaminated จากเชื้อแบคทีเรียทำให้การทดลองล่าช้าออกไป นอกจากนี้เมื่อลองแปลงปลูกจำลองในสัปดาห์ที่ 10 พบว่าสูตร MRS1 จำนวน 1 กระถาง จาก 5 กระถาง โตหนุ่และลำต้นพริกไปทำให้สามารถสรุปผลการทดลองได้ 4 ข้ว จาก 5 ข้ว แนวทางการแก้ไขสำหรับปัญหาที่เกิดขึ้น คือ ควรมีการฉีด Alcohol ในบริเวณที่ทำแลบและควรล้างมือและฉีด Alcohol ทุกครั้งเพื่อป้องกันการ contaminated ในกรณีที่ปลูกพริกลงกระถางควรมีการล้อมกระถางด้วยตาข่ายและตรวจตราอยู่เสมอเพื่อป้องกันสัตว์และแมลงต่างๆ ไม่ให้มารบกวนต้นพริก

การควบคุมโรครากเน่าในคะน้าและผักกาดหอมโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp. QS4 จากต้นผักหวาน
Control of *Pythium ultimum* in kale and lettuce by an endophyte *Xylaria* sp. QS4 from *Quereus lauritolia*
วรภพ จิรณโชติ¹ วัชรภากรณ์ จ्ञาน้อย¹ มนต์ฤดี ศรีไทรทรัพย์¹ และ จิรพันธ์ วรพงษ์¹
¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า *P. ultimum* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (in vitro)
2. เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า *P. ultimum* และการก่อโรคของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. ต่อผักคะน้าและผักกาดหอมในกระถาง
3. เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. ในข้อ 2 ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากเน่า *P. ultimum* และการก่อโรคของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อผักคะน้าและผักกาดหอมในกระถาง

บทนำ

โรครากเน่า (Root Rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *P. ultimum* นับเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายมากต่อผลผลิต โดยเชื้อสามารถเข้าทำลายพืชทุกระยะของการเจริญ และจะระบาดมากในระยที่มีควมชื้นสูงเกิดมากกับพันธุ์ที่มีใบแผ่กว้าง ดังนั้นเกษตรกรมักนิยมใช้สารเคมีในการกำจัดจึงทำให้ประสบปัญหาสารพิษตกค้างจากยากำจัดศัตรูพืช ค่าใช้จ่ายในการซื้อยากำจัดศัตรูพืช ไม่ว่าจะเป็นยาฆ่าแมลง ยากำจัดจุลชีพที่ก่อโรคและยาฆ่าวัชพืช เป็นจำนวนมากขึ้นทุกปี ซึ่งปัญหาการที่ต้องใช้ยากำจัดจุลชีพและเชื้อราในจำนวนมากขึ้นส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการดื้อยา ดังนั้นจึงเกิดงานวิจัยโดยวิธีการตรวจแยกหาเชื้อเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. จากต้นผักหวานที่สร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำไปใช้ในชีววิธีควบคุมโรครากเน่าในคะน้าและผักกาดหอมแทนสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม



รูปแสดงลักษณะอาการของโรครากเน่า

วิธีการทดลอง

การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. จาก stock culture ที่เก็บรักษาไว้

นำชิ้นส่วนของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. จาก stock culture ที่เก็บรักษาไว้ จำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สายพันธุ์ละ 1 plate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-10 วันเมื่อครบเวลาจึงทำการเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. ที่เจริญได้ดี จำนวน 5 สายพันธุ์ เพื่อทำการทดสอบต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของเมล็ดพันธุ์

นำเมล็ดพันธุ์คะน้าและผักกาดหอมมาแช่ใน 70% แอลกอฮอล์ 5 นาทีเพื่อทำการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที เลือกเมล็ดพันธุ์เฉพาะที่จมน้ำ จำนวน 100 เมล็ด มาวางเรียงบน plate ที่รองบริเวณกัน plate ด้วยกระดาษทิชชู และฉีดน้ำจนเปียกชุ่ม (ทำ 3 ซ้ำ) แล้วจึงนำกระดาษทิชชูมาปิดทับเมล็ด แล้วทำการฉีดน้ำให้เปียกชุ่ม ตั้งทิ้งไว้บริเวณที่มีแสงแดดส่องถึงเป็นเวลาประมาณ 3 วัน เมื่อต้นอ่อนงอกทำการนับจำนวนต้นอ่อนที่งอก และบันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์

การทดสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. ที่ทำการคัดเลือก ในการยับยั้งเชื้อ *Pythium ultimum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้ส่วนท้ายของ Pasture pipette ตัดชิ้นวันที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. ที่ทำการคัดเลือก มาวางคว่ำลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, YPD และ SDA (วาร์พ) GPA, MEA และ CMA (วิธีภาภรณ์)(ทำ 2 ซ้ำ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 และ 10 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนด ตัดชิ้นวันที่มีเชื้อเชื้อ *P. ultimum* มาวางรอบๆ เชื้อ *Xylaria* spp. ให้ห่าง 1 เซนติเมตร จำนวน 5 จุด (Antagonistic test) สำหรับชุดควบคุมเชื้อ *P. ultimum* ลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี *Xylaria* spp. แล้วนำจานอาหารทดลองทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง วัดอัตราการเจริญของเชื้อ *P. ultimum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมเปรียบเทียบกับชุด Dual antagonistic test ที่เวลา 2 และ 5 วัน ทำการคำนวณเป็น % inhibition

$$\% \text{ inhibition} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

โดย R_1 คือ อัตราการเจริญของเชื้อ *P. ultimum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นชุดควบคุม
 R_2 คือ อัตราการเจริญของเชื้อ *P. ultimum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *Xylaria* spp.

การทดสอบการออกของเมลิ็ดคะน่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, YPD และ SDA และผักกาดหอมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GPA, MEA และ CMA ที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp.

นำเมลิ็ดพันธุ์คะน่าและผักกาดหอมมาแช่ใน 70% แอลกอฮอล์ 5 นาทีเพื่อทำการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที เลือกเฉพาะเมลิ็ดพันธุ์ที่จมน้ำ นำมาวางรอบๆเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, YPD และ SDA ให้ห่างประมาณ 1 เซนติเมตร จำนวน plate ละ 20 เมลิ็ด บ่มที่อุณหภูมิห้องให้มีแสงสว่างส่องถึง เป็นเวลา 3-5 วัน (ทำ 2 ซ้ำ) บันทึกผลและคำนวณอัตราการออกของเมลิ็ดเป็นเปอร์เซ็นต์

การทดสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp. QS4 ในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* ในผักคะน่าและผักกาดหอมที่ปลูกในกระถาง

การเตรียมดิน

ผสมดินระหว่างดินทั่วไปในแปลงปลูกกับดินที่จำหน่ายเป็นถุง(ดินก้ามปู) อัตราส่วน 1:1 ใส่ในกระถางขนาด

20 x 20 ซม. กระถางละ 500 กรัม โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 5 ชุด (แต่ละชุดทำ 6 ซ้ำ) ดังต่อไปนี้

ชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุม ดังนั้นจะไม่มีเชื้อราเอนโดไฟท์ ใดๆ ลงไปในกระถาง

ชุดที่ 2 เป็นชุดที่ใส่เชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp. QS4 อายุ 10 วัน 4 plates

ชุดที่ 3 เป็นชุดที่ใส่เชื้อ *P. ultimum* อายุ 2 วัน 3 plates

ชุดที่ 4 เป็นชุดที่ใส่เชื้อ *P. ultimum* อายุ 2 วัน 3 plates และเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp. QS4 อายุ 10 วัน 4 plates

ชุดที่ 4 เป็นชุดที่ใส่เชื้อ *P. ultimum* อายุ 2 วัน 3 plates และเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp. QS4 อายุ 10 วัน 15 plates

การเตรียมเมลิ็ด แช่เมลิ็ดพันธุ์คะน่าและผักกาดหอม ในน้ำกลั่น 5 นาที คัดเฉพาะเมลิ็ดที่จมน้ำ

การปลูก ใช้เมลิ็ดพันธุ์คะน่าและผักกาดหอมกระถางละ 25 เมลิ็ด ทำการรดน้ำ 50 มล. : 1 วัน และใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 25 : 5 : 5

ทุก ๆ 1 สัปดาห์ การเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละชุดการทดลองจะนำแต่ละค่าในทุกซ้ำมาหาค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วยวิธี

Fisher's LSD multiple-comparison test

ผลการศึกษา

การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. จาก stock culture

จากการนำเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. ที่แยกได้จากต้นผักหวานจำนวน 21 สายพันธุ์ มาทำการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และทำการคัดเลือกมาจำนวน 5 สายพันธุ์ที่เจริญได้ดี ได้แก่ Qb19, Qb20, Qb21, QS4 และ N3S9 ดังแสดงในรูปที่ 1

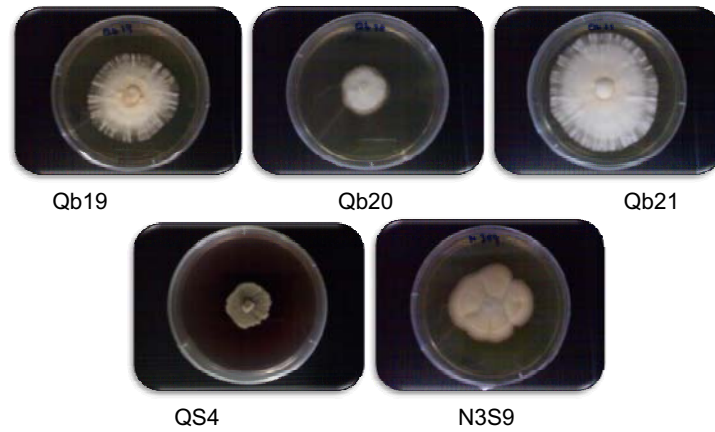
การทดสอบประสิทธิภาพการออกของเมลิ็ดพันธุ์คะน่าและผักกาดหอม

เมลิ็ดพันธุ์คะน่าและผักกาดหอมมีการออกที่อยู่ในเกณฑ์คือ 95.66% และ 90.33% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2

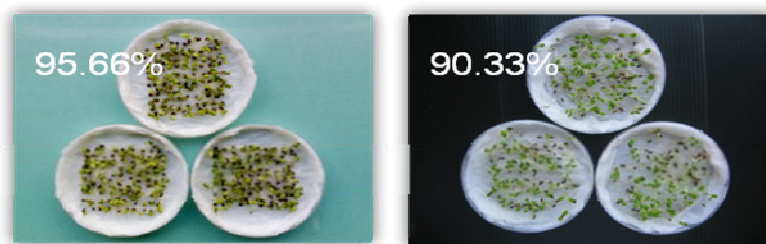
การทดสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. ในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ Qb19, Qb20, Qb21, QS4 และ N3S9 พบว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* สายพันธุ์ QS 4 อายุ 10 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ GPA สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 1. ลักษณะโคโลนีของการนำเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ Qb19, Qb20, Qb21, QS4 และ N3S9 ที่เจริญได้ดี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA



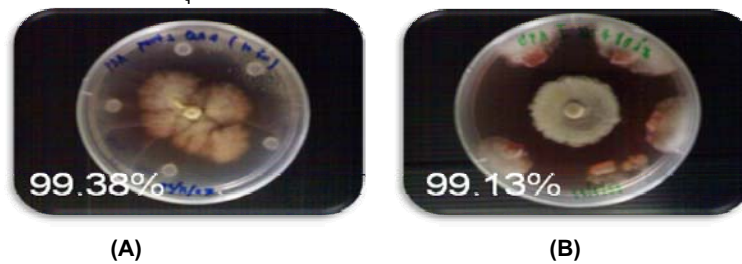
รูปที่ 2. การทดสอบประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดพันธุ์คะน้ำและผักกาดหอม



เมล็ดพันธุ์คะน้ำ

เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม

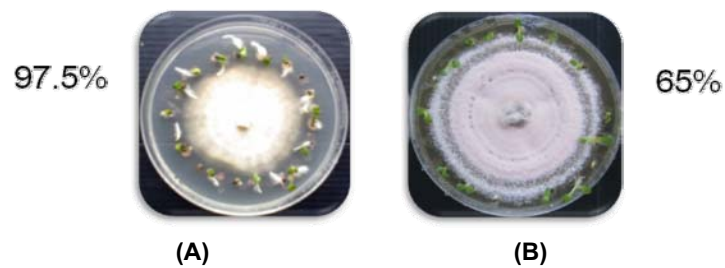
รูปที่ 3. (A) การยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* โดย เชื้อรา *Xylaria* QS4 อายุ 10 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (B) การยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* โดย เชื้อรา *Xylaria* QS4 อายุ 10 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GPA



(A)

(B)

รูปที่ 4. (A) การทดสอบผลของเชื้อ *Xylaria* QS4 บน PDAต่อการงอกของเมล็ดคะน้ำ (B) การทดสอบผลของเชื้อ *Xylaria* QS4 บน GPAต่อการงอกของเมล็ดผักกาดหอม

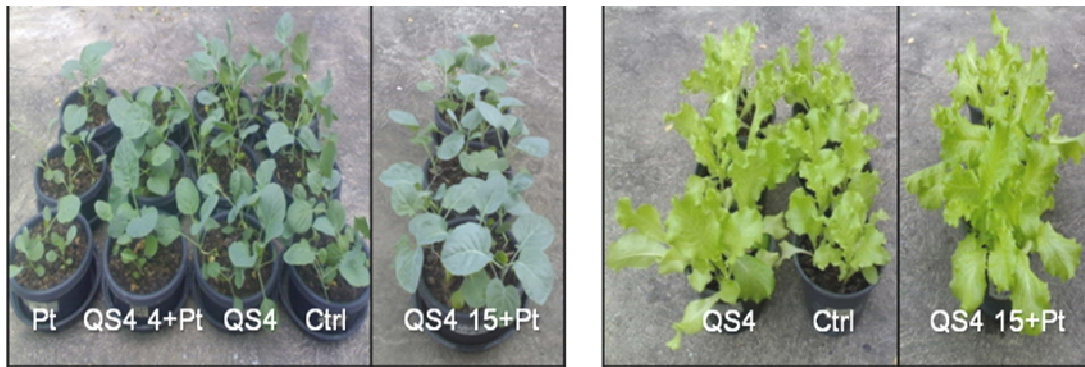


(A)

(B)

การทดสอบการงอกของเมล็ดคะน้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, YPD และ SDA และผักกาดหอมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GPA, MEA และ CMA ที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* QS4 พบว่าเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดคะน้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และมีผลเล็กน้อยต่อการงอกของเมล็ดผักกาดหอมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GPA ดังแสดงในรูปที่ 4

รูปที่ 5. (A-1), (A-2) การเปรียบเทียบต้นคะน้าอายุ 45 วัน และ (B-1), (B-2) การเปรียบเทียบต้นผักกาดหอมอายุ 35 วัน ในชุดการทดลองที่ผสมเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 ในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* (A-3) (A-4) การเปรียบเทียบต้นคะน้าอายุ 51 วัน ในชุดการทดลองที่ผสมเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 2 plates และ *M. albus* MFC2 2 plates ในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum*



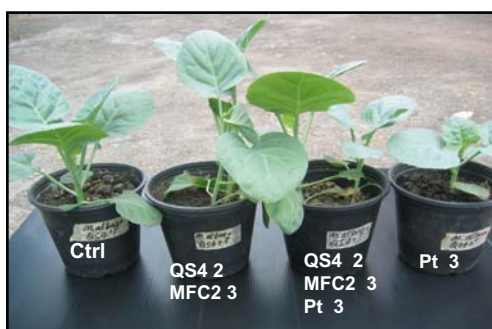
(A-1)

(B-1)

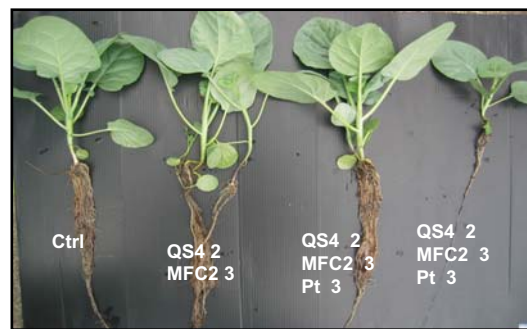


(A-2)

(B-2)



(A-3)



(A-4)

ตารางที่ 1. แสดงการเปรียบเทียบต้นคะน้าอายุ 45 วัน ในชุดการทดลองที่ผสมเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 ในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* 3 plates

ชุดทดลอง	ความสูงจากโคนถึงยอด (cm)	น้ำหนักสด (g/plant)	ความยาวราก (cm)	จำนวนใบ
Non-infested control	12.51a	2.79a	4.62a	6
QS4 4 plates	12.45a	3.22a	4.60a	6
QS4 15 plates + <i>P. ultimum</i>	15.28b	4.41b	11.67b	6
QS4 4 plates + <i>P. ultimum</i>	8.29c	2.88a	4.73a	6
<i>P. ultimum</i>	6.51c	1.47a	5.30a	5

Means with different letters are significantly different according to Fisher's LSD Multiple-Comparison test ($P < 0.05$)

ตารางที่ 2. แสดงการเปรียบเทียบต้นผักกาดหอมอายุ 35 วันในชุดการทดลองที่ผสมเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 ในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* 3 plates

ชุดทดลอง	ความสูงจากโคนถึงยอด (cm)	น้ำหนักสด (g/plant)	ความยาวราก(cm)	จำนวนใบ
Non-infested control	11.92a	1.63a	12.63a	5
QS4 4 plates	15.16b	2.56a	12.15a	5
QS4 15 plates + <i>P. ultimum</i>	15.35b	3.08b	9.25b	5
QS4 4 plates + <i>P. ultimum</i>	9.78a	1.05a	8.2b	5
<i>P. ultimum</i>	-	-	-	-

Means with different letters are significantly different according to Fisher's LSD Multiple-Comparison test ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบต้นคะน้าอายุ 51 วัน ในชุดการทดลองที่ผสมเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 2 plates และ *M. albus* MFC2 3 plates ในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* 3 plates

ชุดทดลอง	ความสูงจากโคนถึงยอด (cm)	น้ำหนักสด (g/plant)	ความยาวราก(cm)	จำนวนใบ
Non-infested control	21.5	18.97	30	7
QS4 2 plates + MFC2 3 plate	16.9	17.29	27	6
QS4 2 plates + MFC2 3 plate + <i>P. ultimum</i>	20	25.6	30	6
<i>P. ultimum</i>	15	5.7	22	6

Means with different letters are significantly different according to Fisher's LSD Multiple-Comparison test ($P < 0.05$)

สรุปผลการทดลอง

จากเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. ที่แยกจากต้นผักหวาน ที่เก็บรักษาไว้ใน stock culture จำนวน 20 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดลองเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน พบว่า มีเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp. ที่เจริญเติบโตได้ดีจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ Qb19, Qb20, Qb21, QS4 และ N3S9 คณะผู้ทำการวิจัยจึงนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium ultimum* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรครากเน่าในพืชผัก ด้วยวิธี Antagonistic Test โดยทำการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPD) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA)(วรกพ) และ Glucose Peptone Agar (GPA), Malt Extract Agar (MEA) และ Corn Meal Agar (CMA สำหรับเชื้อเอนโดไฟท์ *Xylaria* spp.สายพันธุ์ Qb19, Qb20, QS4 และ N3S9 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 และ 10 วัน ส่วนสายพันธุ์ Qb21 สามารถเจริญเติบโตได้เร็วมากจึงทำการเลี้ยงเพียง 5 วัน แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อ *Pythium ultimum* อายุ 2 วัน และ 5 วัน พบว่ามีเพียงสายพันธุ์ QS4 และ N3S9 เท่านั้นที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium ultimum* ได้ โดยทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะที่แตกต่างออกไป คือ บริเวณอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆโคโลนี จะมีสีแดง (QS4) และสีเหลือง (N3S9) ซึ่งเชื้อเอนโดไฟท์ *Xylaria* QS4 อายุ 10 วัน สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด

คณะผู้ทำการวิจัยจึงได้ทำการทดสอบต่อไป คือ การทดสอบผลของเชื้อเอนโดไฟท์ *Xylaria* QS4 อายุ 10 วัน ต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์ โดยผักคะน้า ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, YPD และ SDA ส่วนผักกาดหอม ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GPA, MEA และ CMA ปรากฏว่า เชื้อ *Xylaria* QS4 ไม่มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดพันธุ์คะน้า เมื่อทดสอบเป็นเวลา 3 วัน โดยมีอัตราการงอกสูงที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ส่วนการทดสอบกับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม 5 วัน พบว่า มีเพียงเชื้อ *Xylaria* QS4 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GPA เท่านั้น ที่ไม่มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ส่วนการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA และ CMA เมล็ดพันธุ์ไม่สามารถงอกขึ้นมาได้เลย ซึ่งอาจเป็นผลจากการ contaminate ของเชื้อชนิดอื่นก็เป็นได้

หลังจากที่ได้ข้อสรุปว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* QS4 อายุ 10 วัน ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ GPA ไม่มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดพันธุ์คะน้า และผักกาดหอม ตามลำดับ คณะผู้ทำการวิจัยจึงนำมาทดสอบในสภาวะใกล้เคียงธรรมชาติภายในโรงเรือนเพาะชำจำลอง โดยผสมลงในดินที่ใช้ปลูกปริมาณแตกต่างกันไป แล้วเปรียบเทียบการงอกและการเจริญของผักคะน้าและผักกาดหอม กับชุดควบคุม ปรากฏว่าการผสมเชื้อ *Xylaria* QS4 อายุ 10 วัน จำนวน 15 plates ลงในกระถางที่มีเชื้อ Pathogen *P. ultimum* อายุ 2 วัน 3 plates ให้ผลการงอกของเมล็ด สูงใกล้เคียงกับชุด Non-infested control และไม่พบอาการของโรคปรากฏบนต้นคะน้าอายุ 45 วัน (รูป (A-1) (A-2) และตารางที่ 1 และต้นผักกาดหอมอายุ 35 วันหลังจากปลูก (รูป (B-1) (B-2) และตารางที่ 2 อีกทั้งยังมีการเจริญเติบโตที่สูงกว่าชุด Non-infested control โดยพิจารณาจาก

น้ำหนักสด และความสูงจากโคนต้นถึงยอด เช่นเดียวกับในกระถางที่มีเชื้อ *Xylaria* QS4 เพียงอย่างเดียว แต่ % Germination และการเจริญจะแย่มากในต้นคะน้าและผักกาดหอมในชุดทดสอบที่ผสมเชื้อก่อโรครากเน่า *P. ultimum* เพียงอย่างเดียว จึงทำให้เกิดข้อสังเกตว่า เชื้อ *Xylaria* QS4 นอกจากยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* แล้ว อาจช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตให้แก่พืชได้อีกด้วย ผลการเปรียบเทียบต้นคะน้าอายุ 51 วัน ในชุดการทดลองที่ผสมเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 และ *M. albus* MFC2 (รูป (A-3) (A-4) และตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ 2 ทั้งชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* และเพิ่มการเจริญเติบโตให้แก่พืชได้อีกด้วย จะเห็นได้ชัดเจนว่าการใส่เชื้อ *M. albus* MFC2 เพิ่มเข้าไปสามารถควบคุมปริมาณเชื้อ *Xylaria* sp. QS4 จากเดิม 15 plates เป็น 2 plates และการใส่เชื้อ *M. albus* MFC2 เพิ่มเข้าสามารถควบคุมเชื้อ *P. ultimum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถึง ~4 เท่า ($15-2=13/3$)

จุดเด่นและขีดความสามารถของผลงาน

ผลงานวิจัยชิ้นนี้เป็นครั้งแรกที่มีการประยุกต์ใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ 2 ชนิดที่แยกได้จากสมุนไพรไทยคือ *M. albus* MFC2 จากต้นจันทน์เทศ และ *Xylaria* sp. QS4 จากต้นผักหวานสามารถนำมาใช้เป็นชีวควบคุม (Biocontrol) เชื้อก่อโรครากเน่าในผักคะน้าและผักกาดหอมได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเชื้อราเอนโดไฟท์ 2 ชนิดสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตให้แก่ผักคะน้าและผักกาดหอมได้อีกด้วย นอกจากนี้เชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp. QS4 ยังช่วยให้ผักคะน้าและผักกาดหอมรอดพ้นจากการใช้ปุ๋ยที่ความเข้มข้นสูงถึง 10 เท่า จากความผิดพลาดในการเตรียมปุ๋ยของผู้วิจัยทั้ง 2 คน การใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ *M. albus* MFC2 และ *Xylaria* sp. QS4 ก็เพื่อไม่ให้เหมือนกับสิทธิบัตรที่ Prof. Strobel ได้จดไว้ รวมทั้งผลงานที่มีมาก่อนหน้าเป็นการใช้เชื้อราที่แยกมาจากดินเช่นเชื้อ *Trichoderma* sp. ที่สำคัญได้มีการรับรองจาก Environmental Protection Agency ของประเทศสหรัฐอเมริกาว่าเชื้อ *Muscodor albus* สายพันธุ์ ที่ Prof. Strobel ได้จดสิทธิบัตรนี้ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม จากผลงานวิจัยชิ้นนี้ก็พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง *M. albus* MFC2 และ *Xylaria* sp. QS4 ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ สิ่งแวดล้อม และสามารถนำไปใช้ยับยั้งศัตรูพืชแทนสารเคมีเพื่อช่วยในการพัฒนาและปรับปรุงผลผลิตทางการเกษตรได้จริง กล่าวคือในช่วงของการทำการวิจัย ได้มีหนูที่อาศัยอยู่บริเวณโรงเรือนเพาะชำจำลองมากัดกินต้นผักกาดหอมช่วงที่ต้นผักกาดหอมมีอายุ 14 วัน แต่ก็ไม่พบว่ามีซากศพของหนูตายในบริเวณใกล้เคียงแต่อย่างใด กลุ่มของผู้วิจัย คือ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผศ.ดร.จิรพันธ์ วรพงษ์ (รูปกลาง) และผู้ช่วยวิจัยรวมทั้งตัวผู้วิจัยทั้ง 2 คนได้รับประทานผักที่ปลูกในโครงการวิจัยนี้ตั้งรูปที่แสดงข้างล่าง ส่วนผักคะน้าผู้วิจัยได้นำไปให้คุณแม่ผัดคะน้าน้ำมันหอยรับประทานที่บ้าน สมาชิกในครอบครัวและทุกคนที่ได้รับประทานผักคะน้าและผักกาดหอมก็ยังมีชีวิตอยู่และสุขภาพดีทุกคนดังภาพหมู่



ภาพแสดงผักกาดหอมที่ได้จากการทำการวิจัย และถูกนำมารับประทานภายในกลุ่มของผู้วิจัย คือ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผศ.ดร.จิรพันธ์ วรพงษ์ (รูปกลาง) และผู้ช่วยวิจัยรวมทั้งตัวผู้วิจัยทั้ง 2 คน ซึ่งเป็นผู้ถ่ายภาพนี้



การศึกษาหาเชื้อเอนโดไฟท์เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *Xanthomonas campestris* ในต้นผักกาดหอม

Screening of endophytes for control bacterial leaf spot of lettuce, *Xanthomonas campestris*

ศิริวรรณ รุ่งอินทร์¹ มนต์ฤดี ศรีไทรทรัพย์² และ จีรพันธ์ วรพงษ์²

1) สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* ในผักกาดหอม
2. เพื่อศึกษาเชื้อเอนโดไฟท์จากข้อ 1 ว่า มีผลต่อการงอกและเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอมหรือไม่เมื่อปลูกในแปลงปลูก

บทนำ

ผักกาดหอมเป็นผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่นับวันจะทวีความจำเป็นต้องเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แต่การปลูกผักกาดหอมมักประสบกับปัญหาโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* ชาวสวนรู้จักกันดีในนามของโรคเน่าดำ (Bacterial leaf spot) เพราะลักษณะอาการของพืชที่แสดงออกมาก โดยทั้งแปลงจะมีใบเป็นสีน้ำตาลหรือเหลืองคล้ายสีทอง นับเป็นโรคก่อให้เกิดความเสียหายมาก ต่อการผลิตผักกาดหอมเนื่องจากเชื้อสาเหตุ สามารถเข้าทำลายทุกระยะการเจริญเติบโตการป้องกันและกำจัด เกษตรกรผู้ปลูกมักใช้สารเคมีที่มีราคาแพงและเป็นพิษ งานวิจัยนี้จึงเสนอชีววิธีจากเชื้อราเอนโดไฟท์ *Muscodor albus* strain MFC2 และ การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์อื่น ๆ ที่ได้จากพืชสมุนไพรเพื่อ ควบคุมเชื้อก่อโรคเน่าดำในต้นผักกาดหอมจากการศึกษาเชื้อเอนโดไฟท์ที่สกัดได้จากพืชสมุนไพร ในชนิดที่เป็นทั้งแบคทีเรียและรา นั้นพบว่าเชื้อเอนโดไฟท์มีการสร้างสารทุติยภูมิ ยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชในผักกาดหอมได้ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *X. campestris* ของเชื้อราเอนโดไฟท์นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร และระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ จึงได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *X. campestris* ในเรือนเพาะชำจำลองและทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมไปถึงการจำแนกชนิดของเอนโดไฟท์โดยวิธีทาง molecular เพื่อที่สามารถทราบถึงชนิดและสายพันธุ์เอนโดไฟท์ได้อย่างแท้จริง เพื่อเป็นแนวทางในการหาสูตรและอัตราส่วนอาหารที่เหมาะสมในการนำไป ใช้ในการควบคุมโรคพืชในแปลงปลูกผักกาดหอมได้จริง

วิธีการทดลอง

การทดสอบความสามารถของเชื้อเชื้อเอนโดไฟท์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 วิธี Antagonistic test นำเชื้อราเอนโดไฟท์ ทั้ง 38 สายพันธุ์ นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ PDA, GPA และ YPD ในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5, 7 และ 10 วัน ส่วนเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ TL41 และเชื้อก่อโรค *X. campestris* ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวชนิด MHB จะถูกนำไป shaking เป็นเวลา 8 และ 5 ชั่วโมงตามลำดับ นำเชื้อก่อโรค *X. campestris* ที่ความเข้มข้น 4.3×10^7 CFU จะถูก นำมา spread plate ลงบนอาหารชนิด MHA ปริมาตร 100 I จากนั้นตัดชิ้นส่วนเชื้อราที่ได้ทำการเลี้ยงไว้ตามวันที่ได้กล่าวมาแล้ว นำมาวางบน plate ที่ได้ทำการ spread เชื้อก่อโรค *X. campestris* เสร็จเรียบร้อยแล้วส่วนเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์สายพันธุ์ TL41 ที่ความเข้มข้น 8.3×10^7 CFU จะถูกหยดลงใน disk ที่ฆ่าเชื้อในปริมาตร 10 I วางบน plate ที่ได้ทำการ spread เชื้อก่อโรค *X. campestris* เช่นเดียวกันจากนั้นสังเกตความสามารถในการยับยั้งเชื้อเชื้อก่อโรค *X. campestris* โดยการสังเกต เคลียร์โซนที่เกิดขึ้น

การทดสอบความสามารถของเชื้อเอนโดไฟท์ในเรือนเพาะชำจำลอง

ในการทดลองนี้จะใช้สายพันธุ์ผักกาดหอมที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ผักกาดหอมสายพันธุ์ Grand Rapid ที่ใบไม่ห่อเป็นหัว ที่นิยมปลูกกันทั่วไปในประเทศไทยและทนต่ออากาศร้อนได้ดีกว่า โดยจะทำการปลูกกระถางละ 25 เม็ด ส่วนกระถางที่ใช้ปลูกจะมีขนาด 20x20 ซม. และในระบบการปลูกที่ 1 และ 2 ใช้วัสดุปลูกกระถางละ 500 กรัม แต่ละชุด ทำ 3 ซ้ำ จำนวน 2 ครั้ง แต่ละระบบจะมีชุดการทดลอง 5 ชุดดังนี้

ชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุมดังนั้นจึงไม่มีการใส่เชื้อใด ๆ ลงไปในกระถาง

ชุดที่ 2 เป็นชุดที่ใส่ *X. campestris* ที่มีความเข้มข้น ปริมาณ 4.3×10^7 CFU 25 ml และเชื้อราเอนโดไฟท์อายุ 10 วัน จำนวน 6 plate ส่วนเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ที่ความเข้มข้น 8.3×10^7 CFU ปริมาตร 50 ml

ชุดที่ 3 เป็นชุดที่ใส่เชื้อ *X. campestris* ที่มีความเข้มข้นปริมาณ 4.3×10^7 CFU 25 ml และเชื้อราเอนโดไฟท์อายุ 10 วัน จำนวน 2 plate ส่วนเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ความเข้มข้น 8.3×10^7 CFU ปริมาตร 25 ml

ชุดที่ 4 เป็นชุดที่ใส่เชื้อราเอนโดไฟต์อายุ 10 วัน จำนวน 2 plate ส่วนเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ที่ความเข้มข้น 8.3×10^7 CFU ปริมาตร 25 ml

ชุดที่ 5 เป็นชุดที่ใส่เชื้อ *X. campestris* ที่มีความเข้มข้น ปริมาณ 4.3×10^7 CFU 25 ml

การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเอนโดไฟท์โดยจะทำการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทาง **molecular** พื้นฐาน ดังนี้

1. การสกัดแยกสารพันธุกรรมทั้งหมดจากเชื้อรา นำเชื้อราที่ต้องการสกัด DNA มาส่งดูลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้พาสเตอร์ปิเปตเขี่ยบริเวณปลายเส้นใยและนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นชุดเส้นใยเชื้อราบนอาหาร PDA ทำการล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อแล้ว จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดแล้วเติม DNA lysis buffer (pH 8) 400 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม Tris-HCl 100 ไมโครลิตร แล้วทำการดูใส่ Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หากส่วนผสมมีความหนืดมาก เติม lysis buffer เพิ่มได้แต่ไม่ควรเกิน 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสมา 400 ไมโครลิตร เก็บไว้ Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ เติม 400 ไมโครลิตร Chloroform:TE-saturated phenol 1:1 แล้วผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นนำมาปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายในชั้นบนสุดซึ่งมี DNA ละลายอยู่ประมาณ 300-350 ไมโครลิตร เก็บไว้ Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ เติม 3 M NaOAc (pH 8) 10 ไมโครลิตร และ Isopropanol 0.54 เท่าของปริมาตรสารละลาย DNA และเขย่าไปมาเบาๆ ให้สารละลายผสมกัน จะสังเกตเห็นตะกอน DNA สีเหมือนวุ้นเส้น นำมาปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 ครั้ง เท 70% ethanol ออกและตากตะกอน DNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-30 นาที ละลายตะกอน DNA ด้วย TE Buffer หรือน้ำกลั่น B3 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที ปริมาณ 20-40 ไมโครลิตร ก่อนนำไปใช้และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์ DNA โดยวิธี gel electrophoresis

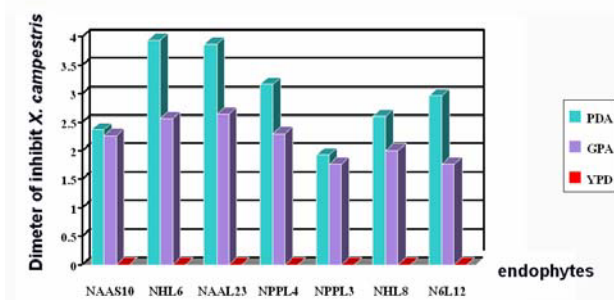
2. การทำ PCR สำหรับใบพืชตัวอย่างที่ทำการสกัดเอา DNA เชื้อราโดยตรงใช้ Universal ITS Primer ในการทำ PCR ซึ่งในหนึ่งปฏิกิริยามีปริมาตรสารรวม 50 ไมโครลิตรจะประกอบด้วย 10X Taq Buffer with 15mM $MgCl_2$, 5X Enhancer, 2U Taq polymerase (Finnzymes), 10mM dNTP, 25μM Primer และ DNA 1 ไมโครลิตร ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ Initial Denaturation ที่ 96 องศาเซลเซียส 2 นาที Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที โดยทำการเพิ่มจำนวนทั้งหมด 30 cycles และ Final Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที (Kong *et al.*, 2003) จากนั้นทำการวิเคราะห์ PCR product ด้วยการ run agarose electrophoresis gel นำ PCR product ของเชื้อราส่งตรวจดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราในฐานข้อมูลของ NCBI

ผลการทดลอง

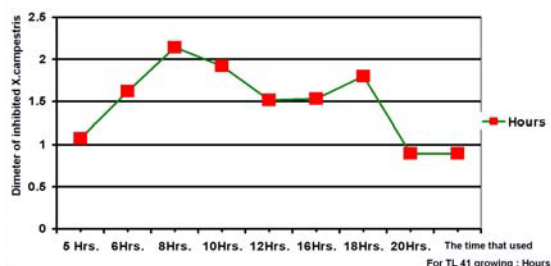
ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อ *X. campestris* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDA, GPA และ YPD

จากการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 38 สายพันธุ์ พบว่า 7 สายพันธุ์ คือ NHL6, NAAS10, NAAL23, NPPL3, NAAL4, NHL8, N6L12 และแบคทีเรียเอนโดไฟท์ สายพันธุ์ TL41 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ส่วนเอนโดไฟท์ *M. albus* strain MFC2 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* ได้ เชื้อราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ NAAL23 จะมีประสิทธิภาพในการสร้างสารทุติยภูมิยับยั้ง *X. campestris* ในอาหารชนิด PDA ได้ดีกว่าในอาหาร GPA ส่วนอาหารชนิด YPD นั้นพบว่าไม่สามารถทำให้เกิดเคลียร์โซน แต่เชื้อเอนโดไฟท์สามารถที่จะเจริญเติบโตบนอาหารได้เท่านั้น (กราฟที่ 1) ส่วนความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ TL41 อายุ 8 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* ได้ดีที่สุด (กราฟที่ 2)

กราฟที่ 1 เชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ NAAL23 จะมีประสิทธิภาพในการสร้างสารทุติยภูมิยับยั้ง *X. campestris* ในอาหารชนิด PDA GPA และ YPD



กราฟที่ 2 ความสามารถของเชื้อสายพันธุ์ TL41 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* ที่เวลาต่างๆ



ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อเอนโดไฟต์ในเรือนเพาะชำจำลอง

เมื่อนำเชื้อราปฏิปักษ์ไปทดสอบประสิทธิภาพ การควบคุมโรคในเรือนเพาะชำจำลอง ชุดการทดลองในดินทางการค้าทั่วไปพบว่าช่วงอัตราการงอกที่ 7 และ 14 วัน พบว่าอัตราการงอกของเมล็ดผักกาดหอมลดลง เนื่องจากการผสมเชื้อลงดินมีส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เชื้อก่อโรคลายพันธุ์อื่นเจริญเติบโตได้ดีทำให้ไปยับยั้งการงอกของเมล็ด แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตภายหลังการงอก 14 วัน สามารถลดความรุนแรง ควบคุมโรคเน่าดำได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังสนับสนุนการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอมอีกด้วย ดังนั้นเชื้อสายพันธุ์ NAAL23 และ TL41 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้อย่างแตกต่างทางสถิติ ดังตารางที่ 1 และ 2 และรูปที่ 2

ส่วนการทดสอบที่ใช้วัสดุปลูกเห็ดพบว่าอัตราการงอก 7 และ 14 วันมีอัตราการงอกน้อยมาก นอกจากนี้ยังพบเชื้อราไม่พึงประสงค์เกิดขึ้นและส่งผลให้ม้อัตรการตายของต้นผักกาดหอม ดังนั้นวัสดุปลูกเห็ดจึงไม่เหมาะสมในการปลูกผักกาดหอม

ผลการจำแนกสายพันธุ์เอนโดไฟต์ TL41 และ NAAL23 ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของสายพันธุ์ TL41 โดยใช้ (Primer 27F-1522R) และ Blast และเปรียบเทียบข้อมูลใน Genbank สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ TL41 ดังนี้ Prokaryota; Bacterial Firmicutes; Bacillales; Paenibacillaceae; *Paenibacillus* สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์สายพันธุ์ TL41 ที่ความเหมือน 99.44% คือ *Paenibacillus polymyxa* strain GBR 472 ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่พบในเห็ดและต้นหนอนตายอยากจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ยีน ITS1-5.8S-ITS2 ของสายพันธุ์ NAAL23 สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ NAAL23 ดังนี้ Eukaryota; Fungi Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Leptosphaeriaceae; mitosporic; Leptosphaeriaceae; *Ampelomyces* และสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ NAAL23 ที่ 1 ความเหมือน 99.42% คือ *Ampelomyces* sp. Po59 ที่พบในต้นไม้เขตร้อนชื้น

ตารางที่ 1. ผลของเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ NAAL23 ต่ออัตราการงอกและการเจริญเติบโตผักกาดหอม

Treatment	%Germination 7 day	%Germination 14 day	33-day old after planting	
	Soil	Soil	High	Fresh weight
Non-infested control	24.0a	24.0a	15.9a	2.2a
NAAL23 6 plate + <i>X. campestris</i> 25 ml	14.0b	15.0b	17.4ad	2.0a
NAAL23 2 plate + <i>X. campestris</i> 25 ml	17.3b	18.3b	18.3bd	3.3b
NAAL23 6 plate	11.0b	12.0c	18.2bd	2.8b
<i>X. campestris</i> 25 ml	13.8b	12.7c	9.7c	0.5c

ตารางที่ 2. ผลของเชื้อราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ TL41 ต่ออัตราการงอกและการเจริญเติบโตผักกาดหอม

Treatment	Germination 7 day	Germination 14 day	37-day old after planting	
			High	Fresh weight
Non-infested control	18.2a± 0.24a	19.2a ± 0.22a	18.1a± 0.04a	3.1a± 0.02a
TL41 25 ml + <i>X. campestris</i> 25 ml	1.2b ± 0.05b	8.7b ± 0.12b	16.2a± 0.06a	2.5a± 0.01a
TL41 50 ml + <i>X. campestris</i> 25 ml	5.3b ± 0.08b	13.3b ± 0.12b	18.2a ± 0.06a	2.9a± 0.02a
TL41 50 ml	5.5b ± 0.22b	13.8b ± 0.28b	16.9a ± 0.03a	3.0a± 0.02a
<i>X. campestris</i> 25 ml	5.1b± 0.04b	10.3b ±0.09 b	12.5b ± 0.02b	1.5b± 0.01b

รูปที่2. แสดงการเจริญเติบโตของต้นผักกาดหอมระยะเก็บเกี่ยวที่แสดงความสามารถในการควบคุมเชื้อก่อโรคนำดำในเรือนเพาะชำจำลอง (A), อัตราการงอกของต้น กาดหอมที่ 14 วัน (B) T1=ชุดควบคุม, T2=ผสมเชื้อเอนโดไฟท์ NAAL23 6 plates + *X. campestris* 4.3x10⁷CFU, T3= ผสมเชื้อเอนโดไฟท์ NAAL23 2 plates + *X. campestris* 4.3x10⁷CFU, T4= ผสมเชื้อเอนโดไฟท์NAAL23 6plates,T5=ผสม *X. campestris* 4.3x10⁷CF



ผลสรุปการทดลอง

ผลจากการทดสอบด้วยวิธี antagonistic test พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ NAAL23 หรือเชื้อ *Ampelomyces* sp. ที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิในการยับยั้งเชื้อ *X. campestris* pv *campestris* ได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA เส้นผ่านศูนย์กลางเคลียร์โซนเท่ากับ 3.86 เซนติเมตรและเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ TL41 หรือเชื้อ *P. polymyxa* อายุ 8 ชั่วโมงสามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคนำดำ *X. campestris* ได้ดีที่สุด บนอาหาร MHA ที่เส้นผ่านศูนย์กลางเคลียร์โซนเท่ากับ 2.14 เซนติเมตร

ผลการทดสอบในเรือนเพาะชำจำลองโดยผสมดินในอัตราส่วน 1:1 ของดินจากแปลงปลูกผักจริงและดินที่ขายตามท้องตลาด ปริมาณ 500 กรัมต่อกระถาง พบว่ากระถางที่ผสมเชื้อ NAAL23 หรือเชื้อ *Ampelomyces* sp. อายุ 10 วัน จำนวน 2 plate และกระถางที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย TL41 หรือเชื้อ *P. polymyxa* ที่ความเข้มข้น 8.3x10⁷CFU สามารถควบคุมเชื้อ *X. campestris* ที่ความเข้มข้น 4.3x10⁷CFU ได้ในระดับหนึ่งทำให้อัตราการงอกของผักกาดหอมน้อยกว่ากระถางของชุดควบคุมที่ไม่มีการผสมเชื้อใด ๆ แต่มากกว่ากระถางที่ผสมเชื้อ *X. campestris* เพียงเชื้อเดียว ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ในขณะที่กระถางที่ผสมเชื้อ NAAL23 หรือเชื้อ *Ampelomyces* sp. เพียงเชื้อเดียว จำนวน 6 plate ทำให้อัตราการงอกของผักกาดหอมน้อยกว่ากระถางของชุดควบคุมและกระถางที่ผสมเชื้อก่อโรคนำดำเพียงเชื้อเดียวที่ความเข้มข้นดังกล่าว ในทางกลับกันกระถางที่ผสมเชื้อแบคทีเรีย TL41 หรือเชื้อ *P. polymyxa* ที่ความเข้มข้นดังกล่าวปริมาตร 50 ml ทำให้อัตราการงอกของผักกาดหอมน้อยกว่ากระถางของชุดควบคุมแต่มากกว่ากระถางที่ผสมเชื้อก่อโรคนำดำเพียงเชื้อเดียว ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหาความเข้มข้นของเชื้อเอนโดไฟท์ทั้งสองที่เหมาะสมต่อไป

การควบคุมเชื้อก่อโรคฟิธีโอซิสในคน *Pythium insidiosum* โดยใช้สารทุติยภูมิที่สกัดจากเชื้อเอนโดไฟท์
Control of the human phythiosis pathogen (*Pythium insidiosum*) using secondary metabolite crude extract
from endophytes

วรินทร์พิภพ ชยัทธภูมิรัตน์¹, มนต์ฤดี ศรีไทรทรัพย์¹, ศิริพร ดันดิโพธิ์พิพัฒน์²,
ธีรพงษ์ กระแจะจันทร์³ จีรพันธ์ วรพงษ์¹

¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

²สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม

³ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี

วัตถุประสงค์

เพื่อหาสารทุติยภูมิจากเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. insidiosum*

บทนำ

โรค pythiosis เป็นโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ (emerging infectious disease) เกิดจากเชื้อ *P. insidiosum* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม oomycetes และจัดอยู่ใน Kingdom Chromista (เชื้อในกลุ่มนี้มีลักษณะเฉพาะทาง physiology และ genetics ที่ ไม่เหมือน และ ไม่ถือเป็น เชื้อในกลุ่ม fungi, viruses, bacteria หรือ parasites) โรคนี้มีความรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต พบได้ทั้งในคนและในสัตว์ เช่น สุนัข แมว ม้า และวัว ที่อาศัยอยู่ในประเทศเขตร้อน ในธรรมชาติ เชื้อ *P. insidiosum* อาศัยอยู่ในน้ำหรือที่ชื้นแฉะ ในรูปของสายรา (รูปที่ 1) เมื่อมีสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม เชื้อ *P. insidiosum* สามารถสร้าง zoospore (รูปที่ 1) ซึ่งมี flagella ช่วยในการว่ายน้ำ Zoospore เป็นส่วนสำคัญของกระบวนการติดเชื้อ เมื่อ zoospore ว่ายน้ำมาสัมผัสกับผิวหนังหรือเยื่อต่างๆ ของคนหรือสัตว์ จะออกเป็นสายรา (hyphae) ขอนไชไปสู่เนื้อเยื่อที่อยู่ลึกลงไป และก่อให้เกิดพยาธิสภาพ



รูปที่1. แสดงถึงลักษณะและรูปร่างของเชื้อ *P. insidiosum* ผ่านกล้องจุลทรรศน์ (ซ้าย) เส้นใย (ขวา) Zoospores ที่อยู่ในถุงบริเวณ hyphal tip (Krajaeun et al. Am J Ophthalmol 2004)

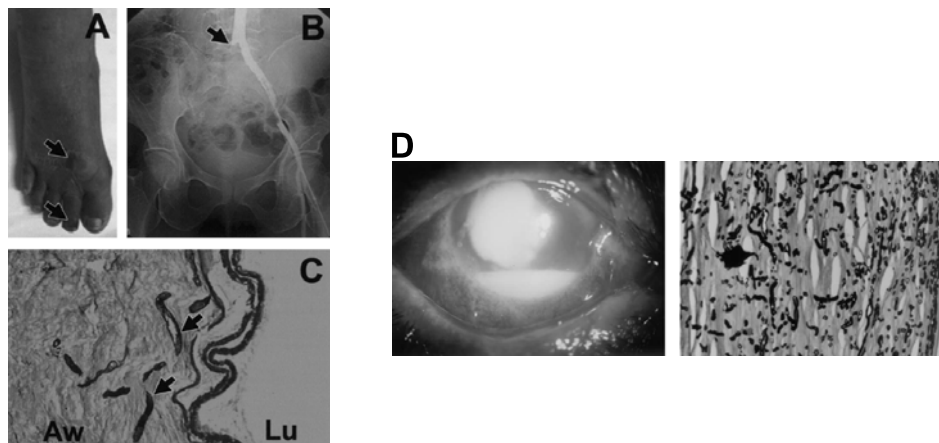
โรค pythiosis ในคนนั้น พบครั้งแรกในประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2528. หลังจากนั้น มีรายงานการพบผู้ป่วยเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยจากประเทศไทย จึงถือได้ว่าประเทศไทยเป็น endemic area ของโรค pythiosis ในคน แต่เนื่องจากบุคลากรทางการแพทย์ส่วนใหญ่ยังไม่รู้จักคุ้นเคยกับโรค และข้อมูลของโรคก็มีอยู่น้อย น.พ. ธีรพงษ์ กระแจะจันทร์ และคณะ จึงได้รวบรวมข้อมูลผู้ป่วยโรค pythiosis ที่วินิจฉัยระหว่างปี พ.ศ. 2528 ถึง 2546 จาก 9 โรงพยาบาลทั่วประเทศ มาวิเคราะห์ทางคลินิกและทางระบาดวิทยา (Krajaeun et al., Clin Infect Dis 2006; 43:569-76) เพื่อให้เข้าใจโรคในทางคลินิกมากขึ้น และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวิจัยแง่มุมอื่น ในการศึกษาครั้งนี้ พบผู้ป่วยจำนวน 102 ราย โดย 40% ของผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยในช่วง 3-4 ปีสุดท้ายของการศึกษา แสดงถึงแนวโน้มที่จะพบโรค pythiosis มากขึ้นในอนาคต ลักษณะทางคลินิกของโรค pythiosis สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ:

(1) ติดเชื้อที่ผิวหนัง (cutaneous/subcutaneous form): พบ 5% ของผู้ป่วยทั้งหมด. ผู้ป่วยมาด้วยแผลเรื้อรัง ฝี-หนอง หรือการอักเสบของชั้นผิวหนังและใต้ผิวหนังบริเวณใบหน้า แขน หรือขา ส่วนใหญ่สามารถรักษาได้ด้วย saturated solution potassium iodide

(2) ติดเชื้อที่เส้นเลือดแดง (vascular form): พบ 59% ของผู้ป่วยทั้งหมด. ผู้ป่วยมาด้วย claudication หรือ gangrene ที่ขา เพราะมีการติดเชื้อที่ผนังหลอดเลือดแดงจนเกิดการอุดตัน (รูปที่ 1) ส่วนใหญ่ (~80% ของผู้ป่วย) รักษาโดยการตัดขาข้างที่ติดเชื้อทั้ง ในรายที่มีการติดเชื้อรุกรามมากก็อาจเสียชีวิตได้จากการแตกของหลอดเลือดแดงใหญ่ (~40% ของผู้ป่วย)

(3) ติดเชื้อที่ตา (ocular form): พบ 33% ของผู้ป่วยทั้งหมด ผู้ป่วยมักจะมาด้วยแผลที่กระจกตา ประมาณ 2-3 สัปดาห์ (รูปที่ 2) การติดเชื้อมักลุกลาม ต้องรักษาโดยการผ่าตัดนำลูกตาข้างที่ติดเชื้อออก (~80% ของผู้ป่วย)

(4) ติดเชื้อบริเวณอื่น (disseminated form): พบ 3% ของผู้ป่วยทั้งหมด ผู้ป่วยในกลุ่มนี้พบติดเชื้อที่เนื้อสมอง ที่โพรงจมูก และไขสันหลัง หรือที่กระเพาะและลำไส้ ผู้ป่วยทั้งหมดในกลุ่มนี้เสียชีวิต



รูปที่ 2 ข้อมูลทางคลินิกและลักษณะรูปร่างของ vascular pythiosis **A**, คนไข้ที่เป็นทาลัสซีเมียและมีบาดแผลบริเวณฝ่าเท้า (ลูกศรชี้) **B**, บริเวณเส้นเลือด (ลูกศรชี้) ที่มีการติดเชื้อ **C**, การย้อมสีดูการติดเชื้อที่เส้นเลือดด้วย Gomori methenamine silver (GMS) (Krajaeun et al. Clin Infect Dis 2006) **D**, ocular pythiosis (ซ้าย) ดวงตาที่มีการติดเชื้อ (ขวา) ส่วนของ hyphae ใน corneal stroma (GMS;x40) (Krajaeun et al. Am J Ophthalmol 2004)

จากข้อมูลทางระบาดวิทยา พบมีผู้ป่วยกระจายอยู่ทั่วประเทศ จึงบ่งชี้ว่ามีการกระจายของเชื้อ *P. insidiosum* อยู่ทั่วประเทศ จากลักษณะภูมิศาสตร์ พบว่าน่าจะมีการกระจายของเชื้อที่ประเทศเพื่อนบ้านด้วย ยังพบด้วยว่า มีปัจจัยบางประการที่สัมพันธ์กับผู้ป่วยโรค pythiosis เช่น การทำอาชีพเกษตรกรรม (75% ของผู้ป่วย) ซึ่งเป็นอาชีพหลักของคนไทย, ช่วงอายุ 20-60 ปี (86%) ซึ่งเป็นช่วงวัยทำงาน, และเป็นเพศชาย (71%) นอกจากนี้ พบว่าผู้ป่วย cutaneous, vascular และ miscellaneous pythiosis ทุกคน มี underlying hematological disorders โดยโรค underlying ที่พบเด่นชัดคือ thalassemia (85%) ซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมที่พบบ่อยในประเทศไทย ส่วนผู้ป่วย ocular pythiosis นั้น ส่วนใหญ่ (84%) ไม่พบมีโรคประจำตัวใดๆ ข้อมูลนี้จึงบ่งชี้ว่ามีปัจจัยบางประการที่ส่งเสริมให้ผู้ป่วยโรคเลือด ติดเชื้อ *P. insidiosum* จนเกิดพยาธิสภาพอย่างไรก็ตาม ผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว ก็สามารถติดเชื้อ *P. insidiosum* ได้

เนื่องจากการพบผู้ป่วยโรค pythiosis รายใหม่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะในประเทศไทย แต่ปัญหาสำคัญของโรค pythiosis คือ มีอัตราทุพพลภาพและอัตราการตายที่สูง เนื่องจากการรักษาทางยาที่มีอยู่ในปัจจุบันใช้ไม่ได้ผล และวัคซีนที่ใช้รักษาโรคมีประสิทธิภาพต่ำ การรักษาหลักจึงต้องใช้การผ่าตัดเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ติดเชื้อออกให้หมดซึ่งทำให้เกิดความพิการจึงมีความจำเป็นรีบด่วนในการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ๆ ที่ดีขึ้น เพื่อลดอัตราทุพพลภาพและอัตราการตายจากโรค

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* ของเชื้อเอนโดไฟท์ที่อยู่ใน Culture collection บนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเชื้อเอนโดไฟท์ที่อยู่ใน Culture collection มาวางคว่ำลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, GPA และ Modified PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้ว ลงเชื้อ *P. insidiosum* อายุ 8 ชม. ลงรอบๆ เชื้อเอนโด

ไฟท์ ให้ห่าง 1 cm จำนวน 5 จุด สำหรับชุดควบคุมเชื้อ *P. insidiosum* ลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเชื้อเอนโดไฟท์ แล้วนำจานอาหารทดลองทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C สังเกตและบันทึกผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน แล้ว ในวันที่ 1, 3 และ 5 วัดและบันทึกการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมเปรียบเทียบกับชุด Dual antagonistic test แล้วนำมาคำนวณตามสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

โดย R1 คือ รัศมีของเชื้อ *P. ultimum* ที่เป็น control R2 คือ รัศมีของเชื้อ *P. ultimum* ด้านที่เจริญติดกับเชื้อเอนโดไฟท์

2. การทดสอบความสามารถของเชื้อเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* จากเชื้อที่มี % inhibition สูงลง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA , GPA และ Modified PDA ที่ อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 วัน เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* โดยนำเชื้อเอนโดไฟท์และเชื้อ *P. insidiosum* มาวางห่างกัน 3 cm คว่ำลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, GPA และ Modified PDA นำ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 วัน สำหรับชุดควบคุมเชื้อ *P. insidiosum* กับชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ

ที่ใช้เลี้ยงเอนโดไฟท์ห่างกัน 3 cm แล้วนำจานอาหารทดลองทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C สังเกตและบันทึกผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวัน ทำการวัดและบันทึก รัศมีการเจริญของเชื้อ *P. insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม แล้วทำการเปรียบเทียบชุดควบคุมกับชุด Dual antagonistic test และคำนวณเป็น % inhibition ตามสูตรข้างต้น

3. วิธีการสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นจากเชื้อเอนโดไฟท์ด้วย Ethyl Acetate

เอนโดไฟท์ที่แยกได้จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามวิธีของ Strobel et al. (2002) ปริมาตร 500 มล. ใน Flask 1,000 ml นาน 14 วัน หลังจากนั้น ส่วนของ Culture broth จะถูกนำไปสกัดหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น (crude extract) ด้วย Ethyl Acetate ปริมาตร 500 มล. 2 ครั้ง และ ระเหยแห้งด้วย Rotary Evaporator หลังจากนั้นส่วนของ crude extracts ที่เตรียมได้นำไปทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ *P. insidiosum* ยังห้องปฏิบัติการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ต่อ ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามารับดี

4. การแยกสารทุติยภูมิบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้ Thin Layer Chromatography

แยกสารทุติยภูมิบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้ Thin Layer Chromatography เพื่อแยกสารสกัดจาก both culture ให้ได้แบบของ สารต่าง แล้วทดสอบการยับยั้งการเจริญ ของแต่ละแบบ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำเชื้อ *P. insidiosum* ที่อยู่มาวางคว่ำลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วจึงนำ crude ของแต่ละแบบหย่อนลงในหลุม แล้วหยดน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร แล้วนำจานอาหารทดลองทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C สังเกตและบันทึกผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. การจำแนกชนิดของเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยรูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาและกระบวนการทางชีวเคมี

รูปร่างลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อเอนโดไฟท์ อาทิเช่น ลักษณะของเส้นใย ลักษณะของโคโลนี และ สปอร์ และ ถ้าเอนโดไฟท์นั้นๆ ไม่สร้างสปอร์หรือโครงสร้างที่เป็นประโยชน์ต่อการจำแนกชนิด วิธีอื่นๆวิธี และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ rRNA (Molecular Phylogeny) จะถูกนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเอนโดไฟท์ ตามวิธีของ White et al., 1990 วิธีโดยสรุปคือบดเส้นใยเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth เป็นเวลา 1-2 วัน ด้วย Liquid Nitrogen ทำให้อาจแตกด้วย สารละลาย Lysis Buffer แล้วตกตะกอนโปรตีนและไขมันด้วย Isoamyl alcohol: Chloroform 1:24 แล้วแยกสกัดและล้าง DNA ด้วย Sodium acetate and 70 % alcohol หลังจากนั้น ปริมาณ DNA ทั้งหมด จะ ถูกนำไปขยายผลเพิ่มปริมาณ rDNA ของ ITS1&2 ด้วย Universal primers ITS1 & ITS4 (White et al., 1990) ส่ง Sequence และ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1&2 ที่มีอยู่ใน GenBank

ผลการทดลอง

ตาราง 1. แสดงความสามารถของเชื้อเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* 3 days

ลำดับที่	เชื้อ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>P. ultimum</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ		
		PDA	GPA	Modified PDA
1	K1น22	100	100	100
2	K1น21	100	100	100
3	N6L12	100	100	100
4	NAAS10	100	100	100
5	NAAL5	100	100	100
6	NHL8	100	100	100
7	NHL6	100	100	100
8	N1L1	100	100	100
9	NKL14	100	100	100
10	N4L3	100	100	100
11	NAAL9	100	100	100
12	NAAS12	100	100	100
13	NPPS9	100	100	100
14	NFL5	100	100	100
15	N7L11	100	100	100
16	N5L4	100	100	100
17	NPPL1	100	100	100
18	N7L9	100	100	100
19	NAAf12	100	100	100
20	NAAf10	100	100	100
21	K6น10/1	100	100	100
22	K1น5/1	100	100	100
23	N7L1	100	100	100
24	NfL3	100	100	100
25	NAAf1	100	100	100
26	NHL20	100	100	100
27	NAAL7	100	100	100
28	QS4	100	100	100
29	TL41	100	100	100
30	NJL4	100	100	0
31	K6L15	100	0	100
32	NPPS4	100	0	0
33	Qb10	100	0	0
34	NHL12	100	no	no
35	NPPS3	100	97.64	100
36	NJS4	93.88	100	100
37	AL38	88.24	88.20	92.89
38	JL2	96.24	90.86	90.99
39	Qb17	90.35	89.62	85.54
40	N3S9	96.94	95.04	94.07
41	N2L6	89.65	91.74	97.03
42	RSb8	97.65	93.63	96.08
43	Qb25	96.41	97.53	96.23
44	NHL15	91.62	89.88	89.31
45	RPR2	97.60	92.59	97.48
46	RTJ3	87.34	90.12	84.78
47	RSSL2	93.42	91.11	82
48	Qb21	97.60	no	88.68
49	PRS18	86.33	no	85.61
50	RSb3	no	no	no
51	K6น10/2	no	no	no

หมายเหตุ no หมายถึง เชื้อ *P. ultimum* เจริญทับเชื้อเอนโดไฟท์จนไม่สามารถวัดระยะได้

ตาราง 2. แสดงความสามารถของเชื้อเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* 3 days

ลำดับที่	เชื้อ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>P. insidiosum</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ		
		PDA	Modified PDA	GPA
1	TL41	85.48	87.50	95.24
2	QS4	74.10	50.79	72.73
3	NAAL7	89.16	76.98	89.77
4	RSb8	96.39	77.78	91.48
5	NHL12	80.72	68.25	81.82
6	NHL15	80.61	75.00	82.98
7	N2L6	72.45	59.21	69.15
8	RPR2	74.49	66.45	70.21
9	RTJ3	57.14	51.32	58.51
10	RRS18	69.39	no	69.68
11	Qb25	80.61	72.37	73.40
12	K1n5/1	no	no	83.51
13	N5L4	no	94.74	96.81
14	NJS4	no	no	84.04
15	RSSL2	no	no	60.11
16	N7L1	no	no	no
17	K6n10/1	no	no	no
18	N6L12	no	no	no
19	NPPS9	no	no	no
20	K1n22	no	no	no
21	NAAS10	no	no	no
22	N3S9	no	no	no
23	NAAf1	no	no	no
24	NAAL5	no	no	no

หมายเหตุ no หมายถึง เชื้อ *P. insidiosum* เจริญทับเชื้อเอนโดไฟท์จนไม่สามารถวัดระยะได้

ตาราง 3. แสดงข้อมูลของเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum*

Strain	Host	ITS identification	% inhibition with <i>P. ultimum</i>	% inhibition with <i>P. insidiosum</i>
TL41	<i>Paederia linearis</i> Hook.f.	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	100 (All)	95.24 (GP)
QS4	<i>Melientha suavis</i> Pierre	<i>Xylaria</i> sp.	100 (All)	74.10 (PDA)
NAAL7	<i>Costus speciosus</i>	<i>Dothideomycete</i> sp.	100 (All)	89.77 (GP)
RSb8	<i>Jatropha gossypifolia</i>	<i>Myrothecium</i> sp.	97.65 (PDA)	96.39 (PDA)
N5L4	Unknown	<i>Dothideomycete</i> sp.	100 (All)	96.81 (GP)
K1n5/1	<i>Amorphophallus</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	100 (All)	83.51 (GP)
NHL12	<i>Osmanthus fragrans</i>	<i>Phyllosticta citrullina</i>	100 (PDA)	81.82 (GP)
NHL15	<i>Osmanthus fragrans</i>	<i>Ascomycota</i> sp.	91.62 (PDA)	82.98 (GP)
RPR2	<i>Kaempferia pulchra</i> Ridl.	<i>Chaetomium</i> sp.	97.60 (PDA)	74.49 (PDA)
N2L6	Unknown	Not done	97.03 (Modi)	72.45 (PDA)
RRS18	<i>Oraxylum indicum</i> (L.) Vent	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	90.12 (GP)	69.68 (GP)
RTJ3	<i>Flacourtia indica</i> (Burm.f.) Merr	Not done	90.12 (GP)	58.51 (GP)

หมายเหตุ All หมายถึง เชื้อเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Pythium* sp. ได้ทั้ง 3 อาหาร Unknown หมายถึง ไม่ทราบชื่อ Host ตั้งแต่ 57-96% เชื้อราเอนโดไฟท์เหล่านั้นได้แก่เชื้อ

ตาราง 4. แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* ของสารสกัดจาก TLC 100 ul (0.1mg/ul DMSO) ของเชื้อเอนโดไฟท์ในวัฒนธรรมที่ 2 (บรรทัดแรก) และ ในวัฒนธรรมที่ 3 (บรรทัดที่ 2)

Strain	จำนวน Band	% inhibition against <i>P. insidiosum</i>
<i>Dothideomycete</i> sp. NAAL7	6	B1=6%, B2=18%, B3=9%, B4=6%, B5=15%, B6=10% B1=14%, B2=17%, B3=11%, B4=9%, B5=17%, B6=9%
<i>Myrothecium</i> sp. RSb8	3	B1=31%, B2=29%, B3=23% B1=32%, B2=30%, B3=27%
<i>Dothideomycete</i> sp. N5L4	3	B1=3%, B2=16%, B3=16% B1=6%, B2=16%, B3=15%
<i>Chaetomium</i> sp. RPR2	4	B1=18%, B2=24%, B3=6% B1=16%, B2=16%, B3=8%
<i>Xylaria</i> sp. Qb 25	5	B1=15%, B2=19%, B3=25%, B4=25%, B5=16% B1=17%, B2=28%, B3=27%, B4=31%, B5=15%
<i>Colletotrichum</i> sp. K1n5/1	7	B1=17%, B2=27%, B3=15%, B4=6%, B5=18%, B6=9%, B7=15% B1=21%, B2=28%, B3=14%, B4=9%, B5=17%, B6=14%, B7=19%
<i>Cladosporium cladosporioides</i> RRS18	3	B1=21%, B2=21%, B3=0% B1=21%, B2=21%, B3=14%
NJS4	3	B1=13%, B2=12%, B3=0% B1=9%, B2=16%, B3=11%

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

Pythium เป็นเชื้อราในกลุ่ม oomycete ซึ่งเป็นที่รู้จักกันว่าสามารถก่อให้เกิดโรคในพืช ตัวอย่างเช่น โรครากเน่า ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Pythium ultimum* แต่จากการศึกษาข้อมูลวิจัยเบื้องต้นของ ผศ.ดร. จีรพันธ์ วรพงษ์ ได้มีการค้นพบว่าเชื้อเอนโดไฟท์ที่เจริญบนสามารถสร้างสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ฆ่า *P. ultimum* ได้ อีกด้านหนึ่งในการแพทย์ พบว่า *Pythium* ยังสามารถก่อให้เกิดโรคร้ายแรงในคนได้ นั่นคือโรค"พิริโอซิส" ซึ่งเกิดจากเชื้อ *P. insidiosum* จึงเกิดสมมุติฐานที่ว่าถ้าเชื้อเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. ultimum* ได้แล้วเชื้อเอนโดไฟท์ก็น่าจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. insidiosum* ได้ด้วย จากสมมุติฐานดังกล่าวพบว่าเชื้อเอนโดไฟท์จาก Culture collection จำนวน 49 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. ultimum* ได้ ผลจากการทดสอบพบว่าจากเชื้อเอนโดไฟท์ 49 สายพันธุ์ดังกล่าวมีเชื้อเอนโดไฟท์จำนวน 24 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. insidiosum* ได้ คิดเป็น 48.98 เปอร์เซ็นต์ เชื้อเอนโดไฟท์ทั้ง 24 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* ตั้งแต่ 57-96% ยกตัวอย่างเช่น เชื้อราเอนโดไฟท์ *Myrothecium* sp. RSb8 แยกได้จากต้นสบู่เลือด (*Jatropha gossypifolia*), *Xylaria polymyxa* QS4 แยกได้จากต้นผักหวาน (*Melientha suavis* Pierre), *Dothideomycete* sp. NAAL7 แยกได้จากต้นเอื้องหมายนาดอกส้ม (*Costus speciosus*) และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Paenibacillus polymyxa* TL41 ซึ่งแยกได้จากต้นเถาตุตหมุดตอหมา (*Paederia linearis* Hook.f) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* 96% , 74%, 90% และ 92% บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, PDA, GP และ PDB ตามลำดับ

เนื่องจากการอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. ultimum* และ *P. insidiosum* ไม่เท่ากัน ดังนั้นวิธีการทำ Antagonistic test จึงแตกต่างกันด้วย กล่าวคือการทำ Antagonistic test กับเชื้อ *P. ultimum* จะใช้วิธีการนำเชื้อเอนโดไฟท์มาลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนเป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้ว ลงเชื้อ *P. ultimum* รอบ ๆ เชื้อเอนโดไฟท์ ให้ห่าง 1 cm จำนวน 5 จุด สังเกตและบันทึกผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. ultimum* แต่วิธีการทำ Antagonistic test กับเชื้อ *P. insidiosum* จะต่างจากเดิมเนื่องจากอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. insidiosum* ช้ากว่าของเชื้อ *P. ultimum* ดังนั้นการลงเชื้อ *P. insidiosum* รอบเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีการเจริญเติบโตอยู่ก่อนแล้วจะทำให้เชื้อเอนโดไฟท์มีการเจริญเติบโตทับเชื้อ *P. insidiosum* ที่ยังไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีพอ ทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าเชื้อเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต

ของเชื้อ *P. insidiosum* ได้หรือไม่ และไม่สามารถหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้อีกด้วย ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมในการทำ Antagonistic test กับเชื้อ *P. insidiosum* จะใช้วิธีการลงเชื้อ *P. insidiosum* พร้อม ๆ กับลงเชื้อเอนโดไฟท์ โดยวางให้เชื้อ เอนโดไฟท์ห่าง 3 cm จากขอบชั้นวุ้นของเชื้อ *P. insidiosum* วิธีนี้จะทำให้แน่ใจได้ว่าเชื้อ *P. insidiosum* มีการเจริญเติบโต และสามารถเห็นการถูกยับยั้งและหาเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งได้ แต่วิธีนี้ก็มีข้อจำกัด คือ วิธีนี้สามารถใช้ได้ดีกับเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีการเจริญเติบโตเร็วเท่ากับเชื้อก่อโรค *P. insidiosum* หลักฐานที่ยืนยันก็คือ ผลการทดสอบ Dual Antagonistic test จะแสดงว่าเชื้อ *Phoma herbarum* N6L12 ไม่สามารถยับยั้ง-ยับยั้งได้เพียงบางส่วน จากการทดสอบด้วยการวางเชื้อ *P. insidiosum* 5 จุด รอบ ๆ เชื้อเอนโดไฟท์ แต่พบว่ามีการงอกขึ้นบริเวณที่เชื้อ *Phoma herbarum* N6L12 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum*

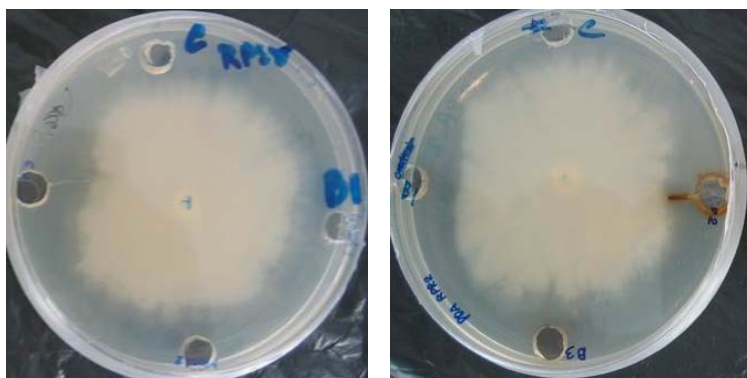
วิธีการทดสอบ Well diffusion assay ของสารกึ่งบริสุทธิ์จาก Thin Layer Chromatography จากสารทุติยภูมิควรมีการ คำนึงถึงระยะห่างระหว่างตัวสารกับเชื้อ *P. insidiosum* จากการทดสอบจะทำโดยการลงเชื้อ *P. insidiosum* ก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงลงสารสกัดผสมกับน้ำกลั่น พบว่าที่ระยะห่างระหว่างตัวสารกับเชื้อ *P. insidiosum* เท่ากับ 0.5 cm จะเห็นผลการ ยับยั้งที่ดีกว่าระยะห่างระหว่างตัวสารกับเชื้อ *P. insidiosum* 1 cm เนื่องจากระยะทางที่ห่างมากเกินไปจะทำให้ฤทธิ์ของสาร สกัดไม่สามารถไปถึงตัวเชื้อได้ และผลของ การทดสอบ Well diffusion assay ที่ผลิตจากเชื้อเอนโดไฟท์ *X. polymyxa* QS4 อายุ 14 วันใน PDB พบว่ามีสารกึ่งบริสุทธิ์จำนวน 5-6 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* (รูป 4A)

ผลการเปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งส่วนใหญ่มา จากเชื้อที่เจริญบน Glucose Peptone Agar (GPA) เนื่องจากอาหาร GPA มีกลูโคส และกรดอะมิโนที่เชื้อราสามารถใช้ได้เลย ทำให้เชื้อเอนโดไฟท์มีการเจริญเติบโตและผ่านไปยังในช่วง Stationary phase ได้เร็วจึงสร้างสารมายับยั้งการเจริญเติบโต ของ *P. insidiosum* ได้ดีกว่าในอาหารชนิดอื่น รองลงมาคือ Potato Dextrose Agar (PDA) ดังนั้นถ้ามีการทดลองเพิ่มเติม เกี่ยวกับการทดลองนี้จึงควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแค่ 2 ชนิดนี้เท่านั้น หรืออาหารชนิดอื่นๆ

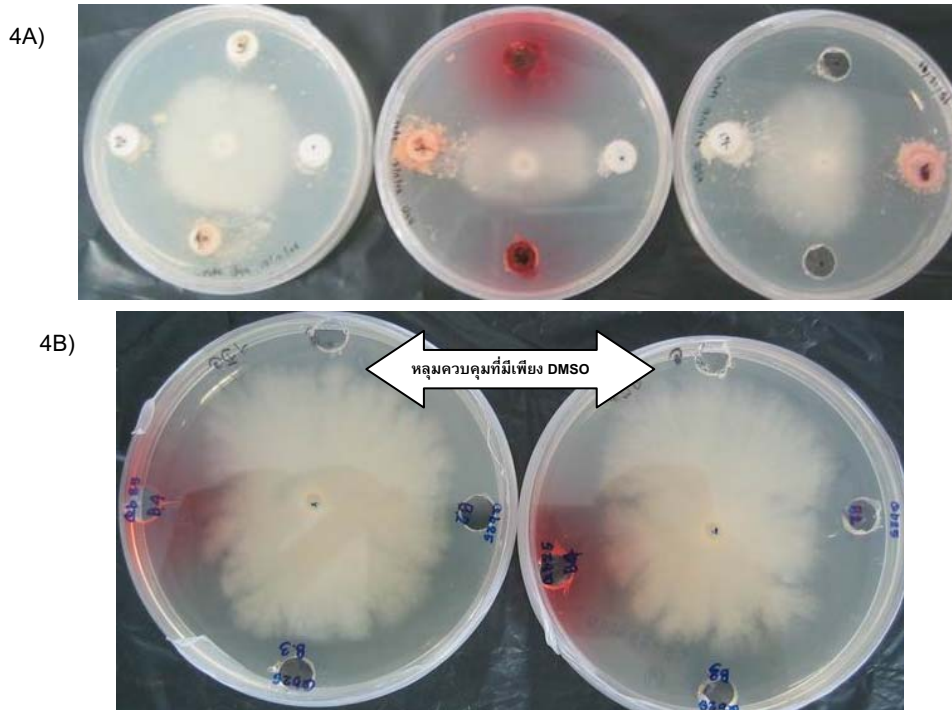
ผลจากตาราง 4. และ รูปที่ 3 แสดงสารสกัดจาก TLC 100 μ l (0.1mg/ μ l DMSO) ของเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* เชื้อราเอนโดไฟท์ *Myrothecium* sp. RSb8 เป็นเชื้อที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้ง เชื้อ *P. insidiosum* สูงกว่าเชื้อเอนโดไฟท์ตัวอื่นๆ แต่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* น้อยกว่าการทดสอบแบบ Dual co-culture มากอาจเป็นเพราะสารสกัดจาก TLC มีความเข้มข้นน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจาก TLC ที่มีน้ำหนักมากกว่า 0.1 mg โดยตรงลงไปในหลุม ดังแสดงในรูป 4A และ 4B นอกจากนี้ผลการทดสอบยังบ่งชี้ได้ว่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูงอาจเป็นผลมาจากสารหลายๆตัวในสารสกัดหยาบจากสารทุติยภูมิของเชื้อเอนโดไฟท์

การทดสอบในอนาคตคือการนำสารกึ่งบริสุทธิ์จาก TLC ที่ผลิตจากเชื้อเอนโดไฟท์ในตารางที่ 4 ไปทดสอบ Cytotoxicity test กับ Human Celline และการจำแนกชนิดของสารที่ไม่เป็นพิษต่อ Human Celline แต่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum*

รูปที่ 3. แสดงสารสกัดจาก TLC 100 μ l (0.1mg/ μ l DMSO) ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Myrothecium* sp. RSb8 (ซ้าย) และ เชื้อ ราเอนโดไฟท์ *Chaetomium* sp. RPR2 (ขวา) ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* ในวันที่ 2 ของการทดสอบ หลุมด้านบนของภาพคือหลุมควบคุมที่มีสารละลาย DMSO เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 4. แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. insidiosum* ในวันที่ 2 ของการทดสอบสารสกัดของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp. QS4 และ *Xylaria* sp. Qb 25 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน 4A) สารสกัดของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp. QS4 จากTLC ในปริมาณที่มากกว่า 1 mg 4B) สารสกัดของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Xylaria* sp. Qb 25 จากTLC ในปริมาณ 100 ul (0.1mg/ul DMSO)



กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำหรับทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านงานวิจัยอาจารย์รุ่นกลาง (RMU4980030) ปี พ.ศ. 2549-2552 รวมทั้งกรมวิชาการเกษตรในการอนุเคราะห์เชื้อก่อโรคพืชเน่าดำ *X. campestris*

เอกสารอ้างอิง

1. Amosukarto, I., Castillo, U., Hess, W.M., Sears, J., Strobel, G.A., 2005. Isolation and characterization of *Muscador albus* I-41 .3s, a volatile antibiotic producing fungus. *Plant Science* 169, 854-861.
2. Chaves, M. M., Maroco, J. P., and Pereira, J. S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 2003. 239-264.
3. Daisy, B.H., Gray A. Strobel, G.A., Castillo, U., Sears, J., Weaver., D.K.Runyon, J.B., 2002. Naphthalene production by *Muscador vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 148, 3737-3741.
4. Ezra, D., Hess, W. M., and Strobel, G. A. New endophytic isolates of *Muscador albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*, 2004.150:4023-4031.
5. Foolad, M.R., Zhang, L.P., and Subbiah, P. Genetics of drought tolerance during seed germination in tomato: inheritance and QTL mapping. *Genome*, 2003. 46:536-545.
6. Grooters A (2003). "Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals". *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33 (4): 695-720, v.doi: 10.1016/S0195-5616 (03) 00034-2.
7. Hensel P, Greene C, Medleau L, Latimer K, Mendoza L (2003). "Immunotherapy for treatment of multicentric

- cutaneous pythiosis in a dog". J Am Vet Med Assoc 223 (2): 215–8, 197.
8. Hsiao, T.C. Plant responses to water stress. Annu. Rev. Plant Physiol., 1973. 24:519–570.
 9. Kong, P., Hong, C., Richardson, P. A., and Gallegly, M. E. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. Fungal Gen. Biol., 2003. 39:238-249.
 10. Krajaejun, T., Prachartam R, Wongwaisayawan S, Rochanawutinon M, Kunakorn M, and Kunavisarut S. Ocular pythiosis: is it under-diagnosed? Am J Ophthalmol 2004; 137:370.
 11. Krajaejun, T., Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, Chaiprasert A, Assanasen P, Saipetch M, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Lekhakula A, Mitarnun W, Kalnauwakul S, Supparatpinyo K, Chaiwarith R, Chiewchanvit S, Tananuvat N, Srisiri S, Suankratay C, Kulwichit W, Wongsaisuan M, and Somkaew S. Clinical and Epidemiological Analyses of Human Pythiosis in Thailand. Clin Infect Dis 2006; 43:569-76.
 12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem., 1951. 193:265-275.
 13. Mahuren, J. D., Coburn, S. P., Slominski, A., and Wortsman, J. Microassay of phosphate provides a general method for measuring the activity of phosphatases using physiological, nonchromogenic substrates such as lysophosphatidic acid. Anal. Biochem., 2001. 298:241-245.
 14. Malinowski, D. P. and Belesky, D. P. Adaptations of Endophyte-Infected Cool-Season Grasses to Environmental Stresses: Mechanisms of Drought and Mineral Stress Tolerance. Crop Sci., 2000. 40:923–940.
 15. Mercier, J., Jime' nez, J.I., 2004. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. Postharvest Biol. Technol. 31, 1-8.
 16. Mercier, J., Manker, D.C., 2005. Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodor albus*. Crop Protection 24, 355-362.
 17. Nakano, Y. and Asada, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. Plant Cell Physiol., 1981. 22:867-880.
 18. Redman, R. S., Dunigan, D. D., and Rodriguez, R. J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? New Phytologist, 2001. 151:705–716.
 19. Sopalun, K., Strobel, G. A., Hess, W. M., Worapong, J., A record of *Muscodor albus*, an endophyte from *Myristica fragrans* in Thailand. Mycotaxon, 2003. 88:239-248.
 20. Stinson, A.M., Zidak, N.K., Strobel, G.A., Jacobsen, B.J., 2003. Mycofumigation with *Muscodor albus* and *M. roseus* for control of seedling diseases of sugar beet and *Verticillium* wilt of eggplant. Plant Dis. 87, 1349-1354.
 20. Strobel, G., Ford, E., Worapong, J., Harper, J. K., Arif, A. M., David, M. G., Fung, P. C. W. and Chau, R. M. W. 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. Phytochemistry 60:179-183.
 21. Strobel, G. A., Dirkse, E., Sears, J. and Markworth, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. Microbiology, 2001. 147:2943-2950.
 22. Strobel, G. A., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. S., and Hess, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. Microbiology, 1996.142:435-440.
 23. Tetsuo, S., Eiji, N., and Lutfur Rahman, S. M. Effects of Water Stress on yield and related morphological characters among tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. Thai Journal of Agricultural Science, 1998. 31(1):60-78.
 24. White, T. J., Bruns, T., and Taylor, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes

- for phylogenetics. In PCR Protocols A guide to Methods and Applications. Edited by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. Academic press, Inc., California: 1990. 315-322.
25. Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Panphut W, Thongon N, Danwisetkanjana K, Ruangrunsi N, Meevootisom V (2004) Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World J Microbiol Biotechnol* 20: 265–272.
 26. Worapong, J. and Strobel, G. A. 2009. Biocontrol of a root rot of kale by *Muscodor albus* strain MFC2. *Biocontrol* 54: 301-306.
 27. Worapong, J., Bryn, S. J., Castio, U., Strobel, G. A., Ford, E. J., and Hess, W. M. 2001. *Muscodor roseus* gen. et sp. nov. an endophyte from *Grevillea pteridifolia*, Australia. *Mycotaxon* 81: 467-478.
 28. Worapong, J., Strobel, G. A., Ford, E. J., and Hess, W. M. 2001. *Muscodor albus* gen. et sp. nov. an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. *Mycotaxon* 79: 67-79.

ผลิตผลของโครงการวิจัย

รางวัล

รางวัลรองชนะเลิศ อันดับ 1 งานนวัตกรรมแห่งชาติในระดับประเทศ นำเสนอโดย นางสาว ศิริวรรณ รุ่งอินทร์ นักศึกษา ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี จากหัวข้อโครงการเรื่อง การประยุกต์ใช้เชื้อเอนโดไฟท์เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคเน่าดำ (*Xanthomonas campestris*) ในต้นผักกาดหอม (ชื่อโครงการในภาษาที่เข้าใจง่าย เชื้อเอนโดไฟท์ชีวควบคุมเชื้อก่อโรครากเน่าดำ (*Xanthomonas campestris*) ในต้น ผักกาดหอม) จาก กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ และ บริษัท ปตท. เคมีคอล จำกัด (มหาชน) ในการประกวด โครงการรางวัลนวัตกรรมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 8 (2551) ระหว่างวันที่ 3-5 ตุลาคม 2551

การผลิตนักศึกษา

นักเรียนระดับมัธยมศึกษาปีที่ 6 จำนวน 5 คน จากโรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ ดังรายนามคือ

นางสาวชมพร รักษาเกียรติศักดิ์ นางสาวรญา พรหมแบ่งชา นางสาวกุสุมา พงนา
นางสาวกุลชา ผลพิสิษฐ์ นางสาวปาริย์ ทองอัครนิโรจน์

นักศึกษาระดับปริญญาตรี จำนวน 10 คน

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ปี 2549 นายวรชิต ธีรฤทธิ์เฉลิม

ปี 2550 นายวรภพ จิรชนโชติ น.ส. วิวิภาภรณ์ จำน้อย น.ส. ศิริวรรณ รุ่งอินทร์ (สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร)

ปี 2551 น.ส. ศรัญญา ถิ่นสุข น.ส. รัชฎา บัวสด น.ส. ปาริณดา สังคีรี นายวรินทร์พิภพ ชยทัตภูมิรัตน์

Mahidol University International College, Biological Science

Miss Chulita Sakolvari and Mr. Panet Lertsupanont

นักศึกษาระดับปริญญาโท (Co advisor) คือ

น.ส. อติษฐ นาคสเวก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

นักศึกษาระดับปริญญาเอก (Co advisor) คือ

1. น.ส. จิตรา เกาะแก้ว ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

2. นายสุเดช บุตทชน ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (In Preperation)

1. Worapong, J., Srisaisup, M., Hess, W.M., Strobel, G.A. and Nunez Vargas, M. P. *Bipolaris thaiendophytica* anam. gen. et. sp. nov., an endophyte from a fruit of *Myristica fragrans*. To be Submitted to Mycotaxon, Impact factor = 0.535.

2. Srisaisup, M., Teeraritchaleem, W., Wichaphon, J., Sittiwat Lertsiri, S. and Worapong, J. Effect of biogas from endphytic fungus *Muscodor albus* strain MFC2 on *Colletotrichum gloeosporioides*. To be submitted Biocontrol Science and Technology, Impact factor = 1.087.

3. Narksavaek, A., Srisaisup, M., Worapong, J. and Inprakhon, P. Screening of endophytic fungi with antibacterial activity from medicinal plants. Submitted and accepted by the Proceeding of Graduate on 30 June 2008.

4. Narksavaek, A., Srisaisup, M., Inprakhon, P. and Worapong, J. Biocontrol of a root rot disease in kale and lettuce by *Xylaria* sp. QS4 from *Quereus lauritolia*. To be submitted to Applied Microbiology and Biotechnology, Impact factor = 2.441.

5. Srisaisup, M., Okubara, P. A., Chansri S., and Worapong, J. *Paenibacillus polymyxa* strain TL41, a bacterial endophyte of *Paederia foetida* and its potential use for control of *Xanthomonas campestris* on lettuce. To be submitted to World Journal of Microbiology and Biotechnology= 0.745.

6. Worapong, J., Srisaisup, M., Chayathatphommirat V., Tuntipopipat, S. and Krajaejun, T. Control of the human phythiosis pathogen, *Pythium insidiosum* using secondary metabolite crude extract from endophytes. To be submitted to Current Microbiology, Impact factor = 1.167.
7. Thinsook., S., Srisaisup, M., Leelaporn., O., Roytrakul S., Triwitayakorn K., Gary, A. S. and Worapong, J. Roles of endophytic *Muscodor albus* MFC2 on tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedling under stress conditions. To be submitted to New Phytologist, Impact Factor: 5.249.

การไปเสนอผลงานวิจัย

การไปเสนอผลงานวิจัยในการประชุม The 8th International Plant Growth Promoting Rhizobacteria Workshop ณ โรงแรม Embassy Suite Hotel Downtown เมือง Portland, มลรัฐ Oregon, ประเทศ สหรัฐอเมริกา ตั้งแต่วันที่ 18 พ.ค. 2552 – 22 พ.ค. 2552 หัวข้อเรื่อง “*Paenibacillus polymyxa* strain TL41, a bacterial endophyte of *Paederia foetida* and its potential use for control of *Xanthomonas campestris* on lettuce” ซึ่งผลงานนี้ได้รางวัลรองชนะเลิศ อันดับ 1 งานนวัตกรรมแห่งชาติในระดับประเทศ จาก กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ และ บริษัท ปตท. เคมีคอล จำกัด (มหาชน) ในการประกวด โครงการรางวัลนวัตกรรมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 8 (2551) ระหว่างวันที่ 3-5 ตุลาคม 2551

ภาคผนวก

Bipolaris thaiendophytica* anam. sp. nov., an endophyte from a fruit of *Myristica fragransWORAPONG, J.^{1*}, SRISAISUP, M.², HESS, W.M.², STROBEL, G.A.³ AND NUNEZ VARGAS, M. P.⁴¹Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand, *Email: stjwr@mahidol.ac.th²Department of Plant and Wildlife Sciences, Brigham Young University, Provo, Utah 84602, USA³Department of Plant Sciences and Plant Pathology, Montana State University, Bozeman, Montana 59717, USA⁴Umachata 136 Cusco, Vargas Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Peru Escuela de Post Grado, Facultad de Biología, Andes Amazon Guianas Herbario Vargas (CUZ), Peru

Abstract — A novel endophyte species of *Bipolaris* named JF2, isolated from the inner fleshy fruit of *Myristica fragrans*, is described and illustrated based on a polyphasic approach. The JF2 strain is distinguishably characterized by the production of straight big brown 1-6 phragmosporous conidia 17-67(38.7) × 11-20(15.4) µm germinating a germ tube at each end. Another unique characteristic is spongy brown sheath nodes interval wrapping around the old hyphae. Molecular phylogeny of ITS1-5.8S-ITS2 sequences supports that taxonomy of the isolate JF2 should be placed in the genus of *Bipolaris* and a sister lineage to the *Curvularia* sp. NR2006D12 (DQ480350). A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase DNA sequence was 88% with *Cochliobolus intermedius* (AF081383) and *Co. kusanoi* (AF081404). On the basis of its distinctive morphological characteristics and phylogenetic position, this strain defines a novel species named *Bipolaris thaiendophytica*, sp. nov.. The type strain of *Bipolaris thaiendophytica* is JF2.

Key words — antagonistic dual test, *Bipolaris*, *Curvularia*, endophyte, ITS and 5.8S rDNA, nutmeg tree, phylogeny, taxonomy

Introduction

Shoemaker proposed to segregate the subdivision *Helminthosporium* (Link: Fr.) into *Drechslera* (Ito) and *Bipolaris* (Shoemaker) (Shoemaker, 1959). With that recognition, he established the genus *Bipolaris* for species that Nisikado (1929) had been classified as the subgenus *Eu-Helminthosporium* (Nisikado) (Shoemaker, 1959). The species was *B. maydis* (Nisikado) Shoem. The evidence for the recognition of those two genera was studied and confirmed by Alcorn (1983, 1988). Based on morphology and germination of conidia, and conidiophore with conidiogenous structure, 52 species of *Bipolaris* were justified in the monograph written by Sivanesan (1987). *Bipolaris*'s conidia were described as fusiform to ellipsoidal, straight to curved, brown, smooth wall, distoseptate (pseudoseptate) conidia with and without a protuberant conidial hilum (Sivanesan, 1987; Alcorn, 1988). The germ tubes of this genus are germinated only from each end cell of conidia (bipolar). The sexual state of the *Bipolaris* is associated with *Cochliobolus* (Shoemaker, 1959; Luttrell, 1977; Sivanesan, 1987). In 1991, Alcorn (1990, 1991) combined and transformed the two genera of *Bipolaris* and *Curvularia* as the synonymous genus.

Due to inadequate conidial morphology and lack of teleomorph in many species of these 3 genera, recent taxonomic revisions have relied on molecular phylogenetic analysis of DNA sequences, in particular, rDNA internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) gene sequences, have been used extensively to solve taxonomic relationships at the species level (Berbee et al., 1999; Zhang and Berbee, 2001). Based on the phylogenetic analysis of ITS and *gpd* sequence data, Zhang and Berbee (2001) reported that the species previously described as *Drechslera portulacae* (orig. CBS 239.48), *Pyrenophora bromi* (orig. CBS 403.72) and *P. portulacae* (orig. DAOM 208494), were reclassified as *Bipolaris portulacae*. In addition, *Drechslera biseptata* (orig. CBS 371.72) and *D. heveae* (orig. CBS 241.92) that had been misidentified were transferred to *Bipolaris spicifera* and *B. heveae*, respectively.

During the last decade, there were a few reports about new species of *Bipolaris*. Chen et al. (2000) mentioned that *B. prieskaensis* was the sixtieth species of *Bipolaris* that was isolated from debris of *Pistacia vera* (L.) (Pistachio) in Prieska, Northern Cape Province of South Africa. Five years later, Tsukiboshi et al. (2005) reported that *B. heveae* (*Co. heveicola*) was another new species causing brown

stripe of Bermuda grass and Zoysia grass. In 2008, Jiang and Zhang identified *B. fusca* as a new species of dematiaceous hyphomycetes from soil in China. We now describe a novel species isolated from a fruit of the woody plant, *Myristica fragrans* (Houtt.) growing in the Siri Rukhachati Medicinal Plant Garden, Salaya campus, Mahidol University, Nakornprathom, Thailand. Its affinity to closely related species is discussed to show its distinguishing morphological features along with the comparative ITS1&2 rDNA and *gpd* sequence data to other related species.

Materials and methods

Fungal isolation, growth, identification and storage

A fruit of *M. fragrans*, from the same tree that *Muscodora albus* strain MFC2 was originally obtained (Sopalun et al., 2003), was sampled from the Siri Rukhachati Medicinal Plant Garden, Salaya campus, Mahidol University, Nakornprathom, Thailand. Isolation procedures were based on Sopalun et al., 2003. Hyphal tips of developing isolates designated –JF2 were aseptically removed and placed on potato dextrose agar (PDA) with small sterile pieces of the carnation leaves (0.5x0.5 cm) to encourage spore production for 10-14 days. One hundred conidia and 50 conidiophores in lactophenol cotton blue solution were examined and measured with a light microscope (Seek Microscope LW 100 BT, China). Photomicrographs of the JF2's morphology were taken by a PowerShot S45 Cannon camera (Japan). The isolated endophytic JF2 fungus was identified down to species level using the monographs described by Sivanesan (1987). The pure culture of JF2 endophyte was preserved using 15% glycerol and stored at –80°C at the culture collection of Mahidol University. It was also deposited as *Bipolaris* sp. at the Montana State University living mycological culture collection as culture -2346.

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy was performed by procedures previously described by Castillo et al. (2005). Isolate JF2 was processed by placing agar pieces and host plant pieces supporting fungal growth into 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2-7.4) with Triton X, a wetting agent, and aspirated for 5 min. and left overnight. Then the fixed agar pieces and plant pieces were placed in #1 Whatman filter paper packets (Whatman Inc. Florham Park, N.J. USA). The packets were made by folding the filter paper over a piece of cork (1.5 x 1.5 cm). The packets were tied with cotton string, and two removable split shot sinkers (ca. 3.25 gm each) were attached next to the packets to hold them under the surface of the dehydrating solutions and liquid carbon dioxide during critical point drying. After that the samples were washed in six 15 min changes of water buffer, followed by 15-min washes in 10%, 30%, 50% ethanol, five-15 min changes in 70% ethanol, and then were left for 18-24 hr in 70% ethanol. They were rinsed for 15 min in 95% ethanol and then three 15-min changes in 100% ethanol, followed by three 15-min changes in acetone. For SEM, the specimens were critically point dried, gold sputter coated, and images were recorded with an XL30 ESEM FEG in the high vacuum mode using the Everhart-Thornley detector.

Fungal DNA isolation and amplification of 18S, ITS1-5.8S-ITS2 and *gpd* genes

For total genomic DNA isolation, the fungus strain JF2 was grown on PDA for 10 days at 23°C. The mycelium was scraped directly from the surface of the agar culture, weighed and extracted by the methods of Lee and Taylor (1990). The universal primers of N1-N8, ITS5 and ITS4 were used for amplifying PCR product of 18S and ITS1-5.8S-ITS2 rDNA genes, respectively (White et al., 1990). The PCR mixture concentrations and thermocycler conditions of 18S DNA were performed based on White et al. (1990) while the ITS/5.8S rDNA was amplified using conditions described by Kong et al. (2003). The PCR of *gpd* DNA sequence was performed using *gpd1* and *gpd2* primers following the protocols of Berbee et al., 1999. The PCR products of 18S rDNA, ITS1-5.8S-ITS2 and *gpd* genes were sent to the Ramathibodee Research Unit, Ramathibodee Hospital for purification and sequencing.

BLAST and phylogenetic analysis of 18S, ITS/5.8S rDNA and *gpd* sequences

Nucleotide sequences of 18S, ITS/5.8S rDNA and *gpd* regions of the JF2 endophytic fungus were determined manually on both strands and submitted to GenBank with a serial number FJ666899, EU447681 and FJ666900, respectively. The 18S, ITS/5.8S rDNA and *gpd* sequences of JF2 endophytic fungus was also searched and compared with other fungal sequences under a BLAST 2.2.19 (Zhang et al., 2000) search of NCBI at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>.

Comparison and alignment of ITS sequences from 40 closely related graminicolous taxa and 4 taxa of out group obtained from GenBank (Table 1) were analyzed using CLUSTAL W version 1.7 (Thomson and Gibson, 1997) and manually aligned afterwards. Those four outgroup taxa were *Alternaria raphani* (U05200), *Setosphaeria monoceras* strain 208988 (AF071340), *S. monoceras*, *S. rostrata* strain 32197 (AF071342) (Zhang and Berbee, 2001). A full alignment of ITS datasets was submitted to the TreeBASE with a matrix number SN3879-18212. An inferred phylogenetic tree was reconstructed from the excluded terminal sites (602 characters) in the ITS and 5.8S regions using a general time-reversible model of distance method in PAUP program (test version 4.0b3, Macintosh). The reliability of the tree topology was determined by bootstrap analysis using 1,000 replicates for the neighbor joining analysis. The TREEVIEW program was used to demonstrate the inferred phylogenetic trees (Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Scotland, UK).

Collections

Material examined: healthy living fruit of *M. fragrans* at Sireerookacharti Garden, Salaya campus of Mahidol University, Nakornprathom province, Thailand, June 8, 2007, J. Worapong and M. Srisaisup. The JF2 was deposited in the culture collection of Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University and Department of Plant Science and Plant Pathology, Montana State University, Bozeman, USA, designed 2346.

Taxonomic description

Bipolaris thaiendophytica J. Worapong, M. Srisaisup, W. M. Hess, and G. A. Strobel, **sp. nov.** PLATE 1-5

MYCOBANK 885

Consociis alba labrum ambitus irregularis cum novae generatoniae usque antiquis hyphae archa est et evoco velvet, floccose, pallide olivo atrum olivo (Instar. 1A). Reverse atrum olivo usque niger centri (Instar. 1B). Mycelium in substratus. Delicatis auctus in PDA in locus temperatur, verbi gratia , numero septem diei nam 23 mm et novem .diei huic 25 mm. Hyphae septae, olivo usque brunneus, smooth cum usque novae generatoniae, esponja brunneus folias cum senectus (Instar 1C et 5B, arrow). Conidiomata formo in rami senectus In vitro senectus uni mensis exertus in PDA (Instar. 1D). Sectionis, haec rami stromata pario non asexual, sexual reproductive organs. Conidiophore simplis solitary, rectus in inferne infecunditas sectionis cum esponja brunnea folia, geniculatae usque caput capitis, brunneus, secundus-3 septae, 30-100(58.2) × 2-5 µm (4.1). Conidiogenous archa cylindrical, integratis, consociatis terminalis, directus blastic, 7-15(10.2) × 2-6(5.2) µm (Instar. 2, 5A et 5B). Conidium muticum, rectus, levidensis inflectum, 1-6 distoseptae (multo 4), elliptica, lisa, centris arca archa atrum brunneus et sensu lato distalis pertinens, cum hilum non protuberante 2-5 (3) µm diam, 17-67(38.7) × 11-20(15.4) µm (Instar. 3, 5A et 5B), bipolaris germinatio (Instar. 4).

ETYMOLOGY: Name *thaiendophytica* referring to its nationality and ecological interaction.

HOLOTYPE: JF2, a living culture from a healthy living fruit of *M. fragrans* at Sireerookacharti Garden, Salaya campus of Mahidol University, Nakornprathom province, Thailand on 8 June 2007. The JF2 was deposited in the culture collection of Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University and Department of Plant Science and Plant Pathology, Montana State University, Bozeman, USA, designed 2346.

TELEOMORPH: not seen.

KEY CHARACTERS — Conidiophore simple solitary, straight in the lower sterile section with spongy brown sheath, geniculate at apex, Dark Yellowish Brown [10 YR 4/2], 2-3 septate, 30-100(58.2) × 2-5(4.1) µm. Conidium muticous, straight to slightly curved, 1-6 distoseptate (mostly 4), ellipsoid, smooth, central cells Dusky Brown [5 YR 2/2] and broader than the distal ones, with a slightly protuberant hilum 2-5 (3) µm diam, 17-67(38.7) × 11-20(15.4) µm (Fig. 3, 5A and 5B), bipolar germination (Fig. 4).

EXPANDED DESCRIPTION — Conidiogenous cell cylindrical, integrated, terminal, single blastic, 7-15(10.2) × 2-6(5.2) µm (Fig. 2, 5A and 5B).

MACROCHARACTERS — **COLONY**, white [N 9.5-9]- in the irregular margin when young, reverse dark olivaceous Olive Gray [5 Y 3/2] to black [N1] the center (Fig. 1B); **OLDER HYPHAL CELLS**, velvety, floccose, floccose pale olivaceous to dark olivaceous Dusky Yellowish Green [5 GY 5/2]-Grayish Olive [10 Y 4/2]-Dark Greenish Gray [5 GY 4/1] (Fig. 1A); **CONIDIOMATA**, formed in branch on old culture aged one month on PDA (Fig. 1D), this branch stromata generated none of asexual or sexual reproductive organs after section.

MICROCHARACTERS — **CONIDIA**, Straight big brown 1-6 phragmosporous cells 17-67(38.7) × 11-20(15.4) µm; **HYPHAL SEPTATE**, olivaceous to brown, smooth when young, spongy brown sheaths when old (Fig. 1C and 5B, arrow).

ECOLOGY, RANGE, DISTRIBUTION — A healthy living fruit of nut meg tree (*Myristica fragrans*). Uncommon.

CULTURE — Mycelium immersed in the substrata. Slowly growing on PDA at room temperature, for example, 7 day for 23 mm and 9 days for 25 mm.

MOLECULAR PHYLOGENY — Based on the BLAST search of 18S (1753 bp), ITS/5.8S rDNA (540 bp) and *gpd* (587 bp) sequences of *Bipolaris thaiendophytica* JF2, this fungus belongs to the phylum of Ascomycota, the sub-phylum of Pezizomycotina, the class of Dothideomycetes, the order of Pleosporales, the family of Pleosporaceae, and the genus of *Biolaris* (mitosporic *Cochliobolus*). Table 2 shows the identity of ITS/5.8S rDNA and *gpd* sequences of closely related taxa with their conidium size recorded by Sivanesan (1987). Five hundred and forty nucleotides of *B. thaiendophytica* JF2 were 100 % identical to the sterile mycelium strain of *Curvularia* sp. NR-2006-D12 (DQ480350), an endophyte fungus isolated from *Garcinia* species in Songkla province located in the Southern part of Thailand (Table 2). Three strains of endophytic *Bipolaris* sp. (Bp-zj strain 01-03) isolated from *Sesuvium portulacastrum* (Guangdong province, China) had 94 % identity from the comparison of 519 bp of the ITS1&2 regions. *B. portulacae* strain DAOM 208494 had 92% identity from a total of 513 bp ITS1&2 nucleotides. Additionally, the ITS sequence of *B. kusanoi*, with conidium morphology that looks like *B. thaiendophytica* JF2 conidia, had the least identity (87%) to that of *B. thaiendophytica* JF2.

The phylogenetic trees obtained from alignments with and without excluded sites were very similar in topology. When all sites were included for phylogenetic analysis, the *B. thaiendophytica* JF2 and a sister

species of *Curvularia* sp. NR-2006-D12 (DQ480350) clearly separated from other topologies of *Bipolaris* spp. (data not show). When the terminal length variation were excluded, the *B. thaiendophytica* and *Curvularia* sp. NR-2006-D12 (DQ480350) shared recent ancestors with the major clade of *B. sorokiniana* (DSM6260), *B. sorokiniana* (BS11), uncultured endophyte clone 16-10-19, *Co. heterostrophus* (BM3) and *B. sacchari*, *B. sorokiniana* (FG42) *B. sorokiniana* with bootstrap support lower than 50 (Fig. 6). Distinctively, *B. kusanoi* with conidium size comparable to that of *B. thaiendophytica* JF2, did not group with *B. thaiendophytica* JF2, but did with the major clade of *Bipolaris* spp. Bp-zj-01-Bp-zj-03, *B. indica*, *B. portulacae* DAOM 2084, *B. portulacae* CBS 40372, and *B. portulacae* CBS 23948.

DISCUSSION

Based on the description by Zhang and Berbee (2001), the basal cell germination and progression of septum shown in figure 4 and 5A supports the fact that the *B. thaiendophytica* JF2 should be placed to the genus of *Bipolaris*. The morphology of *Bipolaris* strain JF2 does not have a close relationship with *Co. australiensis*, *Co. lunatus*, *Co. spicifera*, *Curvularia inaequalis*, *Co. heterostrophus*, *Curvularia geniculata*, *B. sorokiniana*, *B. sacchari*, and *B. kusanoi*. From the description and the illustration (Fig. 1-5), the conidia of *B. thaiendophytica* JF2 vary a lot in length. Although its conidia size was somewhat similar to *B. kusanoi*, the *B. thaiendophytica* JF2 clearly differs from *B. kusanoi* both in phenotypic and genetic features. Based on the description by Sivanesan (1987), *B. kusanoi* has conidiophores in the features of single or in small groups, brown, paler towards the apex, smooth with swollen tips, 16-250x4-6.5 µm. In contrast, the *B. thaiendophytica* JF2 has old mycelium and rough conidiophore that are simple solitary, straight in the lower sterile section with spongy brown sheath (Fig. 1D), geniculate at apex, brown, 2-3 septate with 30-100x2-5 µm in length and width. The old mycelium with spongy brown sheath nodes seemed to be the unique characteristic of *B. thaiendophytica* JF2 that has not previously been described in any species. In addition to differences in morphological characteristics, the ITS1-5.8S-ITS2 and *gpd* sequences of the *B. thaiendophytica* JF2 are different among other fungal species.

A comparative analysis and phylogenetic study of ITS rDNA sequences indicated that *B. thaiendophytica* JF2 formed a distinct clade within the evolutionary radiation of the family Pleosporaceae and clustered with members of genera *Cochliobolus*/*Bipolaris*. Nonetheless, there was no unifying phylogenetic characters between the topology of *B. thaiendophytica* JF2 and *Curvularia* sp. NR-2006-D12 and the sister clade of *B. sorokiniana* (DSM6260), *B. sorokiniana* (BS11), Uncultured endophyte clone 16-10-19, *Co. heterostrophus* (BM3) and *B. sacchari*, *B. sorokiniana* (FG 42) *B. sorokiniana*. In this polyphyletic tree, the *B. thaiendophytica* JF2 was placed in the *Cochliobolus* Group 2 that included species with *Curvularia* type conidia as well as species with straight *Bipolaris* conidia as described by Berbee *et al.* (1999). In addition, the *Cochliobolus* Group 2 appeared to be diverse not only in genetic and morphology as discussed by Berbee *et al.* (1999) but also ecological interaction (Fig. 6).

Molecular data also supports that *Curvularia* sp. NR-2006-D12 (DQ480350) was, a sister taxa of the *Bipolaris* JF2. Coincidentally, both of them are endophytes that were found in different hosts and locations. The *B. thaiendophytica* JF2 was isolated from inside the fruit of nutmeg tree growing in Nakornpathom province located in the central part of Thailand. In contrast, the *Curvularia* sp. NR-2006-D12 was found in the *Garcinia* tree in a forest in Songkla city located in the southern part of Thailand (Phongpaichit *et al.*, 2006). Therefore, this information suggests that the *B. thaiendophytica* JF2 endophytic fungus tentatively has a broad host range. Consistently, both *B. thaiendophytica* JF2 and the *Curvularia* sp. NR-2006-D12 can produce bioactive compounds that have potential use for agricultural and medicinal applications.

With a noted distinctions of morphological data, ITS sequence and its phylogenetic position, this fungal endophyte isolated from *M. fragrans* is a new species of the anamorphic genus *Bipolaris*, in which the name *Bipolaris thaiendophytica* sp. nov. is proposed. The type strain is JF2.

Acknowledgments

Financial assistance has been provided by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission on Higher Education (CHE) number RMU4980030. The authors deeply appreciate the helpful discussion and assistance provided by Professor Don E. Mathre and Professor Mary L. Berbee. It's also a pleasure to acknowledge Professor Leka Manot for helpful comments and lending the book "Graminicolous Species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and Their Teleomorphs" Mycol. Paper 158, Kew, Commonwealth Mycological Institute: 1-126.

Literature cited

- Alcorn JL 1983. Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. Mycotaxon 17: 1-86.
Alcorn JL 1988. The taxonomy of "*Helminthosporium*" species. Annual Review of Phytopathology 26: 37-56.

- Alcorn JL 1990. Additions to *Bipolaris*, *Cochliobolus* and *Curvularia*. Mycotaxon 39: 361-392.
- Alcorn JL 1991. New combinations and synonymy in *Bipolaris* and *Curvularia*, and a new species of *Exserohilum*. Mycotaxon 41: 329-343.
- Buzina W, Braun H, Freudenthuss K, Lackner A, Stammberger H. 2003. Fungal biodiversity as found in nasal mucus. Medical Mycology 41 (2): 149-161.
- Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia 91 (6): 964-977.
- Castillo U, Myers S, Lindsey B, Strobel GA, Hess WM, Hanks J, Reay D. 2005. Scanning electron microscopy of some endophytic Streptomyces in snakevine–*Kennedia nigricans*. Scanning 27: 305-311.
- Chen W, Swart WJ, Nieuwoudt TD 2000. A new species of *Bipolaris* from South Africa. Mycotaxon 76: 149-152.
- Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Dromer F, Lortholary O, Dannaoui E. 2006. Molecular identification of black-grain mycetoma agents. Journal Clinical Microbiology 44 (10): 3517-3523.
- Emami K, Hack E. 2002. Conservation of XYN11A and XYN11B xylanase genes in *Bipolaris sorghicola*, *Cochliobolus sativus*, *Cochliobolus heterostrophus*, and *Cochliobolus spicifer*. Curr. Microbiol. 45 (4), 303-306.
- Intana W, Chamswarng C, Intanoo W, Hongprayoon C, Sivasithamparam K 2003. Use of mutant strains for improved efficacy of *Trichoderma harzianum* for controlling cucumber damping-off. Thai Journal of Agricultural Science 36 (4): 429-439.
- Jiang YL, Zhang TY. 2008. New species of *Bipolaris*, *Scolecobasidium* and *Torula* from soil. Mycotaxon 104: 135-140
- Jong SC, Dugan F, Edwards MJ. 1996. ATCC Filamentous Fungi. 19th edition, 141.
- Kong P, Hong C, Richardson PA, Gallegly ME. 2003. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. Fungal Genetics Biology 39: 238-249.
- Lee SB, Taylor JW. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In PCR Protocols a Guide to Methods and Applications. Edited by Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky J.J., White, T.J. Academic Press, Inc., California, 282-287pp.
- Luttrell ES 1977. Correlations between conidial and ascigers state characters in *Pyrenophora*, *Cochliobolus* and *Setosphaeria*. Review Mycology 41: 251-279.
- Nisikado Y. 1929, Studies on the *Helminthosporium* diseases of Gramineae in Japan. English summary of 1928 original paper in Japanese. Berichte des Ohara Instituts für Landwirtschaftliche Forschungen in Kuraschiki, Japan 4: 111-126, pl XII-XX.
- Olivier C, Berbee ML, Shoemaker RA, Loria R. 2000. Molecular phylogenetic support from ribosomal DNA sequences for origin of *Helminthosporium* from *Leptosphaeria*-like loculoascomycete ancestors. Mycologia 92 (4): 736-746.
- Pan JJ, Baumgarten AM, May G. 2008. Effects of host plant environment and *Ustilago maydis* infection on the fungal endophyte community of maize (*Zea mays*). New Phytologist . doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02350.x
- Phongpachit S, Rungjindamai N, Rukachaisirikul V, Sakayaroj J. 2006. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. FEMS Immunology and Medical Microbiology 48 (3): 367-372.
- Pryor BM, Gilbertson RL. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. Mycological Research 104 (11): 1312-1321.
- Shoemaker RA. 1959. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from “*Helminthosporium*”. Canadian Journal of Botany 37: 879-887.
- Sivanesan A. 1987. Graminicolous Species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and Their Teleomorphs. Mycol. Paper 158, Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1-126.
- Sopalun K, Strobel GA, Hess WM, Worapong J. 2003. A record of *Muscador albus*, an endophyte from *Myristica fragrans* in Thailand. Mycotaxon 88: 239-248.
- Tsukiboshi T, Chung WH, Yoshida S. 2005. *Cochliobolus heveicola* sp. nov. (*Biolaris heveae*) causes brown stripe of Bermuda grass and *Zoysia* grass. Mycoscience 46: 17-21.
- Thomson, J., Gibson, T. 1997. Clustal V Multiple Sequence Alignments. In: Documentation (Installation and Usage) European Molecular Biology Laboratory Postfach Germany, 1-37.
- Wang G, Li Q, Zhu P. 2008. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian Sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. Antonie Van Leeuwenhoek. Feb 93 (1-2): 163-74.
- White TJ, Bruns T, Taylor JW. 1990. Amplification of direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Edited by Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky J.J., and White, T.J. Academic Press, Inc., California, 315-324.
- Zhang Q, Berbee ML. 2001. *Pyrenophora* phylogenetics inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia 93 (6): 1048-1063.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J Comput. Biol. 7(1-2): 203-14.



Fig. 1. *Bipolaris thaiendophytica* JF2 (from holotype). **A.** Colony growing on PDA 9 days; **B.** Reverse colony; **C.** mycelium with spongy brown sheath nodes (1 channel of scale bar = 1 μ m); **D.** Branch stromata (1 channel of scale bar = 10 μ m).



Figs. 2, 3. Conidia and conidiophore of *Bipolaris thaiendophytica* JF2 (1 channel of scale bar = 1 μ m) **2.** Conidia. **3.** Conidiophore



Fig. 4. Conidia of *B. thaiendophytica* JF2 with bipolar germination (1 channel of scale bar = 1 μ m). Arrows indicate a germ tube at each end.

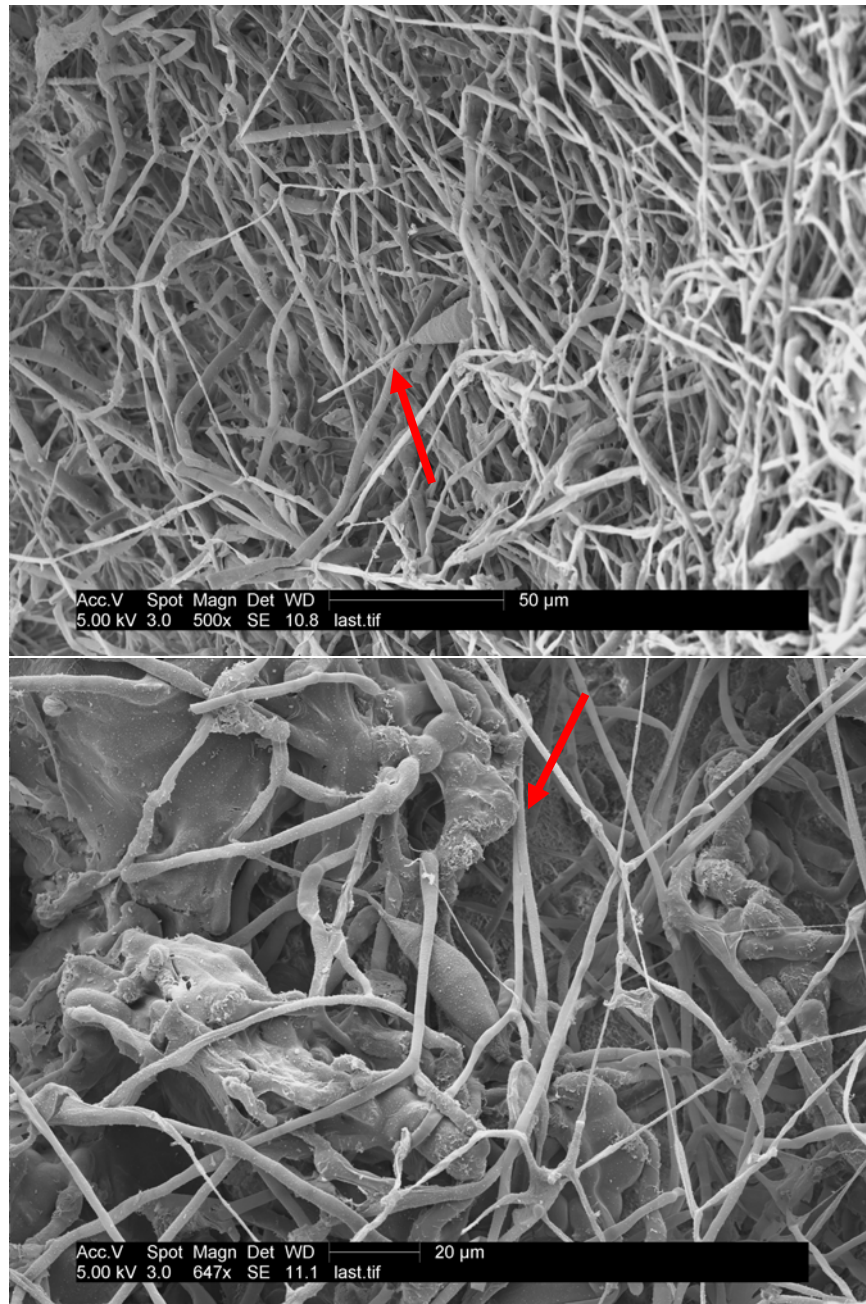
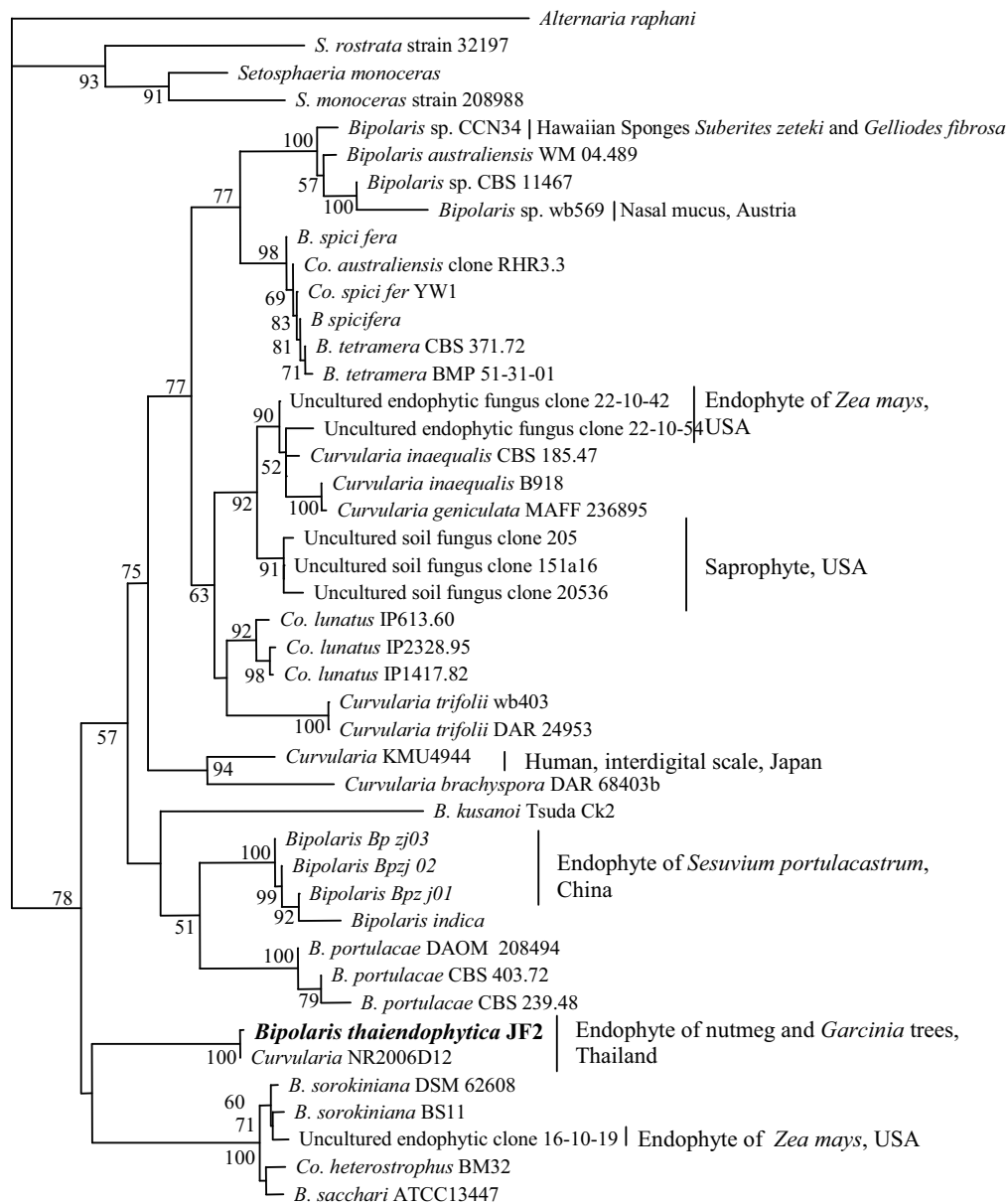


Fig. 5. A) Scanning electron micrograph of hyphae, mycelium and a conidium with a basal germ tube of *B. thaiendophytica* JF2 growing on PDA. **B)** Scanning electron micrograph of hyphae with swollen nodes (arrows) and a conidium.



10

Fig. 6. An inferred distance bootstrap phylogram from ITS sequences of *Bipolaris thaiendophytica* strain JF2 and 43 taxa retrieved from GenBank. Number at each internode is the bootstrap value of neighbor-joining analysis from 1,000 bootstrap replicates with general time-reversible distance correction. Scale bar represents 10 base pair substitutions. The ecological interaction of some taxa is diagrammed to the right.

Biogases produced by *Muscodora albus* MFC2 and its potential application for control *Colletotrichum gloeosporioides*

Jeerapun Worapong^{1*}, Sittiwat Lertsiri¹, Monrueedee Srisaisup¹, Jetsada Wichaphon¹, Worachit Teeraritchalerm¹, and Gary A. Strobel^{2*}

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University

²Department of Plant Sciences and Plant Pathology, Montana State University, Bozeman, Montana 59717, USA

*Corresponding authors:

Jeerapun Worapong: E-mail address: stjwr@mahidol.ac.th

Tel.: 662-441-9816 Ext. 1133; Fax: 662-889-3955,

Gary A. Strobel: E-mail address: uplgs@montana.edu

Abstract

Application of the fungus *Muscodora albus* MFC2 to control *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from mango cultivar Nam-Dok-Mai was evaluated. After 5-day exposure with ten-day old PDA *Muscodora albus* MFC2 cultures, a number of *C. gloeosporioides* plugs were killed while some remained alive in vitro tests. Fourteen-day old *M. albus* MFC2 cultures in autoclaved non polished rice grain mixture could either inhibit or and kill the growth of *C. gloeosporioides* mycelial plugs on PDA plates after 10 day exposure. The same amount of *M. albus* MFC2 colonized grains provided 90% inhibition of *C. gloeosporioides* spore germination after 24-h exposure. Five-day fumigation with 50 g of 14-day old *M. albus* MFC2 colonized grains partially retard growth *C. gloeosporioides* in wound-inoculated mangoes. The GC-MS analysis showed that putative bioactive volatile compounds of 14-day old *M. albus* MFC2 colonized grains were methyl isobutylate, ethyl isobutylate, butyl isovalerate and 1-ethenyl-4-methoxy-benzene. The serendipitous result of high production of ethanol and hydrocarbons including α -guaiene, trans(β)-caryophyllene, and aromadendrene from *M. albus* MFC2 colonized non polished rice grains became a valuable observation with regard to alternative energy.

Keywords: anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, endophyte, mango, volatile organic compound (VOC)

Introduction

Mango (*Mangifera indica* Linn) is one of the world's most famous fruits. The most popular cultivar for ripen fruit trading that has been cultivated in Thailand is Nam Dok Mai for its unique flavor, texture, size and attractive appearances (Figure 1). These distinctive properties make the Nam Dok Mai variety become the first exported fruit from Thailand to Asia, Europe and America. However, mango fruit of this cultivar is sensitive to physical and chilling injury and is susceptible to anthracnose disease that is caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Symptoms on the surface of mango fruits include the tear-stain patterns with characteristic brown to black lesions that develop after harvesting, resulting in the loss of export value for mango. Unfortunately, disinfestations of fresh mango fruit using chemical control of anthracnose is difficult since *C. gloeosporioides* remains quiescent in the cuticle of unripe fruit after harvest and prolonged storage leading to physiological changes in the fruit, favoring pathogen development (Eckert et al., 1996). The anthracnose infections can be prevented either with protective treatments or by treatment with pre- and post-harvest fungicides that penetrate the infection site to restrain further development. Using hot water dips incorporating fungicides and spraying with benzimidazole and ergosterol biosynthesis inhibitors (EBIs) is relatively effective in protecting the crop against pathogen infection and in extending the storage life of mango fruit during overseas shipment (Johnson et al., 1997; Chung Kuo, K., 2001; Swart et al., 2002). However, those chemicals are expensive and hazard to human while a biological approach would be more environmentally appealing. Therefore, biocontrol agents were evaluated as an alternative to fungicides to control anthracnose on the mango to avoid the hazardous of chemicals to human, animals and environments.

Biocontrol agents that recently have been used for postharvest disease control are, for example, *Bacillus licheniformis* and *Muscodora albus*. *B. licheniformis* was elucidated as a pre and post-harvest spray treatment either on its own or alternated with copper oxychloride to control mango fruit diseases (Govander, et al., 2001 and 2005; Silimela and Korsten, 2007). Another interesting biofumigant source is the endophytic fungus *M. albus* strains CZ-620 that was firstly discovered by Strobel et al. (2001). Several strains of

M. albus have been reported as diverse and effective volatile organic compounds (VOC) against many plant pathogens (Worapong et al., 2002; Daisy et al., 2002a, b; Sopalun et al., 2003; Erza et al., 2004). In addition, Strobel et al. (2001) showed that artificial mixtures of these VOCs can inhibit and kill fungal pathogens.

Mercier and Jime' nez (2004) showed that the *M. albus* strain CZ-620 cultivated in autoclaved rye grain can be applied as a mycofumigant for controlling *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* of apple, as well as brown rot of peaches in the near distance without physical contact with the fruits. They also reported that the VOCs of *M. albus* CZ-620 can partially inhibit the growth of *Colletotrichum acutatum*, *C. coccodes* and *Rhizopus* sp. on potato dextrose agar. Three abundant volatile compounds produced by one-day rye grain culture of the CZ-620 strain were 2-methyl-1-butanol, isobutylic acid, ethyl propionate, and followed by trace amounts of phenethyl alcohol, 2-methylbutyl acetate, isobutyl alcohol, ethyl isobutyrate, methyl 2-methylbutyrate and ethyl butyrate. They mentioned that single pure compounds of 2-methyl-1-butanol, ethyl butyrate and isobutyric acid were highly inhibitory activity, while ethyl propionate, ethyl isobutyrate and methyl isobutyrate had some inhibitory activity against agar plugs of *R. solani*.

The *M. albus* strain MFC2 isolated from *Myristica fragrans* grown in Thailand is closely related to the original *M. albus* CZ-620 but, its volatile antibiotics produced from PDA culture are different which include globulol and ledol (Sopalun et al., 2003). Promising applications of this strain and its VOCs have been analyzed. One of the potential uses was as a biocontrol agent of *Pythium ultimum* for vegetable crops (Worapong and Strobel, 2008).

In this study, the effect of volatile gases from *M. albus* MFC2 cultured in 2 different grain mixtures on the mycelial growth and conidia of *C. gloeosporioides* isolated from Nam-Dok-Mai mango was investigated both in vitro test and wound inoculated mango fruits. We also identified the bioactive VOCs produced by culture of *M. albus* MFC2 in a mixture of non-polished rice grains by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS).

Materials and Methods

Isolation and identification of anthracnose fungus from Nam-Dok-mai mango

Five ripen mango fruits with anthracnose symptoms were bought from a Salaya district orchard, then washed and air-dried.

The suspected black spots on 2 Nam-Dok-Mai mango was cut and put on the Potato Dextrose Agar (PDA), then incubated at 30°C for 3-5 days. Two colonies from each mango were chosen for tested pathogens. Koch postulates were used to confirm that those isolates were anthracnose pathogen. Identification of each isolate was performed based on combination of morphological classification (Sutton, 1980), and ITS1/2-5.8S DNA sequence (Lee and Taylor, 1990, White et al., 1990). Measurements of microscopic features were made using an Olympus CH-2 light microscope while the ITS1/2-5.8S DNA sequencing were done by the center of research of Ramathibordee Hospital. All of *C. gloeosporioides* strains used in this study were stored in a 15% glycerol solution at -80°C at the Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

Effect of VOCs from PDA *M. albus* MFC2 culture on *C. gloeosporioides*

The effect of volatiles on *C. gloeosporioides* was investigated on PDA as described by Strobel et al. (2001). A 1 cm strip of PDA was removed across each plate to make a medium-free moat physically separating two areas with medium and preventing any metabolites from diffusing across the plate through the medium. After growing *M. albus* MFC2 on one side of the plate for 10 days, a 6mm diameter plug of 5-days-old *C. gloeosporioides* on PDA was added to the other side before sealing with parafilm. This experiment was repeated two times with three replicates.

Preparation culture of *M. albus* MFC2 in 2 different grain mixtures

Two different formulas of grain mixtures were used in this experiment. The first formula was comprised of sorghum based animal feed, rice bran and water in the ratio of 100:10:10 by weight whereas the second one contained sorghum based animal feed, non-polished rice, rice bran, and water in the ratio of 70:30:10:10 by weight. To prepare *M. albus* MFC2 in each nutrient formula, 50 PDA plugs with 0.5 mm in diameter of 10 day *M. albus* MFC2 were added into 100 ml potato dextrose broth (PDB) and incubate without shaking at room temperature for 10 days. After that mix 50 ml 10 day of *M. albus* MFC2 with 50 g of each nutrient formula.

Effect of VOCs from *M. albus* MFC2 cultured on **2 different grain mixtures** on *C. gloeosporioides*

Ten day olds of *M. albus* MFC2 cultured in each nutrient formula (~7.6 g) was replaced on one side of the PDA plate, and then a 6 mm diameter plug of *C. gloeosporioides* was put to the other side before sealing with parafilm. The growth of *C. gloeosporioides* was recorded for the effect of volatiles from each formula. Three replicate plates were used for each experiment. Growth was rated after 10 days of exposure. Plugs with no growth of the pathogen were transferred to fresh PDA to assess their viability. After that an effective grain mixture was selected for further test of 2 different incubation times that were 10 and 15 days by the same procedures. This experiment was repeated three times with four replicates.

Effect of *M. albus* MFC2 colonizing grain volatiles on conidial germination of *C. gloeosporioides*

To observe the effect of *M. albus* MFC2 volatiles on germination rate of *C. gloeosporioides* conidia, the conidial solution was applied instead of the 6 mm-diameter plug of *C. gloeosporioides*. Conidia of 10-day *C. gloeosporioides* were re-suspended in 0.01% Tween 20, and the 10^4 spores/ml concentration was adjusted with a hemacytometer. Germ tube production was observed at 5, 24 and 48 hours after application under the light microscope. Three replicate plates were used, and this experiment was repeated two times.

Control of **anthracnose** on **Nam-Dok-mai mango** by *M. albus* MFC2 **colonizing grain volatiles of formula 2**

Nam-Dok-mai mangoes with no injury were selected, washed, air dried and placed in the 15.5x22.5x12.5 cm plastic box. The fruits were wounded on one side by piercing the skin with a 4 mm long sterilized sharp point knife. Each wound was then inoculated with 10 μ l of *C. gloeosporioides* suspension at $6-8 \times 10^7$ conidia/ml. The concentration of the conidia was measured as described previously. The *M. albus* MFC2 colonized 5 days in nutrient formula (50 g) in a 8 oz bottle was added to each box immediately after inoculation and the boxes were closed. The size of anthracnose pustule was measured by leaving the colonized grain in the boxes for 5 days at room temperature. There were 2 fruits per box and three boxes per treatment.

Analysis of VOCs produced by *M. albus* MFC2 colonized grains

The effective nutrient formula controlling *C. gloeosporioides* was selected for identification of volatile compounds produced by *M. albus* MFC2. Five 8 oz-bottles containing *M. albus* MFC2 colonized in nutrient formula 1 (50 g) for 5, 10 and 14 days at RT were connected to Solid Phase Micro Extraction (SPME) combined with gas chromatography-mass spectrometry. The SPME with polydimethylsioxane (PDMS) fiber (100 μ m, Supelco, Bellefonte, PA, USA) was used for volatile sampling. The adsorption time for volatiles produced by *M. albus* was 20 min at room temperature. After that, the fiber was thermally desorbed in GC injection port (220 °C for 5 min) to release those volatile compounds.

GC-MS (an Agilent 6890 plus GC/HP 5973 MSD, Agilent, USA) was used to identify the volatile organic compounds. Helium was used as a carrier at a flow rate of 1.5 ml min⁻¹ with split ratio of 1:1 at 220°C. The separation of volatile compounds was achieved on a fused silica capillary column (25 m x 0.32 mm i.d., HP-FFAP; J&W Scientific, Folsom, CA) coated with cross linked polyethylene glycol modified with nitroterephthalic acid as stationary phase (film thickness of 0.50 µm). Temperature program was as follows: 40°C for 2 min, ramped to 230°C at 10°C min⁻¹. Mass selective detector capillary direct-interface temperature was 280°C. Acquisition was performed in positive electron impact ionization mode (70 eV). The compounds were tentatively identified based on the comparison of the mass spectra of unknown compounds with those in the Wiley 275.L mass spectral database (Hewlett-Packard Co.). The volatile compounds from sterilized grain bottles with the same nutrient without culture of *M. albus* MFC2 were used as a control to subtract the background gas.

Results and Discussion

Isolation and identification *C. gloeosporioides* from Nam-Dok-Mai mango

Ten strains of *C. gloeosporioides* isolated from 5 mango fruits variety Nam-Dok-Mai in Nakornprathom orchards were selected for species identification based on the combination of morphological characteristics and ITS sequence. These ten strains of *C. gloeosporioides* were MN7, MN9, MN16, MN19, MN24, MN25, MN35, MN57, MN85 and MN86. All 10 isolated strains produced cylindrical conidia about 13.4-14.5 x 3.7-4.5 micron, and white fluffy to pale gray colonies with salmon orange oozing spores. These characteristics indicated that all of 10 should be classified as *C. gloeosporioides* as described by (Sutton, 1980). The BLAST search analysis of ITS1&2-5.8S DNA sequences strongly confirmed that 10 isolated strains were *C. gloeosporioides* with the 99% identity to *C. gloeosporioides* AJ301909.1.

Effect of volatiles from PDA *M. albus* MFC2 culture on isolated strains of *C. gloeosporioides*

There was no growth of *C. gloeosporioides* during 5-day exposed to *M. albus* MFC2. Viability of *C. gloeosporioides* after 5-day exposure to *M. albus* MFC2 growing on PDA was investigated. Upon transferring to fresh PDA after 5-day exposed to *M. albus* MFC2, six plugs of *C. gloeosporioides* test strains including MN7, MN9, MN24, MN25, MN35 and MN57 were killed while *C. gloeosporioides* isolates of MN16, MN19, MN85 and MN86 remained viable. Seven strains of *C. gloeosporioides* including MN7, MN9, MN24, MN25, MN35, MN57 and MN86 were used for the following experiments.

Effect of VOCs from *M. albus* MFC2 cultured in 2 different grain mixtures on *C. gloeosporioides*

VOCs from 10-day *M. albus* MFC2 cultured in formula 1 grain mixtures of sorghum based animal feed, rice bran and water in the ratio of 100:10:10 by weight provided 65-100% inhibitory activity against 6 *C. gloeosporioides* strains of MN7, MN9, MN25, MN35, MN57 and MN85, but kill a *C. gloeosporioides* strains of MN24 (Table 1). VOCs from 10-day *M. albus* MFC2 cultured in formula 2 grain mixtures of sorghum based animal feed, non-polished rice, rice bran, and water in the ratio of 70:30:10:10 by weight provided 100% inhibitory activity against 5 *C. gloeosporioides* strains of MN7, MN9, MN24, MN25, and MN85, but kill 2 *C. gloeosporioides* strains of MN35 and MN57 (Table 1). Additionally, VOCs from 14-day *M. albus* MFC2 cultured in formula 2 grain mixtures gave 100% inhibitory activity against 6 *C. gloeosporioides* strains of MN7, MN9, MN24, MN25, MN57 and MN85, but kill a *C. gloeosporioides* strains of MN35 (Table 2).

Effect of VOCs *M. albus* MFC2 volatiles on conidial germination rate of *C. gloeosporioides*

Antifungal volatile compounds from 5-day-old cultures of *M. albus* in 7.6 g of the ingredients containing sorghum based animal feed, non-polished rice, rice bran, and water in the ratio of 70:30:10:10 by weight provided 90% inhibition of germ tube germination of *C. gloeosporioides* spores that were close to *M. albus* MFC2 at 2 cm (Figure 2. A and B) compared to the control treatment (Figure 2. C) at the same distance. However, the *C. gloeosporioides* spores that far away from *M. albus* MFC2 colonizing grain culture could produce germ tubes at the same rate of the control treatment.

Control of anthracnose on Nam-Dok-mai mango by *M. albus* MFC2 colonizing grain volatiles of formula 2

Necrosis lesions on wound-inoculated fruits of the control were bigger than necrosis lesions on wound-inoculated fruits exposed to 10-day-old *M. albus* MFC2-colonized grains.

Analysis of VOCs produced by *M. albus* MFC2 colonized grains

After subtracting volatile compounds from sterilized non polished rice mixture bottles without culture of *M. albus* MFC2, the SPME connected with GC-MS revealed that there were 17 volatile compounds at 5- and 10- day incubation periods, and 21 volatiles molecules at 14-day incubation (Table 3). Among 21 volatile compounds, they were an acid, 2 carbonyls, 3 alcohols, 7 esters and 8 hydrocarbons. Four volatile compounds distinctively found only at 14-day culture were methyl isobutylate, ethyl isobutyrate, butyl isovalerate and 1-ethenyl-4-methoxy-benzene. High concentration volatile compounds appearing through out the incubation time were ethanol, followed by isoamyl alcohol, aromadendrene, trans (beta)-caryophyllene, isoamyl acetate, α -guaiene, phenethyl acetate, ethyl acetate and isobutyl alcohol. Five other volatiles consistently found in small amounts were hexyl acetate, mesifuranne, 3-octanone, trans-caryophyllene, and 2-nonanone. Volatile compounds including isoamyl acetate, isoamyl alcohol, α -guaiene, δ -guaiene, trans (beta)-caryophyllene, phenethyl acetate and aromadendrene increased with prolonged incubation of the *M. albus* MFC2 colonizing grain culture.

Acknowledgement

Financial assistance was provided by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission on Higher Education (CHE) number RMU4980030.

References

- Ann, P.J., Chen, M.F. and Hwang, R.C. (1997) Effects of environmental factors on disease incidence of mango anthracnose and bacterial black spot. In: Proceedings of the Symposium on Climatic Effects on the Occurrence of Plant Diseases and Insects, pp. 29-40 (Tu, C.C. and Yang, C.M., Eds.), Society of Agrometeorology, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.
- Arauz, L.F., 2000. Mango anthracnose: economic impact and current options for integrated management. Plant Dis. 84, 600–611.
- Chung Kuo, K. (2001) Sensitivity of Mango Anthracnose Pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*, to the Fungicide Prochloraz in Taiwan. Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(B) Vol. 25, No. 3, pp. 174-179.
- Mercier, J. and Jime' nez, J. I. (2004) Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. Postharvest Biol. Technol. 31:1–8.
- Kotchakorn Kongkaew, Wissanu Niyomlao and Puwanart Fuggate, Suwalee Chandkrachang, (2005) Preharvest chitosan sprays for the control of postharvest diseases and quality of Nam-Dok-Mai mango during storage. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005.

- Prior, C., Elango, F. and Whitwell, A. (1992) Chemical control of *Colletotrichum* infection in mangoes. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, pp. 326-336 (Bailey, J.A. and Jeger, M.J., Eds.), CAB International, Oxon, U.K.
- Teerapawa, W., N. Tongtummachard, V. Premanoj and S. Vijittranond. 1994 (b). The prevention and treatment of mango post-harvest disease for freight shipment. Research Report 1994, Ministry of Agriculture, Thailand, pp. 115-139.
- Johnson, G.I., Sharp, J.L., Milne, D.L., Oosthuyse, S.A., 1997. Postharvest technology and quarantine treatments. In: Litz, R.E. (Ed.), *The Mango: Botany, Production and Uses*. CAB International, Cambridge, pp. 447–507.
- Swart, S.H., Serfontein, J.J., Kalinowski, J., 2002. Chemical control of post-harvest diseases of mango-the effect of prochloraz, thiobendazole and fludioxonil on soft brown rot, stem-end rot and anthracnose. S.A. Mango Growers' Assoc. Yearbook 22, 55–62.

Table 1. Effect of VOCs from 10-day *M. albus* MFC2 colonizing on 2 different grain formulas on growth and viability of 7 isolates of *C. gloeosporioides* after 10-day exposure

Test strains	% inhibition (and viability) by VOCs of Formula 1	% inhibition (and viability) by VOCs of Formula 2
MN7	100, 100, 65 (3G)	100, 100, 100 (3G)
MN9	100, 100, 100 (3G)	100, 100, 100 (3G)
MN24	100, 100, 100 (3D)	100, 100, 100 (2D/G)
MN25	100, 84, 73 (D/2G)	100, 100, 100 (2D/G)
MN35	100, 100, 100 (2D/G)	100, 100, 100 (3D)
MN57	100, 75, 100 (3G)	100, 100, 100 (3D)
MN86	100, 100, 100 (3G)	100, 100, 100 (2D/G)
Total dead colony	6/21	12/21

Table 2. Effect of VOCs from 10- and 14-day *M. albus* MFC2 colonizing grain formula 2 on growth and viability of 7 isolates of *C. gloeosporioides* after 10-day exposure

Test strains	% inhibition (and Viability) of 10-day <i>M. albus</i> MFC2 colonizing grain	% inhibition (and Viability) of 14-day <i>M. albus</i> MFC2 colonizing grain
MN7	100, 100, 100, 100, 93, 100, 93, 100, 100, 100, 100, 96, (12G)	100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, (10D, 2G)
MN9	100, 100, 92, 100, 100, 100, 96, 100, 92, 100, 100, 100, (1D, 11G)	100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, (10D, 2G)
MN24	100, 90, 100, 100, 100, 100, 96, 100, 100, 100, 96, 100, (5D, 7G)	100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, (10D, 2G)
MN25	97, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 94, 100, 100, (5D, 7G)	100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, (8D, 4G)
MN35	97, 100, 100, 97, 100, 100, 97, 100, 100, 100, 97, 100, (5D, 7G)	100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, (7D, 5G)
MN57	44, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, (4D, 8G)	97, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, (5D, 7G)
MN86	81, 100, 100, 75, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, (4D, 8G)	100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, (10D, 2G)
Total dead colony	24/84	60/84

Table 3. Identified volatile compounds produced by *M. albus* non-polished rice culture at 5-, 10- and 14-day old.

Rt ^a	Compounds	Abundance (Peak area x 10,000)		
		5 days	10 days	14 days
1.44	ethyl acetate	25.46	25.79	23.99
1.70	methyl isobutyrate	ND	ND	16.27
1.83	Ethanol	103.54	133.41	130.91
2.13	ethyl isobutyrate	ND	ND	21.47
3.87	isobutyl alcohol	16.01	16.62	16.86
4.35	isoamyl acetate	13.96	15.10	30.43
5.40	butyl isovalerate	ND	ND	10.00
5.63	isoamyl alcohol	27.98	53.01	79.81
6.35	3-octanone	3.89	3.72	3.30
6.78	hexyl acetate	7.02	7.06	7.00
8.26	2-nonanone	1.59	1.07	1.24
10.64	isobutyric acid	2.04	2.24	2.11
10.69	α-bergamotene	12.51	5.60	13.52
10.75	α-guaiene	17.73	10.38	25.24
10.83	Trans-caryophyllene	1.96	1.04	3.10
10.94	Mesifuranne	7.69	3.83	4.15
11.98	1-ethenyl-4-methoxy-benzene	ND	ND	5.17
12.23	δ-guaiene	2.58	1.98	7.03
12.40	Trans (beta)-caryophyllene	3.34	1.13	42.96
13.48	Phenethyl acetate	12.04	10.41	24.24
17.30	Aromadendrene	31.61	30.40	52.92

Notes: *Cut-off peak area at 10000. ND: Not detected or peak area is lower than cut-off at 10000 (or at 1.00 as shown in this table). ^aRetention time (Rt) were based on FFAP column.

Figure legends

Figure 1. Big oval with a sharp-pointed tip with golden-yellow color Tearstain patterns with characteristic brown to black lesions of Nam-Dok-Mai mango fruit infected by *C. gloeosporioides*

Figure 2. The comparison of GC/MS analysis for the volatile compounds produced by *M. albus* MFC2 colonized grains at 5, 12 and 14-day-old cultures and the volatile compounds of sterilized grain bottles that holding the same nutrient without culture of *M. albus* MFC2 used as a control to subtract the background gas. The GC/MS chromatogram profiles of TIC: SCSLS606.D, TIC: SCSLS609.D TIC: SCSLS610.D and TIC: SCSLS604.D show volatile compounds produced by *M. albus* MFC2 colonized grains at 5, 12 and 14-day-old cultures and the control, respectively.

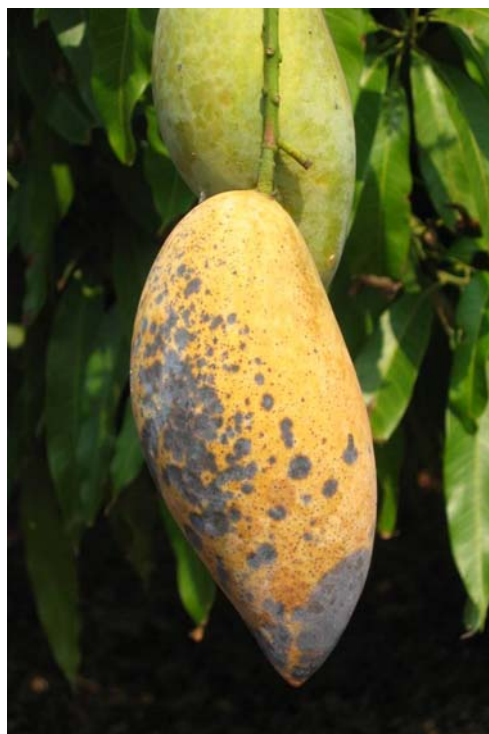


Figure 1. Big oval with a sharp-pointed tip with golden-yellow color Tearstain patterns with characteristic brown to black lesions of Nam Dok Mai mango fruit infected by *C. gloeosporioides*

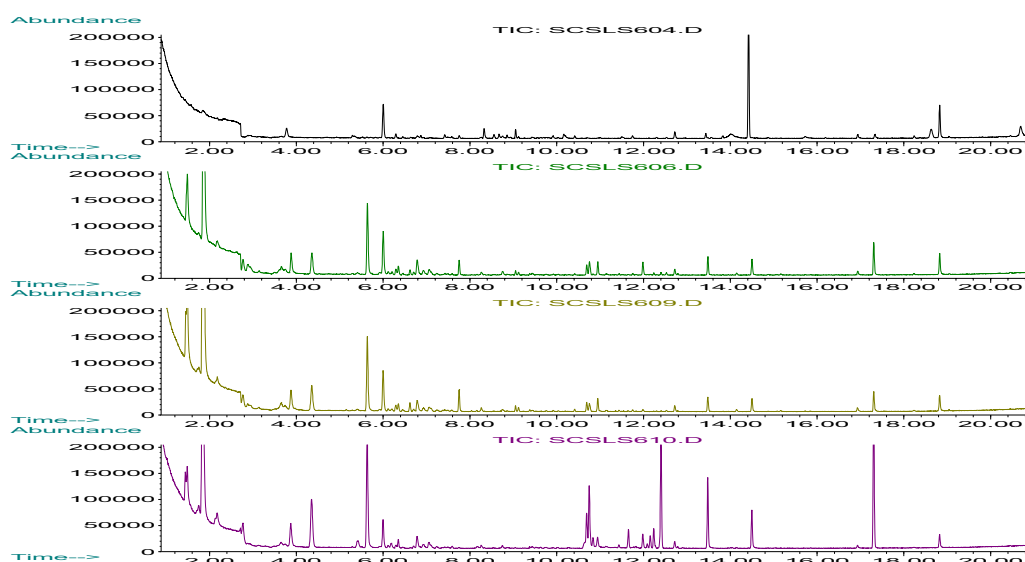


Figure 2. The comparison of GC/MS analysis for the volatile compounds produced by *M. albus* MFC2 colonized grains at 5, 12 and 14-day-old cultures and the volatile compounds of sterilized grain bottles that holding the same nutrient without culture of *M. albus* MFC2 used as a control to subtract the background gas. The GC/MS chromatogram profiles of TIC: SCSLS606.D, TIC: SCSLS609.D, TIC: SCSLS610.D and TIC: SCSLS604.D show volatile compounds produced by *M. albus* MFC2 colonized grains at 5, 12 and 14-day-old cultures and the control, respectively.

SCREENING OF ENDOPHYTIC FUNGI WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITIES FROM MEDICINAL PLANTS

Atinuch Narksavaek, Monrueedee Srisaisup,
Jeerapun Worapong* and Pranee Inprakhon*

Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University,
Rama 6 Rd., Bangkok 10400, Thailand

Abstract

The endophytic fungi with antibacterial activities were screened from Thai medicinal plants. One hundred and forty six fungal endophytes were isolated from six medicinal plants collected from Koa-Yai forest, Nakornrachasima provinces whereas 380 endophytic fungi were isolated from five herb plants in Kanchanaburi campus of Mahidol University. All 526 fungal endophytes of two host origins were determined for antibacterial activities against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 using dual co-culture method on Potato Dextrose Agar and Glucose Peptone Agar. There were 18 endophytic isolates with an antibacterial activity against *S. aureus* and 17 isolates have ability to inhibit *E. coli*. Seven endophytic isolates could inhibit growth of both *E. coli* and *S. aureus*. Starting from these results, the antimicrobial activity of endophyte extracts from different culturing methods and media was also tested by disc diffusion method against five drug-resistant strains including *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *MRSA-1320* and *MRSA-2*. Twenty three extracts of 10 day PDB shaking cultures had ability to inhibit growth of all pathogens. In addition, the 15 extracts of which cultured for 10 days in stand and shaking GP both have the inhibition activity against all pathogens. These data indicate that rainforest endophytes from medicinal trees are reservoirs to search for antibiotic compounds against drug-resistant bacteria.

***Corresponding authors:** stjwr@mahidol.ac.th and scpip@mahidol.ac.th

Introduction

The pathogenic microorganisms have speedy spread for a century. Especial for the food-borne pathogen which eases to infected in human body such as *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, and *Escherichia coli* [1]. These pathogenic bacteria that have overcome to multiple drugs are a global problem causing increased concern in healthcare institutions. In the past decades, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections have been estimated to kill a lot of people both in develop and developing countries [2]. One possible solution is the discovery and introduction of new antibacterial compounds from many sources such as plants, microorganisms and others. Endophytes from rain forests are one of the great source of new antimicrobial compounds because there is a number of undiscovered endophytes residing in the estimated 500,000 species on the world [3-6]. *Pestalotiopsis* is one of the most common and amazing endophytic genus that produces many active compounds inhibiting plant and human pathogens [7]. Therefore this project was aimed to isolate endophytes from Thai medicinal plants growing in forests of Thailand, and to determine antibacterial activity against drug resistant bacterial strains of *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *MRSA-1320* and *MRSA-2*.

Materials and Method

Origin of plant materials and laboratory isolation procedure

Table 1 Host plants and their geographical regions used in this experiment

Host plant	Geographical regions
<i>Begonice</i> sp.	Kanchanaburi
<i>Albizzia myriophylla</i> Benth	Kanchanaburi
<i>Paederia</i> sp.	Kanchanaburi
<i>Quereus lauritolia</i> Indica	Kanchanaburi
<i>Caesalpinaceae</i> sp.	Kanchanaburi
<i>Zingiberaceae</i> sp.	Nakornrachasrima
<i>Arisaema pattaniensis</i> Gagnep	Nakornrachasrima
4 unknowns botanical name	Nakornrachasrima

The eleven healthy medicinal plant materials were collected from two forests in Kanchanaburi campus of Mahidol University and Nakornrachasrima provinces of Thailand (Table1). Collection and isolation methods were performed as described by Strobel [4].

Determination of antibacterial activity

Fungal endophytes were grown on Potato Dextrose Agar (PDA) and Glucose Peptone Agar (GPA) for 7, 10 and 14 days at 28°C. To do dual antagonistic test, *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 29522 were streaked on each Mueller Hinton agar (MHA) and incubate 24 h at 37°C. Afterward, 5 single colonies of tested bacteria were put in each Mueller Hinton broth (MHB) and incubated for 5 hours in rotary shaker. Each tested bacterial culture in a log phase was spread 0.1 ml on MHA plates. Then a fresh colony of 7, 10 and 14 day old of each endophyte was cut and placed on each tested bacterial MHA plate. Clear zone of growth inhibition was measured for antagonistic activities of endophytic fungi against tested pathogens.

Crude extraction for antimicrobial test

The endophytic strains that potentially produce bioactive compounds were grown on PDA and GPA medium for 10 days. Then 10 days of each endophyte strain on each medium was cut into small piece (0.5 cm²) as inoculums. One hundred pieces of each endophytic inoculum on each medium were inoculated in 2L flasks containing 1000 ml PDB and GP medium and leaved for 10. After 10 days, culture broths were filtered through cheesecloth for secondary crude extraction. Method of crude isolation was performed using Ethyl Acetate (Merck, USA) as an extraction solvent [7]. The organic part or ethyl acetate fraction was collected and evaporated out using rotary evaporator BUCHI EL-131 at 50°C.

Disc diffusion assay for antimicrobial against drugs resistant strains

To determine antimicrobial activity of crude extract, drug resistant strains of *Acinetobacter*, *P. Aeruginosa*, *C. Albicans*, Methicillin-resistant *S. aureus*-1302 (MRSA-1320) and Methicillin-resistant *S. aureus*-2 (MRSA-2) were used. These drug resistant pathogens were kindly provided by Associate Professor Srisurang Tantimavanich, Department of Clinical Microbiology, Siriraj Hospital campus, Mahidol University. Put on MHA coating bacterial plate in 4 sections. Twenty micro liter of equal concentration of crude extract were applied on sterile paper disc in a MHA plate coated with log phase pathogen. The same amount of ethyl acetate was used as a control.

Results and Discussion

Isolation of endophytic fungi

Five hundred and twenty six endophytic fungi were isolated from eleven plant species of two forest regions, Kanchanaburi (380 strains) and Nakornrachasrima province (146 strains) (Table2).

Table 2 Numbers and strains endophytic fungi from each host plant

Host plant	Geographical regions	Strain code	No. of isolates
<i>Begonice</i> sp.	Kanchanaburi	BL1-31, Bb1-8, Bs1-18	57
<i>Albizzia myriophylla</i> Benth	Kanchanaburi	AL1-53, Ab1-23, As1-3	79
<i>Paederia</i> sp.	Kanchanaburi	TL1-52, Ts1-23	75
<i>Quereus lauritolia</i> Indica	Kanchanaburi	QL1-40, Qb1-8, Qs1-13	61
<i>Caesalpiniaceae</i> sp.	Kanchanaburi	CL1-42, Cb1-27, Cs1-29, CC1-10	108
<i>Zingiberaceae</i> sp.	Kao-Yai, Nakornrachasrima	K6s1-11, K6L1-10, K6F1-6	27
<i>Arisaema pattaniensis</i> Gagnep	Kao-Yai, Nakornrachasrima	K1s1-9, K1L1-22	31
4 unknowns botanical name	Kao-Yai, Nakornrachasrima	K2s1-7, K2L1-15, K3s1-5, K3F3, K3L1-15, K4F1, K4L1-6, K4s1-12, K5s1-10, K5L1-16	88
Total			526

Among the plants species, *Caesalpiniaceae* provided the highest number of 108 endophytic fungi. In regard to the plant parts, it was found that the leaf gave various isolates of endophytes more than other parts of the same host plant.

Antibacterial activity

The production of antimicrobial agents by endophytic fungi might be influenced by the culturing media [8]. Therefore, the 7, 10 and 14 day of endophyte which were grown on PDA and GPA and their inhibiting ability against *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923 were compared (Table 3). Table 3 also showed the strain of endophytic fungi which have the inhibition activity against *E. coli* and *S. aureus* in different culture medium. The total 13 isolates could inhibit growth of *E. coli* on PDA and GPA. The growth of *S. aureus* was inhibited by 15 isolates endophyte on PDA and GPA. In addition, 4 isolates of Tl11, k1L21, K6L5 and Qb19 on GPA or PDA cultures had high antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*. Figure 1 illustrated inhibition clear zone of *S. aureus* growth caused by the strain Qb8 and Qb19. Thirteen of 15 isolates cultured on GPA could partially inhibit either *E. coli* or *S. aureus*. The antibacterial activity on GPA show that 2 isolates of K1L22 and K6L5 from *Zingiberaceae* sp. growing on GPA exhibited antibacterial activities against of *E. coli* and *S. aureus* with inhibition zone 0.8-2.0 cm. The activity on PDA reveal that 3 isolates of K6L5, Tl11 and Qb19 show their inhibiting activities against *E. coli* and *S. aureus* with inhibition zone 0.75-1.75 cm.

Table 3 The number of all isolated endophyte cultured for 7, 10 and 14 days on PDA and GPA which have antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*

Inhibition strains against <i>E.coli</i>		Inhibition strains against <i>S. aureus</i>	
GPA	PDA	GPA	PDA
K1L22, K6L5, K1L21, K5s11, K6s8, K6F2/2-1, K6L7/2, Qs4	K6L5, Tl11, Qb19, Qs4, Ts1, K5s11, K6F1/1, K6F4	K1L22, K6L5, Qb9, Qb18, Ab17/1, Ab18, Al38, K6F5/1, K6s10/1	K6L5, Tl11, Qb19, Qb8, Qb9, Qb10, Qb13, Qb17, Qb18, Qb21, Qb22, Ab12, Ab17/1, Ab18, Al38, K1L21, K6s10/2, K6L7/2

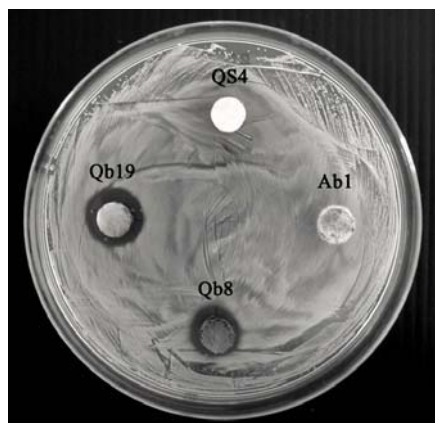


Fig1. Anti *S. aureus* tested on Mueller Hinton Agar. Endophyte strains Qb8 and Qb19 growing on PDA for 7 days could inhibit *S. aureus* ATCC 25923.

Table 4 presented the total number of endophytic fungi related with their host plants, which have antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*. Notably, *Quereus lauritolia* and *Zingiberaceae* sp. are plants hosting high numbers of endophytes with antimicrobial activity (Table 4). It is not surprised that *Zingiberaceae* is the common plant family hosting endophytes with antimicrobial activity as reported by Bussaban et al. [9, 10].

Determination of inhibiting ability of endophyte crude extracts

The discovery of antibiotic against pathogens and drug resistant bacteria constitutes a priority research in medical field [2]. Therefore, all endophytes that were active against *E. coli* or *S. aureus* on GPA and PDA were tested against pathogenic strains in this part (Table 5).

Table 4 Numbers of endophytes with antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli* using dual co-culture method

Host plant	Activity against <i>E. coli</i>		Activity against <i>S. aureus</i>	
	PDA	GPA	PDA	GPA
<i>Begonice</i> sp.	-	-	-	-
<i>Albizzia myriophylla</i> Benth	-	-	4	3
<i>Paederia</i> sp.	2	-	1	-
<i>Quereus lauritolia</i> Indica	2	1	8	2
<i>Caesalpinaceae</i> sp.	-	-	-	-
<i>Zingiberaceae</i> sp.	4	4	2	3
<i>Arisaema pattaniensis</i> Gagnep	-	2	1	1
4 unknowns botanical name	1	1	-	-

Table 5 Number of endophytic crude extracts with antimicrobial activities from different culture media under shaking and still conditions

Pathogenic strains	Number of extracts with antibacterial activities			
	Glucose peptone broth (GPB)		Potato dextrose broth (PDB)	
	Still	shaking	Still	shaking
<i>Acinetobacter</i> sp.	14	15	23	23
<i>P. aeruginosa</i>	14	15	22	23
<i>MRSA-1302</i>	14	15	23	23
<i>MRSA-2</i>	13	15	23	23
<i>C. albicans</i>	14	15	23	23

Table 5 displayed the antimicrobial activity of crude extract from 10 day culture in GP broth and PDB by different condition. The results indicate that 23 extracts of 10 day PDB shaking cultures had ability to inhibit growth of all pathogens. In addition, the 15 extracts which were cultured for 10 days in shaking GP broth, have the inhibition activity against all pathogens. Moreover, the two different culture conditions of same culture media gave no different activity of crude extract against 5 pathogenic bacteria, *Acinetobacter* sp., *P. aeruginosa*, *MRSA-1302*, *MRSA-2* and *C. albicans*. These results implied that there is no specific optimal condition enhancing endophytes to produce active secondary metabolites. It seems that ability to produce active metabolite depending on the species of endophytes.

Conclusion

In this study, several endophytic fungi screened from Thai ethnobotanical plants promise for antibiotic compounds against drug resistant bacteria. The highest numbers, 108 isolates of endophytic fungi, were screened from *Caesalpinaceae* plant species. The leaf is the part of plant providing the most number of endophytes. A result of culture conditions suggested that antibacterial activity against tested pathogens seem to be varied

according to species of endophyte themselves and types of media. The purification and structure elucidation of such compounds is actually in progress in our laboratory.

Acknowledgements

This work was major supported by the grant number RMU4980030 from Commission on Higher Education (CHE) and Thailand Research Fund (TRF). The minor financial assistance was provided by the grant from Mahidol University. We are grateful for a master scholarship to Miss Atinuch Narksavaek supported by the Center for Agricultural Biotechnology under the Higher Education Development Project, Commission on Higher Education, the Ministry of Education.

References

- [1] Liu X, Dong M, Chen X, Jiang M, Lv X, Zhou J. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;78:241–7.
- [2] RM K, MA M, Nadle J PS, K G, Ray S HL, R L, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*. 2007;298:1763–71.
- [3] Lu H, Zou WX, Meng JC, Hu J, Tan RX. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*. 2000;151(1):67-73.
- [4] Strobel GA. Microbial gifts from rain forests. *Can J Plant Pathol*. 2002;24:14-20.
- [5] Schulz B, Boyle C, Draeger S, Rommert A-K, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol Res*. 2002;106(9):996-1004.
- [6] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*. 2003;5:535–44.
- [7] Strobel GA, Ford E, Worapong J, K. Harper J, M. Arif A, M. Grant D, et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*. 2002;60:179–83.
- [8] Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Panphut W, Thongon N, Danwisetkanjana K, Ruangrunsi N, et al. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2004;20:265-72.
- [9] Bussaban B, Lumyong P, McKenzie EH, Hyde KD. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. *Canadian journal of microbiology*. 2001;47(10):943-8.
- [10] Bussaban B, Lumyong P, Hyde KD, McKenzie EH. Three new species of *Pyricularia* are isolated as Zingiberaceous endophyte from Thailand. *Mycologia*. 2003;95(3):519-24.

A novel strain of bacterial endophyte *Paenibacillus polymyxa* TL41 isolated from *Paederia foetida* and its potential to control *Xanthomonas campestris* on lettuce

Monrueedee Srisaisup¹, Supasssara Chansri¹, Pat A. Okubara³ and Jeerapun Worapong^{1*}

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Rd., Payathai, Bangkok, Thailand 10400

*Corresponding author

E-mail: stjwr@mahidol.ac.th tongseeworapong@gmail.com

Phone(s): 662-441-9820 Ext. 1133, Fax: 662-441-9322

ABSTRACT

The present study firstly reported a novel strain of bacterial endophyte *Paenibacillus polymyxa* TL41 isolated from a leaf of stink vine (*Paederia foetida*) growing at Mahidol University, Kanchanaburi Campus, Thailand. We also addressed its potential application as a good biocontrol agent of *X. campestris* on lettuce under field experiment conditions. A dual antagonistic test showed that a 8-10-hr old Mueller Hinton broth culture of *P. polymyxa* TL41 could strongly inhibit the growth of *X. campestris* on Mueller Hinton agar. Thoroughly mixing 500 g mixture of soil and field soil at ratio 1:1 by weight with 4.2×10^9 CFU of *P. polymyxa* TL41 could restore seed germination in pots infested with 1.1×10^9 CFU of *X. campestris* under field experiments after 14 days of planting. *P. polymyxa* TL41 at this concentration could promote growth of lettuce for up to 5 and 8 weeks after planting in inoculated soil with *X. campestris* to level close to that of the non-infested control, but higher than infected *X. campestris* lettuce populations. *P. polymyxa* TL41 was able to inhibit *Alternaria alternata* (54%), *Colletotrichum capsici* (28%), *C. gloeosporioides* (90%), *Fusarium* sp. (53%), *F. equiseti* (63%), *Phytophthora palmivora* (68%) and *Pythium ultimum* (100%) on potato dextrose agar. The obtained results provide promising information for this endophytic bacterium in the control of a broad spectrum of plant pathogens.

Key words: antimicrobial activity, biocontrol agent, endophyte, *Paederia foetida*, *Paenibacillus polymyxa*, stink vine, *Xanthomonas campestris*

INTRODUCTION

MATERIALS AND METHODS

Endophytic isolation, growth and storage

The stink vine twigs (*Paederia foetida* Linn, Rubiaceae) was collected from the forest at Mahidol University, Kanchanaburi Campus, Saiyok, Kanchanaburi, Thailand. A plant sample was dissected into 4 parts that were leaf (L), outer bark (OB), inner bark (IB), and cortex (C). The isolation procedures were followed Worapong et al., 2006. Endophytic isolates and a pure bacterial culture designated – TL41 were transferred on potato dextrose agar (PDA, HiMedia, Mumbai, India). Morphological characteristics were examined with a light microscope (Seek Microscope LW 100 BT, China). The ability to use carbon source was done using api 20 C AUX (bioMérieux, NC, USA (<http://apiweb.biomerieux.com>)). The pure culture of TL41 endophytic bacterium was preserved using 15% glycerol and stored at –80 C at the culture collection, department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University.

Identification based on 16S rDNA analysis

The pure culture of TL41 endophytic bacterium TL41 was grown in Mueller Hinton broth (Difco, MD, USA) at room temperature for 18 hours. This overnight culture was used as a template DNA to amplify 16S rDNA with universal primers; 27F, 357F, 920F, 520R, 1080R, 1522R. The PCR and sequencing conditions were followed protocols of Dahllöf et al. (2000). The DNA was amplified in a Mastercycle Eppendorf thermocycler (Eppendorf, Germany). The 16S rDNA PCR product of strain TL41 was sent to the Ramathibodee Research Unit, Ramathibodee Hospital for sequencing. The 16S rDNA sequence was determined manually on both strands and submitted to GenBank with a serial number xxxx. The 16S rDNA sequence of TL41 endophytic bacterium was also searched and compared with other sequences under Blast 2.1, a search of NCBI at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Comparison and alignment of 16S rDNA sequences from 10 closely related bacterial strains and 4 taxa of out group obtained from GenBank (Table 1) were analyzed using CLUSTAL W version 1.7 (Thomson and Gibson, 1997) and manually aligned afterwards. An inferred phylogenetic tree was reconstructed using a general time-reversible model of distance method in PAUP program (test version 4.0b3, Macintosh). The reliability of the tree topology was

determined by bootstrap analysis using 1,000 replicates for the neighbor joining analysis. The TREEVIEW program was used to demonstrate the inferred phylogenetic trees (Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Scotland, UK).

Antagonistic tests against *Xanthomonas campestris*

The *X. campestris* was bought from the department of Agriculture of Thailand. Both endophytic bacterium TL41 and *X. campestris* were grown overnight in Mueller Hinton broth at room temperature. The concentrations of both endophytic bacterium TL41 and *X. campestris* were measured every 2 hour using viable plate count method, and calculated as Colony Forming Unit (CFU). The inhibition activity of endophytic bacterium TL41 against *X. campestris* was detected 2-hr interval time using inhibition disk assay. *X. campestris* overnight culture broth at 0.1 ml was added on Mueller Hinton agar, then 20 ul of endophytic bacterium TL41 overnight culture broth was applied on 6 mm paper disk.

Antagonistic tests against fungal and oomycetous pathogens in vitro

The endophytic isolate TL41 was grown in PDA at room temperature for 2 days. Then, 5 small plugs of each plant pathogen were placed 1.0 cm from the edge of TL41 colony with two replicate plates. These pathogens included the following: *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici*, *Fusarium* sp., *F. equiseti*, *Ganoderma* sp., *Geotrichum* sp., *Phytophthora palmivora*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia* sp., and *Sclerotinia* sp.. The strains of *A. alternata*, *C. gloeosporioides* and *F. equiseti* were isolated from chili, mango and banana, respectively. The *C. capsici* and *Ganoderma* sp. were bought from the department of Agriculture of Thailand. The species of *Fusarium*, *Geotrichum*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia*, and *Sclerotinia* were provided by Professor Gary A. Strobel at Montana State University. Growth of tested pathogens was rated after 3 days of inoculation with TL41. The inhibition levels were calculated by using the formula $(R1-R2/ R1) \times 100$. R1 indicated colony radius of control plant pathogens, and R2 indicated colony radius of tested plant pathogens (Intana et al., 2003).

Control of *X. campestris* on lettuce under field experiment conditions

Five treatments were modified from Worapong and Strobel, 2009 to observe the ability of TL41 to control *X. campestris* on lettuce starting from germination, growth and harvesting under field experiment conditions. A control treatment had only viable lettuce seeds. The second treatment contained 25 ml of 8.3×10^7 CFU TL41 and 25 ml of 4.3×10^7 CFU *X. campestris*. The third treatment was 50 ml of 8.3×10^7 CFU TL41 and 25 ml of 4.3×10^7 CFU *X. campestris*. The fourth treatment was 50 ml of 8.3×10^7 CFU TL41.

The fifth treatment was a negative control consisting of 25 ml of 4.3×10^7 CFU *X. campestris*. Each pot contained 25 viable lettuce seeds and 500 g mixture of soil and field soil at ratio 1:1 by weight placed into each 8.5x 10-inch pot. Duplicate experiments were done with three replicates for each treatment. . All pots were put out doors under the blue screen to protect them from insect infestation. The percentage of germination of kale seeds in each pot was recorded after 2-3 weeks. After germination for 5 weeks, seedling plants were randomly selected for measurements of their height and weight. Again, after 34 days, the representative kale plants were measured for the height and weight.

Statistical analyses

The analysis of variance of seedling growth and adult growth data was performed using the SPSS software version 11.5 for Windows. Differences among treatments were analyzed with the Fisher's LSD multiple-comparison test.

RESULTS and DISCUSSION

A pure bacterial culture designated – TL41 was transferred on potato dextrose agar (PDA).

ACKNOWLEDGMENTS

Financial assistance was provided by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission on Higher Education (CHE) number RMU4980030 and RPLUS number R50A3001. We also thank you Miss Siriwan Rung-in at Agriculture Science program, Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Kanchanaburi Campus, Saiyok, Kanchanaburi, who performed well this study with us. This research was awarded for the second place of the 8th National Competition of Thailand Innovation Awards 2008, organized by the Nation Innovation Agency (NIA), Ministry of Science and Technology, The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King and the PTT Chemical Public Company Limited, 4-5 October 2008.

LITERATURE CITED

Cheunbarn, T., S. Cheunbarn and T. Khumjai, 2008. Prospectus of bacterial granule for treatment of real textile industrial wastewater. Int. J. Agri. Biol., Vol. 10, No. 6, 2008; 689-692

Dahllöf, I., Baillie, H. and Kjelleber, S. 2000. rpoB-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3376–3380.

Table 1. Carbon utilization activity of *P. polymyxa* TL41 after 72 hours

<i>Carbon ingredients</i>	<i>Turbidity</i>
D-glucose	+
Glycerol	+
Calcium-keto-gluconate	+
L-Arabinose	+
D-xylose	+
Adonitol	-
Xylitol	-
D-galactose	+
Inocitol	-
D-sorbitol	+
Methyl- α D-glucopyranoside	+
N-Acetyl-Glucosamine	+
D-cellobiose	+
D-lactose	+
D-maltose	+
D-saccharose	+
D-trehalose	+
D-melezitose	-
D-raffinose	+
Protease activity	+

Table 2. Antagonistic ability and growth rate of *P. polymyxa* TL41 against *X. campestris* at different interval time

Time (hr)	5	6	8	10	12	14
Growth rate (CFU)	4.2×10^7	5.2×10^7	9.8×10^7	1.0×10^9	6.7×10^8	6.5×10^8
Clear zone (cm)	1.1	1.6	2.4	2.5	1.9	1.5

Table 3. Effect of 25 and 50 ml of 8.3×10^7 CFU *P. polymyxa* TL41 treatments on lettuce seed germination in the presence or absence of 25 ml of 4.3×10^7 CFU *X. campestris* after planting 7 and 14 days in pots containing 500 g of commercially sold soil mixed with field soil.

Treatment	Number of germinated seedling after planting 7 days	Number of germinated seedling after planting 14 days
Non-infested control	$18.2 \pm 0.24a$	$19.2 \pm 0.22a$
TL41 25 ml+ <i>X. campestris</i> 25 ml	$1.2 \pm 0.05b$	$8.7 \pm 0.12b$
TL41 50 ml+ <i>X. campestris</i> 25 ml	$5.3 \pm 0.08b$	$13.3 \pm 0.12b$
TL41 50 ml	$5.5 \pm 0.22b$	$13.8 \pm 0.28b$
<i>X. campestris</i> 25 ml	$5.1 \pm 0.04b$	$10.3 \pm 0.09 b$

Means with different letters are significantly different according to Fisher's LSD multiple-comparison test ($P < 0.05$). There was no treatment-experiment interaction. Each value is mean $\pm$ standard error. In each treatment, twenty-five viable lettuce seeds were added per pot.

Table 4. Effect of 25 and 50 ml of 8.3×10^7 CFU *P. polymyxa* TL41 treatments on lettuce growth in the presence or absence of 25 ml of 4.3×10^7 CFU *X. campestris* after planting 8 weeks in pots containing 500 g of commercially sold soil mixed with field soil.

Treatment	Height from tip to stem base (cm)	Length of pulled roots (cm)	Number of leaves	Fresh weight (g/plant)
Non-infested control	$18.1 \pm 0.04a$	$4.9 \pm 0.02a$	$4.5 \pm 0.01a$	$3.1 \pm 0.02a$
TL41 25 ml+ <i>X. campestris</i> 25 ml	$16.2 \pm 0.06a$	$4.5 \pm 0.03a$	$4.1 \pm 0.01a$	$2.5 \pm 0.01a$
TL41 50 ml+ <i>X. campestris</i> 25 ml	$18.2 \pm 0.06a$	$5.0 \pm 0.01a$	$4.2 \pm 0.01a$	$2.9 \pm 0.02a$
TL41 50 ml	$16.9 \pm 0.03a$	$5.4 \pm 0.02b$	$4.1 \pm 0.02a$	$3.0 \pm 0.02a$
<i>X. campestris</i> 25 ml	$12.5 \pm 0.02b$	$5.0 \pm 0.04a$	$3.2 \pm 0.02b$	$1.5 \pm 0.01b$

Means with different letters are significantly different according to Fisher's LSD multiple-comparison test ($P < 0.05$). There was no treatment-experiment interaction. Each value is mean $\pm$ standard error of 30 plants from each treatment.

Table 5. Antagonistic ability of 8 hr-old *P. polymyxa* TL41 against fungal plant pathogens after co-cultured with fungal pathogens on PDA for 3 days

Tested pathogen	% Inhibition
<i>Alternaria alternata</i>	53.5
<i>Colletotrichum capsici</i>	27.5
<i>C. gloeosporioides</i>	90.0
<i>Fusarium sp.</i>	52.5
<i>F. equiseti</i>	63.0
<i>Ganoderma sp.</i>	0.0
<i>Geotrichum sp</i>	0.0
<i>Phytophthora palmivora</i>	68.4
<i>Pythium ultimum</i>	100.0
<i>Rhizoctonia sp.</i>	0.0
<i>Sclerotinia sp.</i>	0.0

The inhibition levels were calculated by using the formula: $(R_1 - R_2 / R_1) \times 100$. R_1 indicated colony radius of control plant pathogens. R_2^* was the mean of 10-colony radius of tested plant pathogens.

Figure 1. Antagonistic ability of 10 hr-old Mueller Hinton broth culture of *P. polymyxa* TL41 against *X. campestris* with the control on the upper plate



Figure 2. Effect of 25 and 50 ml of 8.3×10^7 CFU *P. polymyxa* TL41 treatments on lettuce growth in the non-infested and infested 25 ml of 4.3×10^7 CFU *X. campestris*; A) after planting 5 weeks, B) after planting 8 weeks. From left to right: non-infested control, TL41 25 ml+*X. campestris* 25 ml, TL41 50 ml+*X. campestris* 25 ml, TL41 50 ml *X. campestris* 25 ml



Growth Inhibition of the Pathogenic Oomycete *Pythium insidiosum* by Secondary Metabolite Crude Extract from Endophytes

Jeerapong Worapong^{1*}, Monruedee Srisaisup¹, Varinpipob Chayathatphommirat¹, Siriporn Tuntipopipat², Tassanee Lowhnoo³, Wanta Yingyong³ and Theerapong Krajaejun^{4*}

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Rd., Payathai, Bangkok, Thailand 10400

²Institute of Nutrition, Mahidol University, Putthamonthon 4, Salaya, Putthamonthon Nakhon Pathom 73170

³Research Center and ⁴Department of Pathology, Faculty of Medicine-Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Rama 6 Rd., Payathai, Bangkok, Thailand 10400

***Corresponding authors:**

1. Jeerapong Worapong, Ph.D.

E-mail: stjwr@mahidol.ac.th and tongseeworapong@gmail.com

Phone: 662-441-9820 Ext. 1133, Fax: 662-441-9322

2. Theerapong Krajaejun, M.D.

E-mail: mr_en@hotmail.com

Phone: 662-201-1379, Fax: 662-201-1611

Keywords: anti-pythiosis, endophyte, pythiosis, *Pythium insidiosum*, *Pythium ultimum*, secondary metabolite

Abstract

Pythiosis is a life-threatening infectious disease of humans and animals, and is caused by the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. The disease has been increasingly reported from tropical and subtropical areas of the world. Treatment option for pythiosis is limited. Conventional antifungal drugs are ineffective. Radical surgery of an effected organ is the main treatment for pythiosis, resulting in handicaps in most patients. Many patients die from the infection. In this study, we screened crude extracts of 50 endophytes exhibiting anti-*Pythium ultimum* activity for their inhibitory effect on growth of *P. insidiosum* by using a dual antagonistic test on 3 different media: potato dextrose agar (PDA), glucose peptone agar (GPA) and modified potato dextrose agar (mPDA). Twenty three endophytes (46% of all endophytes tested) inhibited *P. insidiosum* growth by 50-97%. Based on ITS1-5.8S-ITS2 sequence analysis, seven fungal and one bacterial endophytes with highest anti-*P. insidiosum* activity were identified as *Dothideomycete* sp. N5L4 (97% inhibition of *P. insidiosum* growth on GPA), *Myrothecium* sp. RSb8 (96% inhibition on PDA), *Dothideomycete* sp. NAAL7 (90% inhibition on GPA), *Phyllosticta citrullina* NHL12 (82% inhibition on GPA), *Xylaria* sp. QS4 (78% inhibition on PDA), *Chaetomium* sp. RPR2 (75% inhibition on PDA), *Cladosporium cladosporioides* RRS18 (70% inhibition on GPA), and the bacterium *P. polymyxa* TL41 (95% inhibition on GPA). GPA and PDA served as suitable media for production of endophytic anti-*P. insidiosum* compounds. Thin layer chromatography (TLC) was used to separate crude extract of *Xylaria* sp. QS4. Well diffusion assay demonstrated that compounds derived from 6 individual TLC bands of *Xylaria* sp. QS4 markedly inhibited *P. insidiosum* growth. In addition, *Xylaria* sp. QS4 could produced a red compound at 100 ul of 0.1 mg/ul in DMSO stopping growth of *P. insidiosum* on SDA for 14 days implying a long stability of this compound. To our knowledge, this is the first report showing that endophytes isolated from Thai medicinal plants are promising reservoirs to search for anti-*P. insidiosum* compounds for a treatment of patients with pythiosis.

Introduction

Pythiosis is a life-threatening infectious disease of humans and animals, and is caused by the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*, which is a member in Family Pythiaceae, Order Pythiales, Class Oomycetes and the Phylum Pseudofungi in the Kingdom Chromista (Stramenopila). *P. insidiosum* inhabits in swampy areas, and is present in 2 forms: mycelium and biflagellate zoospores. Although pythiosis in animals has been increasingly reported worldwide, most human pythiosis cases have been reported from Thailand. Thalassemia is a major predisposing factors for human pythiosis. Clinical manifestations of human pythiosis can be divided into 4 forms: (i) Vascular pythiosis (59% of reported cases) is an infection of arteries leading to arterial occlusion and aneurysm. Most patients become handicaps because the main treatment to control the infection is limb amputation. Many patients die from the infection. (ii) Ocular pythiosis (33 %), is an infection of eyes in which patients present corneal ulcers or keratitis. Most of these patients undergo enucleation to remove an infected tissue. (iii) Cutaneous/subcutaneous pythiosis (5%) is an infection of cutaneous and subcutaneous tissues leading to granulomatous and ulcerative lesions. (iv) Disseminated pythiosis (3%) is an infection of other internal organs such as brain tissue, sinus or gastrointestinal tract. Treatment option for pythiosis is limited. The use of conventional antifungal drugs is ineffective in treatment of pythiosis because *Pythium* lack the drug target ergosterol biosynthesis pathway, and radical surgery is the main treatment option for cure. Therefore, finding a more effective treatment is an important goal.

Endophytes are microbes including fungi and bacteria that inhabit internal tissues of plants with mutualistic relationships (Strobel 2002). They are currently considered as one source of novel secondary metabolites offering the potential for medical exploitation because there are so many undiscovered endophytes occupying in tropical rainforest plants (Strobel and Daisy, 2003). Several novel compounds produced by endophytes that are able to inhibit *P. ultimum* are oocydin A, coronamycins, munumbicins E-4 and E5 (Strobel et al., 1999; Ezra et al., 2004, Castillo et al., 2006). Thus, it would appear that they might govern the novelty and biological activity of the secondary metabolites against *P. insidiosum* that is the same genus as *P. ultimum*.

The objectives of this study are 1) to screen endophytes having anti- *P. ultimum* whether they can inhibit a growth of *P. insidiosum* based on a dual antagonistic test on PDA, GPA media and mPDA; 2) to extract and identify secondary metabolite crude extracts from endophyte strains with anti-*P. insidiosum* activity using Thin Layer Chromatography technique; 3) to analyze crude extracts with anti-*P. insidiosum* activity for the cytotoxicity test against human cell lines. Novel compounds with anti-*P. insidiosum* activity may be discovered and developed to produce promising medicinal cream providing treatments of pythiosis patients from amputation or death.

Material and Methods

Microorganisms

Fifty strains of endophytes with anti-*P. ultimum* were recultured from culture collection at the department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Rd., Payathai, Bangkok, Thailand. Table 1 showed names and hosts of studied endophytic strains. *P. ultimum* was provided by Professor Gary A. Strobel at the department of Plant Sciences and Plant Pathology, Montana State University, Bozeman, Montana 59717, USA. *P. insidiosum* was a CBS strain.

Determination of anti-P. insidiosum activity

Fungal endophytes were grown on one side of PDA, GPA and mPDA for 3-7 days at 28°C. To do dual antagonistic test, a 6 mm plug of 5-day old SDA *P. insidiosum* culture was placed at 0.5 cm far from endophytic colony. Clear zone of growth inhibition was measured for antagonistic activities of endophytic fungi against tested *P. insidiosum*. The inhibition levels were calculated by using the formula $(R1-R2/R1) \times 100$. R1 indicated colony radius of control plant pathogens, and R2 indicated colony radius of tested plant pathogens (Intana et al., 2003).

TLC Crude extraction for anti-P. insidiosum test using well diffusion assay

The endophytic strains that potentially produce bioactive compounds against *P. insidiosum* were grown on PDA and GPA medium for 10 days. Then 10 days of each endophyte strain on each medium was cut into small piece (0.5 cm²) as inoculums. One hundred pieces of each endophytic inoculum on each medium were inoculated in 1L flasks containing 500 ml PDB and GP medium and leaved for 10. After 10 days, culture broths were filtered through cheesecloth for secondary crude extraction. Method of crude isolation was performed using Ethyl Acetate (Merck, USA) as an extraction solvent (Strobel and Daisy 2003). The organic part or ethyl acetate fraction was collected and evaporated out using rotary evaporator BUCHI EL-131 at 50°C. Each dry crude extract was spotted on 20×20 cm TLC aluminum sheets with silica gel 60 F₂₅₄ (MERCK KgaA, Darmstadt, Germany). Then the TLC sheet was put into the glass tank filled with ethyl acetate:methanol at 10:1 by volume. To see bands of separated compounds, the UV lamp was used. Each band was scrapped and weighted for 100 mg. Add 1 ml of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) into each crude extract. After that 100 µl of TLC crude extract in DMSO solution was added into 6 mm wells that are 0.5 cm far from the colony of 5-day old SDA *P. insidiosum* culture. Each petridish had a control well containing only 100 µl DMSO solution. The inhibition levels were calculated the same as mentioned previously.

Fungal endophyte identification based on ITS1-5.8S-ITS2 regions

For DNA isolation, the fungus strain JF2 was grown on PDA for 7-10 days at 23°C. The mycelium was scraped directly from the surface of the agar culture and weighed. Total genomic DNA was extracted by the methods of Lee and Taylor (1990). The universal primers, ITS5 and ITS4 were used for amplifying PCR product of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA genes and (White et al., 1990). The PCR of ITS/5.8S rDNA was done based on Sopalun et al., 2003. The DNA was amplified in a Mastercycle Eppendorf thermocycler (Eppendorf, Germany) with thermocycler conditions described by Kong et al. (2003).

Acknowledgement

Financial assistance was provided by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission on Higher Education (CHE) number RMU4980030. A scholarship RPLUS number R51A01002 for Mr. Varinpipob Chayathatphommirat was supported by the Research Projects for Undergraduate Students, TRF.

References

- Ezra, D., Castillo, U., Strobel, G., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J., Condrón, M., Teplow, D.B., Sears, J., Maranta, M., Hunter, M., Weber, B., and Yaver, D. 2004. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillated *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology*. 150: 785-793.
- Grooters A (2003). "Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals". *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33 (4): 695–720, v.doi: 10.1016/S0195-5616 (03) 00034-2.
- Harper, J.K., Ford, E.J. G.A. Strobel, G.A., Arif, A., Grant, D.M., Porco, J., Tomer, D.P. and O'Neill, K. 2003. Pestacin: a 1,3 –dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis* microspora possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* 59: 2471-2476.
- Hensel P, Greene C, Medleau L, Latimer K, Mendoza L (2003). "Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog". *J Am Vet Med Assoc* 223 (2): 215–8, 197.
- Kong P, Hong C, Richardson PA, Gallegly ME. 2003. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics Biology* 39: 238-249.
- Krajaejun, T., Prachartam R, Wongwaisayawan S, Rochanawutinon M, Kunakorn M, and Kunavisarut S. Ocular pythiosis: is it under-diagnosed? *Am J Ophthalmol* 2004; 137:370.
- Krajaejun, T., Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, Chaiprasert A, Assanasen P, Saipetch M, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Lekhakula A, Mitarnun W, Kalnauwakul S, Supparatpinyo K, Chaiwarith R, Chiewchanvit S, Tananuvat N, Srisiri S, Suankratay C, Kulwichit W, Wongsaisuwan M, and Somkaew S. Clinical and Epidemiological Analyses of Human Pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis* 2006; 43:569-76.
- Lee SB, Taylor JW. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In *PCR Protocols a Guide to Methods and Applications*. Edited by Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky J.J., White, T.J. Academic Press, Inc., California, 282-287pp.
- Sopalun K, Strobel GA, Hess WM, Worapong J. 2003. A record of *Muscodora albus*, an endophyte from *Myristica fragrans* in Thailand. *Mycotaxon* 88: 239-248.
- Strobel, G.A. 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnol.* 22: 315-333.

Strobel G. A. and Daisy B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Review* 12: 491–502.

Strobel, G.A., Li, J.Y., Sugawara, F., Koshino, H. Harper, J. and Hess, W.M. 1999. Oocydin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. *Microbiol.* 145: 3557-3564.

White, T. J., Bruns, T., and Taylor, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols A guide to Methods and Applications*. Edited by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. Academic press, Inc., California: 1990. 315-322.

Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Panphut W, Thongon N, Danwisetkanjana K, Ruangrunsi N, Meevootisom V (2004) Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World J Microbiol Biotechnol* 20: 265–272.

Table 1. Selected endophytic strains and their hosts

Strain	Host
TL41	<i>Paederia linearis</i> Hook.f.
QS4	<i>Melientha suavis</i> Pierre
NAAL7	<i>Costus speciosus</i>
RSb8	<i>Jatropha gossypifolia</i>
N5L4	Unknown
K1n5/1	<i>Amorphophallus</i> sp.
NHL12	<i>Osmanthus fragrans</i>
NHL15	<i>Osmanthus fragrans</i>
RPR2	<i>Kaempferia pulchra</i> Ridl.
N2L6	Unknown
RRS18	<i>Oraxylum indicum</i> (L.) Vent
RTJ3	<i>Flacourtia indica</i> (Burm.f.) Merr

Table 2. Antagonistic activity of selected endophytes against *P. ultimum* after co-cultured for 3 days on PDA, GPA and Modified PDA

No.	Strain	% inhibition on <i>P. ultimum</i>		
		PDA	GPA	Modified PDA
1	K1u22	100	100	100
2	K1u21	100	100	100
3	N6L12	100	100	100
4	NAAS10	100	100	100
5	NAAL5	100	100	100
6	NHL8	100	100	100
7	NHL6	100	100	100
8	N1L1	100	100	100
9	NKL14	100	100	100
10	N4L3	100	100	100
11	NAAL9	100	100	100
12	NAAS12	100	100	100
13	NPPS9	100	100	100
14	NFL5	100	100	100
15	N7L11	100	100	100
16	N5L4	100	100	100
17	NPPL1	100	100	100
18	N7L9	100	100	100
19	NAAf12	100	100	100
20	NAAf10	100	100	100
21	K6n10/1	100	100	100
22	K1n5/1	100	100	100
23	N7L1	100	100	100
24	NffL3	100	100	100
25	NAAf1	100	100	100
26	NHL20	100	100	100
27	NAAL7	100	100	100
28	QS4	100	100	100
29	TL41	100	100	100
30	NJL4	100	100	0
31	K6L15	100	0	100
32	NPPS4	100	0	0
33	Qb10	100	0	0
34	NHL12	100	no	no
35	NPPS3	100	97.64	100
36	NJS4	93.88	100	100
37	AL38	88.24	88.20	92.89
38	JL2	96.24	90.86	90.99
39	Qb17	90.35	89.62	85.54
40	N3S9	96.94	95.04	94.07
41	N2L6	89.65	91.74	97.03
42	RSb8	97.65	93.63	96.08
43	Qb25	96.41	97.53	96.23
44	NHL15	91.62	89.88	89.31
45	RPR2	97.60	92.59	97.48
46	RTJ3	87.34	90.12	84.78
47	RSSL2	93.42	91.11	82
48	Qb21	97.60	no ^a	88.68
49	PRS18	86.33	no	85.61
50	RSb3	no	no	no
51	K6n10/2	no	no	no

no^a represents *P. ultimum* colony grew over colony of endophytes

Table 3. Antagonistic activity of selected endophytes against *P. insidiosum* after co-cultured for 3 days on PDA, GPA and Modified PDA

N0.	Strain	% inhibition on <i>P. insidiosum</i>		
		PDA	Modified PDA	GPA
1	TL41	85.48	87.50	95.24
2	QS4	74.10	50.79	72.73
3	NAAL7	89.16	76.98	89.77
4	RSb8	96.39	77.78	91.48
5	NHL12	80.72	68.25	81.82
6	NHL15	80.61	75.00	82.98
7	N2L6	72.45	59.21	69.15
8	RPR2	74.49	66.45	70.21
9	RTJ3	57.14	51.32	58.51
10	RRS18	69.39	no	69.68
11	Qb25	80.61	72.37	73.40
12	K1n5/1	no	no	83.51
13	N5L4	no	94.74	96.81
14	NJS4	no	no	84.04
15	RSSL2	no	no	60.11
16	N7L1	no	no	no
17	K6n10/1	no	no	no
18	N6L12	no	no	no
19	NPPS9	no	no	no
20	K1n22	no	no	no
21	NAAS10	no	no	no
22	N3S9	no	no	no
23	NAAf1	no	no	no
24	NAAL5	no	no	no

no^a represents *P. ultimum* colony grew over colony of endophytes

Table 4. Identified endophytes with anti *P. ultimum* and anti *P. insidiosum* activity

Strain	ITS identification	% inhibition on <i>P. ultimum</i>	% inhibition on <i>P. insidiosum</i>
TL41	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	100 (All)	95.24 (GP)
QS4	<i>Xylaria</i> sp.	100 (All)	74.10 (PDA)
NAAL7	<i>Dothideomycete</i> sp.	100 (All)	89.77 (GP)
RSb8	<i>Myrothecium</i> sp.	97.65 (PDA)	96.39 (PDA)
N5L4	<i>Dothideomycete</i> sp.	100 (All)	96.81 (GP)
K1n5/1	<i>Colletotrichum</i> sp.	100 (All)	83.51 (GP)
NHL12	<i>Phyllosticta citrullina</i>	100 (PDA)	81.82 (GP)
NHL15	<i>Ascomycota</i> sp.	91.62 (PDA)	82.98 (GP)
RPR2	<i>Chaetomium</i> sp.	97.60 (PDA)	74.49 (PDA)
N2L6	Not done	97.03 (Modi)	72.45 (PDA)
RRS18	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	90.12 (GP)	69.68 (GP)

All means endophytes that could inhibit *Pythium* sp. on 3 different media.

Table 5. Welled antagonistic activity of 100 ul (0.1mg/ul DMSO) TLC crude extracts produced by 7 selected endophytes on 7 day-old *P. insidiosum* after 2, 3 and 7 days of inoculation on SDA

Strain	No. of Band	% inhibition of each band on <i>P. insidiosum</i> after 2 days of inoculation	% inhibition of each band on <i>P. insidiosum</i> after 3 days of inoculation	% inhibition of each band on <i>P. insidiosum</i> after 7 days of inoculation
<i>Dothideomycete</i> sp. NAAL7	6	B1=6, B2=18, B3=9, B4=6, B5=15, B6=10	B1=14, B2=17, B3=11, B4=9, B5=17, B6=9	-*
<i>Myrothecium</i> sp. RSb8	3	B1=31, B2=29, B3=23	B1=32, B2=30, B3=27	-*
<i>Dothideomycete</i> sp. N5L4	3	B1=3, B2=16, B3=16	B1=6, B2=16, B3=15	B1=23, B2=30
<i>Chaetomium</i> sp. RPR2	4	B1=18, B2=24, B3=6, B4=27	B1=16, B2=16, B3=8, B4=28	B4=17
<i>Xylaria</i> sp. Qb 25	5	B1=15, B2=19, B3=25, B4=25, B5=16	B1=17, B2=28, B3=27, B4=31, B5=15	B2=11, B3=18, B4=39, B5=24
<i>Colletotrichum</i> sp. K1t5/1	7	B1=17, B2=27, B3=15, B4=6, B5=18, B6=9, B7=15	B1=21, B2=28, B3=14, B4=9, B5=17, B6=14, B7=19	B1=39, B2=37, B7=25
<i>Cladosporium cladosporioides</i> RRS18	3	B1=21, B2=21, B3=0	B1=21, B2=21, B3=14	B1=11, B2=11

-* represent no antagonistic activity on *P. insidiosum* after 7 days of inoculation on SDA. Bold letters means increasing of antagonistic activity on *P. insidiosum* after 3 and 7 days of inoculation on SDA.

Figure legend

Figure 1. Welled antagonistic activity of 100 ul (0.1mg/ul DMSO) TLC crude extracts from 2 endophytes on *P. insidiosum* after 2 and 3 days of inoculation TLC 100 ul (0.1mg/ul DMSO) on SDA; Left from endophytic *Myrothecium* sp. RSb8 and Right from endophytic *Chaetomium* sp. RPR2. The upper control well of each plate contained only DMSO solution.

Figure 2. Welled antagonistic activity of *Xylaria* sp. QS4 on *P. insidiosum* on SDA: A) 1 g crude TLC extracts, B) 100 ul (0.1mg/ul DMSO) TLC after 3 days of inoculation, and C) TLC 100 ul (0.1mg/ul DMSO) after 7 days of inoculation.

Figure 1. Welled antagonistic activity of 100 μ l (0.1mg/ μ l DMSO) TLC crude extracts from 2 endophytes on *P. insidiosum* after 2 and 3 days of inoculation TLC 100 μ l (0.1mg/ μ l DMSO) on SDA; Left from endophytic *Myrothecium* sp. RSb8 and Right from endophytic *Chaetomium* sp. RPR2. The upper control well of each plate contained only DMSO solution.

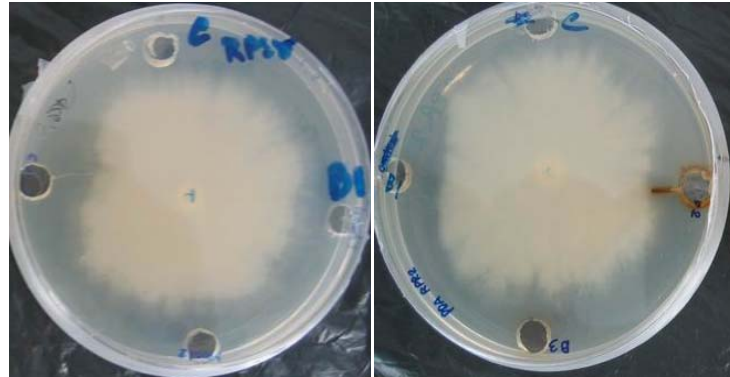


Figure 2. Welled antagonistic activity of *Xylaria* sp. QS4 on *P. insidiosum* on SDA: A) 1 g crude TLC extracts, B) 100 μ l (0.1mg/ μ l DMSO) TLC after 3 days of inoculation, and C) TLC 100 μ l (0.1mg/ μ l DMSO) after 7 days of inoculation.

