รายงานฉบับสมบูรณ์

สัญญาเลขที่ RTA5580007

โครงการ: ชีววิทยาและศักยภาพของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ในการเป็นตัวส่งเสริมการเจริญและควบคุมทางชีวภาพของพืชเศรษฐกิจบางชนิดในประเทศไทย

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง

บทคัดย่อ

การศึกษาโครงสร้างชุมชนของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากและดินรอบรากของสักและกฤษณาจากสวนป่าในประเทศไทยด้วยวิธี Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T–RFLP) ร่วมกับการทำโคลน (clone libraries) พบว่าองค์ประกอบชุมชนของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในสักและกฤษณามีความคล้ายคลึงกัน พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมด 38 ชิ้นส่วน โดย 31 ชิ้นส่วนพบทั้งในสักและกฤษณา ชุมชนของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในตัวอย่างสักที่เก็บมาจากแหล่งต่างกัน มีความคล้ายคลึงเช่นเดียวกับในกฤษณา ชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดบ่งบอกได้ว่าเป็นเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่อยู่ในตระกูล *Claroideoglomeraceae Diversisporaceae Gigasporaceae* และ *Glomeraceae* ตระกูลเด่นคือ ตระกูล *Glomeraceae* พบได้ในทุกแหล่งที่ศึกษา ความจำเพาะของชนิดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากและดินรอบรากไม่ได้รับผลกระทบจากชนิดของพืชอาศัยและแหล่งของตัวอย่าง (รากและดิน) แต่ได้รับผลกระทบจากแหล่งที่เก็บตัวอย่าง การปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกฤษณาและสัก พบว่าต้นกล้าสักจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการตอบสนองการเจริญที่ดีต่อการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามากกว่าการไม่ปลูกเชื้อ ต้นกล้าสักที่ปลูกด้วยเชื้อ *Claroideoglomus etunicatum* PBT03 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ *C. etunicatum* NNT10, *Entrophospora colombiana* และต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อตามลำดับ ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนใบและความกว้างของใบระหว่างชุดการทดลอง ในส่วนของกฤษณาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านความสูง เมื่อทำการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในระบบปลอดเชื้อ พบว่าต้นกล้าสักที่ปลูกเชื้อด้วย *Funneliformis mosseae* RYA08 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ *Glomus intraradices*, *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03 และต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อการปลูกเชื้อ *G. intraradices* มีผลต่อน้ำหนักสดของลำต้น แต่ให้ผลน้ำหนักแห้งของลำต้นเป็นรองจากเชื้อ *F. mosseae* RYA08 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในจำนวนใบและน้ำหนักสดของรากระหว่างต้นที่ได้รับและต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ ส่วนการเพิ่มจำนวนสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์

ไมคอไรซา โดยใช้วัสดุปลูกและพืชอาศัยชนิดต่างๆ ชี้ให้เห็นว่าอัตราการเข้าสู่รากและจำนวนสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละสายพันธุ์ ได้รับผลกระทบจากพืชอาศัยและวัสดุปลูก จำนวนสปอร์และอัตราการเข้าสู่รากโดยรวมมีปริมาณมากที่สุด เมื่อปลูกร่วมกับข้าวโพดหวาน (3,690 สปอร์/ 100 ซม^3 และการเข้ารากร 65%) และเมื่อใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุผสม (3,612 สปอร์/ 100 ซม^3 และการเข้ารากร 63%) ทำการประเมินประสิทธิภาพของปุ๋ยเศษซากใบไม้ที่หาได้ในท้องถิ่นในการเพิ่มจำนวนสปอร์แบบฟาร์ม โดยใช้หัวเชื้อที่ได้จากการปลูกในการทดลองแรก พบว่าข้าวโพดหวานปลูกในปุ๋ยเศษซากใบไม้ที่ผสมด้วยเวอร์มิคูไลท์ให้จำนวนสปอร์มากกว่าการใช้พืชอาศัยอื่น สำหรับการเพิ่มจำนวนสปอร์แบบปลอดเชื้อโดยใช้สปอร์ที่ทำให้งอกก่อนปลูกกับรากแครอทดัดแปลงพันธุกรรม พบว่าสปอร์ *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03, *F. mosseae* RYA08 และ *G. intraradices* พบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์มากในอาหาร MSR *G. intraradices* มีมากกว่าสปอร์ชนิดอื่น เส้นใยของ *G. intraradices* และ *F. mosseae* แผ่กระจายไปโดยทั่วอาหารเพาะเลี้ยงในจานและสร้างสปอร์ใหม่ภายใน 14 และ 24 วัน ตามลำดับ

เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ร่วมกับรากพืชและช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชที่ให้อาศัย ต้นชาน้ำมัน (*Camellia oleifera* Abel.) เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่จากประเทศจีนที่นำเข้ามาปลูกในประเทศไทย น้ำมันจากเมล็ดของต้นชาน้ำมันมีคุณภาพสูง งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ (1) เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในระบบรากของต้นชาน้ำมันที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย และ (2) เพื่อศึกษาผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อการเจริญเติบโตของต้นชาน้ำมัน ผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากของต้นชาน้ำมันอยู่ในช่วง 57-77% และมีจำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในระบบรากของต้นชาน้ำมันประมาณ 9-19 สปอร์/ดิน 1 g ความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีความสัมพันธ์กับต้นชาน้ำมันพบจำนวน 24 สปีชีส์ ซึ่งพบว่า *Septoglomus constrictum*, *Claroideoglomus luteum*, *Acaulospora laevis* และ *Rhizophagus fasciculatus* เป็นสปีชีส์เด่นที่พบในทุกตัวอย่างดิน สำหรับผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อการเจริญเติบโตของต้นชาน้ำมัน พบว่าต้นชาน้ำมันที่มีเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มีน้ำหนักแห้งและปริมาณธาตุอาหารของต้นชาน้ำมันสูงกว่าต้นที่ไม่มีเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญ สารเคมีกำจัดศัตรูพืชไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นชาน้ำมัน และเมทาแลกซิลซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดเชื้อรามีผลต่อการลดลงของเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากของต้นชาน้ำมัน

เก็บตัวอย่างเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาจำนวน 57 ตัวอย่าง และเชื้อราซาโพรบจำนวน 25 ตัวอย่างได้จากการเก็บในภาคเหนือของประเทศไทยสำหรับใช้ในการทดลองเปรียบเทียบไอโซโทป พบเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดใหม่ คือ *Scleroderma suthepense* และพบเห็ด *Morganella purpurascens* เป็นครั้งแรกในประเทศไทย ไอโซโทปคาร์บอนและไนโตรเจนเสถียร

แยกเชื้อราออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เอคโตไมคอร์ไรซาและซาโพรบ แยกเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*) เห็ดตับเต่าดำ (*P*hlebopus *portentosus*) เห็ดกรวด (*Pisolithus albus*) และเห็ดลูกฝุ่น (*Scleroderma sinnamariense*) จากดอกเห็ดแต่ละชนิด ทำการตรวจสอบความสามารถในห้องปฏิบัติการในการผลิต indole-3-acetic acid (IAA) การละลายโลหะที่เป็นพิษที่ต่างกัน (โคบอล (Co) แคดเมียม (Cd) ทองแดง (Cu) ตะกั่ว (Pb) สังกะสี (Zn)) ซึ่งอยู่ในรูปแร่ธาตุที่ไม่ละลายน้ำและความทนทานต่อโลหะ ผลการทดลองพบว่าเชื้อราทดสอบทั้งหมดสามารถผลิต IAA ได้ในอาหารเหลว และ IAA ที่เชื้อราผลิตสามารถกระตุ้นการยืดตัวของ coleoptile และเพิ่มการงอกของเมล็ดและความยาวรากของพืชทดสอบ ปริมาณ IAA สูงที่สุด (65.29±1.17 ไมโครกรัมต่อลิตร) ได้มาจากเชื้อเห็ดตับเต่าดำ หลังจากการเลี้ยง 40 วันในอาหารเหลวที่เติมด้วย L-tryptophan 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตร เชื้อเห็ดที่ทดสอบทั้งหมดสามารถละลายโลหะที่ไม่ละลายน้ำในรูปของแร่ธาตุได้ โดยมีความแตกต่างกันตามความแตกต่างของชนิดโลหะและสายพันธุ์ของเชื้อเห็ด ดัชนีการละลายและความทนทานต่อโลหะลดลงเมื่อความเข้มข้นของแร่ธาตุโลหะเพิ่มขึ้น เห็ดเผาะแสดงความทนทานต่อโลหะต่ำที่สุด

การแยกราเอนโดไฟท์สมุนไพรและพืชตระกูลแตงในพื้นที่จังหวัดพะเยา สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 429 ไอโซเลท จากนั้นนำราเอนโดไฟท์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของแคนตาลูปที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี dual culture พบว่า ราเอนโดไฟท์ *F. solani* (EU), *F. solani* (DU) และ *F. solani* (MY) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคได้ดีที่สุดเท่ากับ 82.33, 81.37 และ81.37 ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบการควบคุมโรคในระดับโรงเรือน พบว่าการใช้เชื้อราทั้ง 3 ชนิด ร่วมกันสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญโดยมีค่าจำนวนกิ่ง จำนวนใบ น้ำหนักสดและแห้ง น้ำหนักผลสด ปริมาณของแข็งที่ละลายในน้ำ มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และดัชนีความรุนแรงของโรคน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การทดลองในระดับแปลงทดลองให้ผลไม่แตกต่างกัน

ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของผู้ปลูกปาล์มน้ำมันในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ คือการติดเชื้อโรคลำต้นเน่าซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Ganoderma boninense* เป็นโรคหลักที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตและในกรณีที่รุนแรงส่งผลให้เกิดการตายของต้นปาล์มน้ำมันมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ การควบคุมโรคลำต้นเน่าด้วยสารเคมียังไม่ได้ผลนัก ดังนั้นการศึกษานี้จะประยุกต์ใช้ความรู้ทางชีววิทยาเพื่อส่งเสริมให้เกิดการใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพทางการเกษตร โดยทำการคัดเลือกแอคติโนมัยซีทรอบรากและเชื้อราเอนโดไฟท์จากปาล์มน้ำมันที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญและควบคุมทางชีวภาพในพืช พบเชื้อรากลุ่ม *Xylaria* spp., *Phomopsis* spp., *Colletotrichum* sp. และ *Muscodor* spp. เป็นสกุลเด่นที่พบในใบปาล์มน้ำมัน โดยเชื้อราสกุล *Muscodor* sp. จำนวน 10 ไอโซเลท สร้างสารระเหยยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคโดยให้ผลการยับยั้งการเจริญมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์สารระเหยพบ 2-Methylpropanoic acid เป็นสารระเหยหลักที่เชื้อราสกุล *Muscodor* spp. สร้างขึ้น

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทบริเวณดินรอบรากปาล์มน้ำมันได้ทั้งหมด 226 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค พบเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ *Streptomyces* sp. AB21, AB24, AB83, AB168, AB204 และ AB225 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้ง 6 ไอโซเลท ระบุสปีชีส์เป็น *Streptomyces yunnanensis* AB21, S. *corchorusii* AB24, *S. sioyaensis* AB83, *S. iranensis* AB168 และ *Streptomyces* sp. AB204 และ AB225 จัดเป็นสปีชีส์ใหม่ เมื่อทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal inhibitory concentrations, MICs) ของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซีทต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* sp. AB21 และ *Streptomyces* sp. AB83 มีค่า MIC ต่ำที่สุดและสามารถยับยั้งได้ดีกว่าสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา nystatin นอกจากนี้การศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่าสารระเหยที่ *Streptomyces* sp. AB21 สร้างขึ้นมีผลในการส่งเสริมการเจริญของ *Arabidopsis thaliana* col-0 โดยกระตุ้นการเจริญของพืชให้มีความยาวรากและลำต้นที่ยาวกว่าพืชควบคุม และมีขนาดใบที่ใหญ่กว่า พบสารระเหย 2-Methyl-2-bornene และ 1,3,2-Dioxaborolane, 4,4-dimethyl-5-oxo,2-ethyl เป็นสารระเหยหลักที่สร้างจาก *Streptomyces* sp. AB21 โดยมีปริมาณ 15.57 และ 15.05 เปอร์เซ็นต์ของสารระเหยทั้งหมดตามลำดับ

ราเอนโดไฟท์ คือ กลุ่มราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้พืชเกิดโรค รากลุ่มนี้มีความสามารถในการสร้างสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินที่สำคัญ เนื่องจากสามารถกระตุ้นการยืดยาวของเซลล์ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และกระตุ้นเกิดรากในพืชได้ งานวิจัยนี้จึงได้คัดแยกราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต IAA จากต้นกาแฟซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เพื่อเป็นทางเลือกในการใช้ประโยชน์จาก IAA ที่ราเอนโดไฟท์ผลิตในการส่งเสริมการเจริญของพืชเศรษฐกิจ การศึกษาพบว่าราเอนโดไฟท์จำนวน 94 ไอโซเลท จากราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 115 ไอโซเลท ที่แยกจากต้นกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า (*Coffea arabica*) และ โรบัสต้า (*Coffea canephora*) สามารถผลิต IAA ได้ เมื่อทดสอบโดย colorimetric assay และราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 สามารถผลิต IAA ได้ปริมาณสูงสุด(1205.58±151.89 μg ml^{-1}) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เติม 8 mg ml^{-1} L-tryptophan เป็นเวลา 26 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C นอกจากนี้พบว่า IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ A109 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการยืดยาวเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าว (*Oryza sativa* L.) ข้าวโพด (*Zea mays*) และ ข้าวไรย์ (*Secale cereal* L.) เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน IAA และเมื่อทำการบ่งชี้ชนิดของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 โดยอาศัยข้อมูลทางอณูชีววิทยาและลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ราเอนโดไฟท์ A109 มีความสัมพันธ์กับ *Colletotrichum gloeosporioides*

ทำการคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 289 ไอโซเลตจากพืช 14 ชนิด โดยไอโซเลต AL1T1 และ AL1T2 จากว่านหางจระเข้ (*Aloe vera* L.) สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรค

ในยางพาราได้ดีที่สุด คือ *Phellinus noxius* และ *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* ตามลำดับ สารสกัดหยาบของไอโซเลต AL1T1 มีค่า MIC เท่ากับ 0.31 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และไอโซเลต AL1T2 มีค่า MIC เท่ากับ 0.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์สร้างไอระเหยอินทรีย์สกุล *Muscodor* จากใบของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.) ได้ 4 ไอโซเลต โดยทุกไอโซเลตสร้างไอระเหยอินทรีย์มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย, ยีสต์ และเชื้อรา) ได้หลายชนิด ไอโซเลต RTM5IV3 มีความคล้ายกันของลำดับเบส ITS-5.8S rDNA น้อยกว่า 86% เมื่อเปรียบเทียบกับ *Muscodor* สปีชีส์อื่น จัดจำแนกเป็นเชื้อ *M. heveae* sp. nov. สร้างไอระเหยอินทรีย์มีสารประกอบหลัก คือ 3-methylbutan-1-ol และสารประกอบรอง คือ 3-methylbutyl acetate และอนุพันธุ์ azulene ไอระเหยอินทรีย์ของ *M. heveae* สามารถใช้ควบคุมเชื้อก่อโรครากขาว (*Rigidoporus microporus*) ของยางพาราในระดับโรงเรือนได้

โรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* pv. *citri* การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในการควบคุมโรคพืชมีผลเสียต่อผู้บริโภค วัตถุประสงค์ของวิจัยนี้เพื่อศึกษาจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มที่สามารถยับยั้ง *X. citri* pv. *citri* จุลินทรีย์เอนโดไฟท์แยกได้จากพืชตระกูลส้ม 6 ชนิด ได้แก่ มะนาว (*Citrus aurantiifolia*) มะกรูด (*C. hystrix*) ส้มโอ (*C. maxima*) ส้มเกลี้ยง (*C. sinensis*) ส้มจุก (*C. nobilis*) และส้มเขียวหวาน (*C. reticulata*) สามารถแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 315 ไอโซเลต ซึ่งแบ่งเป็นเชื้อรา 65 ไอโซเลต (20.63%) แอคติโนมัยซีท 80 ไอโซเลต (25.40%) และแบคทีเรีย 170 ไอโซเลต (53.97%) คัดเลือกจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *X. citri* pv. *citri* ได้แก่ เชื้อรา *Pestalotiopsis* TA 18, *Fusarium* SO 21 และ *Fusarium* PO 55 แอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้แก่ *Streptomyces* ไอโซเลต NO 37, NO 42 และ NO 43 ส่วนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพที่คัดเลือก ได้แก่ *Bacillus* ไอโซเลต LE 24, PO 80 และ PO 109 ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่คัดเลือกได้ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของ *X. citri* pv. *citri* ผลการทดลองพบว่า เชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงใน potato dextrose broth (PDB) เชื้อ *Streptomyces* ทั้ง 3 ไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงใน modified soluble starch broth (MSSB) และ glucose soybean broth (GSB) ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* LE 24 ที่เพาะเลี้ยงใน MSSB, *Bacillus* PO 80 และ *Bacillus* PO 109 ที่เพาะเลี้ยงใน yeast extract peptone dextrose broth (YEPDB) สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุด ทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคแคงเกอร์ในมะนาวโดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่มีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาทดสอบในโรงเรือน พบว่าทั้งน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบจากจุลินทรีย์เอนโดไฟท์สามารถควบคุมการเกิดโรคแคงเกอร์ในมะนาวได้

ศึกษาจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพืชของข้าวป่า ข้าวปลูก หญ้าวัชพืช และจากตัวอย่างเศษสะสมบริเวณที่อาศัยของด้วงกระดิ่งเงิน (*Martinus dermestoides*) และตัวเต็มวัยของผีเสื้อข้าวสาร (*Corcyra cephalonica*) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชข้าว

โดยนำจุลินทรีย์จำนวน 110 ไอโซเลท เลี้ยงใน PDB และ F1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27-30 °C) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นกรองเพื่อแยกส่วนน้ำเลี้ยงและเส้นใยออกจากกัน แล้วนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 3 ครั้ง โดยใช้ ethyl acetate ปริมาตรเท่าๆ กัน ทำให้แห้งโดยใช้ rotary evaporator จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก และละลายใน methanol เตรียมเป็นสารสกัดหยาบ ทำการทดสอบกับเชื้อก่อโรคในข้าว 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Xanthomonas oryzae* XPK1, X. oryzae XPK3, *Cercospora oryzae* BS124, *Curvularia lunata* PKC2, *Fusarium* sp. PKF1, *Pyricularia oryzae* BS265, *P. oryzae* BS306, *P. oryzae* BS308 และ *Rhizoctonia* sp. PKR ด้วย agar diffusion method พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อราเอนโดไฟท์ 3N5 ที่เลี้ยงใน PDB สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. oryzae* BS124 ได้ดีที่สุด 43.2±1.0% ส่วนราเอนโดไฟท์ 3S1 ที่เลี้ยงทั้งในอาหาร PDB และ F1 ยับยั้ง *X. oryzae* XKP1 ได้ดีที่สุดให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 20.5±1.3 mm และ 23.75±2.50 mm ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกราเอนโดไฟท์ทั้งสองไอโซเลทมาศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค (MIC) ดังกล่าว ซึ่งพบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 2 mg/ml และ 0.075 mg/ml ตามลำดับ และเมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนส์ 5.8S-ITS 16S และ 28S rRNA ของราเอนโดไฟท์สองกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า 3N5 และ 3S1 เป็นราในจีนัส *Gaeumannomyces* และ *Sarocladium* ตามลำดับ ซึ่ง *G. oryzae* 3N5 จัดเป็นราเอนโดไฟท์ชนิดใหม่ที่แยกได้จากข้าวป่า *Oryza rufipogon*

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน *Klebsiella variicola* SS-2, *Burkholderia kururiensis* SS-5 และ *Sphingomonas* sp. PS-5 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยคัดแยกมาจากข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย แบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาจะถูกติดฉลากด้วยยีน *gus A* และ GFP หรือ DsRed เพื่อติดตามการเข้าครอบครองในพืชอาศัยข้าว และไม่ใช่พืชอาศัย 5 ชนิด อาทิ ข้าวโพด ข้าวฟ่าว ถั่วเหลือง งา และอ้อย พบว่า *Klebsiella variicola* SS-2, *Burkholderia kururiensis* SS-5 และ *Sphingomonas* sp. PS-5 สามารถเข้าครอบครองในพืชอาศัยข้าวทั้งในส่วนที่เป็นรากและต้นโดยเข้าครอบครองทั้งในชั้นเอพิเดอร์มิส คอร์เทกซ์ และมัดท่อลำเลี้ยง ในขณะที่การเข้าครองครองในข้าวโพด และอ้อยจะมีลักษณะคล้ายกัน อย่างไรก็ตามในข้าวฟ่าง ถั่วเหลืองและงา พบว่าสามารถเข้าครองครองได้น้อยมาและเป็นบางบริเวณเท่านั้น และเมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกยีนตรึงไนโตรเจน (*nifH*) ในพืชอาศัยข้าวพบการแสดงออกได้ชัดเจนในข้าวที่ปลูกในสภาพไม่มีแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าที่มีแหล่งไนโตรเจน และจะพบการแสดงได้ดีในบริเวณรากข้าวของทุกเชื้อ ส่วนในพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัย ใช้รากข้าวโพดในการศึกษาการแสดงออกยีนตรึงไนโตรเจนของ *Sphingomonas* sp. PS-5 พบการแสดงออกของยีนตรึงไนโตรเจนหลังจากวันที่ทำการปลูกเชื้อในวันที่ 14 ในปริมาณน้อยกว่ายีน 16S rRNA ดังนั้นแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนเป็นอีกกลุ่มที่น่าสนใจและถูกพัฒนาเพื่อให้สามารถนำไปใช้กับพืชปลูกและเป็นปุ๋ยชีวภาพต่อไป

จากการคัดเลือกและศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp.และ *F. moniliforme* ด้วยวิธี dual culture method พบว่ามี 6 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวโดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากกว่า 70% ขึ้นไป โดยเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท RH1-5-22 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง 6ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูเลสได้ และผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (IAA, siderophore และการละลายฟอสเฟต) จากการทดสอบการควบคุมโรคถอดฝักดาบด้วยวิธี blotter method โดยแช่สปอร์แขวนลอยด้วยเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท RH1-5-22 พบว่าสามารถลดอัตราการเกิดโรคเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นไอโซเลท RH1-5-22 มีความสามารถในการนำมาควบคุมโรคข้าวโดยชีววิธีได้

โพแทสเซียมเป็นธาตุที่มีผลต่อคุณภาพผลไม้ชัดเจนกว่าธาตุอื่น เพราะมีผลโดยตรงต่อการสะสมน้ำตาลในผลไม้และส่งไปเก็บสะสมไว้ที่หัวหรือลำต้น พืชที่ขาดโพแทสเซียมมักจะเจริญเติบโตช้า เหี่ยวง่าย แคระแกร็น ใบล่างเหลือง เกิดเป็นรอยไหม้ตามขอบใบ เมล็ดพันธุ์มีขนาดเล็กและอ่อนแอ โพแทสเซียมในดินที่พืชนำเอาไปใช้เป็นประโยชน์ได้ มีกำเนิดมาจากการสลายตัวของหินและแร่หลายชนิดในดิน โพแทสเซียมที่อยู่ในรูปของสารประกอบยังไม่แตกตัวออกมาเป็นอนุมูลบวก พืชจะดึงดูดไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ โพแทสเซียมในรูปนี้มีปริมาณมากถึง 90-98% ของโพแทสเซียมที่มีในดิน ดังนั้นเพื่อให้โพแทสเซียมในรูปนี้ใช้ประโยชน์ได้เร็วขึ้น จำเป็นต้องอาศัยกลไกที่ทำให้เกิดการสลายตัว ซึ่งการสลายทางอินทรีย์ มีผลเร็วและประหยัดที่สุด จากการศึกษาสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ 79 ไอโซเลต เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการละลายแร่เฟลด์สปาร์และแร่ดินขาว 33 ไอโซเลต ซึ่ง *Aspergillus brasiliensis* ไอโซเลต SC301-1 สามารถละลายแร่ได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและความสามารถในการละลายโพแทสเซียมของเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 เชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYA ที่มีค่าพีเอช 6 หรือ 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน และเชื้อจะมีประสิทธิภาพในการละลายโพแทสเซียมเมื่อเชื้อใช้กลูโคสหรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้โพแทสเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งโพแทสเซียม จากการศึกษานี้จะสามารถนำความรู้และวิธีการทางชีวภาพมาปรับใช้กับแปลงปลูกพืชในสภาพแวดล้อมได้จริง

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญในประเทศไทย อย่างไรก็ตามโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งก็ส่งผลกระทบต่อการผลิตข้าวทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่สามารถละลายฟอสเฟตและผลิตสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิเพื่อยับยั้ง *Pyricularia oryzae* BS265 สาเหตุโรคไหม้ และยับยั้ง *Xanthomonas oryzae* XPK1 สาเหตุโรคขอบใบแห้ง ในการศึกษาสามารถคัดแยกได้แอคติโนแบคทีเรียได้ 110 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง นำแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมดทดสอบการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya's agar พบว่าไอโซเลท CMU-S3 มีการสร้างวงใสสูงสุด 22.8 mm และมีการผลิตกรดออกซาลิก 1.91 ± 0.14 mg./ 200 mg Crude และผลิตกรดทาร์ทาริก 14.04 ± 0.61 mg./ 200 mg Crude นอกจากนี้ทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อรา

Pyricularia oryzae BS265 พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-PW4 มีการยับยั้งการเจริญเติบโตในแนวรัศมี (PIRG) 100% บนอาหาร PDA ในระยะเวลา 14 วัน จากนั้นทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* XPK1 พบว่าไอโซเลท CMU-S1 มีการยับยั้ง 100% บนอาหาร NA แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-S3, CMU-PW4 และ CMU-S1 จัดจำแนกเบื้องต้นตามลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทจัดเป็น *Streptomyces* sp. ดังนั้นแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-S3 CMU-PW4 และ CMU-S1 จึงสามารถนำมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของโรคพืชและส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโดยการละลายฟอสเฟต

คำหลัก: จุลินทรีย์, ตัวเสริมสร้างการเจริญเติบโตของพืช, สารทุติยภูมิ, การควบคุมทางชีวภาพ

Abstract

The study of arbuscular mycorrhizal (AM) fungus community structure in roots and rhizosphere soils of *A. crassna* and *T. grandis* from plantations in Thailand was investigated by terminal restriction fragment length polymorphism complemented with clone libraries. This study revealed that AM fungal community composition in *A. crassna* and *T. grandis* were similar. A total of 38 distinct terminal restriction fragments (TRFs) were found, 31 of which were shared between *A. crassna* and *T. grandis*. The TRFs were attributed to *Claroideoglomeraceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae* and *Glomeraceae*. The *Glomeraceae* were found to be common in all study sites. Specific AM taxa in roots and soils of *T. grandis* and *A. crassna* was not affected by host plant species and sample source (root vs. soil) but affected by collecting site. The AM fungal inoculation with *A. crassna* and *T. grandis*, *T. grandis* plantlets had the best growth response to AM fungal spore inoculation than uninoculated plantlets. *Tectona grandis* plantlets inoculated with *Claroideoglomus etunicatum* PBT03 had highest height followed by *C. etunicatum* NNT10, *Entrophospora colombiana* and uninoculated plantlets, respectively. There were no significant differences in the number of leaf and width of leaf among the treatments. In *A. crassna*, there was no significant difference in height, number of leaf, and wideness of leaf between inoculated and uninoculated plantlets. *Tectona grandis* plantlets inoculated with *Funneliformis mosseae* RYA08 had highest plant height follow by *G. intraradices*, *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03, and uninoculated plant, respectively. Inoculation with *G. intraradices* was affected on shoot wet weight but gave low shoot dry weight inferior to *F. mosseae* RYA08. There was no significant different of the number of leave and root wet weight between inoculated and uninoculated plantlets. AM fungal spores were propagated using different culture materials and host plants. Results indicated that root colonization and number of spores of each AM fungus isolate were affected by host plant and substrate. Total AM fungal spores and percentage of root length colonized were highest when cultured with *Z. mays* (3,690 spores 100 cm^{-3} and 65% root length colonized) and when vermiculite was used as diluent (3,612 spores 100 cm^{-3} and 63% root length colonized). Inocula produced in the first experiment were used to evaluate the efficiency of locally-available leaf litter compost as a component of media for on–farm inoculum production. The results showed that spore production with *Z. mays* in leaf litter compost mixed with vermiculite was considerably higher than that with other host plants. For *in vitro* production, germination percentages of most spore species tend to be higher in

MSR medium measuring from hyphal length of individual germinated spore and percentage of spore germination. *Glomus intraradices* and *F. mosseae* RYA08 hyphae were spreaded throughout the Petri plates and produced new spores successfully after 14 and 24 days of inoculation, respectively.

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi associate with roots of plants and increase growth of the host plants. Tea oil camellia (*Camellia oleifera* Abel.) is a new economic plant from China that imported to grow in Thailand. Oil from seeds of Tea oil camellia is high quality. This research was aimed (1) to study diversity of AM fungi in the root zones of Tea oil camellia that grown in Chiang Mai and Chiang Rai provinces, and (2) to study the effects of AM fungi and plant pesticides on the growth of Tea oil camellia. Results of this research showed that percentage of AM colonization in roots of Tea oil camellia was about 57-77% and spore densities of AM fungi in the root zones of Tea oil camellia was about 9-19 spores/soil 1 g. Diversity of AM fungi associated with Tea oil camellia was found 24 species. *Septoglomus constrictum*, *Claroideoglomus luteum*, *Acaulospora laevis* and *Rhizophagus fasciculatus* were dominant species that found in every soil samples. For the effects of AM fungi and plant pesticides on the growth of the host plant, it was found that Tea oil camellia with AM fungi had significantly higher dry weight and nutrient contents in the plants than the plants without AM fungi. Plant pesticides did not have effect on the growth of Tea oil camellia. Metalaxyl fungicide had the effect on decreasing of percentage of AM colonization in the roots of Tea oil camellia.

The 57 samples of ectomycorrhizal (ECM) fungi and 25 samples of saprotophic fungi were collected in northern Thailand for the isotopic comparison experiment. New spices of ECM fungus, *Scleroderma suthepense* was found and *Morganella purpurascens* was a new report in Thailand. The stable carbon and nitrogen comparisons separated fungal samples into two groups such as ECM fungi and saprotrophic fungi. Pure cultures of *Astraeus odoratus*, *P*hlebopus *portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense* were isolated from each sporocarp. Moreover, the *in vitro* abilities of selected fungi to produce indole-3-acetic acid (IAA), to solubilize different toxic metal (Co, Cd, Cu, Pb, Zn)-containing isoluble minerals, and metal tolerance were investigated. The result indicated that all fungi were able to produce IAA in liquid medium and fungal IAA could simulate coleoptile elongation, and increase seed germination and root length of tested plant. The highest IAA yield (65.29±1.17 µg/ml) was obtained from *P. portentosus* after 40 days of cultivation in

liqiud medium supplemented with 4 mg/ml of L-tryptophan. All selected fungi could solubilize insoluble metal containing minerals which varied for different minerals and fungal species. The solubilization and tolerance indexes decreased when the concentration of metal minerals increased. *Astraeus odoratus* showed the lowest tolerance to metals.

Four hundred and twenty-nine endophytic fungi were isolated from medicinal plant and Cucurbitaceae plant in Phayao. These endophytes were *in vitro* tested for against Fusarium wilt of cantaloupe caused by *F. oxysporum* using dual culture method. *Fusarium solani* (EU), *F. solani* (DU) and *F. solani* (MY) showed the highest percent inhibition (82.33, 81.37 and 81.37 respectively). Effect of this three endophytes were also test for enhance growth and control Fusarium wilt in greenhouse. The results showed that, cantaloupe that inoculated with three endophytes had high growth than control (branch number, leaf number, weight plant and fruit weight) and also gave the highest total soluble solids (TSS) and showed the highest tolerance to infection with *F. oxysporum*, while, in the field was not significantly different.

An importance problem of the oil palm plantation in Southeast Asia is the infection of basal stem rot (BSR) disease caused by *Ganoderma boninense,* the major disease resulted in yield loss and killing more than 80% of all palms in severe cases. The field control of BSR by contact chemicals has not been very successful. Therefore, this study will apply the biological knowledge to support the use of agricultural biotechnology product. To screen the potential rhizosphere actinomycetes and endophytic fungi from oil palm to be used as plant growth promoter and biological control in plant. Endophytic fungi as *Xylaria*, *Phomopsis*, *Colletotrichum* and *Muscodor* are the major genus isolated from oil palm leaves. Ten isolates of *Muscodor* sp. showed volatiles inhibitory potential as a biocontrol agent base on the percentage inhibition of radial growth of fungi pathogen more than 90%. Volatile compounds analysis showed that 2-methylpropanoic acid was the main volatile produced by *Muscodor* spp. Two hundred and twenty-six actinomycete strains were isolated and screened for suppressive the mycelia growth of *G. boninense*. Six antagonistic actinomycetes (AB21, AB24, AB83, AB168, AB204 and AB225) showed percentage inhibition of pathogen radial growth more than 80%. All 6 isolates were identified as *Streptomyces yunnanensis* AB21, S. *corchorusii* AB24, *S. sioyaensis* AB83, *S. iranensis* AB168 and two novel species, *Streptomyces* sp. AB204 and *Streptomyces* sp. AB225. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of crude extracted from actinomycetes were

determined, crude extract of *Streptomyces* sp. AB21 and *Streptomyces* sp. show the lowest MICs values which less than nystatin concentrations. Moreover, the plant growth promote activity were studied. Volatile compounds produced from *Streptomyces* sp. AB21 induced the growth of *Arabidopsis thaliana* col-0. The exposed plants with volatiles had larger leaf size, overall shoot and root size. The most abundant volatile compounds of *Streptomyces* sp. AB21 were 2-Methyl-2-bornene and 1,3,2-Dioxaborolane, 4,4-dimethyl-5-oxo-, 2-ethyl at 15.57% and 15.05% of all compounds, respectively.

Endophytic fungi are group of fungi that live within plant tissues without asymptomatic diseases. These fungi are known to produce important secondary metabolites especially indole-3-acetic acid (IAA). Indole-3-acetic acid is the most active auxin that can stimulate cell elongation, cell division, cell differentiation and root initiation in plants. The IAA produced by endophytic fungi is one of an alternative plant hormone for promoting the growth of economic plants. In this study, one hundred fifteen endophytic fungi were isolated from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. The ability of IAA production of endophytic fungi was investigated by colorimetric assay. The results revealed that, ninety four isolates could produce IAA and the highest IAA yield (1205.58±151.89 μg ml^{-1}) was obtained from fungal isolate A109 when cultivated in PDB medium supplemented with 8 mg ml^{-1} L-tryptophan after 26 days at 30°C in the dark. In addition, the efficiency of fungal IAA as a plant growth promoting compound was examined by using biological assay. The results indicated that IAA produced by fungal isolate A109 had a potential to stimulate the elongations of rice (*Oryza sativa* L.), corn (*Zea mays*) and rye (*Secale cereal* L.) coleoptiles corresponded to a commercial IAA standard. The morphological characteristic and phylogenetic tree of isolate A109 was analyzed. The isolate A109 was revealed to be *Colletotrichum gloeosporioides*.

A total 289 isolates of endophytic fungi was isolated from 14 plant samples. Isolate AL1T1 and AL1T2 from *Aloe vera* L. could produce antibiotic compounds against the pathogenic fungi causing rubber tree disease. The antimicrobial activity of isolate AL1T1 and AL1T2 was highest against *Phellinus noxius* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, respectively. The crude extract of isolate AL1T1 and AL1T2 showed significant antifungal activity against *P. noxius* and *F. oxysporum* f. sp. vasinfectum with MIC about 0.31 mg/ml and 0.16 mg/ml, respectively. Four isolates of volatile-producing endophytic fungi were isolated from leaves of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.) All isolates could produce volatile metabolites with apparent antimicrobial activity against

diverse test microbes (bacteria, yeast and filamentous fungi). An isolate, RTM5IV3, with <86% similarity with the partial ITS-5.8S rDNA gene compared to other species of the genus *Muscodor*, was proposed as a novel species with the name, *Muscodor heveae* sp. nov. Its bioactive volatile metabolites included 3-methylbutan-1-ol as a major component, followed by 3-methylbutyl acetate and azulene derivatives. The volatile organic compounds (VOCs) produced by *M. heveae* were active against the pathogenic fungi *Rigidoporus microporus* causing root disease of rubber tree *in vivo*.

Citrus canker is caused by *Xanthomonas citri* pv. *citri*. Using of chemical pesticides to control plant diseases is harmful to consumers. Objective of this research was aimed to study endophytic microorganisms from citrus plants that could inhibit *X. citri* pv. *citri*. The endophytic microorganisms were isolated from 6 species of citrus plants such as lime (*Citrus aurantiifolia*), kaffir lime (*C. hystrix*), pomelo (*C. maxima*), sweet orange (*C. sinensis*), neck orange (*C. nobilis*) and tangerine (*C. reticulata*). Three hundred fifteen endophytic microorganisms were isolated from the citrus plants. They were composed of fungi 65 isolates (20.63%), actinomycetes 80 isolates (25.40%) and bacteria 170 isolates (53.97%). The selected effective microorganisms that could inhibit the growth of *X. citri* pv. *citri* were fungi in the isolates of *Pestalotiopsis* TA 18, *Fusarium* SO 21 and *Fusarium* PO 55. The selected actinomycetes were *Streptomyces* in the isolates of NO 37, NO 42 and NO 43. The selected effective bacteria were *Bacillus* LE 24, PO 80 and PO 109. Optimal culture media were investigated for the selected microorganisms to produce bioactive compounds for inhibition the growth of *X. citri* pv. *citri*. The results showed that all of the selected fungi cultured in potato dextrose broth (PDB), the selected *Streptomyces* cultured in modified soluble starch broth (MSSB) and glucose soybean broth (GSB), and the selected *Bacillus* LE 24 cultured in MSSB, *Bacillus* PO 80 and *Bacillus* PO 109 cultured in yeast extract peptone dextrose broth (YEPDB) could produce the highest bioactive compounds. The cultural microorganisms and the crude extracts of bioactive compounds in the cultural media of the selected microorganisms were determined for inhibition of lime canker in green house. It was found that both of the cultural microorganisms and the crude extracts could control canker disease in lime.

Endophytic microbial isolated from wild rice, cultivated rice, weed, *Corcyra cephalonica* and *Martinus dermestoides* was investigated the potential in inhibition of some phytopathogens. One hundred and ten microbial isolates were cultivated in potato dextrose broth (PDB) and F1 at room temperature (27-30 °C) for 14 days. The cultures

were harvested by filtration. Culture broths were extracted by equal volume of ethyl acetate for three times and dried by rotary evaporator. Crude extracts were weight and dissolved in methanol and examined the growth inhibition of 9 phytopathogens (*Xanthomonas oryzae* XPK1, *X. oryzae* XPK3, *Cercospora oryzae* BS124, *Curvularia lunata* PKC2, *Fusarium* sp. PKF1, *Pyricularia oryzae* BS265, *P. oryzae* BS306, *P. oryzae* BS308 and *Rhizoctonia* sp. PKR) using agar diffusion method. Crude extract of endophytic fungus 3N5 cultured in PDB greatest inhibited the mycelial growth of *C. oryzae* BS124 with 43.2±1.0%, while crude extract of endophytic fungus 3S1 cultured in PDB and F1 showed greatest inhibition of *X. oryzae* XKP1 with inhibition zone diameter 20.5±1.3 mm and 23.75±2.50 mm, respectively. These two endophytic fungi were then selected for investigating of minimal inhibitory concentration (MIC). The MIC of the extract of these fungal strains that prevented growth of *C. oryzae* BS124 and *X. oryzae* XKP1 were 2 mg/ml and 0.075 mg/ml, respectively. After identification by morphological characteristics and nucleotides (5.8S-ITS 16S and 28S rRNA), 3N5 and 3S1 are belonging to *Gaeumannomyces* and *Sarocladium*, respectively. *Gaeumannomyces oryzae* was accommodated as novel endophytic fungus from wild rice, *Oryza rufipogon*.

Nitrogen fixing endophytic bacteria; *Klebsiella variicola* SS-2, *Burkholderia kururiensis* SS-5 and *Sphingomonas* sp. PS-5 were isolated from Thai local rices strain *Oryza sativa* that are a plant growth promoting bacterium. Three bacterial strains were marked with the *gus A* gene and fluorescent protein gene (GFP: Green Florescent Protein gene; DsRed: Red Fluorescent protein gene) for observed colonization in rice as a host plant and 5 other non- host plants, including corn, sorghum, sesame, soybean and sugarcane seedlings. The result showed that *Klebsiella variicola* SS-2, *Burkholderia kururiensis* SS-5 and *Sphingomonas* sp. PS-5 could colonize in epidermis, cortex and vascular tissue of root and stem of rice. The colonization in corn and sugarcane showed the same with rice. However, few bacterial population was observed in sorghum, soybean and sesame and colonized in some region. The nitrogen fixing gene expression was studied in rice and found that the gene expression was clearly expressed in conditions without nitrogen source as well as with nitrogen. The best of *nifH* gene expression was root's rice region in all 3 bacteria. The expression in non-host plant of *nifH* gene in corn root was studied by *Sphingomonas* sp. PS-5 found that nitrogen fixing gene expression showed less than 16S rRNA gene at 14 days after cultivation. So, endophytic diazothrophic bacteria are an interesting and were developed to promote plant growth and use as fertilizer plant.

The efficiency of actinomycetes was screened and studies of antagonistic activities of *Fusarium* sp. and *F. moniliforme* were tested by dual culture method. The result showed that six isolates were able to inhibit the growth of fungi more than seventy percent. This study found that actinomycetes isolate RH1-5-22 was high effectiveness in antagonistic activities. Furthermore, six isolates were able to produce degrading enzyme cellulase and plant growth promoters (IAA, siderophore and phosphate solubilization). The efficacy of controlling disease was assessment by blotter method. The result showed the rice seed (KDML 105) were soaked in spore suspension of actinomycetes isolate RH1-5-22 reduced the incidence of bakanae disease. This study proposed that the actinomycetes isolate RH1-5-22 has a challenge to be used in biological control.

Potassium is the major essential macronutrient that plays an important role in the growth, metabolism and development of plants. Potassium in the soil that useful to plant are originates from the decay of many types of rocks and minerals. More than 90% of potassium is in the form which plant cannot absorb. Therefore, to increase decay of potassium compound to potassium ion (K+). The organic weathering using microorganisms is good process that economical and the fastest mechanism. In this study, microbial isolates were obtained from rhizosphere soil on modified Aleksandrov medium containing feldspar and kaolin as potassium source. Thirty three isolates, among 79 cultures tested, showed significant potassium solubilization on minerals powder supplemented plates. *Aspergillus brasiliensis* SC301-1 effective in dissolving the potassium bearing-minerals. Maximum potassium solubilization was observed on *A. brasiliensis* SC301-1 in KCl as potassium source and glucose or sucrose as carbon sources. Potassium solubilization was found more when the fungus *A. brasiliensis* SC301-1 were grown as well in Czapek yeast extract agar with medium pH at 30^{o}C when incubated for 5 days. These results suggested that the environmental conditions could be optimized for growth of potassium solubilizing microorganisms and these cultures could be exploited for plant growth improvement under field conditions.

Rice (*Oryza sativa* L.) is an important food crop in Thailand. However, rice blast and bacterial leaf blight diseases affect to rice production causing economic losses. This research aim to select actinobacteria that can solubilize tricalcium phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$ and produce secondary metabolites to inhibit *Pyricularia oryzae* BS265 causing rice blast disease and *Xanthomonas oryzae* XPK1 causing bacterial leaf blight disease. In this study, 110 rhizosphere actinobacteria were isolated from 15 rhizosphere

soil samples. All of actinobacteria were tested for phosphate solubilizing on Pikovskaya's agar. The result showed that actinobacteria strain CMU-S3 showed the highest clear zone of phosphate solubilization (22.8 mm) and oxalic acid was produced as 1.91 ± 0.14 mg./200 mg Crude and tartaric acid was 14.04 ± 0.61 mg./ 200 mg Crude. In addition, those actinobacteria were tested for antifungal activity against *Pyricularia oryzae* BS265. The actinobacteria CMU-PW4 showed 100% inhibition of the radial growth (PIRG) on potato dextrose agar for 14 days. Then, isolated rhizosphere actinobacteria were tested for antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* XPK1. The actinobacteria CMU-S1 showed inhibition (100%) on nutrient agar. Actinobacteria CMU-S3, CMU-PW4 and CMU-S1 were preliminary identified based on morphological characteristics and all three isolates were classified to genus *Streptomyces*. Therefore, *Streptomyces* sp. strain CMU-S3 CMU-PW4 and CMU-S1 could be used as biological control of plant disease and rice growth promoting by phosphate solubilization.

Keyword: microorganism, Plant growth promote, secondary metabolite, biocontrol