รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ชีววิทยาและศักยภาพของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ในการเป็นตัวส่งเสริมการเจริญ และควบคุมทางชีวภาพของพืชเศรษฐกิจบางชนิดในประเทศไทย

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง

และคณะ

กันยายน 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ชีววิทยาและศักยภาพของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ในการเป็นตัวส่งเสริมการเจริญ และควบคุมทางชีวภาพของพืชเศรษฐกิจบางชนิดในประเทศไทย

ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ลำยอง
และคณะ

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

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

Executive summary

Research title: Biology and Potential of Endophytic Microbes as Plant Growth Promoter and Biocontrol Agents of Some Economic Crops in Thailand

Project Leader: Professor Dr. Saisamorn Lumyong
Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

Research Field: Microbial diversity and utilization in biotechnology

Budget: 7,500,000 Baht

Period: 3 years

Rational and Significance:

Limitation of nutrients in soil such as nitrogen, phosphorus and potassium, together with diseases are the two major factors that affect plant health and yield. Agrochemical, fertilizer and pesticide, have been used for a long time in agricultural systems. Several negative effects i.e. resistance of pathogen to applied chemical, pollution, soil deterioration, hazards to producer and consumers and high cost. At present consumer demand of pesticide free products is increasing. An alternative to pesticide use is applying sadaptive symbiotic technique, such as using plant growth promoting endophytic microbes, which can promote growth by fixing nitrogen (diazotroph bacteria), phosphorus and potassium solubilization, producing phytohormone (IAA), producing antibiotic and siderophore. These microorganisms can be applied as biofertilizer. Making this alternative competitive with chemical application in terms of crop yield, and developing effective plant growth promoting microorganism (PGPM) agents in both in vitro and in vivo systems is the research goal.

Endophytic microbes are a group of microbes that live inside plant tissue without having any negative effects on the host plant, as the interaction can be symbiotic, mutualistic or latent pathogen. One plant can harbor more than 30 species of endophytes. Endophytic fungi and bacteria have been studied for a long time and utilization of these microorganisms still in progress both in medicine and agricultural fields. Target endophyte consist of mycorrhizal fungi arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, ectomycorrhial (EM) fungi, orchid mycorrhiza and diazotophic bacteria. Some have a

board host range, but most have only a narrow host range. To use these microbes effectively research need to be conducted on specific microbes and their hosts. Biodiversity of target PGPM, screening, propagation of selected strain and suitable techniques for inoculation need to be evaluated before host seedling tests can be carried out. Additionally, the PGPM mechanism of action needs to be interpreted for effective application.

Climate and land use have led to a series of environmental issues in northern Thailand. Agricultural area are expanding without effective control, particularly in higher elevations where slash and burn farming for crops such as corn, rice and vegetables by both ethic group and local people and causing a range of problems. In dry season (October – May) air pollution and smoke haze from burning agricultural waste and leaf litter in deciduous forests for mushroom collection is a serious environmental and public health hazard. Forested areas are decreasing leading to flooding and landslides in the raining season. A comprehensive management plan is needed that will grow high value crops that treturn a high income and can reduce economic pressure on forested land. High value crops including rice, teak, para rubber, physic nut, oil palm, tea, coffee and orchids, and can be grown at high and low elevations. These plants need a good start with healthy seedling and effective transplantation techniques together with good management of fertilizer, pest and pathogens that will ensure the good growth of plant until harvest. The knowledge from this study can be applied throughout the South East Asia.

Plant growth promoting microbes (PGPM) are a group of bacteria and fungi that are found in association with roots (mycorrhiza) or live in plant (endophytes). They can improve the quality of plant growth directly or indirectly. Direct effects on plant growth include promoting substances that synthesize microbs (phytohormones), increase water uptake and certain plant nutrients (P, N, Fe) from the environment. The indirectly promote plant growth by preventing phytopathogenic organisms. Many mechanisms are involved; (1) produces or changes of plant growth regulators (indole acetic acid, gibberellic acid, cytokinin and ethylene. (2) a symbiotic N2 fixation, (3) antagonism against phytopathogenic microorganisms by producing siderophore, antibiotics and cyanide (4) uptake and transfer P from environment.

This project will investigate microbial diversity and mechanisms that are involved in enhancing plant growth and inhibiting infection of plant pathogens. Four model microorganisms will be evaluated in some economicly important plants. (1). Mycorrhizal

fungi as PGPM: AMF for teak, oil tree, physic nut and bamboo and EM fungi for Quercus and some economic plants (2). Endophytes as PGPM and biocontrol agent for rice, para rubber tree and orchids (3). Diazotrophic bacteria for rice, and (4). phosphorus and potassium solubilizer as PGPM for rice and corn. These 4 PGPM types are a model for demonstrating the response and benefits of PGPM. Specific mechanism involving PGPM, colonization and gene expression of endophytic diazotrophic bacteria in host and non-host and mechanism of biocontrol will be studied in selected agents. Screening, propagation, mechanism of PGPM or properties to be a suitable PGPM will be determined, then appropriate formulation and application of effective PGPM will be evaluated both in vitro and in vivo. Fesibility of production and scale up will also be analysed.

Summary of the results

The research was divided into 3 topics according to the type and mode of action of microorganism. The first topic's aimed to evaluate the potential of mycorrhizal fungi as biofertilizesr of some economic crops. The second subtopic aimed to evaluate endophytic microbes as plant growth promotor (PGPM) and biocontrol agents. Third phosphorus and potassium solubilizing bacteria.

1.1 Biology and mycorrhizal development [Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and ectomycorrhizal fungi (ECM)]

1.1.1 *Arbuscular mycorrhizal fungi as PGPR of teak and agar wood*

The study of arbuscular mycorrhizal (AM) fungus community structure in roots and rhizosphere soils of *A. crassna* and *Tectona. grandis* from plantations in Thailand was revealed that AM fungal community composition in both plants was 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 both plants was not affected by host plant species and sample source (root vs. soil) but affected by collecting site. *Tectona 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. In *A.*

crassna, there was no significant differed in height, number of leaf, and wideness of leaf between inoculated and uninoculated plantlets. *Tectona grandis* plantlets inoculated *in vitro* with *Funneliformis mosseae* RYA08 had highest plant height follow by *G. intraradices*, *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03, and uninoculated plant, respectively. 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 vermiculite 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, *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.

1.1.2 *Arbuscular mycorrhizal fungi as PGPR for tea oil*

Diversity of AM fungi in the root zones of tea oil camellia and the effects of AM fungi and plant pesticides on the growth of tea oil camellia were studied. Results showed that percentage of AM colonization in roots of tea oil camellia was about 57-77% and spore density of AM fungi in the root zones was about 9-19 spores/soil 1 g. Twenty-four AM fungal species associated with tea oil camellia were found. *Septoglomus constrictum*, *Claroideoglomus luteum*, *Acaulospora laevis* and *Rhizophagus fasciculatus* were dominant species in every soil samples. Tea oil camellia that inoculated with AM fungi had higher dry weight and nutrient contents than uninoculated plants. Plant pesticides were not affected on growth of tea oil camellia. Metalaxyl fungicide was affected on decreasing of percentage of AM colonization in the roots of tea oil camellia.

1.1.3 *Ectomycorrhizal fungi as PGPR*

The status of the mycorrhizal or saprophytic mushroom were evaluated.The 57 samples of ectomycorrhizal (ECM) fungi and 25 samples of saprotophic mushroom 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: ECM fungi and saprotrophic fungi. Pure cultures of *Astraeus*

odoratus, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense* were isolated from each sporocarp. 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 liquid medium supplemented with 4 mg/ml of L-tryptophan. All selected fungi could solubilize insoluble metal (Co, Cd, Cu, Pb, Zn) 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.

1.2 Endophytic microbes as plant growth promotor (PGPM) and biocontrol agents

1.2.1 *Endophytic fungi of cantaloupe*

Four hundred and twenty-nine endophytic fungi were isolated from medicinal plant and Cucurbitaceae plant in Phayao. These endophytes were *in vitro* tested 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 these three endophytes was 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.

1.2.2 *Endophytic fungi and actinoobacteria as PGPR for oil palms*

The potential of endophytic fungi and rhizosphere actinobacteria from oil palm to be used as plant growth promoter and biological control in plant were screened. 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 actinobacteria 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 actinobacteria 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.

1.2.3 *Endophytic fungi as PGPR for coffee*

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 identified as *Colletotrichum gloeosporioides*.

1.2.4 *Endophytic fungi as PGPR for rubber*

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*.

1.2.5 *Endophytic microbes as PGPR for citrus plants*

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 *, Pestalotiopsis* TA 18, *Fusarium* SO 21 and *Fusarium* PO 55. The selected actinobacteria were *Streptomyces* NO 37, NO 42 and NO 43. The selected effective bacteria were *Bacillus* LE 24, PO 80 and PO 109. Optimal culture media for the selected microorganisms were investigated bioactive compounds production for inhibition the growth of *X. citri* pv. *citri*. The results showed that all of the selected fungi could produce the highest bioactive compounds when 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). 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 the cultural microorganisms and the crude extracts could control canker disease in lime.

1.2.6 *Endophytic fungi as biocontrol agents*

Endophytic fungal 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 fungal isolates were cultivated in potato dextrose broth (PDB) and F1, and then harvested by filtration. Culture broths were extracted by ethyl and crude extracts were weight and dissolved in methanol. crude extracts were 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*.

1.2.7 *Nitrogen fixing endophytic bacteria as PGPR*

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, little 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.

1.2.8 *Actinobacteria as biocontrol agents*

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.

1.3 The study of phosphate and potassium solubilizing microbes

1.3.1 *Phosphorus solubilizing microbes*

This research was aimed 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. The actinobacteria CMU-S1 showed inhibition against *Xanthomonas oryzae* XPK1 (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.

1.3.2 Potassium solubilizing microbes

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 was affected 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. The activity of potassium solubilization was higher when the fungus *A. brasiliensis* SC301-1 was grown in Czapek yeast extract agar with medium pH at 30 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.

บทนำ

การปลูกสวนป่าในปัจจุบันเป็นที่ต้องการทั้งในหน่วงงานของรัฐบาลและเอกชนทั้งในและต่างประเทศ ในแง่สวนสักเพื่อเอาไม้และสวนกฤษณาเพื่อเอาน้ำมันหอมระเหยที่มีราคาแพง ซึ่งไม้ทั้งสองชนิดนี้ยังเป็นไม้ยืนต้นให้เนื้อไม้คุณภาพ และไม้ยืนต้นชนิดใกล้สูญพันธุ์ตามลำดับ ต้นกล้าพันธุ์ดีในปัจจุบันสามารถพัฒนาได้โดยใช้ทั้งเมล็ดพันธุ์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การทำกล้าไม้จากเมล็ดต้องการเวลานานและบางครั้งให้ต้นที่มีลักษณะที่แตกต่างซึ่งไม่เป็นที่ต้องการ ดังนั้นการผลิตกล้าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงนิยมมากในธุรกิจการผลิตกล้าพืชทางเศรษฐกิจ ปัญหาของกล้าที่ผลิตโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือมีการตายหรือไม่เจริญหลังการย้ายปลูก ในแต่ละพื้นที่ ก็จะได้ต้นที่เจริญได้ไม่ 100% เนื่องจากความไม่ทนต่อสภาพแวดล้อมของกล้าไม้ต้องการการดูแลและให้ปุ๋ยในระยะแรก ซึ่งเสียค่าใช้จ่ายสูง ในต่างประเทศมีพืชเศรษฐกิจหลายชนิดที่เกษตรกรซึ่งมีความรู้มีการปลูกหัวเชื้อไมคอร์ไรซาลงไปในระยะกล้าซึ่งเชื้อจะสามารถช่วยให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้ในพื้นที่ที่ขาดฟอสฟอรัสและไนโตรเจน แสดงให้เห็นว่าเชื้อไมคอร์ไรซามีความสามารถเพิ่มความสมบูรณ์ให้กับพืชโดยไม่ต้องใช้ปุ๋ยเคมี ด้วยเหตุนี้การศึกษาและคัดเลือกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญของสักและกฤษณาจึงมีความสำคัญ เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชทั้งสองก่อนการย้ายปลูก

ต้นชาน้ำมัน (*Camellia oleifera* Abel.) เป็นพืชที่นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยในปี 2549 จากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยสำนักงานมูลนิธิชัยพัฒนาได้นำเมล็ดและต้นชาน้ำมันมาศึกษาและทดลองปลูกเพื่อพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจ จึงถือได้ว่าชาน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ที่น่าสนใจ พื้นที่ที่เหมาะสมในการปลูกชาน้ำมันต้องมีความสูงจากระดับน้ำทะเล 800 เมตร ขึ้นไป (สมพล 2553) มีการปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และนครราชสีมา น้ำมันจากต้นชาน้ำมันมีคุณภาพสูง มีสารต้านอนุมูลอิสระ และมีวิตามินอีสูง ในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนมีการบริโภคน้ำมันที่ได้จากเมล็ดชาน้ำมันมาเป็นเวลานาน สามารถใช้ปรุงเป็นอาหาร เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง หรือในผลิตภัณฑ์ยา ต้นชาน้ำมันเป็นไม้พุ่มหรือไม้ต้นขนาดเล็ก ไม่ผลัดใบ สูง 2-4 เมตร กิ่งอ่อนมีขนสาก ใบเดี่ยวเรียงสลับ แผ่นใบหนาเป็นมัน ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยถี่ๆ ปลายใบแหลม ดอกสมบูรณ์เพศ ออกเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อ 2-3 ดอก กลีบดอก 5-9 กลีบ เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก เกสรเพศเมียเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็น 3 แฉก มีผลเป็นแบบชนิดแห้งที่แตกได้ (loculicidal capsule) รูปทรงกลม ขนาดผ่านศูนย์กลาง 2-5 เซนติเมตร เมื่อแก่จะแตกออกจากบริเวณปลายผล เป็นแฉก 3-4 ส่วน แต่ละส่วนจะมีเมล็ด 1-5 เมล็ด (สมพล 2553) เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืช โดยต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ร่วมกัน เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาช่วยดูดน้ำและธาตุอาหารให้กับรากพืช (Marschner 1995) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ช่วยให้พืชมีความต้านทานต่อโรค ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (สมจิตร 2549; Youpensuk et al. 2006; Youpensuk et al. 2012) มีรายงานว่าในดินที่ถูกรบกวนด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น การไถ

ที่ดิน การทำลายป่า การเผาพื้นที่การเกษตร หรือการปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่ใช่พืชให้อาศัยของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา การกระทำเหล่านี้มีผลกระทบต่อเชื้อราไมคอร์ไรซา ทำให้ปริมาณสปอร์ ความยาวของเส้นใย และจำนวนสปีชีส์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาลดลง (Kabir et al. 1998; Dodd 2000) รายงานว่าการใช้สารเคมีทางการเกษตร มีผลต่อการเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้น้อยลง และยังพบว่า cypermethrin ที่ความเข้มข้น 10 ppm ยับยั้งการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ได้ 25% (Laatikainen and Heinonen 2002) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซกับต้นชาน้ำมัน และผลของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เพื่อเป็นแนวทางในการนำเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาช่วยในการเจริญเติบโตของต้นชาน้ำมันในแปลงปลูกของเกษตรกรต่อไป

เชื้อราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ร่วมกับพืช โดยมีความสัมพันธ์กันแบบพึ่งพาอาศัย โดยไม่ก่อให้เกิดโรค ราเอนโดไฟท์ได้รับสารอาหารต่างๆ จากพืชเพื่อใช้ในการดำรงชีวิต ในขณะเดียวกันเชื้อเอนโดไฟท์จะช่วยส่งเสริมทำให้พืชดูดซับธาตุอาหารได้มากขึ้น ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งยังสามารถทำให้พืชอาศัยต้านทานต่อโรคและแมลง Petrini (1986) จึงได้คัดเลือกหาเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีความสามารถในการป้องกันกำจัดโรค และนอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโต อันจะช่วยลดต้นทุนการผลิต ลดการใช้สารเคมี

แคนตาลูปมีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย แล้วนำไปปลูกที่เมืองแคนตาลูปใกล้กรุงโรม ประเทศอิตาลี จึงได้ชื่อว่าแคนตาลูปตั้งแต่บัดนั้นมา แหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา อเมริกาใต้ และบางประเทศในอเมริกากลาง สำหรับทวีปเอเชียได้มีการขยายการปลูกแคนตาลูปในประเทศญี่ปุ่นและไต้หวัน ประเทศไทยเริ่มมีการทดลองปลูกแคนตาลูปเมื่อปี พ.ศ. 2508 ที่จังหวัดสระแก้ว (ธงชัย 2531) การปลูกแคนตาลูปแพร่หลายไปทั่วประเทศ ในปี พ.ศ. 2554 ปัจจุบันมีเกษตรกรปลูกแคนตาลูปใน 27 จังหวัด โดยจังหวัดสระแก้วเป็นจังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด รองลงไปคือ ขอนแก่น เชียงใหม่ บุรีรัมย์ และตาก ตามลำดับ (กรมส่งเสริมการเกษตร 2549) มีพื้นที่ปลูกรวมกันทั้งประเทศ 32,941 ไร่ ได้ผลผลิต 22,165.15 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร 2550) แต่ในปี พ.ศ. 2555 พื้นที่ปลูกทั้งประเทศลดลงเหลือเพียง 8,146 ไร่ และผลผลิตรวมทั้งประเทศเหลือเพียง 16,440.45 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร 2556) แคนตาลูปมีจุดแข็งคือ สามารถเก็บรักษาได้นานและทนทานต่อการขนส่งได้ดีกว่าแตงไทย อีกทั้งมีรสชาติดี จึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ทำให้ราคาของผลผลิตค่อนข้างดี โอกาสที่จะขยายตลาดภายในประเทศยังมีอยู่สูง ในอนาคตหากมีศักยภาพการผลิตที่เพียงพออาจเป็นพืชที่ส่งออกทำรายได้เข้าประเทศอีกทางหนึ่ง (อารักษ์ และอุษา 2543) การผลิตแคนตาลูปของเกษตรกรมักประสบปัญหา โดยปัญหาที่สำคัญของการปลูกแคนตาลูปคือด้านโรคพืช โดยโรคที่สำคัญได้แก่ รากเน่าโคนเน่า หรือโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) เกิดจากเชื้อราชนิด *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* ที่อยู่ในดิน และโรคราน้ำค้าง เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิด *Pseudoperonospora*

การควบคุมโรคในแปลงปลูกแคนตาลูปนั้น เกษตรกรยังใช้สารเคมีเป็นหลัก ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง นอกจากนี้การใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นเวลานานอาจส่งผลให้มีการตกค้างของสารพิษทั้งในผลผลิตและในสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นผลเสียต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค รวมถึงสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในสภาพแวดล้อม จากปัญหาดังกล่าวจึงมีการศึกษาการควบคุมโรคโดยชีววิธีมากขึ้น ส่วนใหญ่ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ (Antagonistic microorganism) โดยตรง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคในแคนตาลูป

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis quineensis* Jacq.) มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา (Rees et al. 2007) นิยมปลูกมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย ซึ่งเป็นแหล่งผลิตแหล่งใหญ่ของโลก อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มในประเทศไทยมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณผลผลิตปาล์มน้ำมันคือ สายพันธุ์ อุณหภูมิ ปริมาณน้ำ และการรบกวนของเชื้อโรคและแมลง พบการเกิดโรคตั้งแต่ในระยะต้นกล้าจนถึงระยะให้ผลผลิต โดยโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน (basal stem rot) เป็นโรคที่แสดงอาการรุนแรงและทำความเสียหายแก่ผู้ปลูกปาล์มน้ำมันในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งในประเทศไทย มีสาเหตุมาจากเชื้อเห็ด *Ganoderma* sp. (Susanto et al. 2005) เมื่อมีการติดเชื้อ เนื้อเยื่อภายในลำต้นปาล์มน้ำมันจะถูกทำลาย รากมีลักษณะเปราะหักง่าย เนื้อเยื่อภายในรากผุเปื่อยร่วนเป็นผง (Naher et al. 2012) ปาล์มน้ำมันที่เป็นโรคจะให้ผลผลิตลดลงหรือไม่ให้ผลผลิตเลย และเมื่อโรคแสดงอาการรุนแรงปาล์มน้ำมันจะยืนต้นตาย ซึ่งการแพร่กระจายของเชื้อโรคเกิดขึ้นได้ทั้งทางดินโดยรากของต้นที่เป็นโรคสัมผัสกับรากต้นปกติหรือโดยสปอร์ของเชื้อที่แพร่กระจายไปในอากาศ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวเกษตรกรมักจะใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดโรคพืชคลุกเคล้าเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูก รวมถึงฉีดพ่นเมื่อพืชแสดงอาการของโรค แต่การใช้สารเคมีในการป้องกันและควบคุมเชื้อ *Ganoderma* sp. ยังไม่ได้ผลที่ดีนัก (Soepena et al. 2000) อีกทั้งยังก่อให้เกิดการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมและอาจเป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภค ดังนั้นนักวิจัยจึงต้องการที่จะนำความรู้ทางด้านวิธีการทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ โดยทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Ganoderma* sp. มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืชและ/หรือชักนำให้พืชเกิดการต้านทานต่อโรค ซึ่งไม่พียงแต่ควบคุมโรคแต่ยังสามารถกระตุ้นให้พืชมีความต้านทานต่อโรคทำให้ได้ต้นแม่พันธุ์พืชที่แข็งแรง โดยจะนำมาพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบที่ผู้ผลิตกล้าปาล์มน้ำมันและเกษตรกรผู้เพาะปลูกสามารถนำไปใช้ได้ง่าย เพื่อทดแทนและลดปริมาณการใช้สารเคมี อีกทั้งยังเป็นการช่วยรักษาระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ

ราเอนโดไฟท์เป็นเชื้อราที่อยู่อาศัยในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้พืชแสดงอาการของโรคหรือมีผลข้างเคียงใด ๆกับพืช (Huang et al. 2001) โดยสามารถอาศัยในราก ลำต้น หรือใบ และสามารถสร้างสปอร์ในเนื้อเยื่อพืชได้ (Stone et al. 2004) ราเอนโดไฟท์อยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยโดยพืชให้อาหาร ขณะที่เชื้อราสร้างสารทุติยภูมิเมแทบอไลต์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วยกระตุ้นการเจริญและป้องกันพืชอาศัยจากเชื้อโรค แมลงและสัตว์ได้ (Yang et al. 1996)

อย่างไรก็ตามราเอนโดไฟท์อาจทำให้พืชแสดงอาการของโรคได้เมื่อเกิดความเครียด (Huang et al. 2001) ราเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารทุติยภูมิเมแทบอไลต์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิดและถูกใช้ทางการเกษตร การแพทย์ และอุตสาหกรรมอาหาร โดยเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic compounds) สารต้านมะเร็ง (anticancer compounds) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant compounds) เป็นต้น ซึ่งเป็นที่ยอมรับในประสิทธิภาพการทำงานและความปลอดภัยไม่ก่อผลข้างเคียงกับสุขภาพของมนุษย์ สารปฏิชีวนะหลาย ๆชนิดรวมทั้งสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราถูกสร้างจากราเอนโดไฟท์ในสกุล *Xylaria* เช่น sordaricin และ multiplolides A, B มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* (Boonphong et al. 2001; Ponhcharoen et al. 2008) ส่วนสารปฏิชีวนะ griseofulvin ($C_{17}H_{17}ClO_6$) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช (Pimentel et al. 2011) นอกจากนี้สารปฏิชีวนะจากราเอนโดไฟท์ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น ราเอนโดไฟท์สกุล *Phomopsis* สร้างสาร phomopsichalasin มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis Salmonella gallinarum* และ *Staphylococcus aureus* ได้ (Horn et al. 1995) ปัจจุบันมีการศึกษาการใช้ประโยชน์ของราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด รวมทั้งเชื้อราก่อโรคในยางพารา เช่น เชื้อ *Rigidoporus microporus* ที่ทำให้เกิดโรครากขาวเข้าทำลายระบบรากทำให้รากเน่า ต้นยางจะแสดงอาการใบเหลืองโดยอาจเกิดขึ้นที่กิ่งใดกิ่งหนึ่งแล้วลุกลามไปทั้งต้นและต้นยางพารายืนต้นตายในที่สุด (สายทอง 2556) การป้องกันในปัจจุบันทำได้โดยการขุดดินรอบ ๆต้นยางพาราที่เป็นโรคเพื่อไม่ให้มีการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรค กำจัดเศษซากทั้งหมดของต้นยางก่อนปลูกยางพารา ปรับสภาพดินไม่ให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อร่วมกับใช้สารเคมีทำลายเชื้อราหรือใช้ผสมดินก่อนปลูกยางพารา ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากราเอนโดไฟท์ในการควบคุมโรคพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมเชื้อก่อโรคในพืชที่มีประสิทธิภาพ ยั่งยืนและลดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมและปัญหาด้านอันตรายต่อผู้ใช้งานได้

แอคติโนมัยซีทหรือแอคติโนแบคทีเรีย (actinomycetes or actinobacteria) เป็นชื่อเรียกกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีปริมาณเบสกัวนีนและไซโตซีนในดีเอ็นเอสูงกว่าแบคทีเรียทั่วไป สร้างเส้นสายที่แตกแขนงเป็นกิ่งก้านคล้ายเชื้อราแต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า ผิวหน้าโคโลนีหยาบและมีการพัฒนาเป็นเส้นใย (hyphae) เจริญลงในอาหารแข็ง เรียกว่า substrate mycelium และบางสายพันธุ์สร้างเส้นใยขึ้นไปในอากาศ เรียกว่า aerial mycelium เพิ่มจำนวนโดยการแตกหัก (fragmentation) หรือสร้างสปอร์ ซึ่งใช้เวลาในการเจริญเพื่อเพิ่มจำนวนนานกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น (Gathogo et al. 2004) จัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความหลากหลายสูง พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปทั้งในดิน น้ำ หรือเนื้อเยื่อพืช แอคติโนมัยซีทมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศน์ โดยมีส่วนช่วยในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุในสิ่งแวดล้อม มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิเมแทบอไลต์ซึ่งออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สาเหตุโรค จึงมีความสำคัญต่อการค้นพบยาชนิดใหม่ และสารปฏิชีวนะที่นำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช (Strobel 2002; Xu et al.

2010) และในปัจจุบันมีการศึกษาความหลายหลายของแอคติโนมัยซีทในพืชหลายชนิด เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์กับพืชอาศัย รวมถึงการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ จากแอคติโนมัยซีทโดยเฉพาะสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร การแพทย์และอุตสาหกรรม

เชื้อราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi) คือ เชื้อราที่ในช่วงหนึ่งหรือตลอดวงจรชีวิตจะอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชทั้งในส่วนของลำต้น ใบ ก้านใบ และรากของพืชที่มีความสมบูรณ์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนภายในเนื้อเยื่อโดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคกับพืชอาศัย (Stone et al. 2000) โดยมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis และ mutualistic) กับพืช จุลินทรีย์เอนโดไฟท์มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญของพืช กระตุ้นให้พืชมีการตอบสนองทางสรีระวิทยาเพื่อทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมและต้านทานการเข้าทำลายของแมลง ไส้เดือนฝอย และเชื้อสาเหตุโรค (Hallmann and Berg 2006; Ryan et al. 2008; Sturz and Nowak 2000) นอกจากนี้สารอินทรีย์ระเหยจากเชื้อราเอนโดไฟท์มีความสำคัญต่อระบบนิเวศทั้งบริเวณเหนือผิวดินและในดิน เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพต่อการนำมาใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร อุตสาหกรรมและการแพทย์ ในด้านการเกษตรให้ความสนใจสารระเหยจากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถนำมาใช้เพื่อการการส่งเสริมการเจริญของพืชและควบคุมทางชีวภาพต่อจุลินทรีย์ แมลง และศัตรูพืชอื่นๆ ซึ่งจะเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้นและยังช่วยลดการใช้สารเคมีในการเพาะปลูกพืช

ออกซิน (Auxin) เป็นฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช กระตุ้นการสร้างและขยายขนาดเซลล์ กระตุ้นการเกิดตารากและการเจริญของราก ในพืชออกซินถูกสร้างบริเวณปลายยอด ปลายราก เนื้อเยื่อเจริญ ผลอ่อน ซึ่งมากน้อยแตกต่างกันไป การรักษาปริมาณออกซินในเนื้อเยื่อต่างๆจะมีการสร้างและทำลายไปพร้อมๆกัน ในเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญจะมีการสร้างมากกว่าในเนื้อเยื่อที่อายุมาก ออกซินในธรรมชาติที่พืชสร้างขึ้นและค้นพบเป็นชนิดแรกคือ Indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นโครงสร้างออกซินที่พบมากสุดและมีฤทธิ์ออกซินสูง ในปัจจุบันมนุษย์สามารถสังเคราะห์ออกซินเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านเกษตรกรรม อาทิ ใช้ออกซินในการเร่งราก การเปลี่ยนเพศดอก เพิ่มการติดผล เพิ่มขนาดผล การป้องกันผลร่วง ใช้กำจัดวัชพืช และการใช้ออกซินผสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจหรือไม้อนุรักษ์ ออกซินสังเคราะห์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ Phenylacetic acid (PAA), 2,4-Dicholorophenoxyacetic acid (2,4-D), L-naphthylacetic acid (NAA), 4-CPA (4-Chlorophenoxyacetic acid) เป็นต้น ออกซินเหล่านี้ใช้วิธีการทางเคมีในการสังเคราะห์ทำให้มีราคาสูง ออกซินสังเคราะห์บางชนิดมีความคงตัวในธรรมชาติสูง เมื่อนำไปใช้ส่งผลให้พืชแบ่งเซลล์มากผิดปกติ (tumor) ไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและเกษตรกรผู้ใช้ รวมทั้งผลผลิตที่ได้จากการใช้สารสังเคราะห์อาจเกิดการสะสมและส่งผลเสียต่อสุขภาพแก่ผู้บริโภคในอนาคต มีการรายงานการผลิตออกซินจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย รา และสาหร่าย อย่างไรก็ตาม IAA (ออกซินในธรรมชาติ) ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่มีการ

รายงานในปัจจุบันยังมีปริมาณน้อยไม่สามารถนำไปใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม ทางคณะผู้จัดทำจึงได้ศึกษา IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ซึ่งแยกได้จากต้นกาแฟ เนื่องจากราเอนโดไฟท์เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญที่มนุษย์นำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย มีการรายงานการศึกษาและวิจัยการใช้ประโยชน์จากราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต IAA เพื่อกระตุ้นการเจริญของพืช และกาแฟเป็นพืชที่มีความสำคัญในระบบเศรษฐกิจโลก เพราะอุตสาหกรรมการส่งออกเมล็ดกาแฟมีขนาดใหญ่เป็นอันดับสองรองจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมและในระดับภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกเมล็ดกาแฟที่มีขนาดใหญ่เป็นอันดับสามในภูมิภาคนี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้คัดแยกราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการผลิต IAA จากต้นกาแฟ และศึกษาผลของ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ต่อการส่งเสริมการเจริญของพืช เพื่อในอนาคต IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์จะเป็นหนึ่งในตัวเลือกที่น่าสนใจในการนำไปใช้เพื่อการส่งเสริมการเจริญของพืชเศรษฐกิจในการทำเกษตรกรรมที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมต่อไป

มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) เป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการประกอบอาหาร โดยในปี พ.ศ.2554 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะนาว 96,056 ไร่ และให้ผลผลิต 102,141 ตันต่อปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) โรคแคงเกอร์ของมะนาวเป็นปัญหาสำคัญ มักพบการระบาดของโรคมากที่สุดในช่วงฤดูฝน มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas citri* pv. *citri* ซึ่งสามารถแพร่กระจายไปกับลม น้ำ น้ำฝน หรือกิ่งพันธุ์ที่เป็นโรค โรคแคงเกอร์เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้ม (*Citrus* spp.) ที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มทั่วโลก (Civerolo, 1984; Schubert and Miller, 2000) โรคนี้สามารถเกิดได้ที่ส่วนต่างๆของต้น ได้แก่ ผล ใบ และกิ่ง อาการของโรคจะมีจุดนูนสีน้ำตาล กระจายทำให้เป็นแผลกว้าง ตรงกลางบุ๋ม ต้นมะนาวที่เชื้อสาเหตุของโรคเข้าทำลายอย่างรุนแรงจะทำให้ต้นทรุดโทรม ใบร่วง ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ การควบคุมโรคส่วนใหญ่มักใช้สารเคมี ซึ่งส่งผลกระทบต่อ สุขภาพของผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชและสามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยไม่ทำให้เกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืชชนิดนั้นๆ นอกจากนี้จุลินทรีย์เอนโดไฟท์บางชนิดยังเป็นประโยชน์ต่อพืชที่อาศัย โดยจะช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านทานศัตรูพืชชนิดต่างๆ เพิ่มความแข็งแรงและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเกษตรกรรมและพืชเศรษฐกิจ มีรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับเอนโดไฟท์ รายงานว่าเชื้อเอนโดไฟท์มีประโยชน์กับพืชอาศัย โดยช่วยให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรค ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช สร้าง growth-promoting substance ตรึงไนโตรเจน ช่วยในการดูดซับแร่ธาตุและสารอาหารต่างๆในดิน ช่วยให้พืชทนต่อสภาวะเครียด และยังช่วยชักนำให้พืชทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม โดยนำมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ (biological control) เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีในการควบคุมโรค

พืช ตัวอย่างการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ จากพืชตระกูลหญ้า สามารถสร้างสาร ecomycins เป็นสารตัวใหม่ในกลุ่ม lipopeptides และยังพบว่าสามารถที่จะยับยั้งเชื้อ *Cryptococcus neoformans* และ *Candida albicans* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคในคนได้ (Miller, 1998) งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการศึกษาเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากพืชตระกูลส้มที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาว

ข้าวเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย คนไทยมีการบริโภคข้าวและเพาะปลูกเพื่อการค้าทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งการค้าข้าวในตลาดโลกมีการแข่งขันสูงมากขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องส่งออกข้าวคุณภาพดีเพื่อปรับให้เข้ากับสภาวะการแข่งขัน (อารี และคณะ 2544) ประเทศไทยแม้จะมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวมากแต่ก็ประสบปัญหาด้านผลผลิตต่ำ จากการศึกษาต้นทุนการผลิตการปลูกข้าวในเขตนาชลประทาน จังหวัดอุตรดิตถ์ ปี พ.ศ. 2552 พบว่าค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับสารป้องกันกำจัดโรคและวัชพืชเป็นค่าใช้จ่ายตัวแปรที่ส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตโดยรวมของเกษตรกร (วลัยพร และคณะ 2554) โดยปัญหาโรคข้าวที่สำคัญมีหลายชนิด เช่น ใบขีดสีน้ำตาล กาบใบแห้ง และโรคไหม้ เป็นต้น ซึ่งมีการระบาดเป็นระยะๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย เมื่อมีการระบาดจะส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตเป็นอย่างมาก (Sirithunya et al. 2008) การป้องกันและกำจัดโรคพืชมีการแนะนำให้ใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดเชื้อก่อโรค ซึ่งสารเคมีเหล่านี้เป็นอันตรายและมีความเป็นพิษต่อเกษตรกรและสิ่งแวดล้อม โดยทำให้ความหลากหลายทางชีวภาพลดลง เกิดการตกค้างของสารเคมีแล้วถ่ายทอดหมุนเวียนอยู่ในห่วงโซ่อาหาร และทำให้พืชหรือสัตว์ในท้องถิ่นสูญพันธุ์ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้ซึ่งอาจก่อให้เกิดอาการเฉียบพลันหรือสะสมเรื้อรังในร่างกายได้ อีกทั้งสารเคมีราคาแพงทำให้ต้นทุนในการผลิตเพิ่มขึ้นเป็นผลให้เสียความสามารถในการแข่งขันด้านราคา ดังนั้นจึงมีการหาวิธีต่างๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี เช่น สารสกัดสมุนไพรในการป้องกันกำจัดโรคข้าว (Plodpai et al. 2013) สารทุติยภูมิที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีส (Prabavathy et al. 2006) และการใช้เชื้อเอนโดไฟท์เพื่อยับยั้งโรคข้าว (Tian et al. 2004; Naik et al. 2009; Ji et al. 2014) เอนโดไฟท์คือจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับพืชซึ่งอาศัยอยู่ในช่วงชีวิตหนึ่งหรือตลอดชีวิตของพืชโดยไม่ทำให้พืชแสดงอาการของโรค สามารถจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่เป็นเอนโดไฟท์ได้แก่ รา และแบคทีเรีย (Hamayun et al. 2009; Zhenhua et al. 2012) เอนโดไฟท์มีบทบาทที่สำคัญต่อพืชอย่างยิ่ง โดยสามารถเพิ่มความต้านทานให้แก่พืชต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิต (Carroll 1988; Naik et al. 2009; Zhenhua et al. 2012) สร้างสารกำจัดแมลงศัตรูพืช (Daisy et al. 2002) ช่วยส่งเสริมการตรึงแก๊สไนโตรเจน (James 2000) ผลิตสารช่วยในการเจริญเติบโตของพืช (Jasim et al. 2013) นำมาใช้บำบัดดินที่เสื่อมสภาพหรือมีการปนเปื้อนให้กลับมามีความอุดมสมบูรณ์ (Ryan et al. 2008) สามารถย่อยสารประกอบโฮโดรคาร์บอน (Phillips et al. 2008) และเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด (Li et al. 2000, 2011; Pimentel et al. 2011) เหมาะสำหรับนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี การศึกษาศักยภาพของราเอนโดไฟท์จากข้าวเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืชบางชนิดจึงเป็น

ประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากราเอนโดไฟท์มีอยู่แล้วในธรรมชาติน่าจะมีความปลอดภัยต่อระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังควบคุมการเพาะเลี้ยงได้ง่าย เพาะเลี้ยงได้ในปริมาณมาก หากพัฒนาจนมีต้นทุนในการเพาะเลี้ยงต่ำ อาจจะนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นมาพัฒนาทดแทนการใช้สารเคมีที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากข้าวและจุลินทรีย์จากแมลงที่มีความสัมพันธ์กับข้าว คัดกรองหาจุลินทรีย์ที่สร้างสารต้านเชื้อแบคทีเรียหรือสารต้านเชื้อรา เพื่อใช้ในการควบคุมโรคข้าว และระบุชนิดพร้อมประเมินคุณสมบัติเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวที่ผลิตโดยจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่คัดเลือก

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีการเพาะปลูกพืชหลายชนิดทั้งเพื่อบริโภคภายในประเทศ และเพื่อการส่งออก พืชอาหารที่สำคัญของประเทศไทย อาทิ ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่ว งา และอ้อย (ปรีดา และปรีชา 2553) ในปัจจุบันได้มีการคิดหาวิธีในการลดใช้สารเคมีทางการเกษตรทั้งอยู่ในรูปของปุ๋ยและสารเคมีในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช นอกจากการใช้วิธีกลหรือกระบวนการทางฟิสิกส์ที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชปลูกและป้องกันกำจัดศัตรูพืช พบว่าแนวทางชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีส่วนช่วยให้พืชเจริญเติบโตได้ดีและสามารถลดต้นทุนในการผลิตพืชได้อีกด้วย ดังนั้นจึงเกิดความร่วมมือระหว่างนักวิทยาศาสตร์และเกษตรกรที่มีความสนใจในการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตรมาใช้ในการปรับปรุงดินและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร (Hallmann et al. 1997) อีกทั้งแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพืชโดยเข้าไปอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชและเป็นประโยชน์แก่พืช ไม่ทำอันตรายหรือก่อให้เกิดโรคกับพืช เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ (endophytic bacteria) โดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์มีความสัมพันธ์ร่วมกับพืชหลายประการ (Sturz et al. 2000) เช่น ความสัมพันธ์ในการสร้างกรดอินโดล-3-แอซีติก, การผลิตสารซิเดอร์โรฟอร์ และที่สำคัญสามารถตรึงไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลหญ้า เช่น อ้อย ข้าว (James และ Olivares, 1998) เป็นต้น ดังนั้นการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชและเอนไซม์ต่างๆ จะมีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช (Mclnroy และ Kloepper 1995) จุลินทรีย์ดังกล่าวที่ถูกคัดสรรและมีประโยชน์ต่อพืชอาศัยจะสามารถเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชอาศัยได้ และยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชอาศัยอีกด้วย อีกทั้งสามารถลดปัจจัยในการปลูกพืชและลดผลเสียต่างๆ จากการเพาะปลูกเชิงเคมีได้ จึงเป็นที่มาของการศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากข้าวที่มีความสามารถในการครอบครองพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น และยังคงความสามารถในการตรึงไนโตรเจนภายในพืชอาศัยแต่ละชนิดที่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป

โพแทสเซียมเป็นธาตุที่มีผลต่อคุณภาพผลไม้ชัดเจนกว่าธาตุอื่นๆ ทั้งนี้เพราะโพแทสเซียมมีบทบาทที่สำคัญต่อการสร้างและการเคลื่อนย้ายอาหารจำพวกแป้งและน้ำตาลซึ่งมีผลโดยตรงต่อการสะสมน้ำตาลในผลไม้ (จำเป็น 2553) และส่งไปเก็บสะสมไว้ที่หัวหรือที่ลำต้น ดังนั้นพวกพืชเศรษฐกิจ เช่น อ้อย มะพร้าว และมัน จึงต้องการโพแทสเซียมสูงมาก พืชที่ขาด

โพแทสเซียมมักจะเจริญเติบโตช้า เหี่ยวง่าย แคระแกร็น ใบล่างเหลือง เกิดเป็นรอยไหม้ตามขอบใบ เมล็ดพันธุ์มีขนาดเล็กและอ่อนแอ โพแทสเซียมในดินที่พืชนำเอาไปใช้เป็นประโยชน์ได้มีกำเนิดมาจากการสลายตัวของหินและแร่มากมาย หลายชนิดในดิน โพแทสเซียมที่อยู่ในรูปอนุมูลบวก หรือโพแทสเซียมไอออน (K^+) เท่านั้นที่พืชจะดึงดูด ไปใช้เป็นประโยชน์ได้ ถ้าโพแทสเซียมยังคงอยู่ในรูปของสารประกอบยังไม่แตกตัวออกมาเป็นอนุมูลบวก (K^+) พืชก็ยังดึงดูดไปใช้เป็นประโยชน์ไม่ได้ (Zakaria 2009) ซึ่งโพแทสเซียมส่วนใหญ่จะเป็นองค์ประกอบของแร่เฟลด์สปาร์ (feldspar) ไมก้า (mica) อิลไลต์ (illite) และ เวอร์มิคูไลต์ (vermiculite) เป็นส่วนที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันที โพแทสเซียมที่อยู่ในรูปนี้มีปริมาณมากถึง 90-98% ของโพแทสเซียมที่มีอยู่ในดิน ดังนั้นเพื่อให้โพแทสเซียมในรูปนี้ใช้ประโยชน์ได้เร็วขึ้น จึงจำเป็นต้องอาศัยกลไกที่ทำให้เกิดการสลายตัว (ปิยะมาศ 2546) ในการที่จะทำให้โพแทสเซียมอยู่ในสภาพที่นำมาใช้ประโยชน์ได้ มี 3 วิธี คือ การสลายทางกายภาพ การสลายทางเคมี และการสลายทางอินทรีย์ การสลายทางอินทรีย์ (organic weathering) จะมีผลเร็วและประหยัดที่สุด ซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้จุลินทรีย์เข้าช่วยย่อยสลาย จะทำให้พืชสามารถนำโพแทสเซียมไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น จุลินทรีย์พวกนี้ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า silicate bacteria ที่สามารถใช้โพแทสเซียมจาก aluminosilicate ที่ไม่ละลายน้ำ ขณะเดียวกันก็จะปลดปล่อยโพแทสเซียมออกมาด้วย แต่ในปัจจุบันโพแทสเซียมที่ใส่ให้กับพืชส่วนใหญ่จะใส่ในรูปของปุ๋ยเคมี ซึ่งในกระบวนการผลิตปุ๋ยเคมีโพแทสเซียมมีต้นทุนสูง สิ้นเปลืองพลังงานและเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงต้องการที่จะนำความรู้และวิธีการทางชีวภาพมาปรับใช้จริงในระบบการผลิตขนาดใหญ่ และส่งเสริมให้มีการใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพทางการเกษตร จึงมุ่งเน้นที่จะใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการละลายธาตุโพแทสเซียม เพื่อลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีโพแทสเซียมลง และเป็นการลดต้นทุนในการผลิตให้กับเกษตรกร อีกทั้งยังช่วยรักษาระบบนิเวศของสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักของประชากรและเป็นสินค้าส่งออกของประเทศไทย แต่ในปัจจุบันการผลิตข้าวต้องประสบกับปัญหาการขาดธาตุอาหาร การเกิดโรคระบาดโดยเฉพาะโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งพบว่ามีการระบาดทั่วทุกภาคในเขตที่มีการเพาะปลูกข้าวส่งผลให้เพิ่มต้นทุนในการผลิตในการใช้ปุ๋ยเคมีและสารเคมี เช่น Benomyl Carbendazim และ Tebuconazole (อรพรรณ 2552) ในการป้องกันโรค ซึ่งการใช้ปุ๋ยเคมีและสารเคมีในการป้องกันโรคนั้นทำให้เกิดการสะสมของสารเคมีในดิน ดินเกิดความเสื่อมโทรม ดินเป็นกรด-ด่าง ทำให้การปลูกข้าวในครั้งต่อไปไม่เจริญเติบโต และที่สำคัญการได้รับสารเคมีจากการสัมผัส การสูดดมทางระบบหายใจ ส่งผลต่อการระคายเคืองต่อผิวหนังและเยื่อบุต่างๆ เมื่อเกษตรกรได้รับการสะสมของสารเคมีในปริมาณมากจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรในระยะยาว ดังนั้นการใช้ชีววิธีจากการใช้จุลินทรีย์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยอาศัยแอคติโนแบคทีเรียในการละลายฟอสเฟตเพื่อให้พืชได้รับธาตุอาหารฟอสฟอรัสในกระบวนการเจริญเติบโตของพืช เช่น เป็นองค์ประกอบสำคัญของ Adenosine triphosphate (ATP) นิวคลีโอไทล์ (Nucleotile) กรด

นิวคลีอิก (Nucleic acids) ฟอสโฟไลปิด (Phospholipid) เป็นตัวถ่ายทอดพลังงานจากสารหนึ่งไปยังสารอื่นๆ ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืช และเป็นองค์ประกอบของสารต่างๆที่มีสะสมอยู่ในเมล็ด ซึ่งเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการงอกของเมล็ดพืช ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากฝอยและรากแขนงในระยะแรก ช่วยเพิ่มความต้านทานโรคบางชนิด ช่วยเร่งให้พืชแก่เร็ว ซึ่งจะช่วยในการออกดอก ออกผล และการสร้างเมล็ดของพืช ทำให้ผลผลิตของพืชมีคุณภาพดี รวมทั้งฟอสฟอรัสยังช่วยให้รากพืชสามารถใช้โพแทสเซียมได้ดีขึ้น และช่วยแก้ปัญหาผลเสียจากการที่พืชได้รับไนโตรเจนมากเกินไป นอกจากนี้ฟอสฟอรัสยังทำให้ข้าวมีลำต้นแข็งไม่ล้มง่าย ช่วยในการแตกกอ การพัฒนาของราก การออกดอก และการสุกแก่ของข้าว สำหรับข้าวที่ขาดฟอสฟอรัสจะมีลักษณะแคระแกรน การแตกกอน้อย ใบแคบ สั้น ตั้งตรงและมีสีเขียวเข้ม ลำต้นผอมเรียว ข้าวจะชะงักการเจริญเติบโต จำนวนใบ จำนวนรวงและจำนวนเมล็ดต่อรวงลดลง ใบอ่อนสมบูรณ์ดีแต่ใบแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ฟอสฟอรัสจึงจำเป็นสำหรับต้นข้าวที่ระบบรากยังไม่มีการพัฒนาเต็มที่ ดังนั้นการส่งเสริมการเจริญและการเป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษา เพื่อจะช่วยลดต้นทุนการผลิต ลดปริมาณการใช้สารเคมี และการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรของเกษตรกร นอกจากนี้ยังเป็นการลดความเสี่ยงจากการได้รับสารเคมีจากกิจกรรมต่างๆทางการเกษตรของเกษตรกร

โรคถอดฝักดาบ (Bakanae disease) สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Fusarium fujikuroi* หรือ *Gibberella fujikuroi* (ระยะ telomorph) จัดอยู่ในกลุ่ม Liseola (Karov 2009; Zainudin 2008) พบระบาดมากในภาคเหนือ ภาคอีสานและพบระบาดประปรายในภาคกลาง ลักษณะอาการของโรคหากเกิดในระยะต้นกล้าอาจทำให้ต้นกล้าแห้งตาย ลำต้นผอมซีดกว่าปกติ มีอาการย่างปล้อง เมล็ดที่ติดเชื้อเมื่อนำไปเพาะกล้าจะแสดงอาการของโรคได้แก่ อาการต้นเตี้ยแคระแกรน ต้นข้าวสูงชะลูดผิดปกติ เมื่อมีการติดเชื้อที่รุนแรงส่งผลให้ต้นกล้าข้าวตายภายใน 2-6 สัปดาห์ บริเวณกึ่งกลางปล้องจะมีรากฝอยแตกมากขึ้น ใบซีดและแห้งตาย บริเวณโคนต้นพบกลุ่มเส้นใยสีขาวและสปอร์จำนวนมาก ดอกเป็นหมัน (Ou 1985) ดังนั้นความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่ได้รับ โรคถอดฝักดาบเป็นโรคข้าวที่สำคัญที่ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง ปัจจุบันเกษตรนิยมใช้สารเคมีในการควบคุมโรคเช่น แมนโคเซ็บ คาร์เบนดาซิมและแมนโคเซ็บ แคปแทน ไมโคลบิวทานิล หรือ โพรคลอราช ก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรและปนเปื้อนใน สภาวะแวดล้อมได้ ดังนั้นการควบคุมโรคโดยชีววิธีโดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคพืชให้น้อยลงและความเสียหายลดลงได้

กลุ่มของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สนใจคือ กลุ่มแอกติโนมัยซีสต์ (Actinomycetes) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กรัมบวก เซลล์เดียว และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium* sp. และ *Rhizoctonia solani* ในพริก ในการช่วยส่งเสริมการงอกของพริก (มัลลิกา 2550) และยับยั้งราสาเหตุโรคเหี่ยวในพืชตระกูลกะหล่ำซึ่งเกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum, F. moniliforme, F. semitectum, F. solani* และ *R. solani* ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นการคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีสต์จากดินบริเวณนาข้าวเพื่อทดสอบความสามารถ

ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium fujikuroi* เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีการใช้สารเคมีโดยทดสอบในห้องปฏิบัติการ

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาราไมคอร์ไรซา [เอนโดไมคอร์ไรซา (AMF) เอคโตไมคอร์ไรซา (ECM) และออร์คิดไมคอร์ไรซา]

เอนโดไมคอร์ไรซา

1.1 การศึกษาเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากและดินรอบรากของสัก (*Tectona grandis* Linn.f.) และกฤษณา (*Aquilaria crassna* Pierre.)

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสังคมของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากและดินรอบรากของสัก และกฤษณา ด้วยวิธี terminal restriction fragment length polymorphism

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างรากและดินรอบรากจากสวนป่าสักและกฤษณาในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ นครนายก และจากบริษัท ไทย ออร์คิด แล็บส์ จำกัด ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร ภายในพื้นที่ 50 ตารางเซนติเมตร สวนป่าในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงรายปลูกเฉพาะต้นสัก ส่วนในจังหวัดเพชรบูรณ์ นครนายก และจากบริษัท ไทย ออร์คิด แล็บส์ จำกัด เป็นสวนป่าที่ปลูกสลับทั้งสักและกฤษณาในพื้นที่เดียวกัน ระยะห่างระหว่างต้น 2 เมตร เก็บตัวอย่างรากสักและกฤษณาและเก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตรจากผิวดิน นำดินศึกษาไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี นำตัวอย่างรากมาล้างและปล่อยให้แห้งก่อนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20ºC เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล

สกัดดีเอนเอของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินรอบรากและรากของสักและกฤษณา โดยใช้ชุดสกัดดีเอนเอของ PowerSoil DNA isolation kit (บริษัท MoBio Laboratories, CA) และ Nucleospin Plant II (บริษัท Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) ตามลำดับ ทำการเพิ่มจำนวนดีเอนเอรอบแรกด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา AML1-AML2 (Lee and Young 2008) จำนวน 30 รอบ ปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 20 pmol ของแต่ละไพรเมอร์ 1 unit ของ Taq polymerase (บริษัท Qiagen) และ 0.2 mM ของแต่ละ dNTP (บริษัท Invitrogen) ในบัฟเฟอร์ชุดของบริษัท (บริษัท Qiagen) ทำการเพิ่มจำนวนดีเอนเอโดยใช้เครื่อง Thermocycler PTC100 (บริษัท MJ Research) ที่สภาวะตามลำดับดังนี้ 94ºC 15 นาที ตามด้วย 30 รอบของ 94ºC 30 วินาที 57ºC 45 วินาที 72ºC 45 วินาที และ

72ºC 5 นาที ตรวจวัดปริมาณดีเอนเอด้วย 1% agarose gel จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนดีเอนเอรอบที่สองด้วยไพรเมอร์ที่ติดฉลากสีเรืองแสง (fluorescence labeled primer) HEX-NS31 และ FAM-AML3 ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนเหมือนรอบแรก ทำการเพิ่มจำนวน 15 รอบ ตรวจวัดปริมาณดีเอนเอด้วย 1% agarose gel จากนั้นทำบริสุทธิ์ตัวอย่างด้วยชุดสกัด QIAquick PCR purification kit (บริษัท Qiagen) นำดีเอนเอที่ได้มาทำการตัดแยกปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI*, *Hsp92II* และ *MboI* (Mummey and Rillig 2007) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37ºC ทำบริสุทธิ์ตัวอย่างอีกครั้งด้วยชุดสกัด QIAquick PCR purification kit (บริษัท Qiagen) ขนาดของชิ้นดีเอนเอที่ถูกตัดจากแต่ละตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ขนาดด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสดีเอนเอ ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer System (บริษัท Applied Biosystems) โดยใช้ GeneScanLIZ-600 (บริษัท GeneScan) เป็นดีเอนเอขนาดมาตรฐานเทียบ

การทำโคลนนิ่ง

ชิ้นดีเอนเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนรอบแรกด้วยไพรเมอร์จำเพาะ AML1-AML2 ซึ่งเหลือจากการทำ T-RFLP จะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้ชุด QIAquick PCR purification kit (Qiagen) นำชิ้นดีเอนเอที่ได้ไปเชื่อม (ligation) เข้ากับ pGEM-T Easy Vector (Promega) ปฏิกิริยาการ ligation ตามขั้นตอนของชุด Promega เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่ 4ºC ตลอดคืนแล้วจึงถ่าย vector เข้าสู่ competent cell คือ *Escherichia coli* JM109 โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock) แล้วเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นชุบแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสม ampicllin 100 mg/ml X-gal และ IPTG บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งเป็นโคลนที่มีชิ้นดีเอนเอที่สนใจแบบสุ่มจำนวน 100 โคโลนี ต่อเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสม ampicllin เก็บไว้เป็นเชื้ออ้างอิงต่อไป

การคัดเลือกโคลน

ตรวจหาชิ้นดีเอนเอของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในแบคทีเรียแต่ละโคโลนีที่คัดเลือกโดยการใช้ไพรเมอร์ชุดเดิม คือ AML1 และ AML2 ทำการเพิ่มจำนวนดีเอนเอโดยการใช้เชื้อแบคทีเรียเป็น template โดยตรง (colony PCR) ดีเอนเอที่ถูกเพิ่มจำนวนได้จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI* และ *Hsp92II* แยกปฏิกิริยา เพื่อคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอนเอจากอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่างชนิดกัน เมื่อทำการคัดเลือก 1 clone จาก 1 ชนิดของ RFLP จึงทำการสกัด plasmid ด้วยชุดสกัด NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) และส่ง plasmid ไปหาลำดับเบสของชิ้นดีเอนเอที่สนใจโดยใช้ไพรเมอร์เอนกประสงค์ SP6 และ T7 ด้วยเครื่องหาลำดับเบส ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems) จนได้ลำดับเบสของโคลนที่คัดเลือกแล้ว จึงนำลำดับเบสนั้นมาหาตำแหน่งจับของไพรเมอร์จำเพาะ NS31-AML3

โดยใช้โปรแกรม BioEdit ได้ชิ้นส่วนดีเอนเอขนาด 450 bp จากนั้นตัดเอนไซม์ *Hinf*I, *Hsp92*II และ *Mbo*I โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ตัดเสมือนจริง (virtual digest) restriction mapper

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่อ่านได้จากเครื่องอ่านลำดับเบสดีเอนเอ ได้แก่ ขนาดดีเอนเอ (size) พื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ความสูงของกราฟ (peak height) จำนวนชิ้นดีเอนเอ (T-RFs) มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กันของข้อมูลระหว่างพืชทั้งสองชนิดและระหว่างแหล่งเก็บตัวอย่างด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ SPSS 11.5 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) ทำการวิเคราะห์รูปแบบของ T-RFLP ของกลุ่มตัวอย่างจากดินและรากของพืชทั้งสองชนิดถูกนำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของชุมนุมอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา โดยใช้ Pearson correlation coefficient จัดกลุ่มแบบ unweighted pair-group average (UPGMA) algorithm ด้วยชุดโปรแกรม XLSTAT 2011 (Addinsoft ™ SALR) แล้ววิเคราะห์ผลจากแผนภูมิที่ได้ ลำดับเบส 32 ลำดับที่ได้จากการทดลองนี้จะถูกนำมาจัดเรียงในโปรแกรม BioEdit เปรียบเทียบกับ 28 ลำดับเบสของเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่ได้มาจาก GenBank ชุดลำดับเบสของ SSU rRNA จะถูกตัดให้มีขนาดความยาว 450 bp ตามขนาดที่ควรได้หลังจากการเพิ่มจำนวนด้วยคู่ไพรเมอร์ NS31-AML3 แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbour-joining (NJ) ได้ถูกสร้างขึ้นโดยใช้โปรแกรม PAUP*4b10 (Swofford 2002) และทำการวิเคราะห์ความห่างกันทางวิวัฒนาการของแผนภูมิด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์ Kimura 2-parameter model ด้วย 1000 bootstraps

การทดลองที่ 2 การปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้าสัก

การปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้าสักในกระถาง

เลือกใช้ต้นกล้าสักที่มีลักษณะเดียวกันขนาดความสูง 12-15 เซนติเมตร มาใช้ในการทดลอง ปลูกต้นกล้าสักจำนวน 20 ต้น (5 ซ้ำ × 4 ชุดการทดลองในกระถางพลาสติกขนาด 8 นิ้วที่มีถุงพลาสติกเจาะรูกันถุงเพื่อให้น้ำในกระถางระบายออกและมีดินผสมทราย 2 กิโลกรัมที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุปลูก ทำการปลูกสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณรากจำนวน 100 สปอร์ต่อต้น และปลูกต้นกล้าเป็นเวลา 3 เดือนในโรงเรือนที่มีแสงตามธรรมชาติ รดปุ๋ย modified Hoagland solution (Gambrog and Wetter, 1975) ที่ลดปริมาณฟอสฟอรัส 10 เท่า ทุกๆ 2 สัปดาห์ เมื่อครบอายุการเก็บผล 3 เดือน จึงวัดความสูงของลำต้นเหนือดินและเส้นรอบวงของลำต้น นำรากต้นสักมาทำการย้อมสีเพื่อดูอัตราการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้าสักในระบบปลอดเชื้อ (*in vitro* inoculation)

เลือกใช้ต้นกล้าสักจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขวดเพาะเลี้ยงที่มีลักษณะเดียวกันขนาดความสูง 5 เซนติเมตร ในการทดลอง ย้ายต้นกล้าสักจำนวน 60 ต้น (12 ซ้ำ × 5 ชุดการทดลอง) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ modified Strullu Roman (MSR) medium (Bécard and Fortin 1988) ที่ทำให้เป็นเนื้อเจลด้วย 0.4 % (w/v) gellan gum จำนวน 3 ต้นต่อขวดเพาะเลี้ยง แยกสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิด *Claroideoglomus etunicatum* NNT10 *C. etunicatum* PBT03 และ *Funneliformis mosseae* RYA08 ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยกระถางจากการทดลองครั้งก่อน ออกมาจากวัสดุปลูกด้วยวิธีร่อนแบบเปียก (wet sieving and 50% sucrose centrifugation) (Gerdemann และ Nicolson 1963) แยกสปอร์แต่ละชนิดมาทำความสะอาดบริเวณผิวสปอร์ด้วย chloramine T (2% w/v) streptomycin sulfate (0.02% w/v) และ gentamicin sulfate (0.01% w/v) ด้วยวิธีการทำความสะอาดผิวสปอร์ของ Bécard และ Fortin (1988) จากนั้นฉีดสปอร์ทั้ง 3 ชนิดที่อยู่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จำนวนชนิดละ 20-25 สปอร์ ลงไปบริเวณรากของต้นกล้าสักในขวดเพาะเลี้ยง ในขณะที่ *G. intraradices* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงร่วมกับเนื้อเยื่อราก (root organ culture) บนอาหาร MSR ถูกตัดโดยใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใย สปอร์ จำนวน 3 ชิ้น แล้วย้ายลงบริเวณใกล้รากต้นกล้าสักต่อหนึ่งขวดเพาะเลี้ยง และบ่มไว้ที่ขั้นวางที่มีการให้แสงด้วยหลอดฟลูออร์เรสเซนต์เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิเฉลี่ย 27 ºC เป็นเวลา 2 เดือน เพื่อให้สปอร์มีการงอกเส้นใยใหม่และเข้าสู่ราก สังเกตและติดตามการงอกของสปอร์และเส้นใยใหม่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

ต้นกล้าสักในขวดเพาะเลี้ยงที่อายุ 2 เดือนหลังการปลูกเชื้อออกมาปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 3 นิ้วที่มีเวอร์มิคูไลท์ที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุปลูก รดปุ๋ย modified Hoagland solution (Gambrog and Wetter, 1975) ที่ลดปริมาณฟอสฟอรัส 10 เท่าหนึ่งครั้ง และบ่มไว้ที่ขั้นวางที่มีการให้แสงด้วยหลอดฟลูออร์เรสเซนต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิเฉลี่ย 27 ºC เป็นเวลา 1 เดือน เมื่อครบอายุการเก็บผล 3 เดือน จึงวัดความสูงของลำต้นเหนือดิน จำนวนใบ น้ำหนักสดของรากและลำต้น และน้ำหนักแห้งของลำต้น นำรากต้นสักมาทำการย้อมสีเพื่อดูอัตราการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์อัตราการเข้าสู่รากและความหนาแน่นของสปอร์ด้วยวิธี Univariate analysis ความสูงของลำต้นเหนือดิน จำนวนใบ น้ำหนักสดของรากและลำต้น และน้ำหนักแห้งของลำต้นในแต่ละชุดการทดลองวิเคราะห์ด้วยวิธี One-way analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์หาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองด้วย

การทดลองที่ 3 การเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในระดับสเกลใหญ่

การเพิ่มจำนวนสปอร์แบบกระถาง

จัดเตรียมชุดการทดลองร่วมคือ พืชอาศัย 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพด (*Zea mays* L.) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) และไมยราบไร้หนาม (*Mimosa invisa* Mart. ex Colla) x สปอร์ 3 ชนิด(*C. etunicatum* NNT10 *C. etunicatum* PBT03 และ *F. mosseae* RYA08) x วัสดุ 4 ชนิดปลูก (ดิน: ทราย, ดิน: ทราย: clay brick, ดิน: ทราย: ขี้เถ้าแกลบ และดิน: ทราย: vermiculite) x 4 ซ้ำ นำเมล็ดของพืชอาศัยมาทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิว ด้วย 0.05% sodium hypocloride (NaOCl) แล้วเพาะเมล็ดลงบนทรายที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หลังจาก 14 วันจึงคัดเลือกต้นกล้าที่มีขนาดเท่ากันจำนวน 48 ต้นในแต่ละชนิดพืชอาศัยมาทำการปลูกสปอร์แต่ละชนิด 100 สปอร์ต่อต้น ปลูกลงในกระถางขนาด 8 นิ้วที่มีวัสดุปลูกดังกล่าวข้างต้นอยู่ 2 ลิตรโดยปริมาตร รดปุ๋ย modified Hoagland solution ที่ลดปริมาณฟอสฟอรัส 10 เท่าเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง ทุกๆ 2 สัปดาห์ เมื่อครบอายุการเก็บผล 3 เดือน จึงทำการเก็บวัสดุปลูกมาร่อนแยกสปอร์เพื่อหาความหนาแน่นของสปอร์ต่อวัสดุปลูก 50 กรัม และนำรากมาย้อมสีเพื่อหาอัตราการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในระดับฟาร์ม

เตรียมปุ๋ยเศษซากใบไม้ที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยแยกเอาเศษซากขนาดใหญ่ออกด้วยมือก่อนนำเอาวัสดุปลูกที่เหลือจากการทดลองเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแบบกระถาง นำมาผสมรวมกันและใช้เป็นดินหัวเชื้อที่มีสปอร์ชนิดผสมของ *C. etunicatum* NNT10 *C. etunicatum* PBT03 และ *F. mosseae* RYA08 ประเมินความหนาแน่นของสปอร์ในดินหัวเชื้อด้วยการร่อนแบบเปียกและนับจำนวสปอร์ที่มีชีวิตอยู่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ สังเกตได้จากลักษณะของสปอร์ที่ปรากฏ เช่น ขนาดของแวคิวโอล (ขนาดใหญ่ รวมกันเป็นหนึ่งแวคิวโอล แสดงว่าเป็นสปอร์ตาย) ความหนาแน่นของสปอร์ที่มีชีวิต อยู่ระหว่าง 838.25±77.19 สปอร์ 100 cm^{-3} (ค่าเฉลี่ย ± SEM, n=3 ตัวอย่าง) ผสมดินหัวเชื้อรวมกันกับเวอร์มิคูไลท์และปุ๋ยเศษซากใบไม้ในอัตราส่วน (1:1:1, v/v/v) และเติมเป็นปริมาตรครึ่งหนึ่งของแท็งก์ซีเมนต์ทรงกระบอก ขนาดสูง 50 เซนติเมตร × กว้าง 80 เซนติเมตรที่มีรูระบายน้ำอยู่ข้างใต้ เรียงแท็งก์ซีเมนต์ถูกเรียงใกล้กันและได้รับปรอมาณแสงแดดที่เท่ากัน

นำเมล็ดของพืชอาศัยได้แก่ หญ้าบาร์เฮีย (*Paspalum notatum* Flugge) ดาวเรืองฝรั่งเศส (*Tagetes patula* L.) และ ข้าวโพดหวาน (*Zea mays* var. *saccharata*) และหัวหอม (*Allium cepa* L.) มาทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิว ด้วย 0.05% sodium hypocloride (NaOCl) แล้วเพาะเมล็ดลงบนทรายที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หลังจาก 7 วันจึงคัดเลือกต้นกล้าที่มีขนาดเท่ากันจำนวน 10 ต้นในแต่ละชนิดพืชอาศัยมาทำการปลูกลงในแท็งก์ซีเมนต์แต่ละถัง รดปุ๋ย modified Hoagland solution ที่ลดปริมาณฟอสฟอรัส 10 เท่าเป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง หนึ่งครั้งเมื่อต้นกล้าอายุ 1 เดือนหลังการปลูกเชื้อ เมื่อครบอายุการเก็บผล 3 เดือน ตัดต้นพืชจะถูกตัดออก สุ่มเก็บตัวอย่างรากและวัสดุปลูกอย่างละ 3 ตัวอย่างต่อแท็งก์ นำวัสดุปลูกมาร่อนแยก

สปอร์เพื่อหาความหนาแน่นของสปอร์ต่อวัสดุปลูก 100 กรัม และนำรากมาย้อมสีเพื่อหาอัตราการเข้าสู่รากของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การเพิ่มจำนวนสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ *in vitro*

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ได้แก่ *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03 และ *F. mosseae* RYA08 และใช้ *G. intraradices* เป็นชุดควบคุมบวก

1. คัดเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

ทำการแยกสปอร์ของ *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03 และ *F. mosseae* RYA08 จากกระถางเพาะเลี้ยงโดยวิธีร่อนแบบเปียกและปั่นแยกด้วยสารละลาย 50% กลูโคส (Gerdemann และ Nicolson, 1963) ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวสปอร์โดยใช้ chloramine T (2% w/v), streptomycin sulfate (0.1% น้ำหนัก/ปริมาณ) และ gentamicin sulfate (0.05% น้ำหนัก/ปริมาณ) (Bécard และ Fortin 1988) เก็บสปอร์ไว้ที่ 4ºC จนกว่าจะใช้ บน Minimal (M) medium (Bécard และ Fortin, 1988) ที่มี 0.4% น้ำหนัก/ปริมาณ gellan gum (Phytagel, Sigma) และไม่ใส่น้ำตาลซูโครส ทำการกระตุ้นให้สปอร์งอกบนอาหารเลี้ยง M medium และ modified Strullu Romand (MSR) medium (Declerck *et al*., 1998, ดัดแปลงมาจาก Strullu and Romand, 1986) Petri plates ขนาด 9 เซนติเมตรจำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีสปอร์แต่ละชนิดจำนวน 20 สปอร์วางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด แล้วเอาไปบ่มที่อุณหภูมิ 32ºC และมี 2% CO_2 ในที่มืดเป็นเวลา 25 วัน. สังเกตอัตราการงอกของสปอร์และวัดความยาวของเส้นใยที่งอกออกมาจากสปอร์ที่ 25 วันหลังการบ่ม วัดความยาวของเส้นใยทั้งหมดที่ออกจากสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อใช้วิเคราะห์หาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

2. การปลูกเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนสปอร์ร่วมกับเนื้อเยื่อรากแครอท

เนื้อเยื่อรากแครอทดัดแปลงพันธุกรรม Ri T-DNA (*Daucus carota* L.) clone DC3 ซึ่งได้รับการพัฒนาจาก Bécard และ Fortin (1988) ได้นำมาใช้เป็นรากพืชอาศัยให้กับเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03, *F. mosseae* RYA08 และ *G. intraradices* เพิ่มจำนวนเนื้อเยื่อรากบนอาหาร M medium ที่มี gellan gum (Phytagel, Sigma) 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) อาหาร MSR ที่ทำให้แข็งตัวด้วย 0.4% gellan gum บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อถูกเลือกใช้ในการทดลองต่อไป ทำการปลูกสปอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วของ *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03, *F. mosseae* RYA08 และ *G. intraradices* จำนวนชนิดละ 25 สปอร์ให้กับเนื้อเยื่อรากอายุ 3 วัน กระจายสปอร์วางลงทั่วจานอาหารและให้อยู่ใกล้กับปลายราก โดยใช้ส่วนปลายของใบมีดผ่าตัด หมายเลข 11 ในการถ่ายสปอร์ ทำการทดลอง 4 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง บ่มจานอาหารแบบคว่ำจานเป็นเวลา 3 เดือนในที่มืด ที่

อุณหภูมิ 22±2°C สังเกตการงอกของสปอร์ การเข้าสู่รากเช่นการเพิ่มจำนวนของเส้นใย และการปนเปื้อนของผิวสปอร์เป็นประจำโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ หลังจากการบ่มเป็นเวลา 5 เดือน ทำการละลายเจล 10 mM sodium citrate pH 6.0 (Doner and Bécard, 1991) แล้วแยกรากออกมาย้อม trypan blue (Phillips and Hayman, 1970) เพื่อดูการเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา คำนวณอัตราการเข้าสู่รากด้วยวิธี line intersect method (Tennant, 1975) วิเคราะห์จำนวนสปอร์และอัตราการเข้าสู่รากด้วยวิธี Univariate ตามด้วยการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's post hoc multiple mean comparison test เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$ ในแต่ละชุดการทดลอง การวิเคราะห์ทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรม Statistical Package for Social Sciences version 11.5 (SPSS Inc., IL)

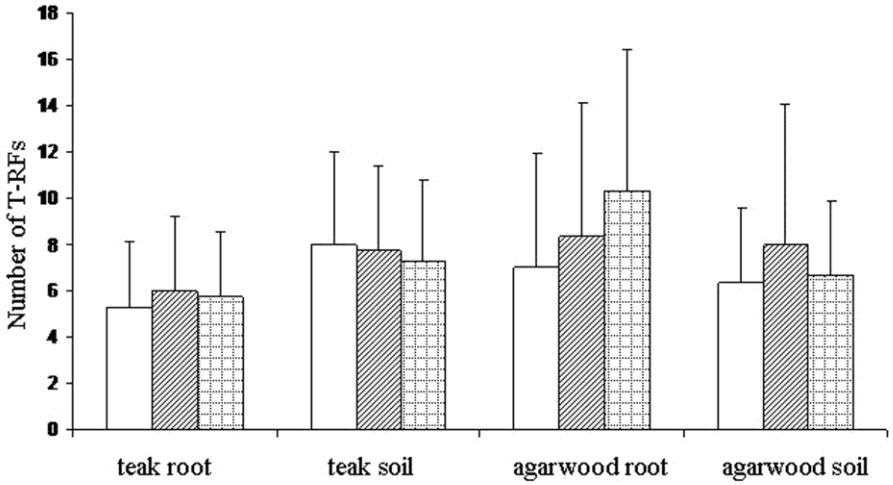
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์อัตราการเข้าสู่รากและความหนาแน่นของสปอร์ด้วยวิธี Univariate analysis ความสูงของลำต้นและเส้บรอบวงของลำต้นสักในแต่ละชุดการทดลองวิเคราะห์ด้วยวิธี One-way analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์หาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองด้วย Tukey's post hoc multiple mean comparison test ที่ $P<0.05$ ทุกการวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม Social Sciences version 11.5 (SPSS Inc., Wacker Drive, Chicago, IL, USA)

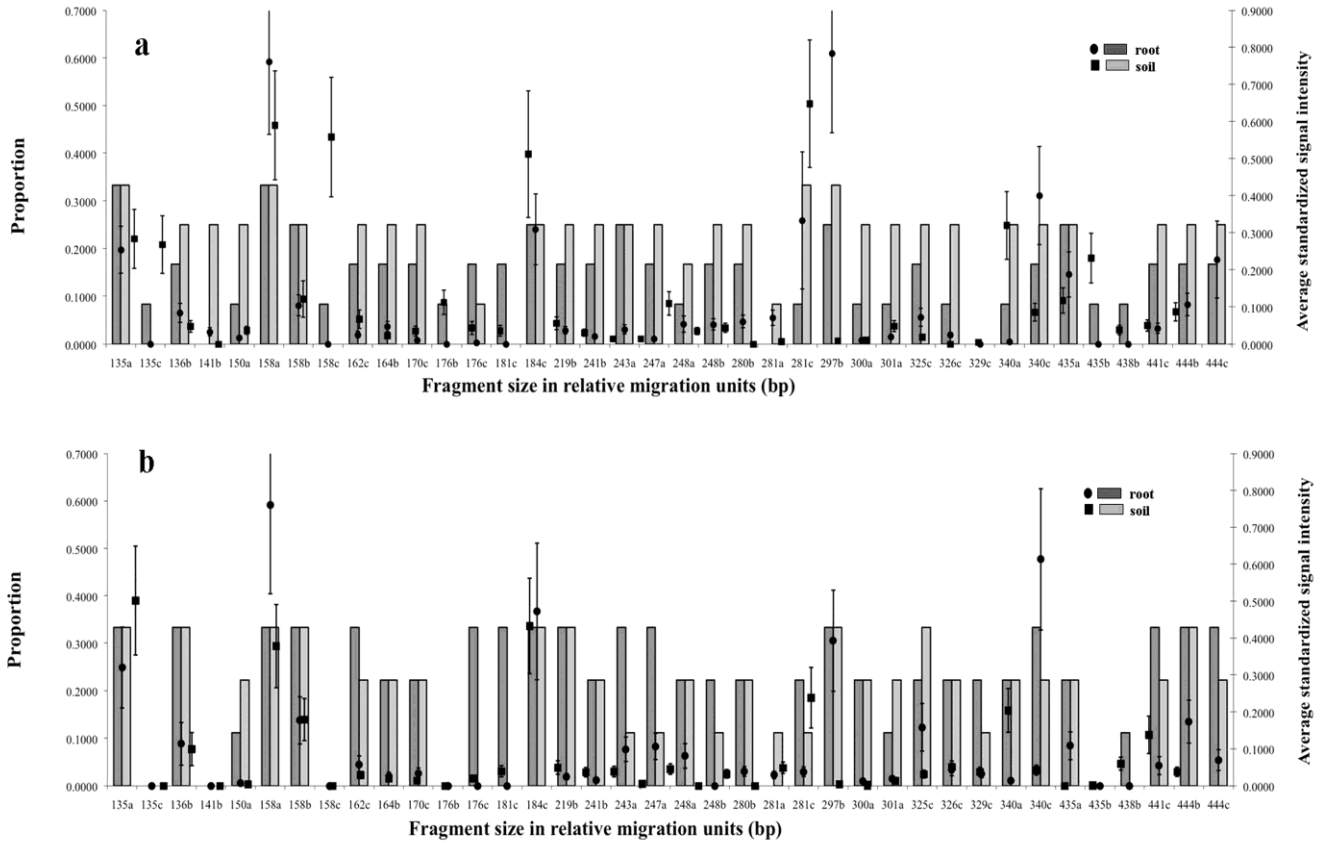
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสังคมของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากและดินรอบรากของสัก (*Tectona grandis* Linn.f.) และกฤษณา (*Aquilaria crassna* Pierre.)

โครงสร้างชุมชนของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาระหว่างรากและดินรอบรากจากแหล่งเดียวกันและพืชชนิดเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพ 1) ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนชิ้นดีเอนเอที่ถูกตัด (T-RF) จากตัวอย่างดินรอบราก (ภาพ 2a) และตัวอย่างราก (ภาพ 2b) กับขนาดชิ้นส่วนดีเอนเอที่พบโดยส่วนใหญ่มีความสอดคล้องกันในแต่ละขนาดของชิ้นดีเอนเอ แต่เมื่อเปรียบเทียบการกระจายตัวของอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในดินกับราก พบว่าพบการกระจายตัวมีมากกว่าในดิน

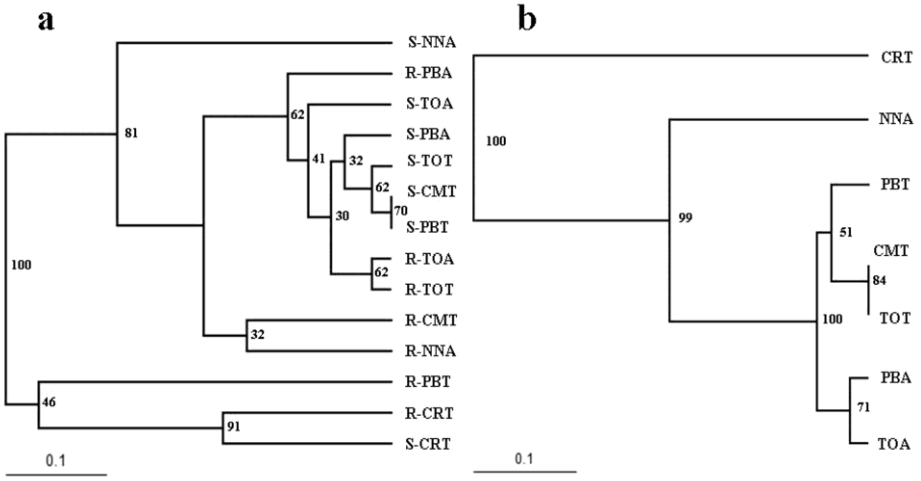


ภาพ 1 ผลของพืชอาศัย (กฤษณา: agarwood, สัก: teak) และแหล่งของตัวอย่าง (ดินและราก) ต่อจำนวนเฉลี่ยของชิ้นดีเอนเอต่อตัวอย่าง โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ MboI (แท่งโปร่ง) HinfI (แท่งลายขวาง) และ Hsp92II (แท่งลายตาราง) ค่าเฉลี่ย ± SEM (n = 4 สำหรับสัก และ n = 3 สำหรับกฤษณา)



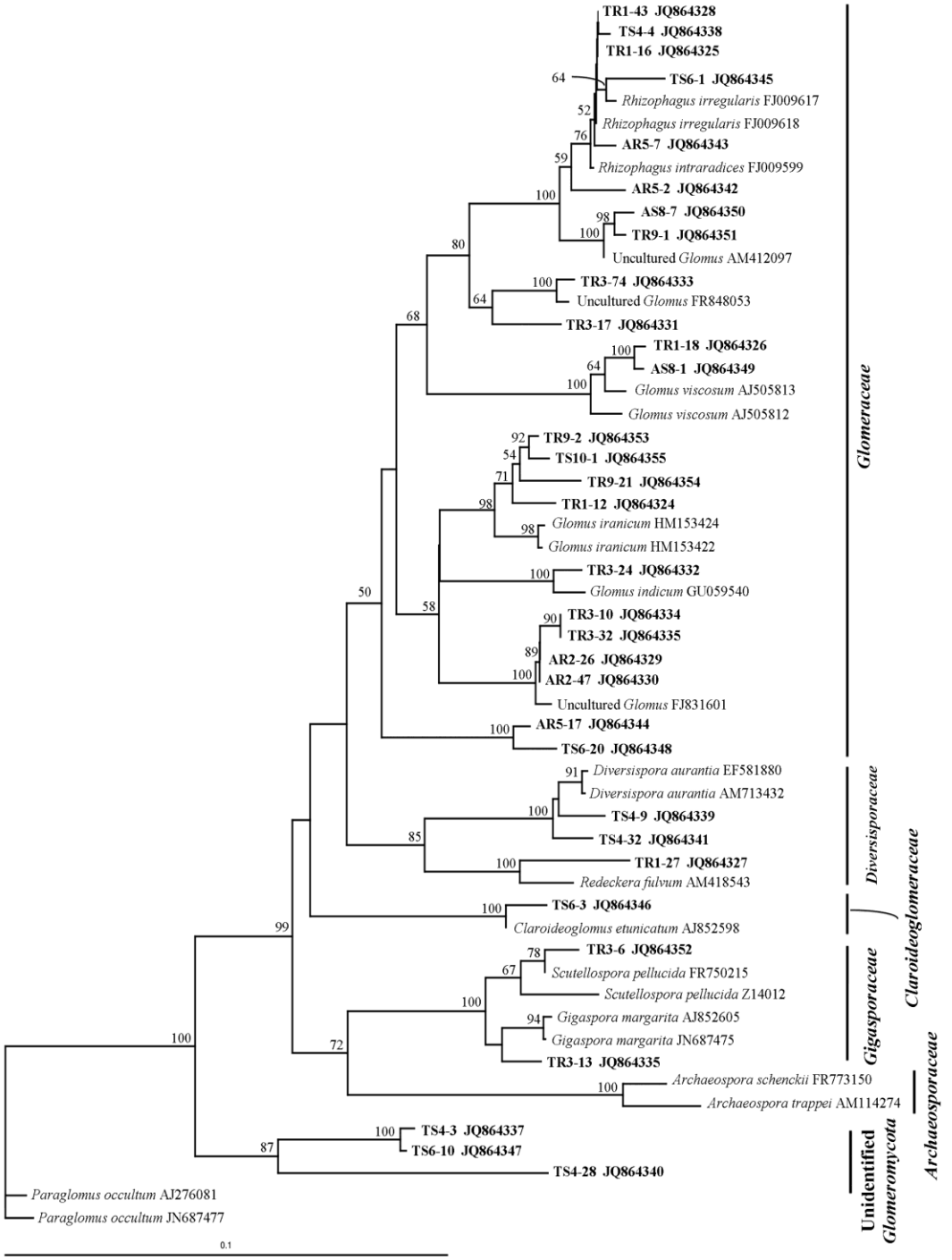
ภาพ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนชิ้นดีเอนเอที่ถูกตัด (T-RF) จากตัวอย่างดิน (กราฟบน) และราก (กราฟล่าง) กับขนาดชิ้นส่วนดีเอนเอที่พบ (กราฟแท่ง) จุดแสดงความเข้มแสงฟลูออร์เรสเซนของแต่ละชิ้นดีเอนเอที่ถูกตัด แถบแสดงค่าเบี่ยงเบน ± SE

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธ์ Pearson correlation coefficient แสดงให้เห็นการจัดกลุ่มรูปแบบ T-RFLP ของกลุ่มตัวอย่างจากดินและรากของพืชทั้งสองชนิด โดยเปรียบเทียบจากแหล่งที่เก็บและชนิดของตัวอย่าง (ภาพ 3) รูปแบบชุมนุมอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาของดินและรากที่เก็บจากแหล่งเดียวกัน รวมถึงที่เก็บจากต่างแหล่งกันมีความคล้ายคลึงกัน จึงถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกัน โดยเฉพาะราก (R-NNA) กับดินรอบรากกฤษณา (S-NNA) ที่เก็บจากนครนายก และราก (R-CMT) กับดิน (S-CMT) ที่เก็บจากเชียงใหม่ โดยมีค่าความเหมือน (similarity) มากกว่า 0.95 ตัวอย่างรากและดินที่เก็บจากสักมีแนวโน้มที่จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (clade สีแดง) แสดงให้เห็นว่าชุมนุมอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากและดินรอบรากสักมีความคล้ายคลึงกันภายในกลุ่มมากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากกฤษณา อย่างไรก็ตามความคล้ายคลึงกันดังกล่าวยังไม่โดดเด่นเพียงพอ



ภาพ 3 การจัดกลุ่มรูปแบบ T-RFLP ของชุมนุมอาร์บัสคุลาร์ไมคอร์ไรซาที่มีความสัมพันธ์กับ สัก (*T. grandis*: T) และกฤษณา (*A. crassna*: A) ในราก (R) และดินรอบราก (S) และสามแหล่งศึกษา (NN: Nakhon-Nayok, PB: Phetchabun และ CM: Chiang Mai)

จากการวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการของ 32 ลำดับเบสที่ได้จากการทำ cloning และ sequencing ร่วมกับ 28 ลำดับเบสจากฐานข้อมูลของ GenBank พบว่า เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบในรากและในดินส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม *Glomeraceae* จัดได้เป็น 6 กลุ่ม ซึ่งส่วนใหญ่จัดเป็นเชื้อ *Glomeraceae* ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ รองลงมาคือกลุ่ม *Paraglomaceae* และ *Gigasporaceae* ตามลำดับ (ภาพ 4) จากการศึกษานี้พบว่าลำดับเบสชนิดเด่น กลุ่ม A มีความใกล้ชิดกันกับลำดับเบสของ *Glomus irregulare* ในขณะที่ กลุ่ม C มีความใกล้ชิดกันกับลำดับเบส *G. iranicum.*



ภาพ 4 แผนภูมิวิวัฒนาการแบบ Neighbour-joining (NJ) ของ partial small subunit rRNA gene ลำดับเบสที่ใช้สร้างแผนภูมิได้จากการใช้ไพรเมอร์ NS31-AML3 *Geosiphon* 2 ลำดับเบสถูกใช้เป็นรากแผนภูมิ โดยมีค่าสนับสนุนเท่ากับ 1000 bootstraps

การทดลองที่ 2 การปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้าสัก

การปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้าสักในกระถาง

ต้นกล้าสักอายุ 3 เดือนหลังการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีการตอบสนองด้านความสูงได้ดีกว่าต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.01*) ลักษณะของต้นกล้าสักและกฤษณาหลังการปลูกเชื้อดังภาพ 5 ต้นกล้าสักที่ปลูกด้วยเชื้อ *C. etunicatum* PBT03 มีความสูงมากที่สุดรองลงมาคือ *C. etunicatum* NNT10 *E. colombiana* และชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ) ตามลำดับ ส่วนต้นกล้ากฤษณาที่ได้รับการปลูกเชื้อไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านความสูงของต้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (ตาราง 1)

ตาราง 1 การตอบสนองด้านความสูงของต้นกล้าสักและกฤษณาหลังการปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและชุดควบคุม

ชนิดสปอร์	**ความสูงของต้นกล้าสัก (ซม.)**	**ความสูงของต้นกล้ากฤษณา(ซม.)**
C. etunicatum PBT03	37.40a	29.65a
C. etunicatum NNT10	36.50a	27.82a
E. colombiana	35.27a	-
ชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ)	29.10b	28.27a
นัยสำคัญ	*P<0.01*	ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

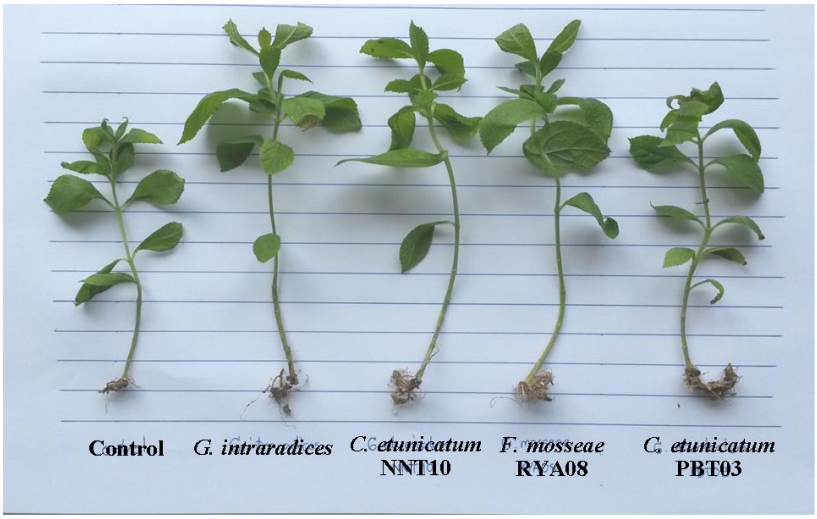
หมายเหตุ: ตัวอักษรบ่งบอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละแถวที่ *P < 0.01* โดยการวิเคราะห์ One-way ANOVA

การปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้กับกล้าสักในระบบปลอดเชื้อ

ต้นกล้าสักที่ได้รับการปลูกด้วยเชื้อ *F. mosseae* RYA08 ให้ผลตอบสนองด้านความสูงของลำต้นดีที่สุด ตามด้วย *G. intraradices C. etunicatum* NNT10 *C. etunicatum* PBT03 และชุดควบคุม ตามลำดับ (ตาราง 2) การปลูกด้วยเชื้อ *G. intraradices* ทำให้ต้นกล้าสักมีน้ำหนักสดของลำต้นมากที่สุด แต่ให้ค่าน้ำหนักแห้งของลำต้นน้อยกว่าเป็นอันดับสอง รองจากเชื้อ *F. mosseae* RYA08 การปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาไม่ทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนใบและน้ำหนักสดของรากสัก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ลักษณะของต้นกล้าสักอายุ 3 เดือนหลังการปลูกเชื้อเป็นดังภาพ 5

ตาราง 2 การตอบสนองด้านการเจริญของต้นกล้าสักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการปลูกเชื้อและไม่ปลูกเชื้ออาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (ชุดควบคุม) เป็นเวลา 3 เดือน

การทดลอง	ความสูง (เซนติเมตร)	จำนวนใบ	น้ำหนักสดลำต้น (กรัม)	น้ำหนักสดราก (กรัม)	น้ำหนักแห้งลำต้น (กรัม)
ชุดควบคุม	8.06 b	14.40 a	0.290 ab	0.0411 a	0.0335 ab
G. intraradices	10.02 ab	16.60 a	0.454 a	0.0919 a	0.0451 ab
C. etunicatum NNT10	10.00 ab	15.20 a	0.286 ab	0.0416 a	0.0320 b
F. mosseae RYA08	10.54 a	15.20 a	0.400 ab	0.0628 a	0.0497 a
C. etunicatum PBT03	8.68 ab	14.80 a	0.268 b	0.0564 a	0.0346 ab
นัยสำคัญ	0.033	0.575	0.017	0.086	0.013



ภาพ 5 ลักษณะของต้นกล้าสักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 3 เดือนหลังการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การทดลองที่ 3 การเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในระดับสเกลใหญ่

การเพิ่มจำนวนสปอร์แบบกระถาง

การเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาให้ผลที่แตกต่างกันระหว่างการเลือกใช้วัสดุปลูก สปอร์และพืชอาศัยแต่ละชนิด ผลการเพิ่มจำนวนดังตาราง 3 เมื่อทำการวิเคราะห์แยกตามแต่ละปัจจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่าสปอร์ *C. etunicatum* PBT03 สามารถเพิ่มจำนวนสปอร์ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *C. etunicatum* NNT10 และ *F. mosseae* RYA08 ตามลำดับ พืชอาศัยที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนสปอร์มากที่สุดคือ ข้าวโพด รองลงมาคือ ข้าวฟ่างและไมยราบไร้หนาม ตามลำดับ ส่วนวัสดุปลูกที่ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนสปอร์มากที่สุดได้แก่ ดิน: ทราย: เวอร์มิคูไลท์ รองลงมาคือ ดิน: ทราย: clay brick, ดิน: ทราย: ขี้เถ้าแกลบ และดิน: ทราย ตามลำดับ (ตาราง 4)

ตาราง 3 ค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่เพิ่มขึ้นร่วมกับชนิดของสปอร์ พืชอาศัยและวัสดุปลูก

ความหนาแน่นของสปอร์ (สปอร์/ 50 กรัม วัสดุปลูก)				
ชนิดสปอร์	ข้าวโพด	ข้าวฟ่าง	ไมยราบไร้หนาม	ชนิดวัสดุปลูก
C. etunicatum PBT03	1,068.33	1,435.00	51.67	ดิน: ทราย
	2,168.33	3,143.67	127.00	ดิน: ทราย: clay brick
	3,307.00	1,225.00	0.00	ดิน: ทราย: ขี้เถ้าแกลบ
	4,525.00	2,435.67	328.67	ดิน: ทราย: vermiculite
C. etunicatum NNT10	949.00	608.67	2.67	ดิน: ทราย
	1,913.00	2,764.33	176.00	ดิน: ทราย: clay brick
	1,942.67	99.67	0.00	ดิน: ทราย: ขี้เถ้าแกลบ
	2,121.00	3,579.00	280.00	ดิน: ทราย: vermiculite
F. mosseae RYA08	540.67	356.67	21.00	ดิน: ทราย
	1,552.33	1,303.00	189.33	ดิน: ทราย: clay brick
	552.67	196.00	0.00	ดิน: ทราย: ขี้เถ้าแกลบ
	1,500.00	1,266.67	216.00	ดิน: ทราย: vermiculite

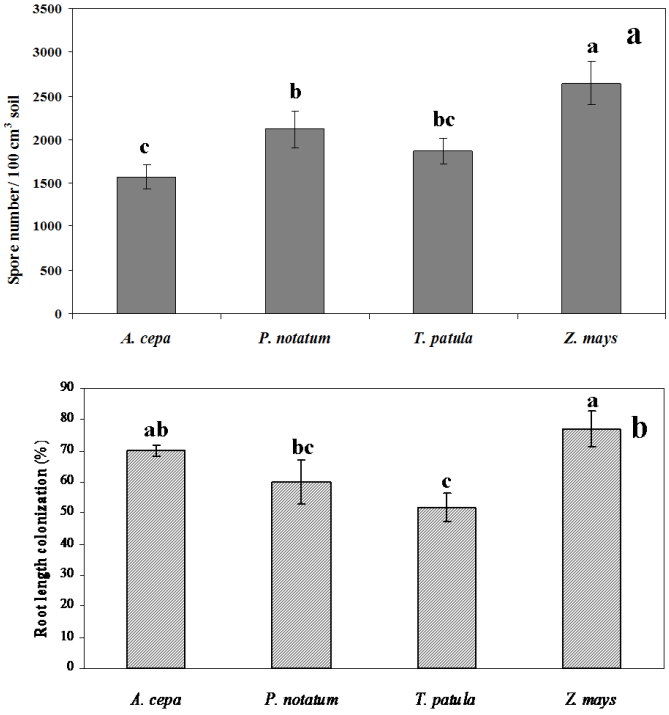
ตาราง 4 ค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่เพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับชนิดของสปอร์ ชนิดของพืชอาศัย และชนิดของวัสดุปลูก

ปัจจัย	**สปอร์/ 50 กรัม วัสดุปลูก***
ชนิดของสปอร์	
Glomus sp. PBT03	1,651.28 a
G. etunicatum	1,203.00 ab
G. mosseae	641.19 b
พืชอาศัย	
ข้าวฟ่าง	1,150.83 a
ข้าวโพด	1,383.75 a
ไมยราบไร้หนาม	87.02 b
วัสดุปลูก	
ดิน: ทราย	419.47 b
ดิน: ทราย: clay brick	1,111.42 ab
ดิน: ทราย: ขี้เถ้าแกลบ	610.25 b
ดิน: ทราย: vermiculite	1,354.33 a

* ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05)

การเพิ่มจำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในระดับฟาร์ม

จำนวนสปอร์ที่เพิ่มขึ้นในการทดลองนี้มีแนวโน้มลดจำนวนลงจากการทดลองเพิ่มจำนวนแบบกระถาง ยกตัวอย่างเช่น จำนวนสปอร์ที่เพิ่มด้วยต้นข้าวโพดหวานในการทดลองแบบกระถางมีจำนวน 1,081 - 9,050 สปอร์ 100 cm^{-3} ในขณะที่การทดลองระดับฟาร์มให้จำนวนสปอร์แบบผสมของเชื้อทั้งสามชนิดอยู่ในช่วง 2,409 - 2,912 สปอร์ 100 cm^{-3} การเพิ่มจำนวนสปอร์ด้วยข้าวโพดหวานให้จำนวนสปอร์อย่างมีนัยสำคัญสูงกว่าการใช้หญ้าบาร์เฮียดาวเรืองฝรั่งเศส และหอมหัวใหญ่ ตามลำดับ (ภาพ 6a) จำนวนสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดอื่นๆในระบบการผลิตสปอร์ มี 24-83 สปอร์ 100 cm^{-3} บ่งบอกชนิดได้เป็น *Acaulospora rugosa* Morton *A. foveata* Trappe and Janos และ *Scutellospora* sp. สปอร์ปนเปื้อนทั้งหมดนี้จะไม่นำมารวมกับผลที่แสดงในตาราง 1 และภาพ 1 เนื่องจากมีจำนวนเพียง 1-3% ของจำนวนทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนสปอร์ที่ได้มีจำนวนเพิ่มขึ้น10 เท่าจากจำนวนสปอร์ตั้งต้นในดินหัวเชื้อ ซึ่งมี 838 ± 77 สปอร์ต่อดินหัวเชื้อ 100 cm^3 และดินหัวเชื้อนี้ถูกผสมอยู่ใน หนึ่งส่วนสามของวัสดุปลูกที่ใช้ในการปลูกแบบฟาร์ม ทำให้จำนวนสปอร์ตั้งต้นเป็น 279 สปอร์ 100 cm^{-3} มีปริมาณสปอร์เป็นหนึ่งในสิบส่วนของจำนวนสปอร์หลังการเก็บเกี่ยว 2,645 สปอร์100 cm^{-3} เมื่อปลูกร่วมกับข้าวโพดหวาน เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของข้าวโพดหวานมีอัตรามากกว่า หญ้าบาร์เฮีย และดาวเรืองฝรั่งเศสอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 6b)

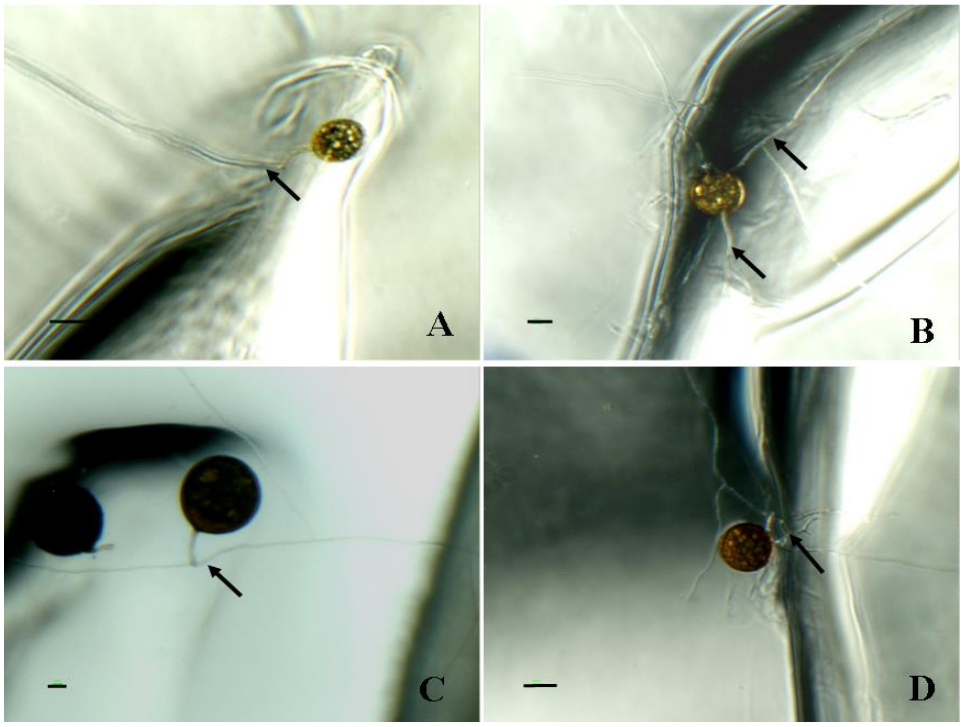


ภาพ 6 จำนวนสปอร์โดยเฉลี่ยจากพืชอาศัยต่างชนิด (a) และอัตราการเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (b) ในระบบการผลิตวฃสปอร์แบบฟาร์มโดยใช้ปุ๋ยเศษซากใบไม้ผสมกับเวอร์มิคูไลท์และดินหัวเชื้อ ในอัตราส่วน 1:1:1 ค่าเฉลี่ย (n=3) ± SEM กราฟแท่งที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี (α=0.05)

การเพิ่มจำนวนสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ *in vitro*

<u>คัดเลือกอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา</u>

สปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03, *F. mosseae* RYA08 และ *G. intraradices* สามารถงอกได้ที่อุณหภูมิ 32ºC ที่มี 2% CO_2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง M และ MSR media (ภาพ 7) สปอร์ *Glomus intraradices* เริ่มมีการงอกภายในระยะเวลา 2 วันหลังการบ่มเชื้อบนอาหารทั้งสองชนิด ในขณะที่สปอรีชนิดอื่นๆเริ่มงอกในวันที่ 4 หลังการบ่ม เส้นใยของ *G. intraradices* มีการงอกผ่านก้านสปอร์ และยืดยาวออกไปเป็นเส้นตรงสู่อาหารได้รวดเร็วกว่าสปอร์ชนิดอื่น (ภาพ 7A) สปอร์ *C. etunicatum* PBT03 งอกเส้ยในที่มีการแตกแขนงมาก (ภาพ 7B) เช่นเดียวกับสปอร์ *F. mosseae* RYA08 (ภาพ7D) ในขณะที่สปอร์ *C. etunicatum* NNT10 มีการแตกแขนงของเส้นใยเล็กน้อย (ภาพ 7C) อัตราการงอกของสปอร์ *G. intraradices* มีค่ามากกว่าสปอร์ของ *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03 และ *F. mosseae* RYA08 ตามลำดับ (ตาราง 5) อัตราการงอกของสปอร์ส่วนใหญ่มีแนวโน้มที่จะมีค่ามากเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MSR medium ความยาวเส้ยใยทั้งหมดของแต่ละสปอร์เดี่ยวของ *G. intraradices* มีค่ามากกว่า *C. etunicatum* PBT03, *C. etunicatum* NNT10 และ *F. mosseae* RYA08 ตามลำดับ



ภาพ 7 เส้นใยที่งอกจากสปอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว (ลูกศร) หลังจากการบ่มเป็นเวลา 25 วัน: (A) *G. intraradices*, (B) *C. etunicatum* PBT03, (C) *C. etunicatum* NNT10, และ (D) *F. mosseae* RYA08. บาร์ = 100 ไมโครเมตร

ตาราง 5 อัตราการงอกและความยาวของเส้นใยของสปอร์เดี่ยวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบนอาหาร minimal medium (M) และ modified Strullu Roman (MSR) media หลังการบ่มเป็นเวลา 25 วัน

ชนิดสปอร์	เปอร์เซ็นต์การงอก (%)		ความยาวของเส้นใยของสปอร์เดี่ยว (มิลลิเมตร)	
	M	MSR	M	MSR
G. intraradices	74.00a[a]	75.33a	7.08a	8.11a
C. etunicatum NNT10	29.50b	36.67b	1.45b	1.35c
C. etunicatum PBT03	20.67b	20.00c	5.40a	4.40b
F. mosseae RYA08	17.38b	28.00bc	1.13b	1.28c

[a]ตัวเลขที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันซึ่งมีตัวอักษรเดียวกันแสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ Tukey's Method of Multiple Comparisons

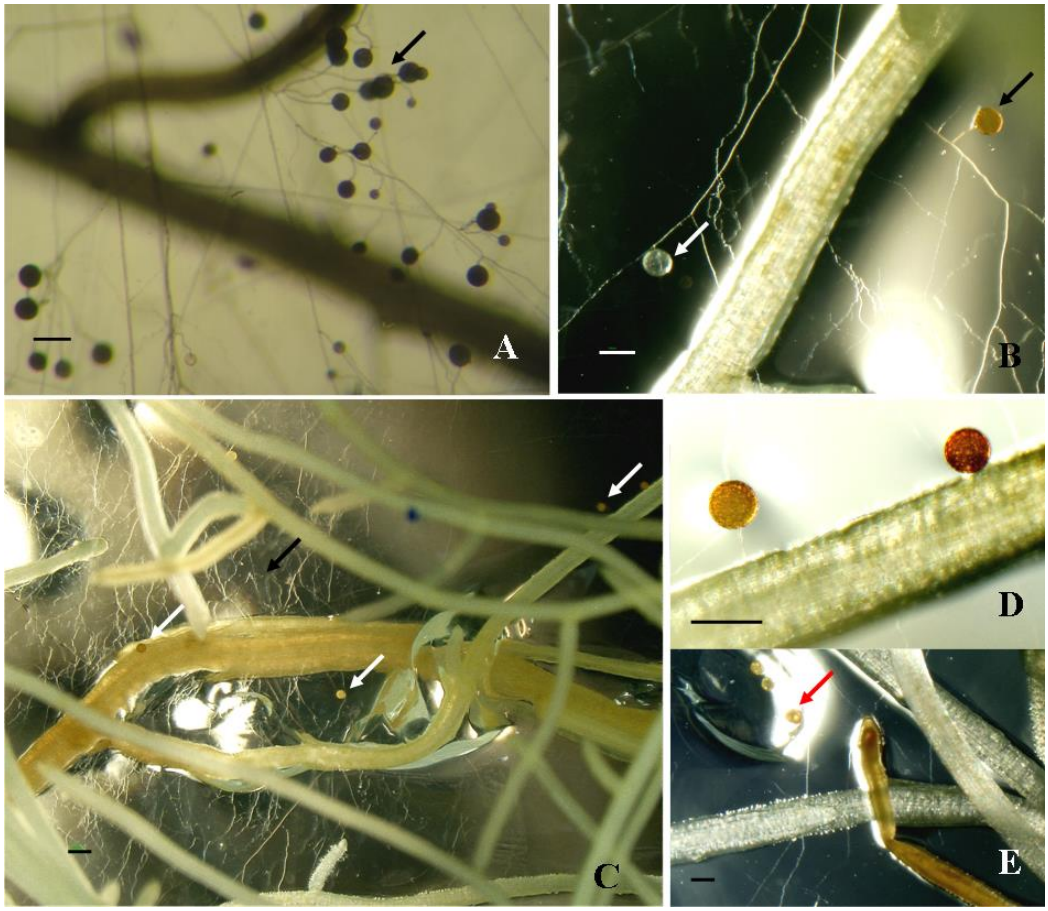
<u>การปลูกเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนสปอร์ร่วมกับเนื้อเยื่อรากแครอท</u>

เส้นใยของ *Glomus intraradices* และ *F. mosseae* RYA08 เจริญแผ่กระจายไปทั่วจานอาหารและเริ่มมีการสร้างสปอร์ใหม่ที่ 14 และ 24 วันหลังการปลูกเชื้อ ตามลำดับ (ตาราง 6 และภาพ 8A–D) *G. intraradices* สร้างเส้นใยยาวเจริญออกไปในแนวรัศมีของจานอาหารเลี้ยงเชื้อและสร้างสปอร์ใหม่เป็นกลุ่ม (ภาพ 8A) ในขณะที่ *C. etunicatum* NNT10 สร้างเพียงเส้นใย แต่ไม่เจริญโดยทั่วจานอาหารและไม่สร้างสปอร์ภายหลังจากการบ่มเป็นเวลา 5 เดือน จำนวนสปอร์ที่สร้างขึ้นใหม่โดยเชื้อ *G. intraradices* และ *F. mosseae* RYA08 มีค่าโดยประมาณเท่ากับ 7,800 และ 26 สปอร์ต่อจานอาหาร ตามลำดับ (ตาราง 6) อัตราการเข้าสู่รากของ *G. intraradices* มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ *F. mosseae* RYA08, *C. etunicatum* PBT03 และ *C. etunicatum* NNT10 ตามลำดับ

ตาราง 6 จำนวนสปอร์ที่ผลิตขึ้นใหม่และลักษณะเส้นใยของสปอร์แต่ละชนิดในการเพิ่มจำนวนแบบ *in vitro* ระยะเวลา 5 เดือนหลังการบ่มเชื้อ

ชนิดสปอร์	**การเข้าสู่ราก (%)**	**การผลิตสปอร์โดยประมาณต่อเพลท**	**ลักษณะการเจริญของเส้นใย**
G. intraradices	93.83 a*	7,800 a	เส้นใยเจริญแผ่กระจายไปทั่วจานอาหารและเริ่มมีการสร้างสปอร์ใหม่ที่ 14 วันหลังการปลูกเชื้อ
C. etunicatum NNT10	8.48 c	0.00 b	สร้างเพียงเส้นใยแต่ไม่กระจายโดยทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
C. etunicatum PBT03	10.99 c	0.00 b	สร้างเพียงเส้นใยแต่ไม่กระจายโดยทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
F. mosseae RYA08	69.00 b	26.33 b	เส้นใยเจริญแผ่กระจายไปทั่วจานอาหารและเริ่มมีการสร้างสปอร์ใหม่ที่ 24 วันหลังการปลูกเชื้อ hyphae

*ตัวเลขที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันซึ่งมีตัวอักษรเดียวกันแสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ Tukey's Method of Multiple Comparisons



ภาพ 8 การเพาะเลี้ยงเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแบบ *In vitro* (A) *G. intraradices*; แสดงกลุ่มของสปอร์ใหม่ที่ถูกสร้างขึ้น (ลูกศร) (B) *F. mosseae* RYA08; แสดงสปอร์ใหม่ (ลูกศรสีขาว) และสปอร์ที่เจริญเต็มที่ (ลูกศรสีดำ) ที่ติดอยู่กับก้านชูสปอร์ (C) เชื้อรา *F. mosseae* RYA08 ที่มีเส้นใยเจริญหนาแน่นโดยทั่วจานอาหารเพาะเลี้ยง (ลูกศรสีดำ) และมีสปอร์ (ลูกศรสีขาว) (D) สปอร์ *F. mosseae* RYA08 ที่สร้างขึ้นภายนอกรากแครอทดัดแปลงพันธุกรรม และ (E) สปอร์ *C. etunicatum* PBT03 (ลูกศรสีแดง) ที่งอกเส้นใยและเข้าสู่รากที่อยู่ใกล้เคียง Bar = 500 µm.

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากฤษณาและสักสามารถสร้างความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกับเชื้อราอารีบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Thapar and Klan, 1988; Kanakdurga *et al*., 1990; Ramanwong, 1998; Tamuli and Boruah, 2002; Singh *et al*., 2003) การทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการเข้าสู่รากของเชื้อราในกฤษณาเพิ่มขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น จาก 5.6 (KCP) ถึง 6.7 (TOL) ในขณะที่การเข้าสู่รากในสักไม่ได้รับผลกระทบ ผลวิเคราะห์นี้อาจชี้ให้เห็นถึงความต้องการความเป็นกรด-ด่างของดินของกฤษณา การทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้าที่พบว่า ลำดับเบสที่พบส่วนใหญ่จัดอยู่ในอันดับ

Glomeraceae ซึ่งประกอบด้วย *Glomus* และ *Rhizophagus* สอดคล้องกับงานวิจัยตีพิมพ์อื่นๆ ที่วิเคราะห์จากแผนภูมิวิวัฒนาการ (Helgason et al. 1999; Mummey and Rillig 2007; Pietikäinen et al. 2007) การพบได้บ่อยของอันดับดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการอยู่รอดภายใต้สภาวะการเกษตรแบบต่างๆ เช่น การรบกวนดินด้วยการไถพรวน การเพาะปลูก และการใช้สารกำจัดศัตรูพืช เช่นเดียวกับการใช้ในแหล่งที่เพชรบูรณ์และนครนายกในการทดลองนี้ สภาวะดังกล่าวอาจเหมาะสมต่อเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอื่นๆ เหตุผลที่เป็นไปได้ของการพบว่า *Glomus* มีความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะดังกล่าวสัมพันธ์กับความแตกต่างของวิธีการเพิ่มจำนวนของ *Glomus* ด้วย (Pietikäinen et al. 2007) *Glomeraceae* สามารถเข้าสู่รากและเพิ่มจำนวนโดยใช้ชิ้นส่วนของเส้นใย ชิ้นรากที่มีการเข้าสู่รากและสปอร์ ในขณะที่ *Gigasporaceae* สามารถเพิ่มจำนวนโดยใช้สปอร์เท่านั้น เพราะไม่สามารถสร้างเวสิเคิลภายในรากได้ เนื่องจากเวสิเคิลเป็นโครงสร้างที่มีลิปิดมากซึ่งสามารถสร้างเส้นใยขึ้นมาใหม่จากรากที่มีการเข้าสู่รากอยู่แล้ว (Gazey et al. 1993; INVAM Newsletter 1993; Brundrett et al. 1999; Helgason et al. 1999) การพบชิ้นส่วนดีเอนเอบางชิ้นในรากหรือในดินเพียงเท่านั้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบางชนิดอาจพบได้น้อยในดิน แต่สร้างโครงสร้างเชื้อราในรากที่มากพอต่อการตรวจจับโดยวิธี T-RFLP ในขณะที่บางชนิดพบเพียงสปอร์ในดินแต่ไม่มีการเข้าสู่ราก ดังนั้น ความจำเพาะของการพบชนิดของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากและดินของสักและกฤษณาได้รับผลกระทบจากแหล่งที่เก็บตัวอย่าง แต่ไม่ได้รับผลกระทบจากชนิดของพืชอาศัยและแหล่งของตัวอย่าง (ดินและราก) ดังนั้นการมีหรือไม่มีอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาใดๆในดินและรากดูเหมือนว่าจะไม่ได้รับผลกระทบอย่างมากจากแหล่งที่อยู่ (Pietikäinen et al. 2007)

จากการทดลองนี้พบว่าการใช้ปุ๋ยเศษซากใบไม้และวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นในการเพิ่มจำนวนหัวเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแบบฟาร์มสำหรับภูมิอากาศแบบร้อนชื้นในประเทศไทย การสร้างสปอร์ได้รับผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญจากชนิดของพืชอาศัยและวัสดุที่ใช้เพาะปลูก การเพิ่มจำนวนสปอร์แบบกระถางจะมีมากเมื่อใช้ข้าวโพดหวาน เช่นเดียวกับการเพิ่มจำนวนแบบฟาร์ม เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้พืชอาศัยอื่นๆ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (Millner and Kitt 1992; Talukdar and Germida 1993; Gaur et al. 2000) ที่พบว่าการสร้างสปอร์สัมพันธ์กับความสามารถของสปอร์ชนิดนั้นๆในการสร้างสปอร์หรือสัมพันธ์กับความชอบอื่นๆ เช่น ปริมาณคาร์บอนที่สามารถใช้ได้ร่วมกับการใช้ข้าวโพด ในการทดลองปลูกร่วมระหว่างเนื้อเยื่อรากแครอทและเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา เส้นใยของ *G. intraradices* และ *F. mosseae* RYA08 แพร่กระจายไปทั่วจานอาหารเพาะเลี้ยงและสร้างสปอร์ใหม่ ในขณะที่สปอร์ชนิดอื่นไม่สร้าง การทดลองนี้สอดคล้องการการศึกษาก่อนหน้าที่ทดลองเพิ่มจำนวน *G. intraradices* ในสภาวะปลอดเชื้อที่พบว่าเชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อต้นแบบที่สามารถเจริญได้เร็วในรากแครอทดัดแปลงพันธุกรรมและยังสร้างสปอร์ได้อย่างรวดเร็ว (Chabot et al. 1992; Arnaud et al. 1996)

สรุปผลการทดลอง

โครงสร้างชุมชนของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากและดินรอบรากของสักและกฤษณาจากสวนป่าในประเทศไทย พบว่าองค์ประกอบชุมชนของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในสักและกฤษณามีความคล้ายคลึงกัน ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่พบ 31 ใน 38 ชิ้นส่วนพบทั้งในสักและกฤษณา บ่งบอกได้ว่าเป็นอยู่ในตระกูล *Claroideoglomeraceae Diversisporaceae Gigasporaceae* และ *Glomeraceae* ตระกูลเด่นคือ ตระกูล *Glomeraceae* ซึ่งพบได้ในทุกแหล่งที่ศึกษา ความจำเพาะของชนิดเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากและดินรอบรากไม่ได้รับผลกระทบจากชนิดของพืชอาศัยและแหล่งของตัวอย่าง (รากและดิน) แต่ได้รับผลกระทบจากแหล่งที่เก็บตัวอย่าง ต้นกล้าสักจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการตอบสนองการเจริญที่ดีต่อการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามากกว่าการไม่ปลูกเชื้อ ต้นกล้าสักที่ปลูกด้วยเชื้อ *Claroideoglomus etunicatum* PBT03 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ *C. etunicatum* NNT10, *Entrophospora colombiana* และต้นที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อตามลำดับ ในส่วนของกฤษณาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านความสูง ต้นกล้าสักที่ปลูกเชื้อในระบบปลอดเชื้อ ด้วย *F. mosseae* RYA08 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ *Glomus intraradices*, *C. etunicatum* NNT10, *C. etunicatum* PBT03 และต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ การปลูกเชื้อ *G. intraradices* มีผลต่อน้ำหนักสดของลำต้น แต่ให้ผลน้ำหนักแห้งของลำต้นเป็นรองจากเชื้อ *F. mosseae* RYA08 อัตราการเข้าสู่รากและจำนวนสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาแต่ละสายพันธุ์ ได้รับผลกระทบจากพืชอาศัยและวัสดุปลูก จำนวนสปอร์และอัตราการเข้าสู่รากโดยรวมมีปริมาณมากที่สุด เมื่อปลูกร่วมกับข้าวโพดหวานและเมื่อใช้เวอร์มิคูไลท์เป็นวัสดุผสม ข้าวโพดหวานที่ปลูกในปุ๋ยเศษซากใบไม้ที่ผสมด้วยเวอร์มิคูไลท์ให้จำนวนสปอร์มากกว่าการใช้พืชอาศัยอื่น 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

1.2 ความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมัน (*Camellia oleifera*) ในภาคเหนือของประเทศไทย

1.2.1 ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมัน

พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่างดินบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมัน

พื้นที่บ้านปางมะหัน อำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย จำนวน 3 แปลงๆ ละ 8 ตัวอย่าง พื้นที่บ้านปูนะ อำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย จำนวน 3 แปลงๆ ละ 8 ตัวอย่าง และพื้นที่ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (โป่งน้อย) อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 แปลงๆ ละ 8 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างทั้งหมด 72 ตัวอย่าง ซึ่งในแต่ละพื้นที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 3.46-5.68 เก็บตัวอย่างดินบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมัน โดยขุดดินบริเวณกึ่งกลางระหว่างต้นและทรงพุ่มของต้นชาน้ำมัน ต้นละ 4 จุด รวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง ขุดที่ระดับความลึกจากผิวดินลงไป 15 cm เก็บตัวอย่างดินใส่ถุงพลาสติกใช้ยางรัดปากถุง บันทึก วัน เดือน ปี และสถานที่เก็บตัวอย่าง

การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากของต้นชาน้ำมัน

นำตัวอย่างรากของต้นชาน้ำมันมาล้างด้วยน้ำประปา แล้วตัดรากเป็นท่อนขนาดประมาณ 1 cm ใส่ในขวดปากกว้างแล้วเติม 10% KOH พอท่วมราก จากนั้นนำไปนึ่งใน autoclave อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำรากมาล้างด้วยน้ำประปาบนตะแกรงเพื่อล้าง KOH ออก แล้วนำรากใส่ในขวดปากกว้างแล้วเติม 0.05% trypan blue ใน lactoglycerol ให้ท่วมตัวอย่างราก แล้วนำไปเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างรากที่ผ่านการย้อมด้วย 0.05% trypan blue จำนวน 30 ชิ้นจากแต่ละตัวอย่าง มาทำ wet mount ด้วย lactoglycerol แล้วตรวจสอบเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในตัวอย่างรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope) ตามวิธีการของ Brundrett et al. (1996)

การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมัน

ชั่งตัวอย่างดิน 50 กรัม ลงในภาชนะ เติมน้ำแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที คนให้อนุภาคดินกระจายตัว แล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 710 250 106 และ 53 ไมโครเมตร ตามลำดับ เติมน้ำลงในภาชนะที่ใส่ดิน คนให้อนุภาคดินกระจายและกรองผ่านตะแกรงดังกล่าวจนกว่าน้ำจะใส จากนั้นชะดิน (ที่มีสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา) ที่ค้างบนตะแกรงขนาด 250, 106, 53 µm ใส่ลงหลอดเหวี่ยงแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทสิ่งแขวนลอยทิ้ง เก็บตะกอนดินที่ก้นหลอดไว้ จากนั้นใส่สารละลายซูโครส 50% ลงไปแล้วเขย่าให้ตะกอนดินที่ก้นหลอดกระจายตัวอยู่ในสารละลายซูโครส นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนแขวนลอยด้านบนที่มีสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ลงบนตะแกรงขนาด 53 µm แล้วล้างสารละลายซูโครสออกด้วยน้ำก๊อก จากนั้นใช้กระบอกฉีดน้ำชะสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่อยู่บนตะแกรง ลงบนกระดาษกรอง (ตีเส้นตารางขนาด 7×7 mm) ที่ใส่ไว้ในกรวยกรอง (Buchner funnel) และต่อ

กับเครื่องดูดสูญญากาศ ใช้ปากคีบ (forceps) นำกระดาษกรองที่มีสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereomicroscope) เพื่อนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

นำสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากตัวอย่างดินมาทำ wet mount ด้วย lactoglycerol บนสไลด์ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ และตรวจสอบการเปลี่ยนสีของผนังด้านในสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเมื่อทำปฏิกิริยากับ Melzer's reagent เพื่อประกอบในการระบุชนิด เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยากับ International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (2014)

1.2.2 ผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อการเจริญเติบโตของชาน้ำมัน

การเตรียมวัสดุเพาะและการเพาะเมล็ดของชาน้ำมัน

นำทรายมาเป็นวัสดุเพาะ โดยนำทรายมานึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำทรายไปใส่ถาดหลุมเพาะเมล็ด ขนาดหลุมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.75 cm เตรียมเมล็ดของชาน้ำมัน จำนวน 180 เมล็ด ฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดชาน้ำมันโดยการแช่ใน 10% Chlorox เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำมาเพาะในถาดหลุมเพาะเมล็ดในโรงเรือน

การเตรียมสารเคมีกำจัดศัตรูพืช

นำสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ที่มีการใช้มากในการแหล่งการผลิตพืช ได้แก่ ไกลโพเซตไอโซโพรพลิแอมโมเนียม (Glyphosate-isopropylammonium), พาราควอต ไดคลอไรด์ (Paraquat dichloride), ไซเพอร์เมทริน (Cypermethrin), คลอร์ไพริฟอส (Chlorpyrifos), คาร์เบนดาซิม (Carbendazim) และ เมทาแลกซิล (Metalaxyl) วิธีใช้ตามอัตราคำแนะนำของสารเคมีแต่ละชนิด (ตาราง 7)

ตาราง 7 ชนิดสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และอัตราการใช้ในการทดลอง

ชื่อสามัญ		กลุ่มสารเคมี	สารสำคัญ	วิธีใช้
ไกลโพเซตไอโซโพรพิลแอมโมเนียม (Glyphosate-isopropylammonim)	กำจัดวัชพืช	Glyphosate-isopropylammonium	N-(phosphonomethyl) glycine, isopropylamine salt 48% W/V SL (N-(phosphonomethyl) glycine 36% W/V)	500 มล. ต่อน้ำ 80 ลิตร / 1 ไร่
พาราควอต ไดคลอไรด์ (Paraquatdichloride)	กำจัดวัชพืช	Bipyridylium	1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium, dichloride 27.6% W/V SL (1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium ion 20% W/V)	440 มล. ต่อน้ำ 80 ลิตร / 1 ไร่
ไซเพอร์เมทริน (Cypermethrin)	กำจัดแมลง	Pyrethroid	(RS)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (1RS, 3RS', 1RS, 3RS)-3-(2, 2-dichlorovinyl)-2, 2-dimethylcyclopropanecarboxylate 35% W/V EC	10 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร
คลอร์ไพริฟอส (Chlorpyrifos)	กำจัดแมลง	Organophosphorus	O, O-diethyl O-3, 5, 6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate 40% W/V EC	50 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร
คาร์เบนดาซิม (Carbendazim)	กำจัดเชื้อรา	Benzimidazole	methyl benzimidazol-2-ylcarbamate 50% W/V SC	20 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร
เมทาแลกซิล (Metalaxyl)	กำจัดเชื้อรา	Phenylamide (acylalanine type)	methyl N-(methoxyacetyl)-N-(2, 6-xylyl)-DL-alaninate 25% WP	20 g ต่อน้ำ 20 ลิตร / 2 ตรม.

การใส่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกระถางทดลอง

นำสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาใส่รองก้นหลุมเพาะในกระถางปลูก โดยใส่จำนวน 450-500 สปอร์ต่อกระถาง แล้วย้ายต้นกล้าที่มีอายุ 2 เดือนลงปลูก หลังจากใส่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเป็นเวลา 1 เดือน แล้วฉีดพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชลงในกระถางทดลอง ตามอัตราที่แนะนำในฉลาก โดยฉีดพ่นจำนวน 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 เดือน ตามกรรมวิธีดังต่อไปนี้ (1) ปลูกเชื้อ+ไกลโพเซต, (2) ไม่ปลูกเชื้อ+ไกลโพเซต, (3) ปลูกเชื้อ+พาราควอต, (4) ไม่ปลูกเชื้อ+พาราควอต, (5) ปลูกเชื้อ+ไซเพอร์เมทริน, (6) ไม่ปลูกเชื้อ+ไซเพอร์เมทริน, (7) ปลูกเชื้อ+คลอร์ไพริฟอส, (8) ไม่ปลูกเชื้อ+คลอร์ไพริฟอส, (9) ปลูกเชื้อ+คาร์เบนดาซิม, (10) ไม่ปลูกเชื้อ+คาร์เบนดาซิม, (11) ปลูกเชื้อ+เมทาแลกซิล, (12) ไม่ปลูกเชื้อ+เมทาแลกซิล, (13) ปลูกเชื้อและฉีดพ่นน้ำประปา และ (14) ไม่ปลูกเชื้อและฉีดพ่นน้ำประปา รวมทั้งหมด 14 กรรมวิธีๆละ 4 ซ้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในดิน

เก็บผลการทดลองหลังการใส่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเป็นระยะเวลา 5 เดือน ตัดส่วนต้นของชาน้ำมันนำไปอบแห้งที่ 70°C เป็นเวลา 3 วัน นำมาชั่งบันทึกน้ำหนักแห้ง แล้วนำไปบดให้เป็นผงละเอียดชั่งตัวอย่างละ 2.5 g เก็บใส่ถุงพลาสติกเพื่อวิเคราะห์ธาตุอาหารในส่วนต้นและใบ โดยวิเคราห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดิน (Total N) โดย Micro kjeldahl method ปริมาณฟอสฟอรัสที่สามารถสกัดได้ (Extractable P) โดย Bray II และ colorimetric method และอ่านค่าโดยใช้เครื่อง Spectophotometer และปริมาณโพแทสเซียมที่สามารถสกัดได้ (Extractable K) ใช้วิธีการสกัดด้วยสารละลาย ammonium acetate 1 N, pH 7 และอ่านค่าด้วย เครื่อง Atomatic absorption (Klute 1982)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

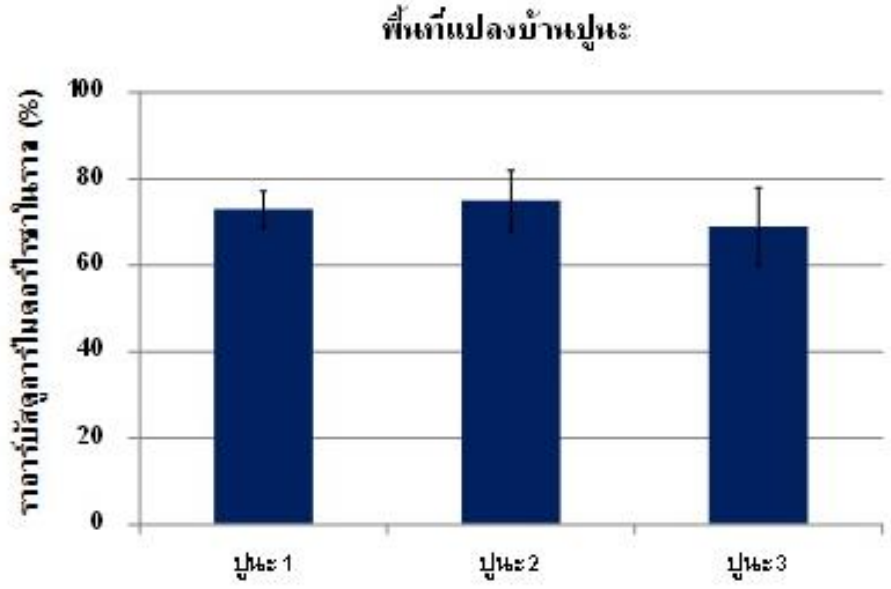
วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS for window version 14.0 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลอง

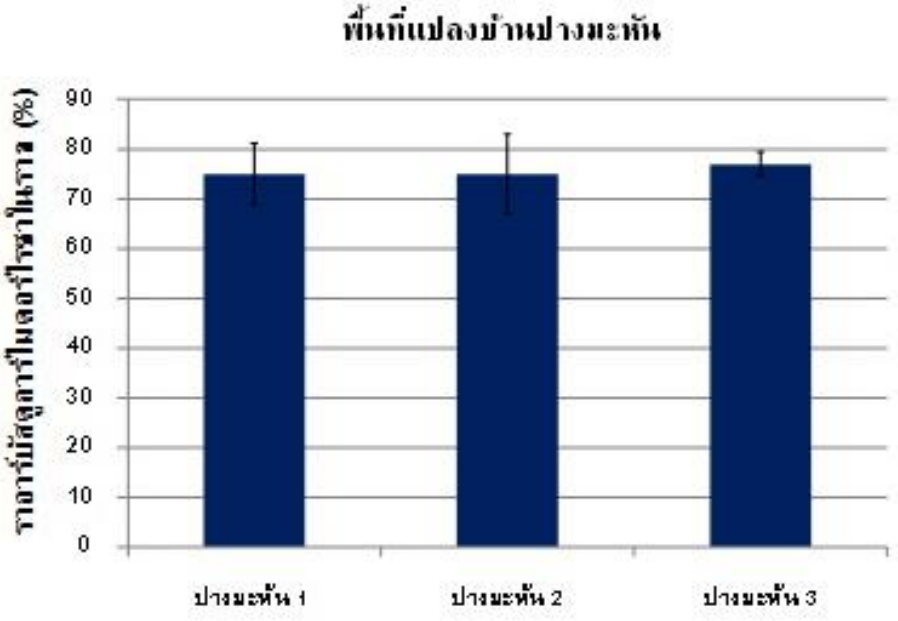
1.2.1 ความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากของชาน้ำมันที่มีการปลูกในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย

จากตัวอย่างดินริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมันจำนวน 9 แปลงรวม 72 ตัวอย่าง ได้แก่พื้นที่บ้านปูนะแปลง 1-3 พบว่าในแต่ละแปลงมีเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากของต้นชาน้ำมันเฉลี่ย 73 75 และ 96% ตามลำดับ (ภาพ 9) พื้นที่บ้านปางมะหันแปลง 1-3 พบว่าในแต่ละแปลงมีเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากของชาน้ำมันเฉลี่ย 75 75 และ 77% ตามลำดับ (ภาพ 10) และพื้นที่ศูนย์วิจัย

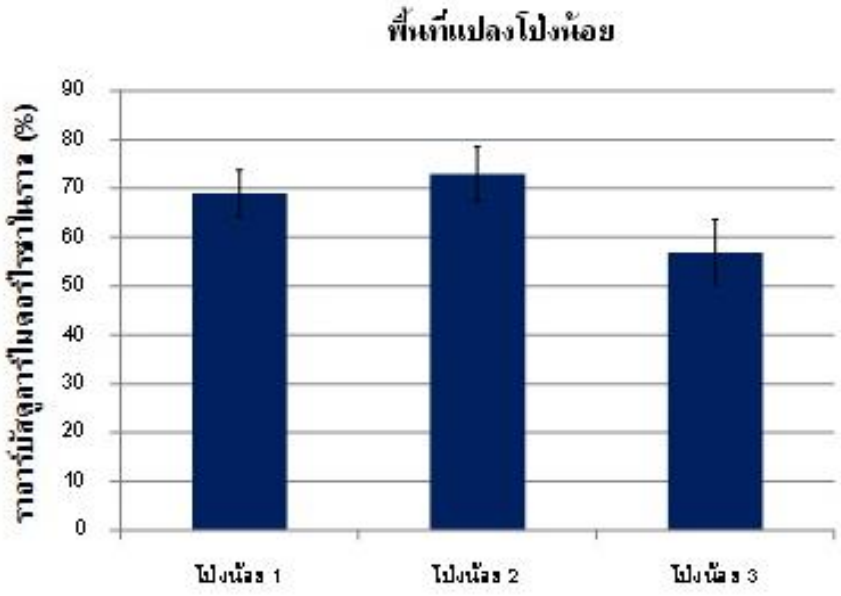
เกษตรหลวงเชียงใหม่ (โป่งน้อย) อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ แปลง 1-3 พบว่าในแต่ละแปลงมีเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากของต้นชาน้ำมันเฉลี่ย 69 73 และ 57% ตามลำดับ (ภาพ 11)



ภาพ 9 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากของต้นชาน้ำมันพื้นที่บ้านปูนะ



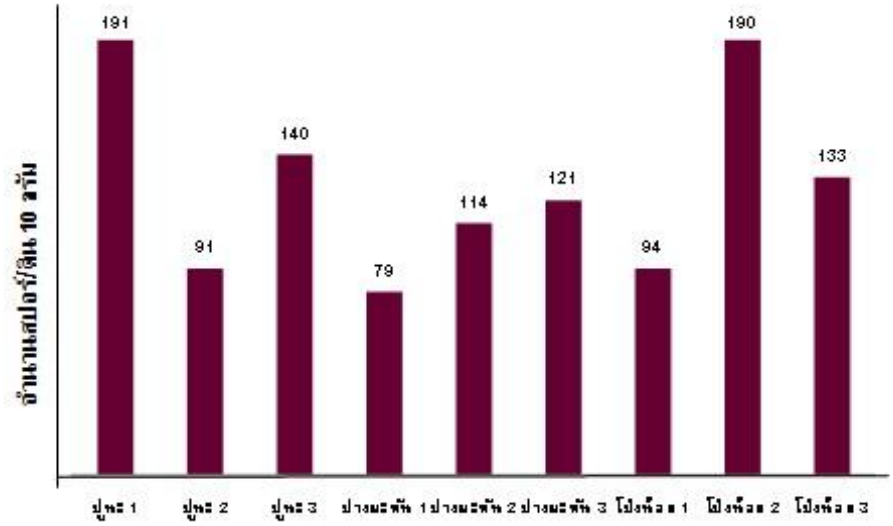
ภาพ 10 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากของต้นชาน้ำมันพื้นที่บ้านปางมะหัน



ภาพ 11 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในรากของต้นชาน้ำมัน พื้นที่โป่งน้อย

จำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมัน

จำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมันในพื้นที่แปลงทั้ง 9 แปลง ได้แก่ พื้นที่ปูนะแปลงที่ 1-3 พบว่าจำนวนสปอร์เท่ากับ 191 91 และ 140 สปอร์/ดิน 10 กรัม พื้นที่ปางมะหันแปลง 1-3 พบว่าจำนวนสปอร์เท่ากับ 79 114 และ 121 สปอร์/ดิน 10 กรัม พื้นที่โป่งน้อยแปลง 1-3 พบว่าจำนวนสปอร์เท่ากับ 94 190 และ 133 สปอร์/ดิน 10 กรัม (ภาพ 12)



ภาพ 12 จำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาดินบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมัน

ความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในจากดินบริเวณระบบราก ของต้นชาน้ำมัน

จำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมันในพื 9 พื้นที่ รวม 72 ตัวอย่าง โดยพบเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในจีนัส *Acaulospora* 8 สปีชีส์ *Ambispora* 1 สปีชีส์ *Claroideoglomus* 1 สปีชีส์ *Dentiscutata* 1 สปีชีส์ *Diversispora* 2 สปีชีส์ *Funneliformis* 1 สปีชีส์ *Gigaspora* 3 สปีชีส์ *Glomus* 1 สปีชีส์ *Racocetra* 1 สปีชีส์ *Rhizophagus* 3 สปีชีส์ *Sclerocystis* 1 สปีชีส์ และ *Septoglomus* 1 สปีชีส์ ซึ่งพบเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในสปีชีส์ *Septoglomus constrictum*, *Claroideoglomus luteum*, *Acaulospora laevis* และ *Rhizophagus fasciculatus* โดยพบในระดับความถี่และพบในปริมาณมากในทุกตัวอย่างดินที่ศึกษา (ตาราง 8) เมื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาพบ 24 สปีชีส์ (ตาราง 9)

ตาราง 8 จำนวนสปีชีส์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและความถี่ในการพบราในแต่ละจีนัส

จีนัส	จำนวนสปีชีส์	ความถี่ที่พบแต่ละจีนัส
Acaulospora	8	+++
Ambispora	1	+
Claroideoglomus	1	+++
Dentiscutata	1	+
Diversispora	2	++
Funneliformis	1	++
Gigaspora	3	+
Glomus	1	+
Racocetra	1	+
Rhizophagus	3	+++
Sclerocystis	1	+
Septoglomus	1	+++
Total	24	

หมายเหตุ: +, พบไม่บ่อย; ++, ปานกลาง; และ +++, พบบ่อย

ตาราง 9 เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่พบบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมันในพื้นที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย

จีนัส	**สปีชีส์**
Acaulospora	*A. capsicula*
	A. colombiana
	A. delicata
	A. denticulata
	A. foveata
	A. laevis
	A. morrowiae
	A. tuberculata
Ambispora	*Am. gerdemannii*
Claroideoglomus	*C. luteum*
Dentiscutata	*D. heterogama*
Diversispora	*Di. eburnean*
	Di. epigaea
Funneliformis	*F. caledonius*
Gigaspora	*G. gigantean*
	G. margarita
	G. rosea
Glomus	*Gl. multicaule*
Racocetra	*R. persica*
Rhizophagus	*Rh. aggregates*
	Rh. fasciculatus
	Rh. manihotis
Sclerocystis	*S. sinuosum*
Septoglomus	*Se. constrictum*

1.2.2 ผลของการศึกษาเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อต้นชาน้ำมันในกระถางทดลอง

ผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อการเจริญเติบโตของชาน้ำมัน

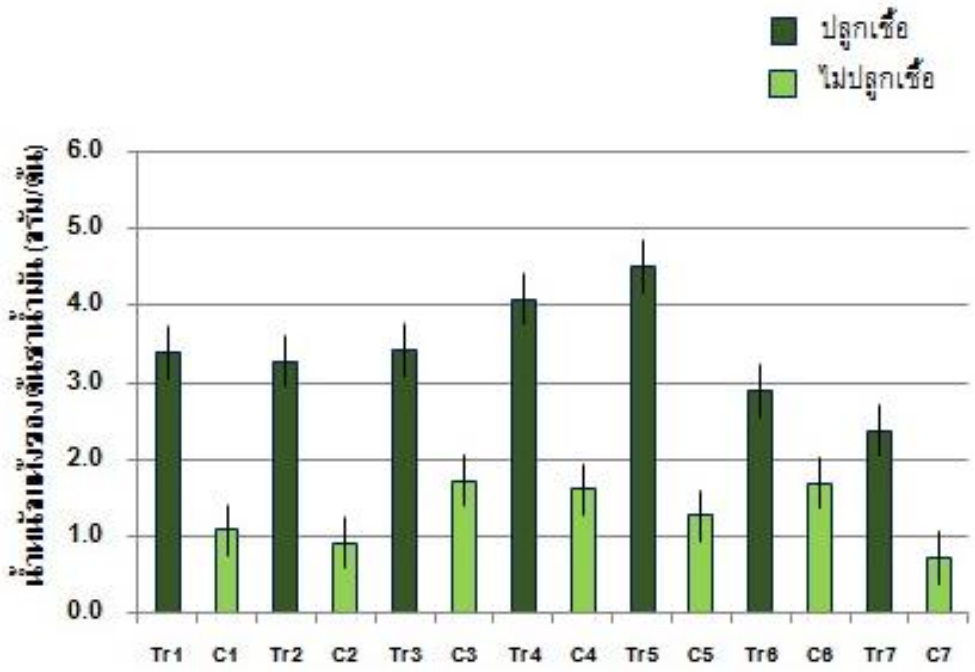
ต้นชาน้ำมันในกระถางทดลอง หลังจากปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาเป็นเวลา 5 เดือน (ภาพ 13) เมื่อตัดส่วนต้นแล้วนำไปอบภายใต้อุณหภูมิที่ 70°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าต้นชาน้ำมันที่ได้รับการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มีน้ำหนักแห้งมากกว่าต้นชาน้ำมันที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญในทุกกรรมวิธีของการทดลอง ในขณะที่สารเคมีกำจัดศัตรูพืชไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นชาน้ำมัน (ภาพ 14)

ภาพ 13 การเจริญเตอบโตของต้นชาน้ำมันในกระถางทดลอง

หมายเหตุ:

Tr1 – Tr7 = ชุดทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และฉีดพ่น (1) ไกลโพเซต, (2) พาราควอต, (3) ไซเพอร์เมทริน, (4) คลอร์ไพริฟอส, (5) คลอร์ไพริฟอส, (6) คาร์เบนดาซิม, (7) เมทาแลกซิล, (8) น้ำประปา

C1 – C7 = ชุดทดลองที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และฉีดพ่น (1) ไกลโพเซต, (2) พาราควอต, (3) ไซเพอร์เมทริน, (4) คลอร์ไพริฟอส, (5) คลอร์ไพริฟอส, (6) คาร์เบนดาซิม, (7) เมทาแลกซิล, (8) น้ำประปา



ภาพ 14 ผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและสารกำจัดศัตรูพืชต่อการเติบโตของต้นชาน้ำมัน

หมายเหตุ:

- Tr1 – Tr7 = ชุดทดลองที่ได้รับการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และฉีดพ่น (1) ไกลโพเซต, (2) พาราควอต, (3) ไซเพอร์เมทริน, (4) คลอร์ไพริฟอส, (5) คาร์เบนดาซิม, (6) เมทาแลกซิล, (7) น้ำประปา
- C1 – C7 = ชุดทดลองที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา และฉีดพ่น (1) ไกลโพเซต, (2) พาราควอต, (3) ไซเพอร์เมทริน, (4) คลอร์ไพริฟอส, (5) คาร์เบนดาซิม, (6) เมทาแลกซิล, (7) น้ำประปา

ผลของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อปริมาณธาตุอาหารของต้นชาน้ำมัน

เมื่อนำตัวอย่างส่วนของต้นชาน้ำมันมาวิเคราะห์ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ที่สะสมทั้งในส่วนต้นและใบ พบว่ากรรมวิธีที่ปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีปริมาณธาตุอาหารทั้ง 3 ชนิดภายในต้นชาน้ำมัน มากกว่าชุดทดลองที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าชุดทดลองที่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชไม่ใช่ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณธาตุอาหารในต้นของชาน้ำมัน (ตาราง 10)

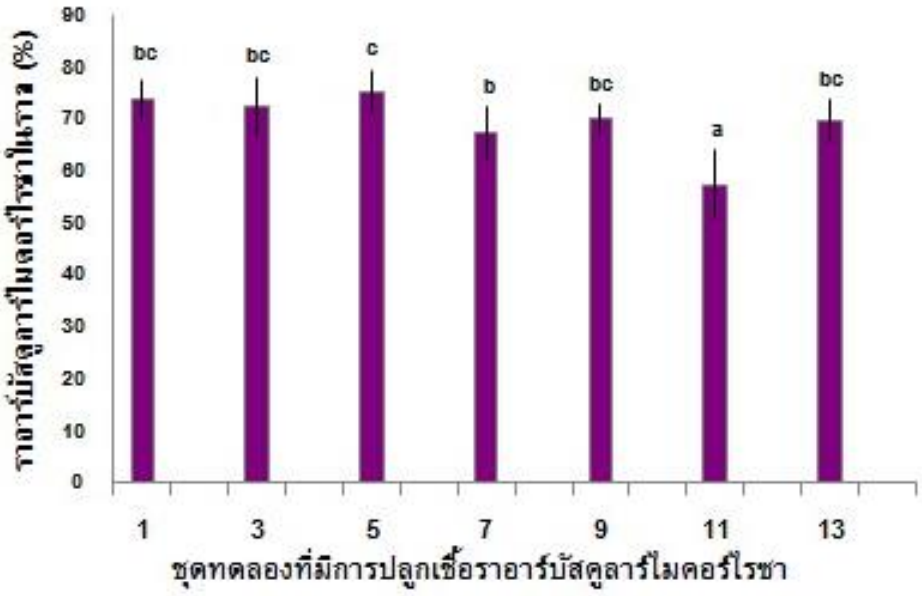
ตาราง 10 ผลของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อปริมาณธาตุอาหารในใบและต้นชาน้ำมัน

กรรมวิธี		ไนโตรเจน (mg/plant)		ฟอสฟอรัส (mg/plant)		โพแทสเซียม (mg/plant)	
		ใบ	ต้น	ใบ	ต้น	ใบ	ต้น
1	ปลูกเชื้อ+ไกลโพเซต	98.03 bc	20.76 abc	1.81 abc	0.78 ab	52.35 a	20.13 a
2	ไม่ปลูกเชื้อ+ไกลโพเซต	35.88 e	8.79 de	0.51 cd	0.18 d	15.18 bc	4.66 d
3	ปลูกเชื้อ+พาราควอต	120.46 ab	20.89 abc	2.42 a	0.69 abc	55.63 a	16.81 ab
4	ไม่ปลูกเชื้อ+พาราควอต	31.27 e	9.24 de	0.31 d	0.15 d	17.14 bc	2.98 d
5	ปลูกเชื้อ+ไซเพอร์เมทริน	120.46 ab	20.89 abc	2.42 a	0.69 ab	55.63 a	16.81 ab
6	ไม่ปลูกเชื้อ+ไซเพอร์เมทริน	31.27 e	9.24 de	0.31 d	0.15 d	17.14 bc	2.98 d
7	ปลูกเชื้อ+คลอร์ไพริฟอส	148.37 a	31.13 a	2.94 a	0.99 a	48.58 a	15.19 ab
8	ไม่ปลูกเชื้อ+คลอร์ไพริฟอส	46.13 de	14.31 cde	0.55 bcd	0.27 d	23.12 bc	5.70 cd
9	ปลูกเชื้อ+คาร์เบนดาซิม	119.11 ab	27.61 ab	2.55 a	0.85 ab	50.61 a	20.19 a
10	ไม่ปลูกเชื้อ+คาร์เบนดาซิม	43.62 e	12.53 cde	0.62 bcd	0.19 d	23.60 bc	3.18 d
11	ปลูกเชื้อ+เมทาแลกซิล	100.06 abc	21.22 abc	2.31 a	0.74 ab	56.12 a	15.01 ab
12	ไม่ปลูกเชื้อ+เมทาแลกซิล	58.05 cde	14.62 cde	0.88 bcd	0.38 cd	33.61 ab	7.08 cd
13	ปลูกเชื้อ+น้ำประปา	67.43 cd	19.05 bcd	1.89 ab	0.63 bc	32.87 abc	11.98 bc
14	ไม่ปลูกเชื้อ+น้ำประปา	16.84 e	6.02 e	0.31 d	0.14 d	8.29 c	1.91 d

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามหลังด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ)

เปอร์เซ็นต์การเข้าสู่รากของต้นชาน้ำมันของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในกระถางทดลอง

จากตรวจเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในตัวอย่างรากของต้นชาน้ำมันในกระถางทดลอง ในชุดทดลองที่มีการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา พบว่ามีค่าเฉลี่ยของการเข้าสู่รากของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอยู่ในช่วง 75.5 - 57.5% โดยชุดทดลองที่มีการปลูกเชื้อและฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดเชื้อราเมทาแลกซิลซึ่งเป็นสารกำจัดเชื้อรา มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาภายในราก น้อยกว่าชุดทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมันที่ 95% (ภาพ 15) ส่วนกรรมวิธีที่ไม่ปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซานั้นพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเข้ารากของชาน้ำมันน้อยมากอยู่ช่วง 0.25 - 0.67%



ภาพ 15 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในชุดทดลองที่มีการปลูกเชื้อ

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีที่มีอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ)

1 = ปลูกเชื้อ+ไกลโพเซต
2 = ไม่ปลูกเชื้อ+ไกลโพเซต
3 = ปลูกเชื้อ+พาราควอต
4 = ไม่ปลูกเชื้อ+พาราควอต
5 = ปลูกเชื้อ+ไซเพอร์เมทริน
6 = ไม่ปลูกเชื้อ+ไซเพอร์เมทริน
7 = ปลูกเชื้อ+คลอร์ไพริฟอส
8 = ไม่ปลูกเชื้อ+คลอร์ไพริฟอส
9 = ปลูกเชื้อ+คาร์เบนดาซิม
10 = ไม่ปลูกเชื้อ+คาร์เบนดาซิม
11 = ปลูกเชื้อ+เมทาแลกซิล
12 = ไม่ปลูกเชื้อ+เมทาแลกซิล
13 = ปลูกเชื้อ+น้ำประปา
14 = ไม่ปลูกเชื้อ+น้ำประปา

วิจารณ์ผลการการทดลอง

เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากของต้นชาน้ำมัน ที่มีการปลูกในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย ในพื้นที่ปูนะ ปางมะหัน และโป่งน้อย มีเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซารากระดับปานกลางถึงค่อนข้างสูง (57 - 77%) และจำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมันในพื้นที่ศึกษา มีความหนาแน่นในระดับปานกลาง อยู่ในช่วงประมาณ 9-19 สปอร์/ดิน 1 กรัม ซึ่งอยู่ในระดับปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับพืชบางชนิด ที่มีความหนาแน่นของสปอร์น้อยกว่า 5 สปอร์/ดิน 1 g หรือพืชบางชนิดที่มีความหนาแน่นของสปอร์ในปริมาณค่อนข้างมากประมาณ 35 สปอร์/ดิน 1 กรัม ความแตกต่างของจำนวนสปอร์ในแต่ละพื้นที่อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของดิน

สภาพแวดล้อม รวมทั้งการใช้ที่ดินหรือสารเคมีในการทำการเกษตรของดินในแต่ละพื้นที่ (Kabir et al. 1998; Brundrett et al. 1996; Youpensuk et al. 2004) จำนวนสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาจากดินบริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมัน ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกับเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากพืช Youpensuk et al. (2006) รายงานว่าเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากพืชอาศัยอาจไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสปอร์บริเวณระบบราก ในการศึกษานี้พบความหลากหลายของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในบริเวณรากชาน้ำมันในพื้นที่สำรวจในจังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่พบว่ามีจำนวน 24 สปีชีส์ ซึ่งถือว่ามีความหลากหลายมากพอสมควร และสปีชีส์เด่น ได้แก่ *Se. constrictum*, *C. luteum*, *A. laevis* และ *Rh. fasciculatus* โดยในทุกตัวอย่างดินที่ศึกษา คุณสมบัติของดิน ชนิดของพืชให้อาศัย การใช้ที่ดินในแปลงเกษตร ส่งผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้แตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์

จากการศึกษาเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเจริญเติบโตของต้นชาน้ำมัน ซึ่งพบว่าต้นชาน้ำมันตอบสนองต่อเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้ดีมาก หรืออีกนัยหนึ่งก็คือเชื้อราเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดธาตุอาหารให้แก่ต้นชาน้ำมันได้ ซึ่งเห็นได้จากน้ำหนักแห้งและปริมาณธาตุอาหารในต้นชาน้ำมันที่มีการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา มีน้ำหนักมากว่าและมีปริมาณธาตุอาหารมากกว่าต้นที่ไม่มีการใส่เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญ และจากผลการทดลองนี้พบว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการช่วยดูดธาตุอาหารของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา Smith and Read (1997) รายงานว่าพืชที่มีเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาช่วยลดความเป็นพิษของสารเคมีและโลหะหนัก เนื่องจากสารเหล่านี้บางส่วนจะถูกเก็บกักไว้ในเส้นใยของเชื้อรา ซึ่งจะช่วยลดปริมาณของสารที่จะทำให้เกิดการเป็นพิษต่อพืชได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในชุดทดลองที่มีการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและฉีดพ่นคลอร์ไพริฟอสซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดแมลง มีปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสสูงสุด และมีปริมาณโพแทสเซียมในระดับสูงด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคลอร์ไพริฟอสมีส่วนประกอบของสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ ได้แก่ O,O-diethyl-O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate ซึ่งส่วนประกอบของฟอสฟอรัส เนื่องเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีประสิทธิภาพในการดูดธาตุฟอสฟอรัสให้กับพืชได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงอาจจะมีความสามารถในการดูดสารประกอบฟอสฟอรัสในสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอสให้แก่พืชได้มากขึ้น ทำให้มีการเจริญเติบโตและการดูดธาตุอาหารต่างๆของพืชมากขึ้นด้วย

เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากของต้นชาน้ำมันในกระถางทดลองมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกับในแปลงปลูกในพื้นที่สำรวจในจังหวัดเชียงรายและเชียงใหม่ อย่างไรก็ตามชุดทดลองที่มีการฉีดพ่นเมทาแลกซิลซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดเชื้อรา พบว่ามีเปอร์เซ็นต์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากน้อยกว่าชุดทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ Larsen et al. และ Sukarno et al. (1996) รายงานว่าการใช้เคมีกำจัดเชื้อราส่งผลต่อการลดลงของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากพืช

สรุปผลการทดลอง

เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากของต้นชาน้ำมัน มีความหลากหลายจำนวน 24 สปีชีส์ โดยสปีชีส์ *Se. constrictum*, *C. luteum*, *A. laevis* และ *Rh. fasciculatus* เป็นชนิดเด่นที่บริเวณระบบรากของต้นชาน้ำมัน และมีเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากของต้นชาน้ำมันในเปอร์เซ็นต์ที่สูงพอสมควร ส่วนต้นชาน้ำมันมีการตอบสนองต่อเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาได้เป็นอย่างดี มีการเจริญเติบโตและปริมาณธาตุอาหารของต้นชาน้ำมันสูงกว่าต้นที่ไม่มีเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาอย่างมีนัยสำคัญ และสารเคมีกำจัดศัตรูพืชไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นชาน้ำมัน และสารเมทาแลกซิลซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดเชื้อรา มีผลต่อการลดลงของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในรากของต้นชาน้ำมัน

1.3 เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา

การทดลองที่ 1 การสำรวจเชื้อรากลุ่มเอคโตไมอคร์ไรซาและรากลุ่มซาโพรบ

ศึกษาเชื้อรากลุ่มเอคโตไมอคร์ไรซาและรากลุ่มซาโพโทปในบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูนและลำปาง นำดอกเห็ดที่เก็บมาได้มาบ่งบอกชนิดโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา จากนั้นนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิที่ 40-45 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการบ่งบอกสถานะต่อไป

การทดลองที่ 2 การบ่งบอกสถานะของเชื้อรากลุ่มเอคโตไมอคร์ไรซาและรากลุ่มซาโพโทปโดยใช้ไอโซโทปเสถียร

นำตัวอย่างเห็ดอบแห้งที่เก็บได้มาทำการบด จากนั้นชั่งจำนวน 2 มิลลิกรัมไปวิเคราะห์ไอโซโทปเสถียรของคาร์บอน ($\delta^{13}C$) และไนโตรเจน ($\delta^{15}N$) โดยใช้เครื่อง Costech ECS4010 elemental analyzer และ$DELTA_{plus}$ XP isotope ratio mass spectrometer ที่ University of New Hampshire Stable Isotope Laboratory, Durham, USA ตามขั้นตอนของ Hobbie et al. (2001)

การทดลองที่ 3 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

การทดลองนี้ใช้เชื้อราเอคโตมคอร์ไรซาในกลุ่ม sclerodermatiod จำนวน 4 ชนิด คือ เห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*) เห็ดตับเต่าดำ (*P*hlebopus *portentosus*) เห็ดกรวด (*Pisolithus albus*) และเห็ดลูกฝุ่น (*Scleroderma sinnamariense*) โดยนำส่วนของเนื้อเห็ดส่วนด้านในดอกเห็ดวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Melin-Norkans (MMN) medium และบ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญออกจากชิ้นเนื้อเยื่อเห็ดทำการต่อเชื้อ ทำให้เชื้อบริสุทธิ์และนำไปศึกษาต่อไป นอกจากนี้เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จะตรวจสอบชนิดโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (Kumla et al. 2012)

การทดลองที่ 4 การทดสอบการผลิต indole-3-acetic acid (IAA)

เลี้ยงเชื้อราทั้ง 4 ชนิดในอาหารเหลว MMN ที่เติม L-tryptophan 2 mg/ml ในขวดแก้วรูปชมพู่ บนเครื่องเขย่า ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นตรวจสอบด้วย colorimetric assay (Tsavkelova et al. 2007)

การหาสภาวะเหมาะสมต่อการผลิต IAA ของเชื้อราที่ทดสอบทั้งหมดในอาหารเหลว โดยปัจจัยที่มีผลได้แก่ อุณหภูมิที่ 20-35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ L-tryptophan ที่ 0-10 mg/ml และระยะเวลาการบ่ม จากนั้นสกัด IAA จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (Ahmad et al. 2005). ตรวจสอบ IAA ที่ผลิตขึ้นด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) ภายใต้แสง UV และการพ่นด้วยสารละลาย Ehmann's reagent and Salkowski's reagent (Ehmann 1977) ตรวจหาปริมาณ IAA ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) (Chung et al. 2003)

นอกจากนี้ IAA ที่เชื้อราสร้างจะนำไปทดสอบการส่งเสริมการเจริญ โดยใช้วิธีทดสอบดังนี้ การยืดยาว Coleoptile ของข้าวและข้าวโอ๊ต และเปอร์เซ็นต์การงอกและความยาวรากของถั่วดำและข้าวโพด โดยใช้ IAA ที่ความเข้มข้น 45 μg/ml เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน IAA และน้ำกลั่น

การทดลองที่ 5 การละลายโลหะที่เป็นพิษในรูปแร่ธาตุที่ไม่ละลายน้ำและความทนทานต่อโลหะ

เลี้ยงเชื้อราทั้ง 4 ชนิดในอาหารวุ้น MMN ที่เติมแร่ธาตุของโลหะต่อไปนี้ $CdCO_3$, $CoCO_3$, $CuCO_3{\cdot}Cu(OH)_2$, $2Pb(CO_3){\cdot}Pb(OH)_2$ และ $ZnCO_3$ ที่ระดับความเข้มข้น 0-15 mM โดยผิวหน้าอาหารวุ้นปิดทับด้วยกระดาษเซโลเฟน บ่มอาหารที่ทดสอบที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือนจากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี วงใสของการละลาย และน้ำหนักแห้ง คำนวณ Solubilization index (Vitorino et al. 2012) และ Tolerance index (Fomina et al. 2005)

ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 การสำรวจเชื้อรากลุ่มเอคโตไมอคร์ไรซาและรากลุ่มซาโพรบ

จากเก็บตัวอย่างทั้งหมด 82 ตัวอย่างแบ่งเป็น เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา 57 ตัวอย่าง และเห็ดซาโพรบ 25 ตัวอย่าง โดยพบ พบเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดใหม่ คือ *Scleroderma suthepense* (ภาพ 16ก) และพบเห็ดซาโพรบ *Morganella purpurascens* (ภาพ 16ข) เป็นครั้งแรกในประเทศไทย

ผลการทดลองที่ 2 การบ่งบอกสถานะของเชื้อรากลุ่มเอคโตไมอคร์ไรซาและรากลุ่มซาโพโทปโดยใช้ไอโซโทปเสถียร

ค่าของไอโซโทรปเสถียรคาร์บอนของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา อยู่ระหว่าง-30.34‰ ถึง -23.05‰ โดยมีค่าเฉลี่ย -26.16±1.56‰ และค่าของไอโซโทรปเสถียรไนโตรเจนของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา อยู่ระหว่าง2.70‰ ถึง13.41‰ โดยมีค่าเฉลี่ย 6.54±2.35‰ ส่วนค่าของไอโซโทรปเสถียรคาร์บอนของเห็ดซาโพรบ อยู่ระหว่าง -26.87‰ ถึง -22.49‰ โดยมีค่าเฉลี่ย -26.16±1.56‰ และค่าของไอโซโทรปเสถียรไนโตรเจนของเห็ดซาโพรบ อยู่ระหว่าง -2.36‰ ถึง 1.84‰ โดยมีค่าเฉลี่ย -0.38±1.16‰ โดยเมื่อเปรียบเทียบกันแล้วค่าของไอโซโทรปเสถียรคาร์บอนของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซามีค่าน้อยกว่าเห็ดซาโพรบ แต่ค่าของไอโซโทรปเสถียรไนโตรเจนของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซามีค่ามากกว่าเห็ดซาโพรบ เมื่อเปรียบเทียบโดยการสร้างกราฟจะเห็นความชัดเจนของเห็ดทั้งสองกลุ่มอย่างชัดเจนดังภาพ 17 ซึ่งสามารถนำไปใช้บ่งบอกสถานะได้

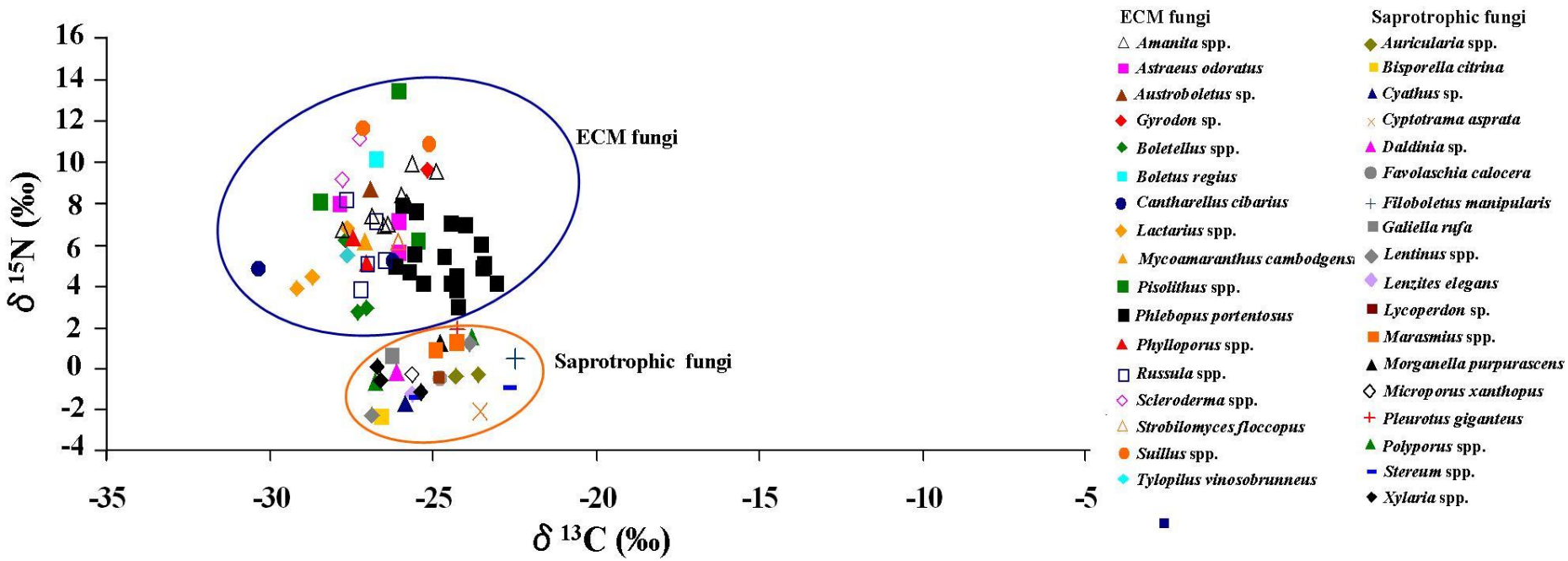
ภาพ 16 เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา (ก) *Scleroderma suthepense* และ (ข)เห็ดซาโพรบ *Morganella purpurascens*

ผลการทดลองที่ 3 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา

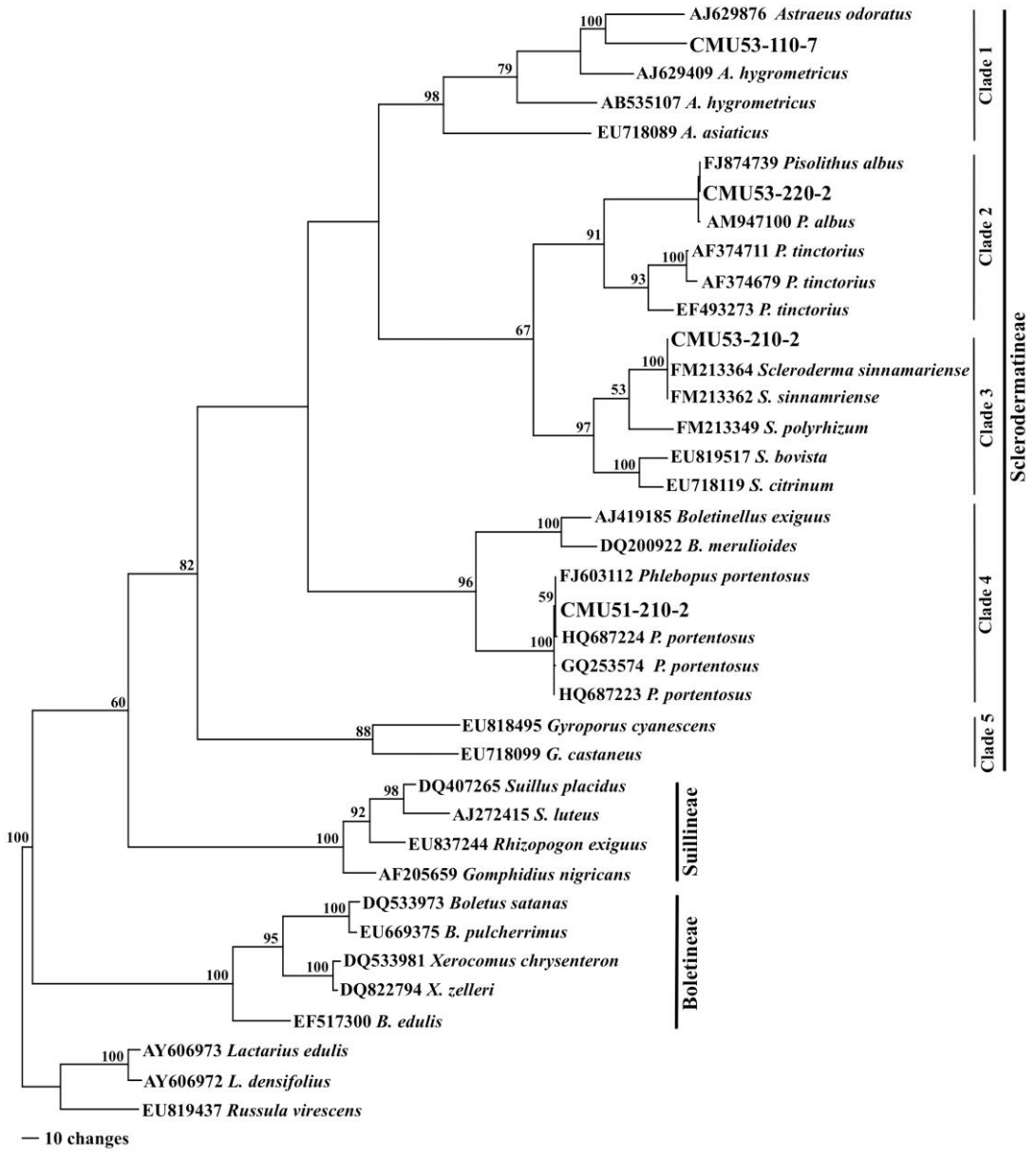
การยืนยันเชื้อราเอคโตมคอร์ไรซาในกลุ่ม sclerodermatiod จำนวน 4 ชนิด สอดคล้องกับ *Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense* โดยใช้อณูชีววิทยา (ตาราง 11 และภาพ 18)

ตาราง 11 ข้อมูลของเชื้อราที่ใช้ในการทดลองนี้

Taxa	Fungal isolate	GenBank number	Location	Collection date	Associated plant
Astreus odoratus	CMU53-110-7	HQ687219	Wiang Pa Pao, Chiang Rai	23 June 2010	*Dipterocarpus* sp.
Phlebopus portentosus	CMU51-210-2	HQ687224	Phrao, Chiang Mai	7 May 2008	*Mangifera indica*
Pisolithus albus	CMU53-220-2	HQ687220	Muang, Chiang Mai	15 June 2010	*Eucalyptus camaldulensis*
Scleroderma sinnamariense	CMU53-210-2	HQ687222	Muang, Chiang Mai	23 May 2010	*Cinnamomum bejolghota*



ภาพ 17 ค่าของไอโซโทปเสถียรคาร์บอนและไนโตเจนของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาและเห็ดซาโพรบ



ภาพ 18 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของเชื้อราที่ใช้ในการทดลองนี้

ผลการทดลองที่ 4 การทดสอบการผลิต indole-3-acetic acid (IAA)

น้ำเลี้ยงเชื้อราที่ทดสอบให้ผลบวกกับ colorimetric assay โดยเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีชมพูเมื่อทดสอบกับ Salkowski's reagent และเมื่อทำ TLC พบว่า IAA ที่ผลิตจากเชื้อราทั้งหมด แสดงค่า Rf 0.48 เท่ากับสารมาตรฐาน IAA ภายใต้แสง UV และการพ่นด้วยสารละลาย Ehmann's reagent and Salkowski's reagent ปริมาณการสร้าง IAA จากการใช้เทคนิค HPLC พบว่า เชื้อ *Pisolithus albus* สร้าง IAA มากที่สุด 33.68±0.98 μg/ml ตามมาด้วย *Phlebopus portentosus* (20.45±1.13 μg/ml)

และ *Astraeus odoratus* (15.93±1.03 μg/ml) ส่วน *Scleroderma sinnamariense* สร้าง IAA น้อยที่สุด คือ 12.84±1.32 μg/ml

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA พบว่า เชื้อราเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่ทดสอบคือ 25-35 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียลเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับทุกชนิดเชื้อราที่ทดสอบ (ภาพ 19ก, 19ข) โดย *P. albus* สร้าง IAA มากที่สุด 33.75±0.78 μg/ml

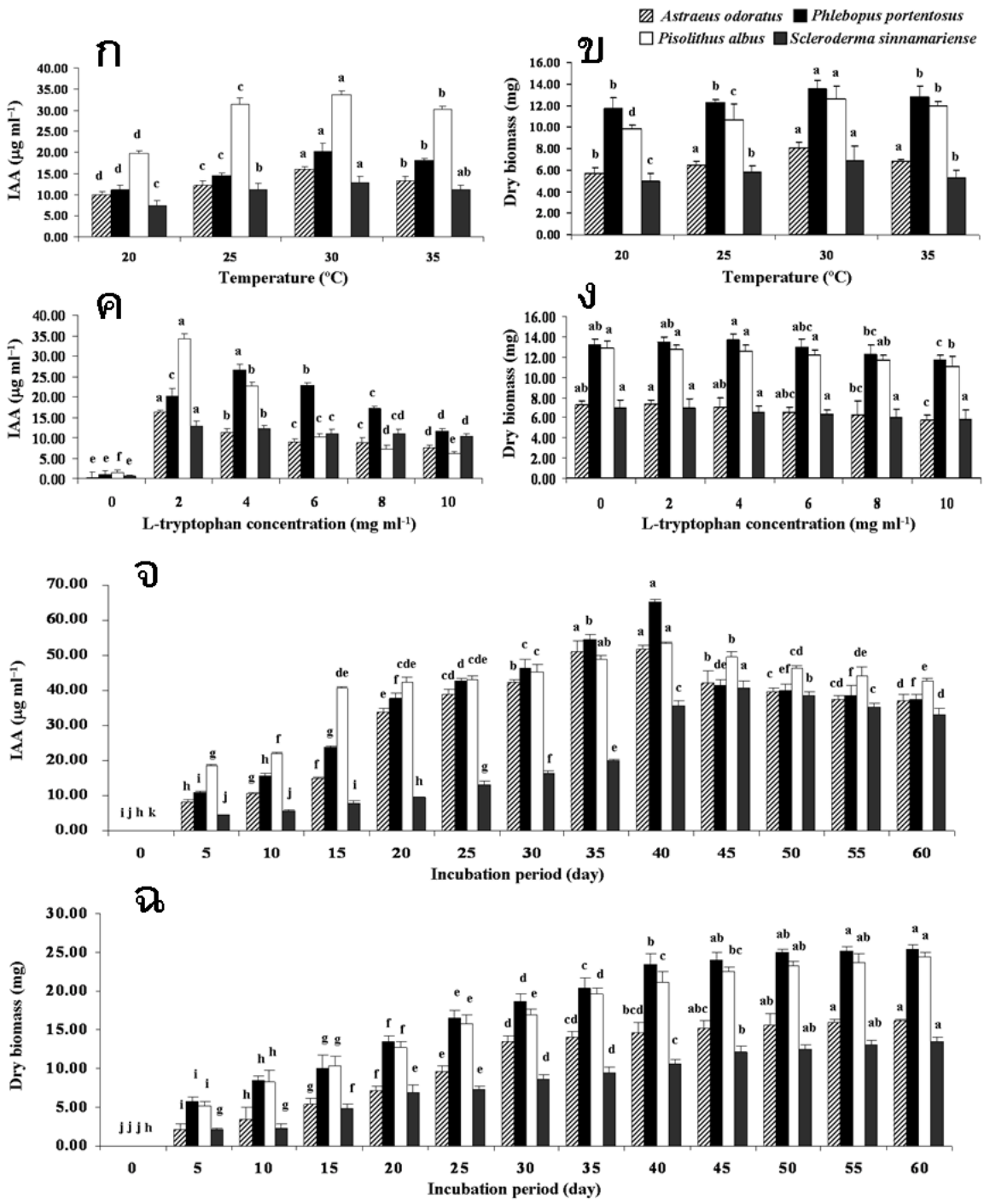
ปริมาณความเข้มข้นของ L-tryptophan มีผลต่อการสร้าง IAA พบว่า ความเข้มข้นที่ 2 mg/ml เหมาะสมสำหรับ *Astraeus odoratus*, *Pisolithus albus* และ *Scleroderma sinnamariense* ส่วน *Phlebopus portentosus* สร้าง IAA มากที่สุดที่ความเข้มข้น L-tryptophan เท่ากับ 4 mg/ml (ภาพ 19ค, 19ง)

ผลของการบ่มแสดงให้เห็นว่าเชื้อราทั้ง 4 ชนิดสร้าง IAA ในช่วงการเจริญ stationary phase และผลิตน้องลง (ภาพ 19จ, 19ฉ) พบว่าเชื้อ *Phlebopus portentosus* สร้าง IAA มากที่สุด คือ 65.29±1.17 μg/ml หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 40 วัน

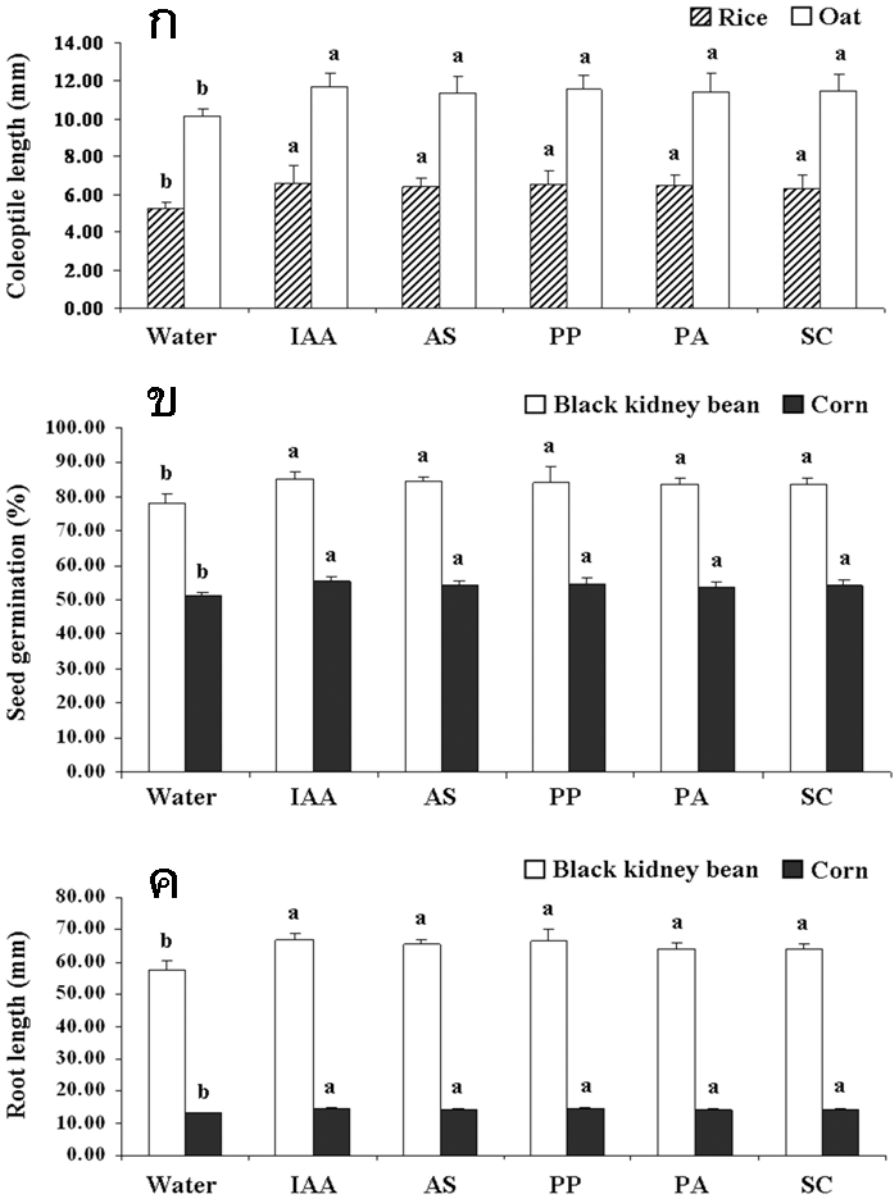
การทดสอบความสามารถของ IAA ที่เชื้อราผลิตขึ้นพบว่า สามารถเร่งการยืดยาว Coleoptile ของข้าวและข้าวโอ๊ต โดยไม่ต่างแบบมีนัยสำคัญกับสารมาตรฐาน IAA (ภาพ 20ก) และสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกและความยาวรากของถั่วดำและข้าวโพดได้ (ภาพ 20ข, 20ค)

ผลการทดลองที่ 5 การละลายโลหะที่เป็นพิษในรูปแร่ธาตุที่ไม่ละลายน้ำ และความทนทานต่อโลหะ

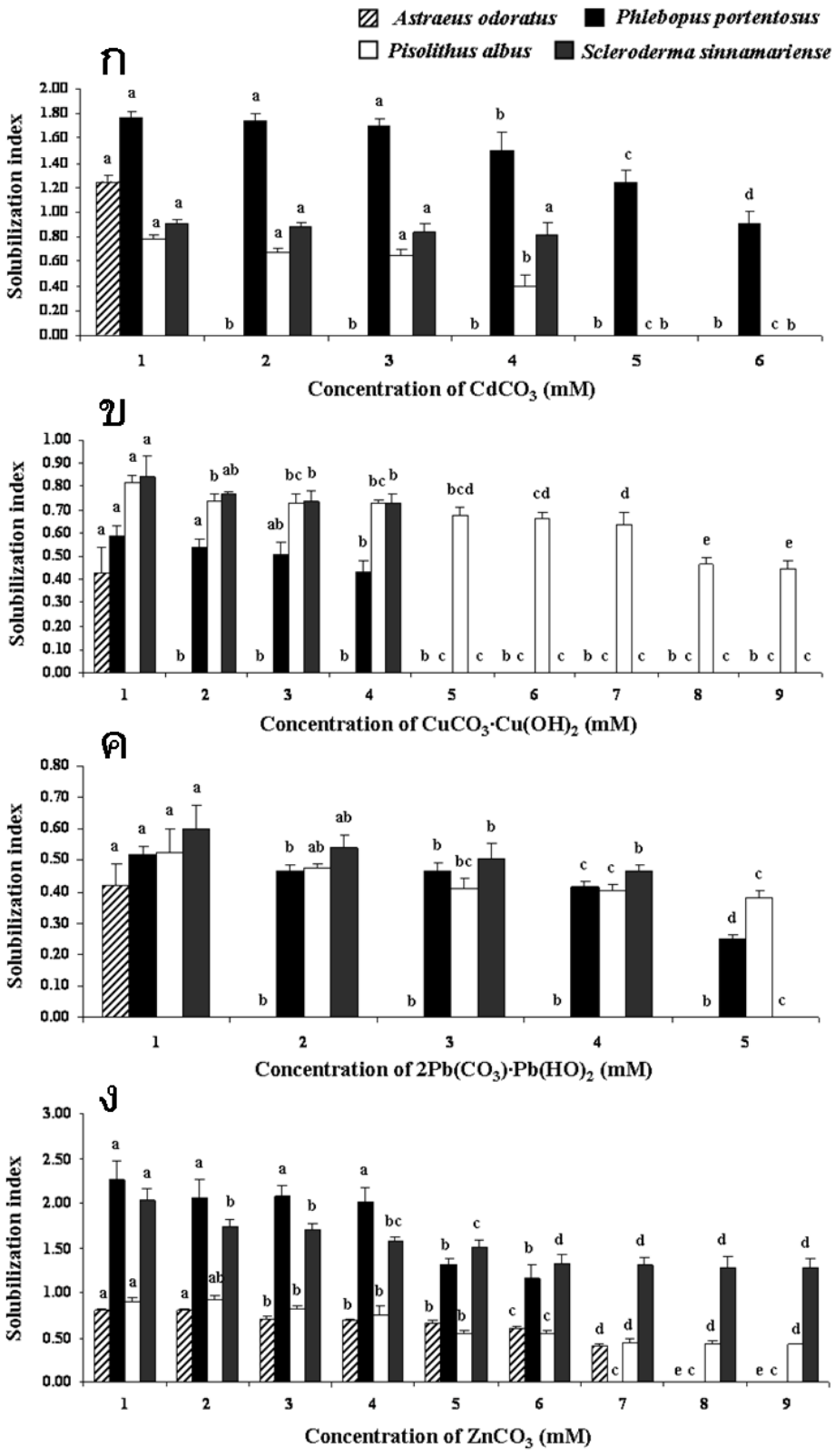
การทดลองพบว่าเชื้อสามารถละลายโลหะที่เป็นพิษในรูปแร่ธาตุที่ไม่ละลายน้ำได้ทั้งอยู่ในรูปการละลายรอบโคโลนีและใต้โคโลนี โดยแตกต่างกันในแต่ละชนิดของเชื้อราและชนิดของโลหะ พบว่า ค่า Solubilization index และ Tolerance index แตกต่างกันในแต่ละชนิดของเชื้อราและชนิดของโลหะ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโลหะมาขึ้น Solubilization index และ Tolerance index มีค่าลดลง (ภาพ 21, 22)



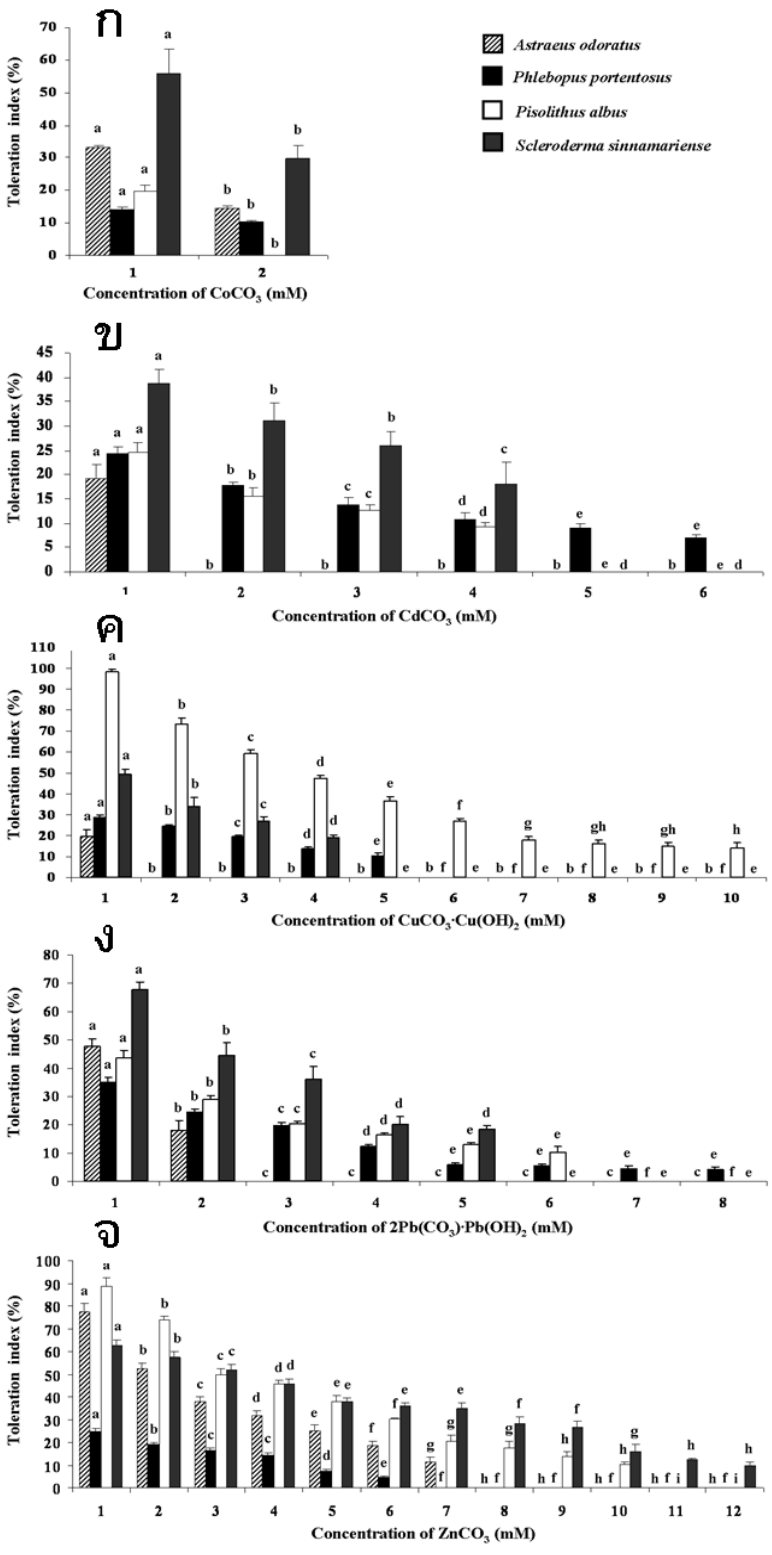
ภาพ 19 สภาวะเหมาะสมต่อการสร้าง IAA ของเชื้อทดสอบ



ภาพ 20 การทดสอบความสามารถของ IAA ที่ผลิตจากเชื้อราในการส่งเสริมการเจริญของพืช



ภาพ 21 ค่า Solubilization index ของเชื้อราที่ทดสอบ



ภาพ 22 ค่า Tolerance index ของเชื้อราที่ทดสอบ

วิจารณ์ผลการการทดลอง

จาการศึกษาพบว่าภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยมีความหลากหลายของเห็ดกลุ่มเอคโตไมคอร์ไรซาและซาโพรบ ในการศึกษาการเปรียบเทียบปริมาณของไอโซโทปคาร์บอน ($\delta^{13}C$) และไนโตรเจน ($\delta^{15}N$) ของเห็ดกลุ่มเอคโตไมคอร์ไรซาและกลุ่มซาโพรบพบว่าปริมาณมีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณเฉลี่ยคาร์บอนไอโซโทปของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซามีปริมาณน้อยกว่าเห็ดซาโพรบ และปริมาณเฉลี่ยไนโตรเจนไอโซโทปของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซามีปริมาณมากกว่าเห็ดซาโพรบ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาปริมาณไอโซโทปทั้งสองในเห็ดสองกลุ่มนี้ (Hart et al. 2006; Zeller et al. 2007; Mayor et al. 2009; Hasselquist et al. 2011; Hou et al. 2012). แหล่งที่มาของคาร์บอนในเห็ดกลุ่มเอคโตไมคอร์ซาได้มาจากการสังเคาระห์แสงของพืช แต่ในเห็ดกลุ่มซาโพรบได้มาจากสับสเตรทที่เจริญ เช่น ไม้ กิ่งไม้หรือใบไม้ ส่งผลให้เกิดความแตกต่างกัน (Hobbie et al. 2001; 2005) ปริมาณไอโซโทปที่สูงในเห็ดกลุ่มเอคโตไมคอร์ไรซานั้นตามการศึกษาก่อนหน้านี้อาจเป็นผลมาจากการส่งผ่านไนโตรเจนระหว่างเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซากับพืชอาศัยโดยจะมีการกักเก็บในเห็ดมากกว่าที่จะส่งผ่านต่อพืชอาศัย ส่วนเห็ดซาโพรบได้ไนโตเจนจากสับสเตรทที่เจริญเท่านั้น (Hobbie et al. 2001, 2005; Kohzu et al. 1999; Taylor et al. 2003) โดยการตรวจสอบปริมาณไอโซโทปทั้งสองสามารถบ่งบอกสถานะของเห็ดชนิดต่างๆ ในระบบนิเวศได้

การยืนยันเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*) เห็ดตับเต่าดำ (*P*hlebopus *portentosus*) เห็ดกรวด (*Pisolithus albus*) และเห็ดลูกฝุ่น (*Scleroderma sinnamariense*) พบว่าเห็ดที่ใช้ในการทดลองจัดอยู่ในเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา กลุ่ม sclerodermatoid ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยเห็ดกลุ่มนี้มีการกระจายในหลากหลายในระบบนิเวศ (Binder and Hibbett 2006; Watling 2006) การทดลองพบว่าทั้งหมดสามารถผลิต IAA ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่าเชื้อเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถผลิต IAA โดยใช้ L-tryptophan เป็นตัวตั้งต้น และความสามารถขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา (Rudawska and Kieliszewska-Rokicka 1997; Karabaghli et al.1998) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการครั้งแรกในการผลิต IAA ของเชื้อทดสอบทั้ง 4 ชนิด

อุณหภูมิ ความเข้มข้นของ L-tryptophan และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยมีผลต่อการผลิต IAA และการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบ พบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเชื้อทดสอบทั้งหมดสามารถผลิต IAA และมีการเจริญของเชื้อได้ดีกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยการเปลี่ยนอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิต IAA รวมไปถึงการเจริญของเชื้อ (Khamna et al. 2010; Apine and Jadhav 2011) นอกจากนี้ความเข้มข้นของ L-tryptophan และระยะเวลาการเพาะเลี้ยง มีผลต่อการผลิต IAA ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยปริมาณการสร้างจะเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญ โดยพบปริมาณ IAA มากที่สุดเมื่อจุลินทรีย์เจริญในช่วง stationary phase และเมื่อผ่านระยะการเจริญนี้ปริมาณ IAA ที่สร้างจะลดลง (Khamna et al. 2010; Apine and Jadhav 2011; Chutima and Lumyong 2012) นอกจากนี้พบว่า IAA ที่เชื้อทดสอบสร้างขึ้นมีผลต่อการยืดยาวของ coleoptile ของข้าวและข้าวโอ๊ต รวมไปถึงการเพิ่มอัตราการงอกและเพิ่มความยาวรากของข้าวโพดและ

ถั่วดำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนนี้ที่พบว่า IAA ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย แอคติโนไมซีท และเชื้อราสามารถกระตุ้นการเจริญของพืชได้ (Hasan 2002; Ahmad et al. 2005; Khamna et al. 2010; Apine and Jadhav 2011; Chutima and Lumyong 2012)

ในระบบนิเวศของดิน เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทและความสำคัญในวัฏจักรการหมุนเวียนสารอาหารและธาตุอาหารต่างๆ (Gadd 2004) โดยเชื้อราเหล่านี้มีกลไกต่างๆ เช่นการละลายแร่ธาตุจากในรูปที่ไม่ละลาย การดูดซับ และการดูดซึม เป็นต้น การทดลองนี้พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อราที่ทดสอบสามารถละลายโลหะที่อยู่ในรูปแร่ธาตุที่ไม่ละลายได้ โดยความสามารถของการละลายนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะ ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อรา ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ (Gadd 2004; Machuca et al. 2007) และโลหะบางชนิดจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อราแต่ปกติต้องการในปริมาณที่น้อย แต่ถ้ามีปริมาณมากจะเป็นพิษและส่งผลต่อการเจริญของเชื้อราได้ โดยผลการทดลองนี้พบว่า โคบอล มีพิษต่อเชื้อราทั้งหมดอย่างรุนแรง แต่สังกะสีมีพิษต่อเชื้อราที่ทดสอบน้อยที่สุด โดยพบว่าความสามารถในการละลายโลหะและการทนต่อความพิษของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซามีความสำคัญต่อการเพิ่มความทนทานต่อพืชอาศัยที่เจริญในแหล่งปนเปื้อนของโลหะนั้นๆ โดยพืชที่มีเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาอยู่จะทนทานได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซา (Gadd 2004; Fomina et al. 2005; Machuca et al. 2007)

สรุปผลการทดลอง

ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยมีความหลากหลายของเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซาและเชื้อราซาโพรบ โดยปริมาณไอโซโทปเสถียรคาร์บอนในกลุ่มเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซามีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มเห็ดซาโพรบ แต่ปริมาณไอโซโทปเสถียรไนโตรเจนในกลุ่มเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซามีปริมาณมากกว่ากลุ่มเห็ดซาโพรบ

เชื้อบริสุทธิ์เห็ดเผาะ (*Astraeus odoratus*) เห็ดตับเต่าดำ (*Phlebopus portentosus*) เห็ดกรวด (*Pisolithus albus*) และเห็ดลูกฝุ่น (*Scleroderma sinnamariense*) สามารถผลิต IAA ในสภาวะห้องปฏิบัติการได้ โดย IAA ที่ผลิตนั้นสามารถส่งผลต่อการเจริญของพืชได้ นอกเหนือจากนี้เชื้อที่ใช้ทดสอลสามารถละลายโลหะที่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำได้ และสามารถทนทนทานต่อความเป็นของโลหะนั้นๆ ซึ่งความสามารถจะขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะและชนิดของเอราที่ใช้ในการทดสอบ

2. การศึกษาจุลินทรีย์เอนโดไฟท์

2.1 ศึกษาผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวในต้นแคนตาลูปในระดับโรงเรือน

การทดลองที่ 1 การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่จากพืชสมุนไพร และพืชตระกูลแตง

การแยกเชื้อเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพร และพืชตระกูลแตงในพื้นที่จังหวัดพะเยา โดยการนำตัวอย่างพืชจากชิ้นส่วนต่างๆ (ใบ กิ่ง ลำต้น และราก) จากพื้นที่จังหวัดพะเยาที่ต่างกันมาล้างด้วยน้ำสะอาด โดยผ่านน้ำไหล (running water) นาน 30 นาที จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ผิว 3 ขั้นตอน ด้วยวิธี (triple

surface sterilization) โดยขั้นตอนแรก นำชิ้นส่วนไปแช่ 70% alcohol นาน 1 นาที จากนั้นนำไปแช่ 2% sodium hypochlorite (NaOCl) นาน 3 นาที แล้วนำไปแช่ 95% alcohol นาน 30 วินาที จากนั้นนำไปวางบนกระดาษทิชชูซับให้แห้ง จากนั้นตัดชิ้นส่วนของพืชขนาดกว้าง × ยาว ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้มา วางบนอาหาร PDA ที่มีผสม rose bengal โดยวางชิ้นส่วนพืช 4 ชิ้นต่อจานอาหาร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25±2 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน นับจำนวนเชื้อราที่เกิดขึ้นแต่ละชิ้นเนื้อเยื่อพืช แล้วย้ายเชื้อราลงสู่อาหาร PDA โดยวิธี hypha tip isolation จากนั้นบ่มไว้จนกว่าจะได้เชื้อที่บริสุทธิ์และเก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ในอาหารวุ้นเอียง (PDA slant) stock culture เพื่อใช้ศึกษาและจำแนกบ่งบอกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้คู่มือ Arnold et al. (2000); Ellis (1971); Ellis (1976); Sutton (1980) และเทคนิคทางอณูชีวโมเลกูลเพื่อบ่งบอกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ จากนั้นนับจำนวนชิ้นของตัวอย่างที่มีเชื้อเจริญออกมาเพื่อนำมาหาค่า colonization rate (Taylor et al. 1999) คำนวณจากสูตร

$$\text{Colonization rate} = \frac{\text{total number of samples yielding. 1 isolated}}{\text{Total number of sample in that trial}} \times 100$$

การทดลองที่ 2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวแคนตาลูป และการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวในแคนตาลูป (Pathogenicity Test)

สำรวจและเก็บตัวอย่างแคนตาลูปแสดงอาการเหี่ยว จากนั้นนำมาแยกเชื้อโดยล้างให้สะอาด จากนั้นตัดชิ้นพืชบริเวณแผลให้มีขนาดประมาณ 3 ×3 มม. นำไปฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite (NaOCl) ความเข้มข้น 1% นาน 3-5 นาที จากนั้นล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วและนำไปวางบนจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อนาน 1-2 สัปดาห์ จากนั้นแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยวิธี hypha tip isolation method และนำไปศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะ ขนาด และสีของสปอร์ โดยใช้คู่มือของ Ellis (1972 และ 1976)

จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้ไปการทดสอบการเกิดโรคกับต้นกล้าแคนตาลูป (ภาพ 23) โดยนำต้นกล้าแคนตาลูปจุ่มในสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ความเข้มข้น 1.0×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นนำต้นกล้านำไปปลูกลงในดินที่เตรียมไว้ บันทึกต้นกล้าที่แสดงอาการ

ภาพ 23 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวในแคนตาลูป

การทดลองที่ 3 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคในแคนตาลูป (dual culture test)

คัดเลือกเชื้อเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค โดยนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมดจากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ร่วมกับเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture technique (Arnold *et al*., 2000) โดยวางเชื้อราเอนไฟท์กับเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของแคนตาลูป *Fusarium oxysporum* ให้ห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร โดยที่วางเชื้อราเอนไฟท์กับเชื้อสาเหตุโรค *F. oxysporum* ไว้ตรงข้าม ในแนวเส้นผ่านศูนย์กลางของจานอาหาร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน ทำการวัดรัศมีการเจริญของราสาเหตุโรคในจานอาหารทดลองและจานควบคุม นำมาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากนั้นคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของแคนตาลูป มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้หนังสือ Ellis (1971), Ellis (1976) และ Sutton (1980) เพื่อบ่งบอกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ คำนวณจากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

เมื่อ A = รัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานชุดควบคุม

B = รัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานชุดทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ กรรมวิธี คือ เชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชแต่ละชนิด วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 (analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์ด้วยวิธีความแตกต่างที่มีนัยสำคัญน้อยที่สุด (Fisher's Least – Significant Different: LSD)

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวของแคนตาลูปในระดับโรงเรือน

การเพาะกล้า

นำเมล็ดพันธุ์แคนตาลูปมาแช่ในน้ำอุ่นนาน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาห่มด้วยผ้าชุบน้ำและปิดผ้ารักษาความชื้นไว้ประมาณ 1-2 วัน เมื่อเมล็ดเริ่มแทงรากออกมา จึงนำไปหยอดในถาดเพาะชำหลุมละ 1-2 เมล็ด โดยใช้ขุยมะพร้าวที่ร่อนเอาเส้นใยออกไปแล้ว ผสมกับปุ๋ยคอกและทรายหยาบที่ร่อนเอาเม็ดกรวดออกไปแล้ว ในอัตรา 1:1:1 โดยปริมาตร (ภาพ 24)

การเตรียมเชื้อราเอนโดไฟท์

ทำการเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ชนิด ในอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากนั้นทำการขูดเส้นใยผสมในน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 1×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ได้เทใส่ลงโคนต้นแคนตาลูปในแต่ละกรรมวิธี ต้นละ 15 มิลลิลิตร โดยทำ

การปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ 2 ครั้ง ได้แก่ครั้งที่ 1 ต้นแคนตาลูปอายุ 1 สัปดาห์ และครั้งที่ 2 ต้นแคนตาลูกมีอายุ 4 สัปดาห์ (ภาพ 24)

ภาพ 24 การเตรียมต้นกล้าแคนตาลูกและการปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ลงในต้นแคนตาลูป (ก = การเตรียมเชื้อราเอนโดไฟท์, ข = การเพาะกล้าแคนตาลูป, ค-จ = การปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์)

วางแผนการทดลองแบบสุมสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD จำนวนทั้งหมด 6 กรรมวิธีๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธี 1 ชุดควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อ *F. oxysporum*

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อ *F. solani* (EU)

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อ *F. solani* (DU)

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อ *F. solani* (MY)

กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อ *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY)

บันทึกผลการทดลอง

ทำการเก็บผลการเจริญเติบโตของต้นแคนตาลูปทุกๆ สัปดาห์ ได้แก่ ความสูง จำนวนใบ และจำนวนกิ่ง

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวของแคนตาลูปในระดับแปลงทดลอง

เพาะต้นกล้า และเตรียมสารละลายเชื้อราเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4 จากนั้นนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ได้เทใส่ลงโคนต้นแคนตาลูปในแต่ละกรรมวิธี ต้นละ 15 มิลลิลิตร โดยทำการปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ 2 ครั้ง ได้แก่ครั้งที่ 1 ต้นแคนตาลูปอายุ 1 สัปดาห์ และครั้งที่ 2 ต้นแคนตาลูกมีอายุ 4 สัปดาห์

วางแผนการทดลองแบบสุมสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD จำนวนทั้งหมด 9 กรรมวิธีๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อ *F. oxysporum*
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อ *F. solani* (EU)
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อ *F. solani* (DU)
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อ *F. solani* (MY)
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อ *F. solani* (EU) + *F.oxysporum*
กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อ *F. solani* (DU) + *F.oxysporum*
กรรมวิธีที่ 8 ปลูกเชื้อ *F. solani* (MY) + *F.oxysporum*
กรรมวิธีที่ 9 ปลูกเชื้อ *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F. oxysporum*

การบันทึกผลการทดลอง

1) **เจริญเติบโตทางลำต้นและผลผลิต** ได้แก่ ความยาวลำต้น จำนวนใบ จำนวนกิ่ง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และน้ำหนักผล
2) **คุณภาพทางเคมีของผลแคนตาลูป** ได้แก่ ปริมาณวิตามินซี (L-Ascorbic acid, LAA)และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solids, TSS)
3) **การประเมินดัชนีความรุนแรงการเกิดโรค**

ทำการประเมินอาการการเกิดโรคของต้นแคนตาลูป โดยมีเกณฑ์คะแนนความรุนแรงการเกิดโรค 0-4 ตามวิธีของ Abdalla (1986) และ Aegerter *et al*. (2000)

0 คือ ไม่เกิดโรค
1 คือ แสดงอาการหี่ยว 1-25 เปอร์เซ็นต์
2 คือ แสดงอาการหี่ยว 26-50 เปอร์เซ็นต์
3 คือ แสดงอาการหี่ยว 51-75 เปอร์เซ็นต์
4 คือ แสดงอาการหี่ยว 76-100 เปอร์เซ็นต์

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกรรมวิธีด้วย Duncan's Multiple-Range Test (DMRT)

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่จากพืชสมุนไพร และพืชตระกูลแตง

การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากชิ้นส่วน ใบ กิ่ง ลำต้น และราก จากพืชตัวอย่างทั้งหมด 29 ชนิด พบเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวนทั้งหมด 429 ไอโซเลท ซึ่งพืชตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้

มากที่สุด ได้แก่ แคนตาลูป 176 ไอโซเลท รองลงมา คือ หางไหล จำนวน 29 ไอโซเลท, รัง จำนวน 19 ไอโซเลท และทับทิม จำนวน 18 ไอโซเลท ตามลำดับ และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่พบเชื้อรามากที่สุด คือ ส่วนใบ โดยพบเชื้อราเอนโดไฟท์คิดเป็นร้อยละ 47.08 ของจำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมด รองลงมา คือ ราก กิ่ง และลำต้น โดยพบเชื้อราเอนโดไฟท์ คิดเป็นร้อยละ 18.88, 17.48 และ 16.55 ตามลำดับ (ตาราง 12) จากนั้นนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมดมาจัดจำแนกกลุ่มชนิด ซึ่งสามารถจัดจำแนกกลุ่มชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ ทั้งหมด 15 Taxa ประกอบด้วย *Phomopsis* spp., *Xylaria* spp., *Guignardia* spp., *Phoma* spp., *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Nodulisporium* spp., *Muscodor* spp., *Phyllosticta* spp., *Penicillium* spp., *Talalomyces* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Memnoniella* spp., Mycelia sterilia ssp. และ Coelomycetes ตามลำดับ โดยเชื้อราที่พบมากที่สุด 23.35% ได้แก่เชื้อราในกลุ่ม Mycelia sterilia จำนวน 63 ไอโซเลท รองลงมา 20.37% ได้แก่กลุ่ม *Phomopsis* spp. จำนวน 55 ไอโซเลท และเชื้อราในกลุ่ม *Xylaria* spp. 15.55% จำนวน 42 ไอโซเลท และยังไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้จำนวน 176 ไอโซเลท (ตาราง 13)

ตาราง 12 แสดงจำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชตัวอย่าง 29 ชนิด จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ

ลำดับที่	ชนิดพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์				รวม (ไอโซเลท)
			ลำต้น	กิ่ง	ใบ	ราก	
1	ข่า	*Alpinia galanga* (L.) Willd.	1	-	4	-	5
2	ขี้เหล็ก	*Senna siamea* (Lam.) Irwin & Barneby.	-	3	1	-	4
3	ชะพลู	*Piper sarmentosum* Roxb.	2	-	5	-	7
4	แคนตาลูป	*Cucumis melo* L. var. *cantaloupensis*	43	-	96	37	176
5	ชะมวง	*Garcinia cowa* Roxb.	-	3	2	-	5
6	ดีปลี	*Piper retrofractum* Vahl.	4	-	1	5	10
7	ทับทิม	*Punica granatum* L.	-	4	7	7	18
8	บุนนาค	*Mesua ferrea* L.	-	2	3	-	5
9	ประดู่	*Pterocarpus macrocarpus* Kurz	-	5	5	3	13
10	ปีบ	*Millingtonia hortensis* Linn.f.	-	4	4	-	8
11	ผักแพรว	*Polygonum odoratum* Lour.	5	-	3	4	12
12	เพกา	*Oroxylum indicum* (L.) Kurz.	-	3	4	3	10
13	ฟ้าทะลายโจร	*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.ex Nees.	3	-	4	2	9
14	มะกรูด	*Citrus hystrix* DC.	-	7	3	2	12
15	มะคำดีควาย	*Sapindus rarak* A.DC.	-	6	4	-	10
16	รัง	*Shorea siamensis* Miq.	-	6	8	5	19
17	ราชพฤกษ์	*Cassia fistula* L.	-	4	2	-	6
18	ลำไย	*Dimocarpus longan* Lour.	1	7	4	-	12
19	สะเดา	*Azadirachta indica* Juss. var. Siamensis Valeton.	-	3	3	-	6
20	สาบเสือ	*Eupotorium odortum* L.	4	-	5	5	14
21	เสลา	*Lagerstroemia loudoni* Teijsm. & Binn.	-	2	2	-	4
22	แสยก	*Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit.	3	-	1	3	7
23	หญ้าถอดปล้อง	*Equisetum debile* Roxb.ex Vauch.	1	-	-	-	1
24	หนอนตายหยาก	*Stemona tuberosa* Lour.	4	-	6	2	12

ลำดับที่	ชนิดพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์				รวม (ไอโซเลท)
25	อุตพิษ	*Typhonium trilobatum* Schott.	-	-	-	1	1
26	หนุมานนั่งแท่น	*Jatropha podagrica* Hook.	-	-	1	1	2
27	หางไหล	*Derris elliptica* (Roxb.) Benth.	-	10	18	1	29
28	อบเชย	*Cinnamomum bejolghotha* (Buch-Ham.)Sweet.	-	3	6	-	9
29	ฮ่อสะพายควาย	*Suregada multiflorum* Baill.	-	3	-	-	3
รวม			71	75	202	81	429
ร้อยละ			16.55	17.48	47.08	18.88	100

ตาราง 13 แสดงจำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ในแต่ละกลุ่มของเชื้อราที่พบในส่วนต่างๆ ของพืชตัวอย่าง

เชื้อรา	จำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากชิ้นส่วนพืช				รวม (ไอโซเลท)	เปอร์เซ็นต์ที่พบ
	ลำต้น	กิ่ง	ใบ	ราก		
Coelomycetes	-	-	-	2	2	0.74
Colletotrichum spp.	2	2	10	1	15	5.56
Fusarium spp.	1	2	7	-	10	3.70
Guignardia spp.	2	8	17	5	32	11.85
Memnoniella spp.	-	-	-	2	2	0.74
Muscodor spp.	-	2	4	1	7	2.59
Mycelia sterilia	2	19	34	8	63	23.35
Group						
Nodulisporium spp.	-	2	5	-	7	2.59
Penicillium spp.	-	2	3	-	5	1.85
Pestalotiopsis spp.	-	-	3	-	3	1.11
Phoma spp.	-	5	12	-	17	6.30
Phomopsis spp.	1	32	18	4	55	20.37
Phyllosticta spp.	-	-	6	-	6	2.22
Talalomyces spp.	-	-	4	-	4	1.48
Xylaria spp.	2	29	9	2	42	15.55
unidentified	43	-	96	37	176	39.46
รวม	53	103	230	60	446	100

การทดลองที่ 2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวแคนตาลูป และการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวในแคนตาลูป (Pathogenicity Test)

จากการนำต้นแคนตาลูปที่แสดงอาการเหี่ยวซึ่งลักษณะอาการที่ใบโดยแสดงอาการใบเหลืองและเหี่ยวเป็นบางใบก่อน อาการเหี่ยวลามไปที่ขั้วใบและเถาแตง ทำให้เถาแตงเหี่ยวตายทั้งต้นในเวลาอันรวดเร็ว เมื่อเหี่ยวมากๆ ผลจะเหี่ยวแห้งแล้วต้นพืชจะตาย (ภาพ 25)

เชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวในแคนตาลูปที่แยกได้คือเชื้อรา *F. oxysporum* จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อรามีลักษณะโคโลนีสีขาวด้านล่างของโคโลนีเป็นครีมปนขาว เส้นใยเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 14 วัน สร้างสปอร์ มีลักษณะคล้ายรูปพระจันทร์เสี้ยว (ภาพ 25)

ภาพ 25 อาการเหี่ยวและเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของแคนตาลูป (*F. oxysporum*)

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวในแคนตาลูป พบว่าหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวนาน 7 วัน พบว่าบริเวณที่ปลูกเชื้อการเกิดโรคมีอาการใบเริ่มเหลือง อาการจะลุกลามทำให้ต้นเหี่ยว และตายในที่สุด (ภาพ 26)

ภาพ 26 การแสดงอาการเหลืองหลังจากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *F. oxysporum*

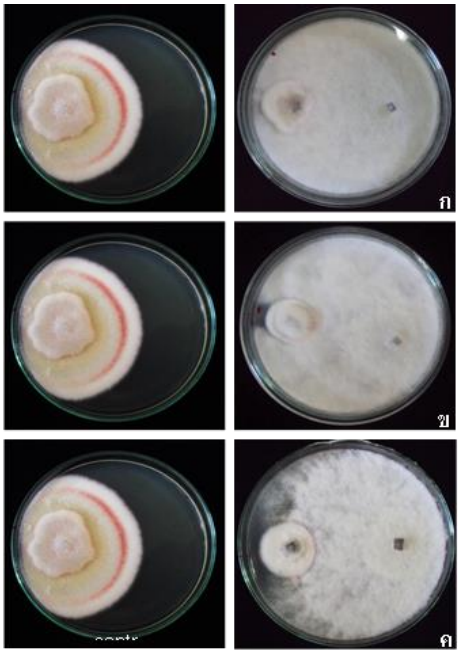
การทดลองที่ 3 การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคในแคนตาลูป (dual culture test)

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ 429 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของแคนตาลูป (*Fusarium oxysporum*) เชื้อราที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด 3 ไอโซเลท ได้แก่ *F. solani* (MY), *F. solani* (DU) และ *F. solani* (EU) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 82.33, 81.37 และ81.37 ตามลำดับ (ตาราง 14 ภาพ 27)

ตาราง 14 ผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวด้วยวิธี dual culture

เชื้อราเอนโดไฟท์	พืชอาศัย	ส่วนที่พบ	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง(1)
F. solani (MY)	Cantaloupe	ราก	82.33 ± 0.01[a]
F. solani (DU)	Burmese Rosewood	ราก	81.37 ± 0.01[a]
F. solani (EU)	Eucalyptus	ราก	80.56 ± 0.01[ab]
F-test			**
CV%			28.98

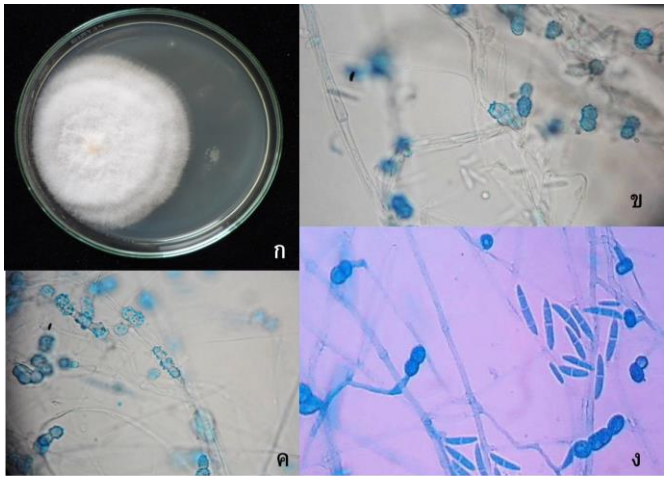
หมายเหตุ: (1) ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± SD ค่าเฉลี่ย (2) ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.01 วิเคราะห์ความแปรปรวนของโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LS



ภาพ 27 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุของโรคเหี่ยวในแคนตาลูป ทดสอบด้วยวิธี dual culture [ก= *F. solani* (MY) ข= *F. solani* (DU) และ ค= *F. solani* (EU)]

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเอนโดไฟท์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเอนโดไฟท์ พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ชนิด คือ เชื้อรา *Fusarium solani* ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA เมื่ออายุ 14 วัน สร้าง aerial mycelium สีขาว บริเวณด้านล่างโคโลนีสีเหลืองอ่อน เชื้อราสร้างไมโครโคนิเดียจำนวนมาก รูป oval-shaped และรูป kidney shape พบทั้งแบบที่เป็นเซลล์เดียว และแบบที่เป็นสองเซลล์ มีขนาดประมาณ 1.5-2.7 × 4.0-8.0 ไมโครเมตร มาโครโคนิเดียผนังหนา ผนังเซลล์ด้าน dorsal surface และ ventral surface ขนานกันตลอดทั้งความยาวของมาโครโคนิเดีย apical cell ปลายทู่ กลม basal cell รูป foot-shaped มี 3-4 septate ขนาด 4.0-5.0 × 39.0-46.0 ไมโครเมตร โคนิดิโอฟอร์เป็นแบบ monophialide ที่เป็นก้านเดี่ยว รูปร่างผอมยาว สร้างคลาไมโดสปอร์ทั้งแบบที่อยู่เดี่ยวๆ แบบอยู่เป็นคู่ และแบบสามเซลล์ ผนังขรุขระ (ภาพ 28)



ภาพ 28 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium solani* (ก = โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส, ข-ค = clamydospore และ ง = macroconidia)

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวของแคนตาลูปในระดับโรงเรือน

ความยาวลำต้นหลัก

จากผลการทดลองแคนตาลูปในแต่ละกรรมวิธีมีความยาวลำต้นเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งต้นแคนตาลูปมีอายุ 80 วัน พบว่าต้นแคนตาลูปมีความยาวลำต้นหลักมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) มีความยาวลำต้นหลักเฉลี่ยมากที่สุด คือ 102.60 เซนติเมตร รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 5) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (DU) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 4) มีความยาวลำต้นหลักเฉลี่ยเท่ากับ 99.60 และ 98.80 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตาราง 15 ภาพ 29)

จำนวนกิ่ง

จากการทดลองต้นแคนตาลูปในแต่ละกรรมวิธีมีจำนวนกิ่งเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งต้นแคนตาลูปมีอายุ 80 วัน พบว่าแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) มีจำนวนกิ่งมากที่สุดเฉลี่ยคือ 5.80 กิ่ง ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (DU) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 4) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 5) มีจำนวนกิ่งเฉลี่ยเท่ากับ 4.40 และ 3.60 กิ่ง ตามลำดับ (ตาราง 15)

จำนวนใบ

จากการทดลองต้นแคนตาลูปในแต่ละกรรมวิธีมีจำนวนใบเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งต้นแคนตาลูปมีอายุ 80 วัน พบว่าต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (DU) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 4)

มีจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด คือ 63.40 ใบ รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 5) มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 62.80 และ 49.40 ใบ ตามลำดับ (ตาราง 15)

น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้น

เมื่อต้นแคนตาลูปมีอายุ 80 วัน ทำการเก็บมาชั่งน้ำหนักสด และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) มีน้ำหนักเฉลี่ยสดมากกว่ากรรมวิธีอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 258.72 กรัม รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 3) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (DU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 4) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดเท่ากับ 209.80 และ 209.00 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 15)

สำหรับน้ำหนักแห้ง พบว่าต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยมากกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 46.70 กรัม รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 3) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (DU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 4) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งเท่ากับ 37.87 และ 37.72 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 15)

น้ำหนักผล

จากการทดลองต้นแคนตาลูปมีอายุ 80 วัน ทำการเก็บผลแคนตาลูปมาชั่งน้ำหนักสด พบว่าแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) มีน้ำหนักผลสดเฉลี่ยมากกว่ากรรมวิธีอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 348.66 กรัม รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (DU) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 4) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 3) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลเท่ากับ 305.00 และ 180.00 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 15)

Non inoculate (control) Inoculate *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY)

ภาพ 29 ผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการเจริญเติบโตของแคนตาลูปในระดับโรงเรือน

ตาราง 15 ผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการเจริญเติบโตของแคนตาลูปในระดับโรงเรือน

ชุดการทดลอง	ความยาวลำต้นหลัก (ซม.)	จำนวนกิ่ง/พืช	จำนวนใบ/พืช	น้ำหนักพืช (กรัม)		น้ำหนักผล (กรัม)
				สด	แห้ง	
Non inoculate (control)	98.52±16.04 *ab*	2.40±0.89 *cd*	37.60±9.71 *bc*	185.80±9.15 *c*	33.53±1.65 *c*	71.43±1.00 *g*
F. oxysporum	79.04±19.41 *b*	2.20±0.84 *d*	31.20±13.66 *c*	190.60±10.06 *c*	34.40±1.82 *c*	91.33±1.53 *f*
F. solani (EU) + *F. oxysporum*	83.00±9.95 *ab*	2.80±0.84 *cd*	36.80±9.98 *bc*	209.80±7.76 *b*	37.87±1.40 *b*	180.00±5.00 *c*
F. solani (DU) + *F. oxysporum*	98.80±11.43 *ab*	4.40±0.55 *b*	63.40±6.84 *a*	209.00±12.47 *b*	37.72±2.25 *b*	305.00±5.00 *b*
F. solani (MY) + *F. oxysporum*	99.60±13.39 *ab*	3.60±0.55 *bc*	49.40±2.88 *ab*	197.60±8.56 *ab*	35.67±1.55 *bc*	110.77±3.67 *d*
F. solani (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY)+ *F. oxysporum*	102.60±21.04 *a*	5.80±1.48 *a*	62.80±14.48 *a*	258.72±12.53 *a*	46.70±2.26 *a*	348.66±8.08 *a*
F-test	*	**	**	**	**	**
CV (%)	16.81	25.83	22.13	4.91	4.92	2.54

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$; Duncan's multiple range test

คุณภาพทางเคมีของผลแคนตาลูป

1) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำ (Total soluble solids; TSS)

เมื่อแคนตาลูปมีอายุ 80 วัน ทำการเก็บผลแคนตาลูปมาวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำ พบว่าผลแคนตาลูปในกรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) + *F. oxysporum* มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำเฉลี่ยมากกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 8.30 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (DU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 4) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) มีค่าเฉลี่ยปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำเท่ากับ 7.83 และ 6.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 16)

2) ปริมาณวิตามินซี (L-Ascorbic acid; LAA)

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในรูปของ L-Ascorbic acid (LAA) ในผลแคนตาลูปที่อายุ 80 วัน พบว่า ผลแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 2) มีค่าเฉลี่ยของ LAA มากที่สุด คือ 6.66 มิลลิกรัม/ 100 กรัม รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 3) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกไม่ปลูกเชื้อรา (กรรมวิธีที่ 1) มีค่าเฉลี่ยของ LAAเท่ากับ 6.05 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 16)

ตาราง 16 ผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อคุณภาพทางเคมีของผลแคนตาลูปในระดับโรงเรือน

ชุดการทดลอง	TSS (%)	LAA (mg/100g)
Non inoculate (control)	4.50±0.35 *e*	6.05±1.05 *ab*
F. oxysporum	5.06±0.06 *d*	6.66±2.78 *a*
F. solani (EU) + *F. oxysporum*	5.10±0.00 *d*	6.05±1.05 *ab*
F. solani (DU) + *F. oxysporum*	7.83±0.15 *b*	4.84±1.05 *ab*
F. solani (MY) + *F. oxysporum*	8.30±0.00 *a*	3.64±0.00 *b*
F. solani (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F. oxysporum*	6.60±0.00 *c*	3.64±0.00 *b*
F-test	**	*
CV (%)	2.48	26.28

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$; Duncan's multiple range test

ความรุนแรงการเกิดโรค

จากการประเมินความรุนแรงการเกิดโรคเหี่ยวต้นแคนตาลูป พบว่าในวันที่ 80 ต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 2) มีความรุนแรงของโรคมากที่สุด และมากกว่ากรรมวิธีอื่นๆ อย่างมีนียสำคัญทางสถิติ คือ 4.00 รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ไม่ปลูกเชื้อรา (กรรมวิธีที่ 1) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 3) มีความรุนแรงเกิดโรคเท่ากับ 3.20

และ 3.00 ตามลำดับ ในขณะที่ต้นแคนตาลูปที่ทำการปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ พบว่ามีการเกิดโรคน้อยกว่าต้นแคนตาลูปที่ไม่ปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ โดยต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) มีคะแนนการเกิดโรคน้อยที่สุด คือ 1.60 รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 5) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (DU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 4) มีคะแนนการเกิดโรคเท่ากับ 2.00 และ 2.60 ตามลำดับ (ตาราง 17)

ตาราง 17 ผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการเกิดโรคของแคนตาลูปในระดับโรงเรือน

ชุดการทดลอง	Disease severity index (DSI)	
	Days after transplanting	
	60	80
Non inoculate (control)	2.60±0.55 *b*	3.20±0.84 *ab*
F. oxysporum	3.40±0.55 *a*	4.00±0.71 *a*
F. solani (EU) + *F. oxysporum*	2.40±0.55 *b*	3.00±0.71 *abc*
F. solani (DU) + *F. oxysporum*	1.80±0.84 *bc*	2.60±0.55 *bc*
F. solani (MY) + *F. oxysporum*	1.40±0.55 *c*	2.00±1.00 *cd*
F. solani (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F. oxysporum*	1.40±0.55 *c*	1.60±0.55 *d*
F-test	**	**
CV (%)	27.96	33.39

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$; Duncan's multiple range test

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการเจริญเติบโตและการยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวของแคนตาลูปในระดับแปลงทดลอง

ความยาวลำต้นหลัก

จากผลการทดลองแคนตาลูปในแต่ละกรรมวิธีมีความยาวลำต้น พบว่าต้นแคนตาลูปที่ปลูกด้วยเชื้อรา *F.solani* (EU) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) มีค่าเฉลี่ยความยาวลำต้นหลักมากที่สุด คือ 145.83 เซนติเมตร รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F.solani* (MY) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 8) มีค่าเฉลี่ยความยาวลำต้นหลักเท่ากับ 113.52 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตาราง 18)

จำนวนกิ่ง

จำนวนกิ่งต้นแคนตาลูปในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกัน โดยต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 2) มีจำนวนกิ่งเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2.29 กิ่ง มากที่สุด รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F.solani* (DU) + *F.oxysporum* (กรรมวิธีที่ 7) มีจำนวนกิ่งเฉลี่ยเท่ากับ 2.06 กิ่ง (ตาราง 18)

จำนวนใบ

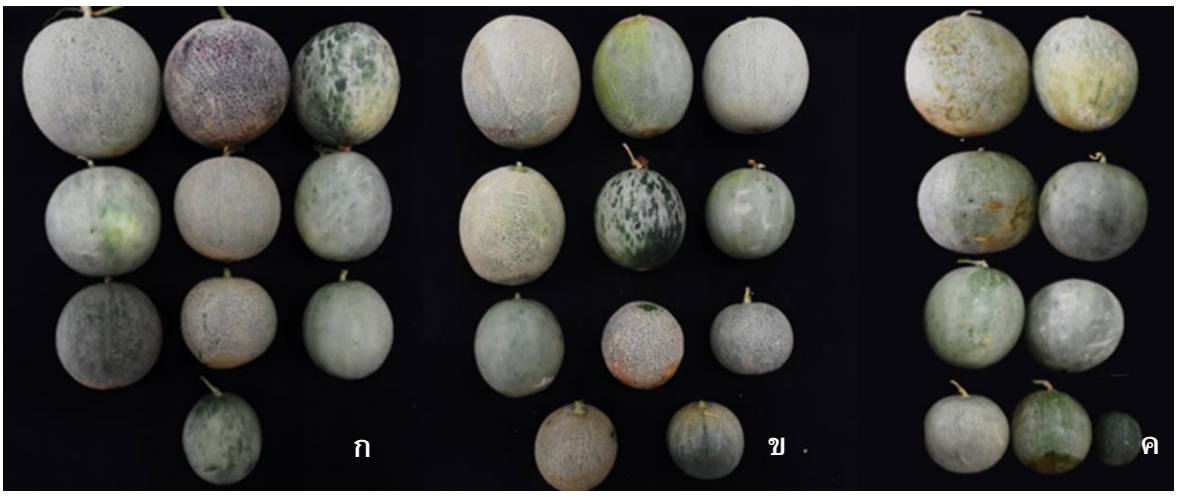
จำนวนใบต้นแคนตาลูปมีไม่ความแตกต่างกัน โดยต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 8) มีจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด คือ 51.20 ใบ รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) (กรรมวิธีที่ 5) มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 51.20 ใบ (ตาราง 18)

น้ำหนักแห้งของลำต้น

ต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยมากที่สุด คือ 32.07 กรัม รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 8) มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยเท่ากับ 26.07 กรัม (ตาราง 18)

น้ำหนักผล

จากการทดลองต้นแคนตาลูปพบว่า บางผลผลิตยังไม่สุกแก่มีความจำเป็นต้องนำมาวิเคราะห์ เนื่องจากต้นของแคนตาลูปเกิดการแห้งตายไม่สามารถเลี้ยงผลผลิตต่อไป และเกิดการมีแมลงเข้าทำลาย ดังนั้นทำการเก็บผลแคนตาลูปมาชั่งน้ำหนักสด พบว่าน้ำหนักผลแคนตาลูปในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) (กรรมวิธีที่ 5) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลมากที่สุด คือ 423.37 กรัม รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 8) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลเท่ากับ 392.92 และ 387.91 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 18 ภาพ 30)



ภาพ 30 แสดงผลผลิตที่ได้จากกรรมวิธีที่มีผลผลิตสูงสุด
ก. ต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY)
ข. ต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) + *F. oxysporum*
ค. ต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. oxysporum*

ตาราง 18 แสดงการเจริญเติบโตของต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ในระดับแปลงทดลอง

ชุดการทดลอง	ความยาวลำต้นหลัก (ซม.)	จำนวนกิ่ง/พืช	จำนวนใบ/พืช	น้ำหนักพืช (กรัม) แห้ง	น้ำหนักผล (กรัม)
Non inoculate (control)	102.58±48.31 ab	1.27±0.32	46.07±27.75	24.39±1.89 ab	325.70±158.51
F. oxysporum	76.67±8.19 b	2.29±0.46	46.07±27.75	20.84±7.06 b	328.69±83.48
F. solani (EU)	108.97± 39.48 ab	1.81±0.57	46.07±27.75	24.60±0.89 ab	329.10±144.52
F. solani (DU	80.83±31.47 b	1.74±0.66	46.07±27.75	21.51±2.05 b	263.75±17.32
F. solani (MY)	75.17±29.60 b	2.00±0.22	51.20±16.75	23.83±3.22 ab	423.37±60.77
F. solani (EU) + *F. oxysporum*	145.83±39.51 ab	1.90±0.46	44.57±21.03	32.07±0.81 a	387.91±179.27
F. solani (DU) + *F. oxysporum*	91.38±20.75 b	2.06±0.09	49.45±8.15	21.70±1.29 ab	334.20±122.94
F. solani (MY) + *F. oxysporum*	113.52±7.07 ab	1.57±0.42	56.36±17.25	26.70±6.92 ab	392.92±107.19
F. solani (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY)+ *F. oxysporum*	100.14±11.54 ab	1.86±1.15	44.74±14.46	23.49±4.60 ab	347.05±266.11
F-test	*	ns	ns	*	ns
CV (%)	3.42	3.40	4.09	2.67	4.72

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$; Duncan's multiple range test

คุณภาพทางเคมีของผลแคนตาลูป

1) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำ (Total soluble solids; TSS)

ทำการเก็บผลแคนตาลูปมาวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำ พบว่าผลแคนตาลูปในแต่ละกรรมวิธีมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ผลแคนตาลูปที่เป็นชุดควบคุม (กรรมวิธีที่ 1) มีค่าเฉลี่ยปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำมากที่สุด คือ 5.46 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 2) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (DU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 7) มีค่าเฉลี่ยปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำเท่ากับ 5.42 และ 5.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 19)

2) ปริมาณวิตามินซี (L-Ascorbic acid; LAA)

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในรูปของ L-Ascorbic acid (LAA) ในผลแคนตาลูป พบว่าผลแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 6) มีค่าเฉลี่ย LAA มากที่สุด คือ 14.83 มิลลิกรัม/ 100 กรัม รองลงมาคือต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (EU) (กรรมวิธีที่ 3) และต้นแคนตาลูปที่ปลูกเชื้อรา *F. solani* (MY) + *F. oxysporum* (กรรมวิธีที่ 8) มีค่าเฉลี่ยของ LAA เท่ากับ 19.58 และ 18.23 มิลลิกรัม/ 100 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 19)

ตาราง 19 ผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อคุณภาพทางเคมีของผลแคนตาลูปในระดับแปลงทดลอง

ชุดการทดลอง	TSS (%)	LAA (mg/100g)
Non inoculate (control)	5.46±2.70	15.98±3.50 bc
F. oxysporum	5.42±2.10	10.58±0.32 c
F. solani (EU)	5.29±1.79	19.58±2.23 abc
F. solani (DU	4.79±2.20	32.63±22.59 ab
F. solani (MY)	3.63±1.82	10.80±2.55 c
F. solani (EU) + *F. oxysporum*	4.50±1.42	17.33±0.95 abc
F. solani (DU) + *F. oxysporum*	5.38±3.44	37.58±5.41 a
F. solani (MY) + *F. oxysporum*	4.58±1.16	18.23±0.32 abc
F. solani (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F. oxysporum*	4.04±2.95	14.18±7.95 bc
F-test	ns	*
CV (%)	7.23	4.78

ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญที่ $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$; Duncan's multiple range test

วิจารณ์ผลการการทดลอง

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Fusarium* sp. โดยวิธี dual culture จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อราที่แยกได้ ทั้งหมด 497 ไอโซเลท ซึ่งมีเชื้อราอยู่ 3 ชนิด ที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ ได้แก่ *F. solani* (MY), *F. solani* (DU) และ *F. solani* (EU) ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ จิตรา และเลขา (2549) ผลการทดสอบความสามารถของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในหห้องปฏิบัติการพบว่าราเอนโดไฟท์ที่ไม่สร้างสปอร์ 5 ชนิด และ รา *Pestalotiopsis* 1 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium* sp. แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Pythium aphanidermatum, P. deliense, P. vexans* และ *Rhizoctonia solani*

การทดสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการเจริญเติบโตและการควบคุมโรคของแคนตาลูปในระดับโรงเรือน พบว่ากรรมวิธีที่ปลูก *F. solani* (EU) + *F. solani* (DU) + *F. solani* (MY) + *F. oxysporum* มีการเจริญเติบโตดีกว่าชุดควบคุม และมีการเกิดโรคน้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อราเอนโดไฟท์สามารถผลิตฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโต และช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (Fisher et al.1984; Petrini 1986) ในขณะที่การทดลองในระดับแปลงทดลองให้ผลไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ไม่สามารถควบคุมได้ เช่นการระบาดของแมลงวันทอง ส่งผลให้ต้นแคนตาลูปตาย ผลเน่า

สรุปผลการการทดลอง

เชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ *F. solani* (EU), *F. solani* (DU) และ *F. solani* (MY) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของแคนตาลูป (*F. oxysporum*) ได้โดยวิธี dual culture โดยมีกลไกเป็นแบบแข่งขันแก่งแย่งพื้นที่ และเมื่อนำไปทดสอบการควบคุมโรคในระดับโรงเรือน และแปลงทดลอง พบว่าการใช้เชื้อราทั้ง 3 ชนิด ร่วมกันสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญ และยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวในระดับโรงเรือนได้ ในขณะที่ในระดับแปลงทดลองให้ผลไม่แตกต่างกัน

2.2 การศึกษาจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพร

2.2.1 คัดแยกราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาแยกราเอนโดไฟท์

พืชตัวอย่างจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ อบเชยป่า เสลา กล้วยป่า ไครน้ำ หญ้าถอดปล้อง และยางพารา ในพื้นที่ที่ทำการศึกษาและเก็บตัวอย่าง สวนสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ดอยสุเทพ จ.เชียงใหม่, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่, สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่, มหาวิทยาลัยพะเยา จ.พะเยา และ พื้นที่ใน จ.นครราชสีมา

การฆ่าเชื้อที่ผิวและการแยกรา

ทำการแยกราโดยวิธี triple sterilization technical (Bussaban et al. 2001) แบ่งเป็นชิ้นส่วนเนื้อใบ เส้นกลางใบ และ กิ่ง

การแยกราที่สร้างไอระเหย สกุล *Muscodor*

สามารถแยกได้โดยใช้จานอาหารชนิดพิเศษที่มีการแบ่งครึ่งวงกลม ด้วยการนำชิ้นตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วตามวิธีในข้อ 1.2.1.1 วางบนอาหาร ½ PDA ที่มีเชื้อรา *Muscodor cinamomi* CMU-Cib461 ที่เจริญอีกด้านของอาหารเป็นเวลา 3 วัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาในอาหาร potato dextrose agar (PDA) (Strobel et al. 2001)

การระบุชนิดของราเอนโดไฟท์โดยลักษณะสัณฐานวิทยา

บ่งบอกชนิดโดยหนังสือสันฐานวิทยารา (Ellis 1971; Carmichael et al. 1980; Sutton 1971;von Arx 1981; Ellis and Ellis 1985; Hyde et al. 2000) ส่วนราที่ไม่พบการสร้างสปอร์นำมาเลี้ยงในอาหาร malt extract agar (MEA) จากนั้นจึงบ่มไว้ภายใต้แสง near UV เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ตามวิธีที่ Frohlich et al. (2000)

การระบุชนิดของราเอนโดไฟท์ โดยเทคนิคชีวโมเลกุล

นำราแต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในจานอาหาร PDA โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน เก็บเส้นใยหรือสปอร์ราที่ผ่านการกรองด้วย miracloth เมื่อทำการ freeze-dried แล้วสกัด DNA โดยนำเส้นใยราประมาณ 15 มิลลิกรัม บดในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติมไนโตรเจนเหลวลงในโกร่งเพื่อให้เส้นใยราแข็งตัวทำการบดเส้นใยจนละเอียดเป็นผง จากนั้นทำตามขั้นตอนของ Bussaban et al. (2001)

การเพิ่มปริมาณ DNA (Polymerase Chain Reaction, PCR) และ Sequencing โดยการเพิ่มปริมาณ rDNA บริเวณ Inthrnal transcribed spacer (ITS) region 1 และ 2 รวมทั้ง 5.8S โดยใช้ primers ITS1 และ ITS4 (White et al. 1990) นำ DNA บริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบสโดยใช้ BigDay Terminater Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) และอ่านลำดับเบสโดยใช้เครื่อง ABIPRISM 310 หรือ ABIPRISM 377 automated DNA sequencers จากนั้นรวบรวม sequencers ที่ได้จากบริเวณ ITS1 และ ITS2 รวมทั้ง 5.8S rDNA โดยใช้โปรแกรม Sequencher 3.1.1 (Applied Biosystems) และจัดเรียงลำดับเบสด้วยโปรแกรม CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) และทำการค้นหาลำดับเบสใน GenBank และ BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่า colonization rates และ intensity จะคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้ (Bussaban et al. 2001)

$$\text{Colonization rates} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่แยกราได้อย่างน้อย 1 ไอโซเลท}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดในการทดลอง}} \times 100$$

$$\text{Intensity} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่แยกราชนิดต่างๆ ได้}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมดในการทดลอง}}$$

ผลการทดลอง

2.2 การศึกษาจุลินทรีย์เอนโดไฟท์

2.2.1 การศึกษาเอนโดไฟท์

จากการแยกราเอนโดไฟท์ในพืช อบเชย ไคร้น้ำ ข้าวป่า และ เสลา จากภาคเหนือของประเทศไทย ตัวอย่างพืชทั้งหมด 270 ตัวอย่าง จาก 4 พืชที่ศึกษา (ตาราง 20) สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 305 ไอโซเลท และจัดจำแนกได้เป็น 43 ชนิด แบ่งออกเป็น 9 ascomycetes, 34 anmophic taxa (12 coelomycetes และ 22 hyphomycetes) ดังตาราง 21 จำนวนเชื้อราที่พบตามชิ้นส่วนของพืชเนื้อใบ เส้นกลางใบ และ กิ่ง พบว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่แล้วสามารถไอโซเลทได้จากกิ่งของพืชมากกว่าเส้นกลางใบ และเนื้อใบดังตาราง 22 และยังพบว่ากลุ่มประชากรราที่พบมากที่สุดคือ *Colletotrichum gloeosporioides* รองลงมาคือ *Guignardia mangiferae* และ *Phomopsis* sp.1 ดังภาพ 31

ตาราง 20 ข้อมูลสรุปเชื้อราเอนโดไฟท์ (ไม่สร้างสารระเหย) จากพืชที่คัดเลือก

Characteristic	CIB	ITE	LAG	ORY
No. of sample	135	45	45	45
No. of isolates recovered	168	36	47	54
Intensity (No. of isolated per sample)	1.24	0.80	1.04	1.20
Species richness	24	13	28	16

CIB= *Cinnamomum bejolghota*, ITE= *Itea* sp. LAG= *Lagerstroemia loudni*, ORY= *Oryza rufipogon*

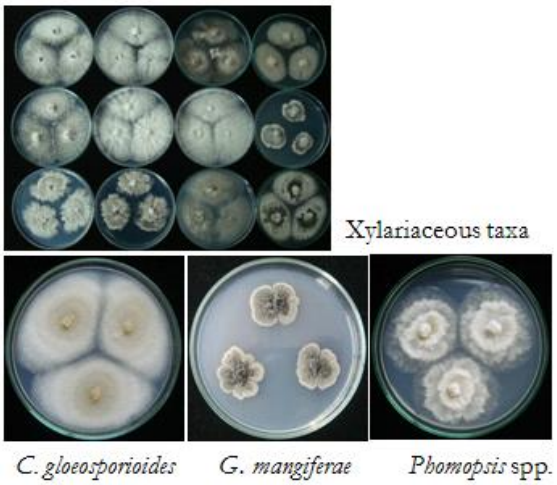
ตาราง 21 เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชที่คัดเลือก

Fungal taxa	CIB	ITE	LAG	ORY
Alternaria alternata		1		2
Curvularia lunata	2			
Chaetomium globosum	3		1	
Cladosporium cucumerinum		2	1	1
Cladosporium tenuissimum	1		1	
Cladosporium sp.		4	1	
Colletotrichum acutatum	9		5	
Colletotrichum coccodes			1	1
Colletotrichum gloeosporioides	32	3	2	4
Eupenicillium ochrosalmoneum	3		1	
Eupenicillium javanicum			1	
Daldinia sp.	3			
Drechslera sp.				1
Fusarium avenaceum	2			
Fusarium oxysporum	1	2	1	2
Fusarium solani	1	1	2	2
Fusarium sp. 1			1	
Fusarium sp. 2				1
Glomerella sp.	4		1	
Guignardia mangiferae	28		1	
Guignardia sp. 1				1
Guignardia sp. 2	1			
Humicola fuscoatra			1	
Humicola sp.	2	1		
Nodulisporium sp. 1			1	
Nodulisporium sp. 2	1			
Nigrospora oryzae	3			4
Nigrospora sp. 1				2
Nigrospora sp. 2		1		
Periconia sp.			1	
Pestalotiopsis mangiferae	4			
Pestalotiopsis microspora		2		
Pestalotiopsis sp. 1			1	
Pestalotiopsis sp. 2			1	
Phoma glomerata				2
Phoma sp.	2		1	
Phomopsis sp. 1	21	2	1	2
Phomopsis sp. 2	12		3	
Phomopsis sp. 3		1		
Phyllosticta musarum			2	

ตาราง 21 เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชที่คัดเลือก (ต่อ)

Fungal taxa	CIB	ITE	LAG	ORY
Phyllosticta sp.			3	1
Talaromyces flavus	2		1	
Verticillium sp.	2		1	
Xylariaceous taxa	18	10	7	17
Mycelia sterilia	11	2	2	9
Total	168	32	46	52

CIB= *Cinnamomum bejolghota*, ITE= *Itea* sp., LAG= *Lagerstroemia loudni*, ORY= *Oryza rufipogon*



ภาพ 31 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์ซึ่งเป็นชนิดเด่นที่แยกได้จากพืชสมุนไพร

ตาราง 22 จำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพืช

ชนิดพืช	Non-volatile			ทั้งหมด
	V	IV	ST	
Cinnamomum bejolghota	42	57	69	168
Itea sp.	16	4	12	32
Lagerstroemia loudni	14	10	22	46
Oryza rufipogon	11	9	32	52
ทั้งหมด	**83**	**80**	**135**	**298**

V= Vein, IV= Internal vein, ST= Stem

การแยกราเอนโดไฟท์สกุล *Muscodor*; จากพืช อบเชย ไครน้ำ ข้าวป่า หญ้าถอดปล้อง เสลาและกล้วยป่าจำนวนเชื้อราที่พบตามชิ้นส่วนของพืชเนื้อใบ เส้นกลางใบ และ กิ่ง พบว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่แล้วสามารถไอโซเลทได้จากกิ่งของพืชมากกว่าเส้นกลางใบ และเนื้อใบ จากตัวอย่างพืชทั้งหมด 261 ตัวอย่าง จาก 6 พืชที่ศึกษาสามารถแยกเชื้อราที่สร้างไอระเหยได้มากที่สุดจากอบเชย ดังตาราง 23 ได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท (ตาราง 23) และจัดจำแนกได้เป็น 6 ชนิด แบ่งออกเป็น 8 Xylariaceous taxa, 5 *Muscodor* spp. และเป็นชนิดใหม่ 4 ชนิด อีกทั้งยังมีอีก 1 hyphomycetes คือ *Cylindrocladium buxicola* เชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อที่ทนต่อไอระเหยของ *Muscodor cinnamomi* ดังตาราง 24

ตาราง 23 ข้อมูลสรุปเชื้อราเอนโดไฟท์ (สร้างสารระเหย) จากพืชที่คัดเลือก

Characteristic	CIB	EQI	ITE	LAG	MUS	ORY
No. of sample	36	36	36	36	36	36
No. of isolates recovered	8	3	4	1	2	2
Intensity (No. of isolated per sample)	0.22	0.08	0.11	0.02	0.05	0.05
Species richness	4	2	2	1	2	2

CIB= *Cinnamomum bejolghota*, EQI= *Equisetum debile*, ITE= *Itea* sp. LAG= *Lagerstroemia loudni*, MUS= *Musa acuminata*, ORY= *Oryza rufipogon*

ตาราง 24 เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชที่คัดเลือกโดยวิธี half plant

Fungal taxa	CIB	EQI	ITE	LAG	MUS	ORY
Cylindrocladium buxicola	1					
Muscodor muse sp. nov.					1	
Muscodor oryzae sp. nov.						1
Muscodor suthepensis sp. nov.	1					
Muscodor equiseti sp. nov.		1				
Muscodor spp.	1		3	1	1	1
Xylariaceous taxa	5	2	1			
Total	**8**	**3**	**4**	**1**	**2**	**2**

CIB= *Cinnamomum bejolghota*, EQI= *Equisetum debile*, ITE= *Itea* sp. LAG= *Lagerstroemia loudni*, MUS= *Musa acuminata*, ORY= *Oryza rufipogon*

ตาราง 25 เชื้อราเอนโดไฟท์สร้างสารระเหยที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพืชต่างๆ

Plants tree	Volatile			Total
	V	IV	ST	
Cinnamomum bejolghota	2		6	8
Equisetum debile			3	3
Itea sp.		2	2	4
Lagerstroemia loudni			1	1
Musa acuminata		2		2
Oryza rufipogon	1	1		2
Total	**3**	**5**	**12**	**20**

V= Vein, IV= Internal vein, ST= Stem

การศึกษาสัณฐานวิทยาทั่วไปของราสกุล *Muscodor* ร่วมกับการใช้ชีวโมเลกุล; พบว่าราที่ทำการแยกโดยวิธี half plant method เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการสร้างไอระเหยยับยั้งราก่อโรคพืช *Rhizoctonia solani* AG-2 พบว่ามีราทั้งหมด 5 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตไอระเหยยับยั้งราก่อโรค เมื่อทำการบ่งชนิดของไอระเหยด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าไอระเหยที่สร้างอยู่ในกลุ่ม Organic copounds เช่น isobutyric acid, isoamyl alcohol และ กลุ่มเอสเทอร์ ดังตาราง 26 จากการศึกษาพื้นฐานทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีความแตกต่างกันทางพื้นฐานสัณฐานวิทยา (ภาพ 32 ถึง 35) และเทคนิคชีวโมเลกุลในส่วนของ ITS (ภาพ 36)

ตาราง 26 การเปรียบเทียบชื่อ IUPAC ของสารประกอบระเหยโดย *Muscodor* ด้วยการวิเคราะห์ GC-MS

RT (min)	Possible compound	*M/z*	Total area (%)			
			M. musae	*M. oryzae*	*M. suthepensis*	*M. equiseti*
3.42	Ethyl 2-methylpropanoate	116	2.96	0.57	2.03	0.82
4.30	Methyl 2-methylbutanoate	116	3.52	–	1.82	0.62
4.39	2-Methylpropyl acetate	116	4.91	9.75	1.3	0.95
4.54	Methyl 3-methylbutanoate	116	0.18	–	0.39	–
6.72	2-Methylpropyl propanoate	144	–	–	0.20	–
7.07	2-Methylpropan-1-ol	74	–	3.48	0.57	0.17
7.77	3-Methylbutanoyl acetate	130	20.41	4.70	3.31	5.60
10.32	2-Methylbutyl 2-methylpropanoate	158	0.21	–	0.97	0.32
10.88	3-Methylbutan-1-ol	88	13.34	32.69	11.00	7.36
12.10	3-Methyl-3-buten-1-ol	86	–	0.27	–	–
12.20	Ethyl 2-hydroxy-2-methylpropanoate	132	–	0.88	–	–
12.97	3-Hydroxy-2-butanone	88	0.59	2.00	0.58	–
13.78	3-Ethyl-2-methylpentane	114	–	–	0.07	–
14.73	6-Methyl-5-hepten-2-one	126	–	–	0.05	–
14.46	2-Methylpropanoyl chloride	106	–	–	–	0.35
16.18	3-Methylhexane	100	–	–	0.04	0.42
16.19	2,4-Dimethyl-1-heptene	126	–	0.13	–	–
16.26	1-(2-Propenyloxy)-heptane	156	–	–	0.12	–
16.31	1-Isobutoxy-2-ethylhexane	186	–	0.31	–	–
19.43	Isopropyl-4-piperidone	141	0.23	–	–	–
19.50	4,5-Dimethyl-1,3-cyclopentanedione	126	–	0.37	0.26	2.05
21.03	2-Methylpropanoic acid,	88	33.17	15.41	57.81	34.63
21.50	Ethyl 2-hydroxypropanoate	118	–	–	0.03	0.70
21.69	[1S-(1. α.,4. α.,7. α.)]-1,2,3,4,5,6,7,8-Octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-azulene	204	0.29	–	0.25	–
21.81	Caryophyllene	204	–	2.19	0.12	–
23.76	Butanoic acid, 2-methyl-	102	1.10	–	0.62	1.02
24.55	Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, [4aR-(4a. α.,7. α.,8a. β.)]-	204	–	–	0.32	–
24.75	Azulene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1. α.,7. α.,8a. β.)]-	204	1.01	0.44	1.99	–
24.99	Spiro[3.4]octan-5-one	124	–	–	0.36	0.72
26.91	2-Methyl-propanamide	87	0.07	–	0.05	–
25.72	3,7-Dimethyl-1,6-octadiene	138	0.05	–	–	–
27.05	2-Phenylethyl acetate	164	3.28	1.46	1.45	1.15
27.27	6-Nitro-2-picoline	138	0.12	–	–	–

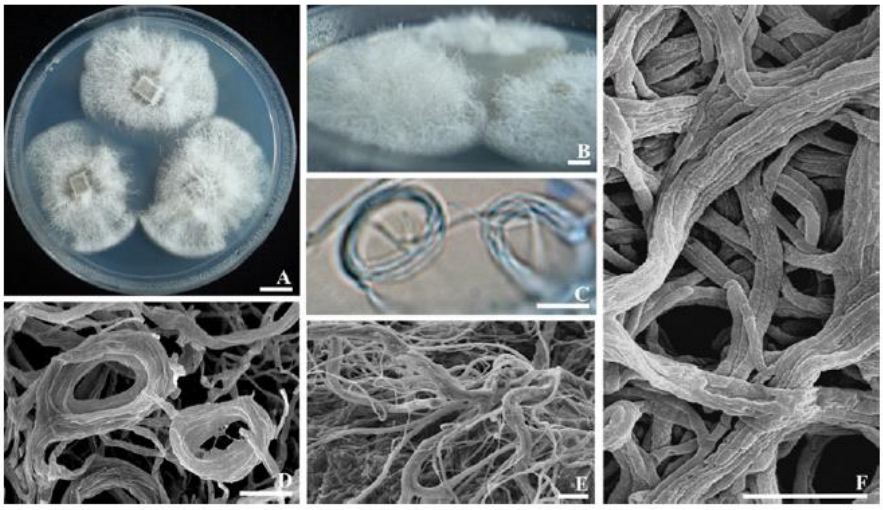


Fig. 1 *Muscodor musae* (CMU-MU3) **a**, **b** culture on PDA, *bars* 1 cm; **c** light microscope micrographs of coiling formation of fungal hyphae, *bar* 10 μm; **d**–**f** scanning electron micrographs, *bars* 10 μm: **d** coiling formation of fungal hyphae; **e**, **f** hyphal cells from the colony edge showing fused, rope-like hyphal cells

ภาพ 32 *Muscodor musae* sp. nov.

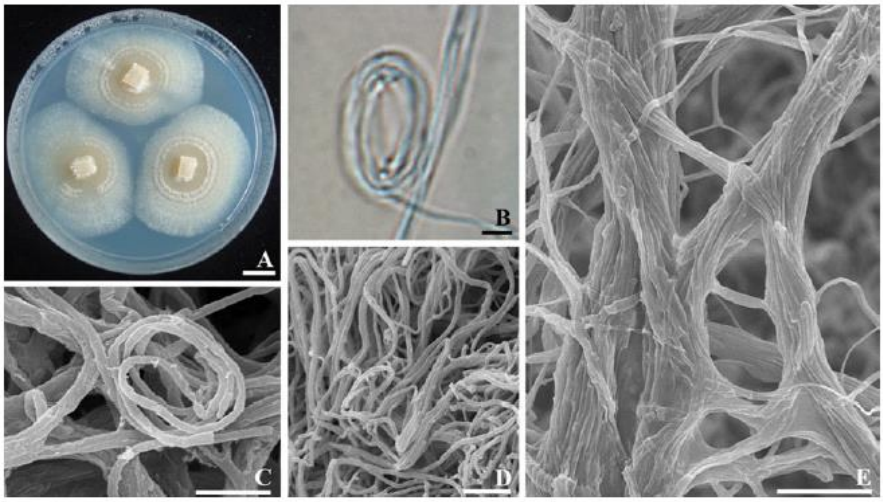


Fig. 2 *Muscodor oryzae* (CMU-WR2) **a** culture on PDA, *bar* 1 cm; **b** light microscope micrographs of coiling formation of fungal hyphae, *bar* 10 μm; **c**–**e** scanning electron micrographs, *bars* 10 μm: **c** coiling formation of fungal hyphae; **d**, **e** hyphal cells from the colony edge showing fused, rope-like hyphal cells

ภาพ 33 *Muscodor oryzae* sp. nov.

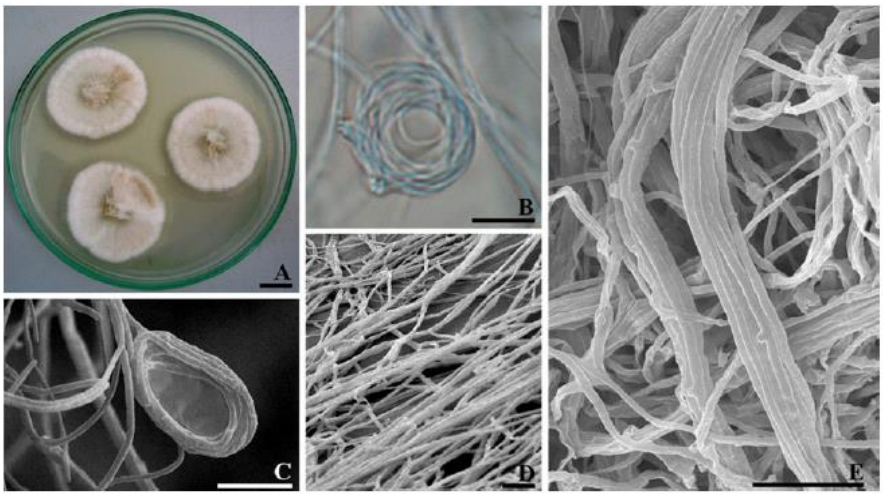


Fig. 3 *Muscodor suthepensis* (CMU-Cib462) **a** culture on PDA, *bar* 1 cm; **b** light microscope micrographs of coiling formation of fungal hyphae, *bar* 10 μm; **c**–**e** scanning electron micrographs, *bars* 10 μm: **c** coiling formation of fungal hyphae; **d**, **e** hyphal cells from the colony edge showing fused, rope-like hyphal cells

ภาพ 34 *Muscodor suthepensis* sp. nov.

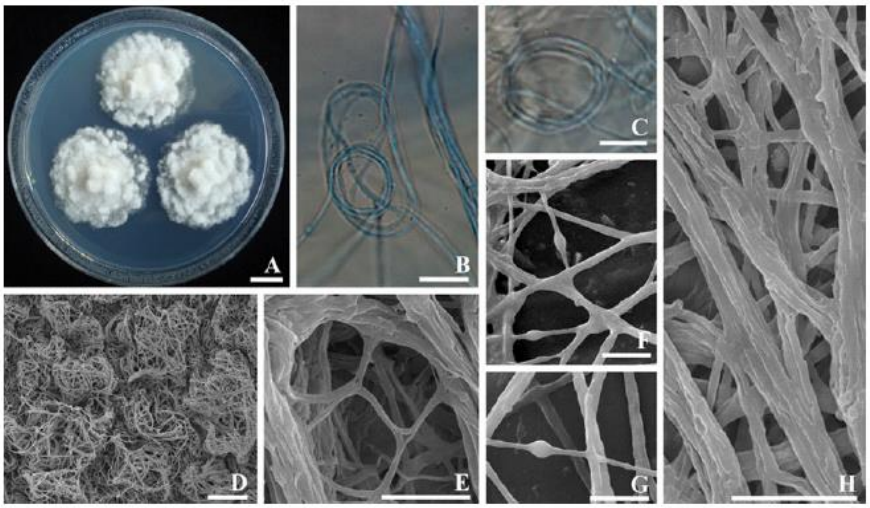


Fig. 4 *Muscodor equiseti* (CMU-M2) **a** culture on PDA, *bar* 1 cm; **b**, **c** light microscope micrographs of coiling formation of fungal hyphae, *bars* 10 μm; **d**–**h** scanning electron micrographs: **d** cottony-like mycelium, *bar* 50 μm; **e** triangular branching pattern; **f**, **g** swollen cells, *bars* 10 μm; **h** hyphal cells from the colony edge showing fused, rope-like hyphal cells, *bar* 10 μm

ภาพ 35 *Muscodor equiseti* sp. nov.

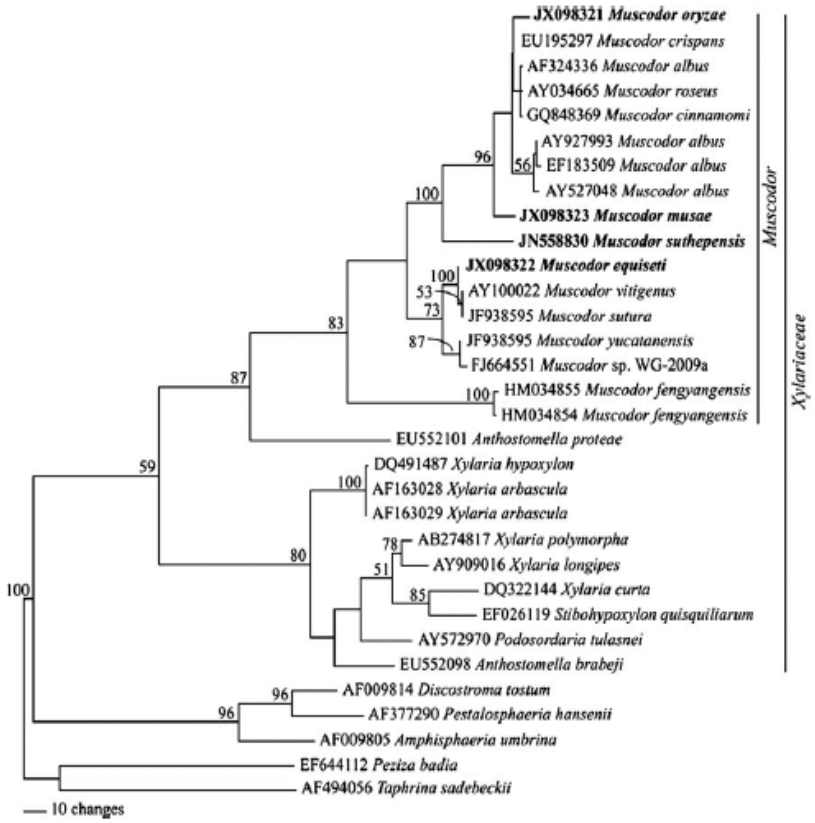


Fig. 5 Maximum parsimonious trees inferred from a heuristic search of the internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 sequence alignment of 32 sequences. *Peziza badia* and *Taphrina sadebeckii* were used to root the tree. Branches with bootstrap values ≥50 % are shown at each branch and the *bar* represents 10 substitutions per nucleotide position. New species are in *bold*

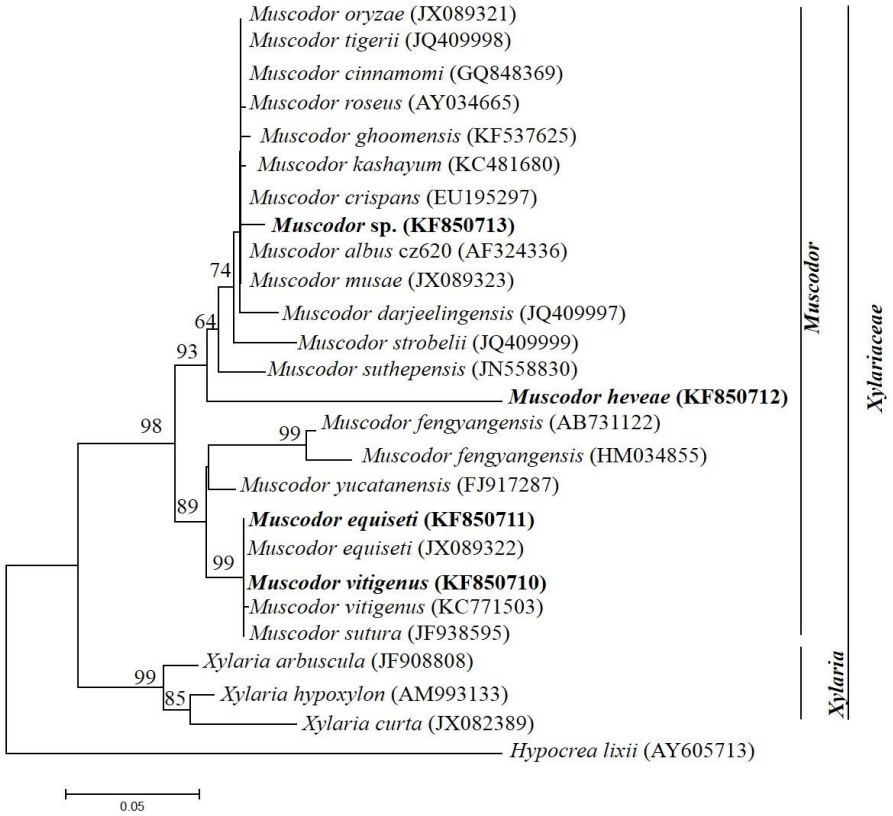
ภาพ 36 Maximum parsimonious trees of genus *Muscodor*

การศึกษาสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกหมวดหมู่เชื้อรา *Muscodor* จากยางพารา

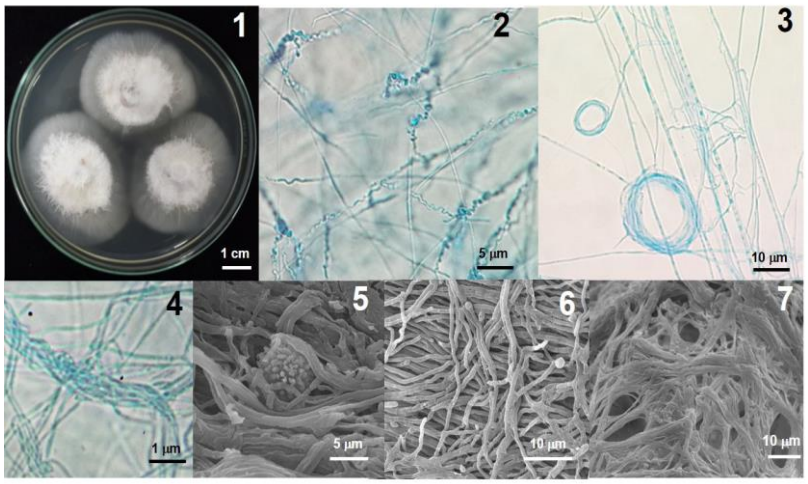
จากลักษณะสัณฐานวิทยาเชื้อราสร้างไอระเหยอินทรีย์ที่แยกจากยางพาราทั้ง 4 ไอโซเลตมีลักษณะสอดคล้องกับสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Muscodor* sp. (ตาราง 57) โดยจากความสัมพันธ์ของลำดับเบส rDNA ITS sequences (ITS4, ITS5) และสร้างเป็น phylogenetic tree (ภาพ 76) พบว่า ไอโซเลต RTM5IV1 (KF850710) ใกล้ชิดกับ *M. vitigenus*, ไอโซเลต RTM5IV2 (KF850711) ใกล้ชิดกับ *M. equiseti*, ไอโซเลต RTM5IV3 มีเปอร์เซ็นต์ DNA identity น้อยกว่า 86 และมีลักษณะสัณฐานวิทยาและและรูปแบบการสร้างไอระเหยที่แตกต่างกับ *Muscodor* สปีชีส์อื่จัดจำแนกเป็นเชื้อ *M. heveae* sp. nov. (KF850712) (ภาพ 77) ส่วนไอโซเลต RTM5IV4 (KF850713) มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกับเชื้อ *Muscodor* สปีชีส์อื่นแม้จะมีเปอร์เซ็นต์ DNA identity ใกล้เคียงกับ *M. albus* ก็ตาม

ตาราง 57 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Muscodor* ที่แยกจากยางพารา

ไอโซเลต	ลักษณะสัณฐานวิทยา
RTM5IV1	โคโลนีสีขาวเมื่อเจริญบน PDA เส้นใยไม่สร้างสปอร์หรือโครงสร้างสืบพันธุ์ เมื่อเจริญบน PDA เชื้อสร้างไอระเหยมีกลิ่น fruity ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค เส้นใยหนา 1.0-2.5 ไมโครเมตร มีการแตกแขนงและมีการรวมกันที่เรียกว่า stalk-like strand ขนาด 5.3-20.5 ไมโครเมตร และสร้างขดเส้นใย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12.8-23.0x15.3-33.2 ไมโครเมตร
RTM5IV2	โคโลนีสีขาวเมื่อเจริญบน PDA ในที่มืด เส้นใยไม่สร้างสปอร์หรือโครงสร้างสืบพันธุ์ โคโลนีมีลักษณะแบบ cotton เส้นใยมีขนาด 1.3-2.5 ไมโครเมตร สร้างขดเส้นใยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20.4-33.15-29.4x25.5-48.5 ไมโครเมตร ปกติพบการสร้าง triangle branching และเส้นใยรวมกันแบบ rope-like strand ขนาด 5.1-15.3 ไมโครเมตร เมื่อเจริญบน PDA เชื้อสร้างไอระเหยมีกลิ่น fruity ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค
RTM5IV3	โคโลนีสีส้มอ่อนเมื่อเจริญบน PDA ในแสงธรรมชาติ และโคโลนีสีขาวในที่มืด เส้นใยไม่สร้างสปอร์หรือโครงสร้างสืบพันธุ์ บริเวณขอบโคโลนีสร้างเส้นใยหยักปีนคลื่น (wavy mycelium) เส้นใยหนา 1.2-3.7 ไมโครเมตร สร้างขดเส้นใย (coil) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14.8-27.1x19.7-39.4 ไมโครเมตร เส้นใยรวมกันมีลักษณะที่เรียกว่า twisted cable-like strand และ robe like strand หนา 4.9-7.4 ไมโครเมตร เส้นใยสร้างโครงสร้างที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ (unknown structure) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.8-7.5 ไมโครเมตร และ swollen cell ที่ปลายเส้นใย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5-4.9 ไมโครเมตร เชื้อสร้างไอระเหยมีกลิ่น fruity ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค
RTM5IV4	โคโลนีสีขาวเมื่อเจริญบน PDA เส้นใยไม่สร้างสปอร์หรือโครงสร้างสืบพันธุ์ เมื่อเจริญบน PDA เชื้อสร้างไอระเหยมีกลิ่น fruity ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค



ภาพ 76 แสดง Phylogenetic tree ของ *Muscodor* ไอเลต RTM5IV1 (KF850710), RTM5IV2 (KF850711), RTM5IV3 (KF850712) และ RTM5IV4 (KF850713) บนพื้นฐานความสัมพันธ์ของ rDNA ITS sequences (ITS4, ITS5) โดยวิธี Neighbor Joining



ภาพ 77 แสดงลักษณะโคโลนีของ *M. heveae* อายุ 10 วันเมื่อเจริญในที่มืด (1) wavy mycelium (2) coiling hypha (3) rope-like mycelium (4,7) unknown structure (5) swollen-like hyphal tip (6)

การทดสอบไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อ *Muscodor* sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แบคทีเรียและยีสต์ก่อโรค

Muscodor ทั้ง 4 ไอโซเลตสามารถสร้างไอระเหยอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา *A. niger, C. gloeosporioides*, *R. microporus*, *P. noxius* และ *G.australe* ได้ 100% ขณะที่ไอโซเลต RTM5IV3 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* ได้มากที่สุดคือ 62.8±2.2 % นอกจากนี้เชื้อ *Muscodor* ทั้ง 4 ไอโซเลต สามารถสร้างไอระเหยอินทรีย์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก, แกรมลบและยีสต์ก่อโรคได้ทั้งหมด 11 ชนิด ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ที่ไม่มีไอโซเลตใดยับยั้งได้ โดยไอระเหยอินทรีย์ของไอโซเลต RT5IV1-3 และ RT5IV1-4 มีประสิทธิภาพมากที่สุด สามารถฆ่าเชื้อและยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด 20 ชนิด (ตาราง 58)

ตาราง 58 แสดง % Inhibition และ viability ของเชื้อ *Muscodor* เมื่อทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อทดสอบ	**%** ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลังจากได้รับไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อ ***Muscodor***			
	RTM5IV1	**RTM5IV2**	**RTM5IV3**	**RTM5IV4**
Gram positive bacteria				
Bacillus cereus	100 (Dead)	0 (Alive)	100 (Alive)	100 (Alive)
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)	0 (Alive)	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Micrococcus luteus	0 (Alive)	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Staphylococcus aureus ATCC 29213	100 (Dead)	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Gram negative bacteria				
Enterobacter aerogenes	100 (Dead)	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Enterococcus faecalis	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)
Escherichia coli ATCC 35218	0 (Alive)	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Klebsiella pneumoniae (ESBL+)	0 (Alive)	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Proteus mirabilis	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27859	0 (Alive)	0 (Alive)	0 (Alive)	0 (Alive)
Salmonella sp. Group D	0 (Alive)	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Yeast[c]				
Cryptococcus neoformans	100 (Dead)	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Filamentous fungi				
Aspergillus flavus	100 (Alive)	98.4±1.3 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum*	39.8±2.2 (Alive)	47.4±1.5 (Alive)	62.8±2.2 (Alive)	47.4±2.3 (Alive)
Ganoderma australe BCC22321	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)
Phellinus noxius BCC26237	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)
Phytophthora parasitica BCC15560	100 (Dead)	97.1±1.3 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Rhizoctonia solani	100 (Alive)	71.1±2.1 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Rigidoporus microporus	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากตัวอย่างพืชสมุนไพร 6 ชนิดและยางพาราพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์โดยเฉพาะราในออเดอร์ Xylariales และรากลุ่ม mycelia sterilia (Cai et al. 2004) นอกจากนี้เป็นครั้งแรกที่สามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์สร้างไอระเหยอินทรีย์สกุล *Muscodor* อีกทั้งเป็นครั้งแรกที่พบว่าไอระเหยอินทรีย์ของ *Muscodor* สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในยางพาราสำคัญทั้งเชื้อรากขาวและรากน้ำตาลได้อีกด้วย และในการศึกษานี้สามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์สปีชีส์ใหม่ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *M. equiseti M. suthepensis M. oryzae M. musae* และ *M. heveae* โดยข้อมูล phylogenetic tree บนพื้นฐานข้อมูล 18S rDNA ITS1-5.8-ITS2 sequences และจากข้อมูลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของไอระเหยอินทรีย์ด้วยวิธี SPME GC/MS เมื่อเปรียบเทียบ *Muscodor* สปีชีส์อื่น ดังนั้นจัดจำแนกเป็นเชื้อ *Muscodor* ทั้ง 5 สกุลเป็นชนิดใหม่ของโลก ซึ่งเดิมทีการจัดจำแนกชนิดของ *Muscodor* จะตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นสำคัญ เช่น ดูลักษณะโคโลนี เส้นใย เป็นต้น (Zhang et al. 2010) และปัจจุบันการวิเคราะห์และเปรียบเทียบส่วนประกอบของไอระเหยอินทรีย์ที่สังเคราะห์โดย *Muscodor* เป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยจัดจำแนกชนิดของราในสกุลนี้ แม้ว่าเชื้อ *Muscodor* แต่ละชนิดจะสร้างสารประกอบไอระเหยอินทรีย์ที่หลากหลายแตกต่างกันแต่บ่อยครั้งที่สร้างสารประกอบหลักชนิดเดียวกันได้ (Kudalkar et al. 2011; Suwannarach et al. 2013) เนื่องจาก *Muscodor* อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยกันและมีรายงานว่าเชื้อสร้างไอระเหยอินทรีย์และปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมรอบ ๆพืชเพื่อป้องกันพืชจากเชื้อก่อโรค (Mitchell et al. 2010; Zhang et al. 2010) ดังนั้นจึงมีประโยชน์ที่จะนำมาใช้ในการป้องกันโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้ ไอระเหยอินทรีย์ของ *Muscodor* มีกลไกในการฆ่าเชื้อราก่อโรคโดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนและเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อรา (Humphris et al. 2002; Fialho et al. 2011) สำหรับวิธี biofumigation เป็นวิธีที่ประยุกต์ใช้ไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อราให้เป็นประโยชน์ในการควบคุมเชื้อก่อโรคหรือเชื้อปนเปื้อนผลผลิตทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว เช่น เชื้อรา *Botrytis cinerea, Penicillium expansum* และ *Sclerotinia sclerotiorum* (Ramin et al. 2005)

สรุปผลการทดลอง

สามารถคัดแยกราเอนโดไฟท์ที่สร้างไอระเหยอินทรีย์ในสกุล *Muscodor* ทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งเป็นชนิดใหม่ของโลกคือ *M. equiseti M. suthepensis M. oryzae M. musae* และ *M. heveae* ที่แยกได้จากใบและกิ่งของต้นอบเชย ข้าวป่า หญ้าถอดปล้อง รวมถึงใบของยางพารา ตามลำดับ ที่สร้างไอระเหยอินทรีย์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย, ยีสต์และเชื้อรา) รวมทั้งเชื้อก่อโรคในยางพารา มีสาร 3-methylbutan-1-ol เป็นสารประกอบหลัก และมีสาร 3-methylbutyl acetate

และอนุพันธ์ azulene เป็นสารประกอบรองลงมา ไอระเหยอินทรีย์ของ *M. heveae*สามารถใช้ควบคุมเชื้อก่อโรครากขาวในยางพาราในระดับโรงเรือนได้

2.3 การคัดเลือกและใช้จุลินทรีย์เอนโดไฟท์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมเชื้อสาเหตุโรคปาล์มน้ำมันโดยวิธีการทางชีวภาพ

2.3.1 การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์และการจัดจำแนก

การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์โดยเทคนิค Tissue transplanting

สุ่มเก็บตัวอย่างใบและรากของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis quineensis* Jacq.) โดยเลือกเก็บเฉพาะต้นที่สมบูรณ์ ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงจำนวน 5 ต้น จากพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยพลังงานชีวมวล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยแบ่งส่วนของใบปาล์มน้ำมันออกเป็น 3 ส่วน คือ veins, rachides และ petioles นำตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันมาล้างให้สะอาดโดยให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตัดใบส่วน vein ก้านใบส่วน rachis และ petiole เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่ใน sodium hypochlorite เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที จากนั้นนำไปจุ่มลงในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษฆ่าเชื้อ (ดัดแปลงจากวิธีของ Taylor et al. 1999; Fröhlich et al. 2000; Pinruan et al. 2010) นำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose agar (PDA) และ Water agar (WA) ที่ผสม chloramphenical 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ rose bengal 0.03 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 5 ชิ้นต่อ 1 จานอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-10 วัน เมื่อเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นพืช ทำการตัดส่วนปลายเส้นใยเชื้อราแล้วย้ายลงในอาหาร PDA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บลงในอาหารวุ้นเอียงที่อุณหภูมิห้องและกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดสอบต่อไป

การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์โดยเทคนิค Half plate method (Ezra et al. 2004)

เตรียมอาหาร PDA ในจานอาหารที่แบ่งเป็นสองส่วน (two-compartment plastic plate) ด้านหนึ่งเป็นอาหาร PDA ส่วนอีกด้านเป็นอาหาร PDA ที่ผสม chloramphenical 0.05 กรัมต่อลิตร และ rose bengal 0.03 กรัมต่อลิตร วางชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของเชื้อ *Muscodor albus* CMU-Cib 461 (Suwannarach et al. 2010) บนอาหาร PDA ที่ไม่มีการผสมสารปฏิชีวนะ เป็นเวลา 3 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันมาล้างให้สะอาดโดยให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นตัดใบส่วน vein ก้านใบส่วน rachides และ petioles เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร และทำการฆ่าเชื้อที่ผิวดังวิธีข้างต้น แล้วนำมาวางอีกด้านหนึ่งของจานอาหาร

การจัดจำแนกเชื้อราเอนโดไฟท์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Ellis 1971; Carmichael et al. 1980; Sutton 1980; Barnett and Hunter 1998) ควบคู่กับการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 7-15 วัน นำไปสกัดดีเอ็นเอและทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ใช้ ITS4 และ ITS5 เป็นไพรเมอร์ จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัด Gel extraction NucleoSpin® Extract II Purification Kit (Macherey–Nagel, Germany) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต แล้วส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปทำการหาลำดับเบสที่บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย ลำดับเบสที่ได้ถูกนำไปเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank แล้วทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Clustal W, BioEdit และ MEGA 6

2.3.2 การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทรอบรากและการจัดจำแนก

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

สุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบต้นปาล์มน้ำมัน (*Elaeis quineensis* Jacq.) จากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยพลังงานชีวมวล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในช่วงเดือนกันยายน พ.ศ. 2555 กำจัดเศษรากและใบไม้ออกจากตัวอย่าง สังเกตลักษณะของดิน สี และวัดค่าความเป็นกรดด่าง จากนั้นแบ่งตัวอย่างดินใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์เพื่อให้ตัวอย่างแห้ง ทำการปรับสภาพตัวอย่าง (pretreatment) ตามวิธีของ Seong et al. (2001) ด้วยฟีนอล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้ความร้อนแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และชุดควบคุม (ตาราง 2) โดยชั่งดินมา 1 กรัม ทำการเจือจางในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมินาน 6 นาที ทำการเจือจางต่อให้มีค่าความเจือจางเท่ากับ 10^{-2} และ 10^{-3} ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากระดับความเจือจางที่ 10^{-2} และ 10^{-3} มา spread plate บนอาหาร starch casein agar (SCA) และ Humic acid-salts-vitamin agar (HVA) (Hayakawa and Nonomura 1987) ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Naldixic acid และ Nystatin บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน เมื่อแอคติโนมัยซีทเจริญออกมาให้ทำการย้ายลงในอาหาร ISP2 จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บลงในกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำการทดสอบต่อไป

การจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของแอคติโนมัยซีท

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เปรียบเทียบลักษณะโคโลนี สี รูปร่างของสปอร์ตามวิธีมาตรฐาน International *Streptomyces* Project (ISP; Shirling and Gottlied 1966) ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อบ่งบอกสกุลของแอคติโนมัยซีท โดยวิเคราะห์กรดอะมิโน

diaminopimelic acid (DAP) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแอคติโนมัยซีทด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) (Hasegawa et al. 1983) หาชนิดของน้ำตาลด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีการของ Mikami and Ishida (1983) บ่งชี้ชนิดของ polar lipid และ menaquinone ด้วยเทคนิค 2D-TLC และ HPLC ตามลำดับ (Minnikin et al. 1984; Collin et al. 1977) และวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันโดยเทคนิค gas chromatography (GC) โดยใช้โปรแกรม microbial identification system (Sherlock Version 6.2B) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล MIDI TSBA40 (Sasser 1990; Kämpfer and Kroppenstedt 1996) ทำการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณ และหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ตามวิธีการของ Nakajima et al. (1999) ลำดับเบสที่ได้ถูกนำไปเทียบกับฐานข้อมูลของ EMBL/GenBank/DDBJ แล้วทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Clustal W, BioEdit และ MEGA 6

2.3.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค

เชื้อราสาเหตุโรคพืชสำหรับการทดสอบ

- *Ganoderma boninense* BCC21330 จากหน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์เฉพาะทาง (BIOTEC Culture Collection) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ *G. boninense* เป็นเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่า (basal stem rot) ในปาล์มน้ำมัน (Rees et al. 2007; Nur Ain Izzati et al. 2008; Bivi et al. 2010)

- *Pestalotiopsis theae* CMU-ELA1 สาเหตุโรคใบจุดในปาล์มน้ำมัน (Suwannarach et al. 2013) จากห้องปฏิบัติการสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการด้านการพัฒนาแบบยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

- *Rigidoporus* sp. เชื้อราสาเหตุโรครากขาวในยางพารา

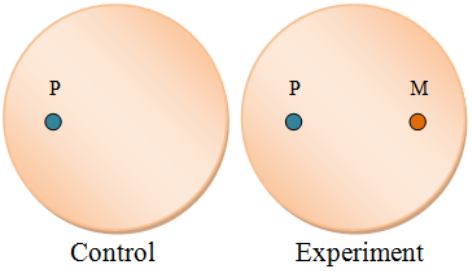
การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธี Dual culture assay (Siddiquee et al. 2009)

เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท เชื้อราเอนโดไฟท์และเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร ISP2 และ PDA ตามลำดับเป็นเป็นเวลา 7 วัน ใช้ปลาย pasture pipette ด้านกว้างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณที่มีการเจริญของแอคติโนมัยซีทหรือปลายเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟท์และเชื้อสาเหตุโรคมาวางบนจานอาหาร PDA ในจานทดลองขนาด 9.0 เซนติเมตร โดยวางเชื้อทดสอบและเชื้อสาเหตุโรคไว้คนละด้านให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร และวางเชื้อสาเหตุโรคไว้ที่ขอบจานด้านหนึ่ง โดยไม่ต้องวางเชื้อทดสอบในด้านตรงข้าม เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ดังแสดงในภาพ 37 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-10 วัน จนเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหาร แล้วทำการวัดรัศมีการเจริญของเชื้อสาเหตุ

โรคในจานอาหารทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เพื่อหาร้อยละการยับยั้งการเจริญ (Percentage of Inhibition) ตามสูตร

$$\text{Percentage of Inhibition} = \frac{r1 - r2}{r1} \times 100$$

โดย r1 คือ รัศมีการเจริญของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม
r2 คือ รัศมีการเจริญของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดทดสอบ



ภาพ 37 การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคปาล์มน้ำมันโดยวิธี Dual culture assay (P=เชื้อสาเหตุโรค และ M=เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ)

การคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารระเหยที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธี Dual culture volatile assay (Suwannarach et al. 2011)

เตรียมอาหาร PDA ในจานอาหารที่แบ่งเป็นสองส่วน (two-compartment plastic plate) จากนั้นใช้ปลาย pasture pipette ด้านกว้างเจาะโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคและจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่ให้ผลการยับยั้งมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค dual culture assay ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7-10 วัน มาวางในแต่ละด้านของจานอาหาร โดยให้ด้านหนึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคอีกด้านเป็นเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ สำหรับชุดควบคุมจะวางเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวบนจานอาหาร ใช้ Parafilm M® พับรอบจานอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดผลการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เพื่อนำมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญ

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค (minimal inhibitory concentration, MIC)

- การเพาะเลี้ยงเชื้อและการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การเลี้ยงเชื้อแบบการหมักบนอาหารแข็ง โดยเพาะเชื้อ *Streptomyces* sp. isolates AB21, AB83 และ AB225 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 agar ปริมาณ 2 ลิตร ต่อ 1 ไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ใช้มีดตัดอาหารวุ้นที่มีการเจริญของเชื้อให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยม

ขนาดเล็ก นำชิ้นอาหารทั้งหมดใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ทำการเติมเอทธิลอะซีเตทให้ท่วมชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ นำขวดรูปชมพู่ไปแช่ใน sonicator นาน 20 นาที จากนั้นเทเอทธิลอะซีเตทออกโดยเทใส่ขวดก้นกลม แล้วเติมเอทธิลอะซีเตทใหม่ลงในขวดรูปชมพู่อีกครั้งก่อนนำกลับไปแช่ใน sonicator ทำซ้ำ 3 รอบ จากนั้นตั้งสารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน เพื่อให้ตกตะกอนก่อนนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วย evaporator แล้วชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบการหมักบนอาหารเหลว โดยเพาะเชื้อ *Streptomyces* sp. isolates AB21, AB83 และ AB225 ในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP2 ปริมาตร 2 ลิตรต่อ 1 ไอโซเลท นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 สัปดาห์ จากนั้นกรองอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านผ้าขาวบางใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขวดใหม่ ทำการสกัดสารด้วยเอทธิลอะซีเตทในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้กรวยแยก ทำซ้ำ 3 รอบ ตั้งสารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน เพื่อให้ตกตะกอนก่อนนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วย evaporator แล้วชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้

- การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) (ดัดแปลงจาก Dhiman et al. 2011)

เพาะเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรค (*G. boninense* BCC21330*, R. microporus* และ *P. theae* CMU-ELA1) บนอาหาร PDA โดยวางชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของเชื้อ 1 ชิ้น ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วันเตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบให้มีความเข้มข้น 5, 2, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.062 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการปรับความเข้มข้นโดยใช้เมทานอลจากนั้นนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นมาหยดลงบน paper disc ปริมาตร 40 ไมโครลิตรต่อ disc ทิ้งไว้ให้สารซึมลงใน disc จนแห้ง โดยใช้ Nystatin ที่ความเข้มข้นเดียวกันเป็น positive control และใช้เมทานอลเป็น negative control จากนั้นวาง disc ของสารแต่ละความเข้มข้นลงบนจานอาหารที่มีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคโดยวางเป็นวงกลมรอบรัศมีการเจริญของเชื้อรา บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน วัดผลการเกิดโซนยับยั้งเทียบกับ positive control เลือกสารสกัดหยาบของเชื้อที่ให้ค่า MIC ต่ำที่สุดมาใช้ในการบ่งชี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค bioautography และเลือกเชื้อที่แสดงค่า MIC ต่ำที่สุดไปใช้ในการทดสอบการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในระดับโรงเรือน (*in vivo*)

2.3.4. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

การผลิต indole 3-acetic acid (IAA)

ศึกษาการผลิต indole 3-acetic acid ตามวิธีของ Bric et al. 1991 เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว PDB และ ISP2 สำหรับเชื้อราและแอคติโนมัยซีทตามลำดับ ที่ผสม tryptophan 0.2% (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น

ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มี Salkowski reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในที่มืด 25 นาที ตรวจสอบสีชมพูที่เพิ่มขึ้น จากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของ IAA โดยเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ IAA

การตรวจสอบสร้างไซเดอร์โรฟอร์

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหาร chrome azurol S agar ตามวิธีของ Schwyn and Neilands (1987) โดยวางเชื้อ 3 จุดบนจานอาหาร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลืองถึงส้ม โดยสีที่เปลี่ยนแปลงแสดงถึงผลบวกจากการสร้างไซเดอร์โรฟอร์

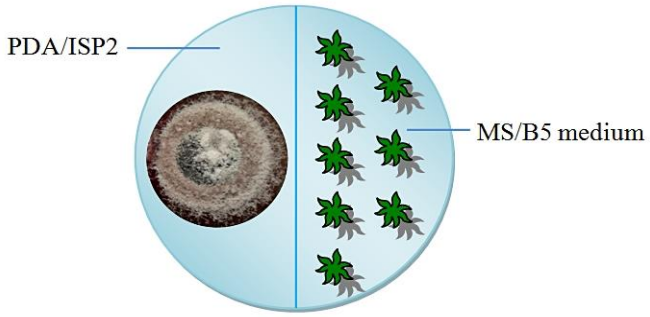
การละลายฟอสเฟส

เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เอนโดไฟท์บนอาหาร Pikovskaya agar ที่มี Tricalcium phosphate (TCP, Sigma, USA) เป็นแหล่งของฟอสเฟต โดยวางเชื้อ 3 จุดบนจานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีเชื้อซึ่งเป็นการยืนยันผลในขั้นแรก นำเชื้อที่สร้างวงใสบนอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว หาปริมาณของฟอสเฟตที่ละลายได้โดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 820 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของฟอสฟอรัสที่ละลายได้เทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ KH_2PO_4 (Fiske and Subbarow, 1925)

2.3.5 การศึกษาผลของสารระเหยจากจุลินทรีย์ต่อการเจริญของพืช

การคัดเลือกจุลินทรีย์สร้างสารระเหยที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญของพืช

ศึกษาผลของสารระเหยจากจุลินทรีย์ต่อการเจริญของเมล็ดพืชในระดับ *in vitro* โดยดัดแปลงวิธีการของ Macías-Rubalcava et al. 2010 และ Hung et al. 2013 โดยทำการทดสอบกับเมล็ดข้าวโพดหวาน ถั่วลันเตา และพืชทดลอง *Arabidopsis thaliana* col-0 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานอาหารที่แบ่งเป็นสองส่วน (two-compartment plastic plate) ด้านหนึ่งเป็นอาหารสำหรับเชื้อทดสอบ ใช้ PDA สำหรับเชื้อรา และ ISP2 สำหรับแอคติโนมัยซีท ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นอาหารสำหรับพืช โดยใช้ Murashige and Skoog medium (MS) และ Gamborg's B5 medium (B5) สำหรับเมล็ดพืชทั่วไปและ *A. thaliana* col-0 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพ 38



ภาพ 38 การศึกษาผลของสารระเหยจากจุลินทรีย์ต่อการเจริญของเมล็ดพืช

วางชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 1 ชิ้น ลงบนจานอาหารด้านหนึ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดพืชแล้วนำมาวางลงบนอีกด้านหนึ่งของจานอาหาร จำนวน 10 เมล็ดต่อจานอาหาร สำหรับถั่วลันเตาและข้าวโพดหวาน และจำนวน 20 เมล็ดต่อจานอาหารสำหรับ *A. thaliana* col-0 เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ พันขอบจานอาหารด้วยพาราฟิล์ม พักเมล็ดในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน แล้วย้ายไปบ่มในที่มืดสลับสว่างอัตราส่วน 10:14 ชั่วโมง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส วัดผลการเจริญของ *A. thaliana* col-0 เมื่ออายุครบ 10 วัน สำหรับเมล็ดถั่วลันเตาและข้าวโพด เมื่อรมด้วยสารระเหยจากจุลินทรีย์ครบ 5 วัน ทำการย้ายลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหาร MS แล้วนำไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 10 วัน วัดอัตราการงอกของเมล็ด ความยาวรากและลำต้น น้ำหนักรากและลำต้นสด และหาปริมาณของคลอโรฟิลล์ทั้งหมดโดยการสกัดด้วยอะซีโตนเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ในที่มืด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 645 และ 663 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดตามสูตร (Hung et al. 2013)

$$\frac{\left((8.02 \times A663) + (20.2 \times A645)\right) \times V}{1000 \times W}$$

เมื่อ V = ปริมาตรของอะซีโตน (มิลลิลิตร) และ W = น้ำหนักใบพืช (กรัม)

การศึกษาผลของสารระเหยจาก *Streptomyces* sp. AB21 ต่อการเจริญของ *Arabidopsis thaliana* col-0

ศึกษาผลของสารระเหยจากจุลินทรีย์ต่อการเจริญของพืชทดลอง *A. thaliana* col-0 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานอาหารที่แบ่งเป็นสองส่วน ด้านหนึ่งเป็นอาหารสำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีท (ISP2) ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นอาหารสำหรับพืช (MS) ขีดเชื้อ *Streptomyces* sp. AB21 ลงบนจานอาหารด้านหนึ่งยาว 4 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดพืชแล้วนำมาวางลงบนอีกด้านหนึ่งของจานอาหารจำนวน 10

เมล็ดต่อจานอาหาร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ พันขอบจานอาหารด้วยพาราฟิล์ม พักเมล็ดในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน แล้วย้ายไปบ่มในที่มืดสลับสว่างอัตราส่วน 8:16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 2 ครั้ง จำนวน 3 ซ้ำ วัดผลการเจริญของ *A. thaliana* col-0 เมื่ออายุครบ 7, 14 และ 21 วัน และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกัน วัดความยาวรากและลำต้น ความกว้างของใบ น้ำหนักพืช และหาปริมาณของคลอโรฟิลล์ตามวิธีการข้อ 5.1

2.3.6 การบ่งชี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การบ่งชี้ชนิดของสารระเหยจากจุลินทรีย์โดยเทคนิค Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

เพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์และแอคติโนมัยซีทในอาหารวุ้นเอียง PDA และ ISP2 ตามลำดับ เป็นเวลา 7-14 วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ใช้ solid phase microextraction (SPME) fiber (Supelco) ที่บรรจุ 50/30 divinylbenzene/carboxen on polydimethylsiloxane ดูดซับสารระเหยโดยเทคนิค head space เป็นเวลา 45 นาที สอดปลายเข็มไฟเบอร์ใส่ในช่องสำหรับฉีดสารแบบ splitless ของ gas chromatography GC 2010 (Shimadzu, Japan) เป็นเวลา 10 นาที ใช้คอลัมน์ I.D. DB-Wax capillary column ขนาด 30 m × 0.25 มิลลิเมตร ที่เคลือบด้วยฟิล์มหนา 0.25 มิลลิเมตร สำหรับเชื้อราใช้สภาวะการทดสอบตามวิธีการของ Suwannarach et al. 2013 และแอตคิโนมัยซีทใช้สภาวะการทดสอบตามวิธีการของ Wan et al. 2008 จากนั้นวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยเครื่อง mass spectrometer MS-QP 2010 Plus (Shimadzu, Japan) โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสารเคมี NIST database

การบ่งชี้สารทุติยภูมิเมแทบอไลต์ซึ่งออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค bioautography

ทำการแยกสารด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) โดยนำสารสกัดหยาบของ *Streptomyces* sp. AB21 และ AB83 ที่ได้จากทดลองที่ 3.3 มาละลายด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วจุดลงบนแผ่น TLC (Silica gel F254) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นปล่อยให้สารเคลื่อนที่แยกออกจากกันโดยใช้ dichlomethane: methanol เป็น mobile phase ในอัตราส่วน 95: 5 สำหรับ crude extract ของ *Streptomyces* sp. AB21 และอัตราส่วน 96: 4 สำหรับ *Streptomyces* sp. AB83 ปล่อยให้สารเกิดการเคลื่อนที่จนถึง solvent front แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้ แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากนั้นทำการคำนวณหาค่า Rf ของสารที่แยกได้จากสารสกัดหยาบแล้วนำแผ่น TLC มาทดสอบด้วยเทคนิค bioautography โดยนำมาวางบนจานอาหารที่มีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคอายุ 2 วัน วาง

แผ่น TLC นาน 1 ชั่วโมง (ภาพ 1) ให้สารแพร่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำแผ่น TLC ออก และทำการวัดค่าการยับยั้งการเจริญทุก 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Choma and Grzelak 2011; Patil et al. 2013)

ผลการทดลอง

2.3.1 ผลการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์และการจัดจำแนก

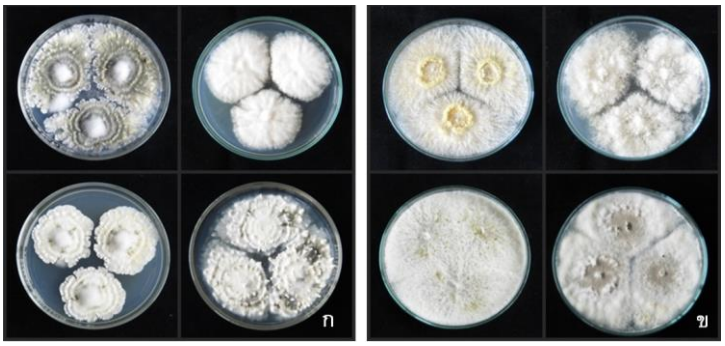
การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์โดยเทคนิค Tissue transplanting

จากจำนวนชิ้นพืชทั้งหมด 300 ชิ้น โดยแบ่งเป็น veins, rachides และ petioles อย่างละ 100 ชิ้น พบว่าใบพืชส่วน vein มีจำนวนไอโซเลทของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืชมากที่สุด โดยคิดเป็น 46 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด (ตาราง 27) จำนวนไอโซเลทที่เจริญออกมาจากชิ้นพืชทั้งหมด 291 ไอโซเลท ถูกแยกจนได้เชื้อบริสุทธ์เพื่อเก็บไว้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคจำนวน 96 ไอโซเลท

ตาราง 27 แสดงจำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบปาล์มน้ำมันโดยวิธี Tissue transplanting และ Half plate method

ลักษณะ	Tissue transplanting			Half plate method		
	vein	rachis	petiole	vein	rachis	petiole
จำนวนตัวอย่าง	100	100	100	50	50	50
จำนวนเชื้อที่ถูกแยก	135	119	37	66	13	39
เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่ถูกแยก	46	41	13	56	11	33

เมื่อทำการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์พบว่า ได้เชื้อราทั้งหมด 26 สกุล ได้แก่ *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* spp., *Curvalaria* sp., *Daldinia* sp., *Fusarium* spp., *Hypoxylon* sp., *Muscodor* sp., เชื้อราในกลุ่ม Mycelia Sterilia 2 สกุล, *Penicillium* sp., *Phomopsis* spp., *Phyllosticta* sp., *Xylaria* spp., และเชื้อราที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ 14 ไอโซเลท โดยเชื้อราในกลุ่ม *Xylaria* spp., *Phomopsis* spp. และ *Colletotrichum* sp. เป็นสกุลเด่นที่พบในใบปาล์มน้ำมัน (ภาพ 39) โดยมีจำนวน 32, 17 และ 13 ไอโซเลทตามลำดับ การแยกโดยเทคนิคนี้ได้เชื้อราที่มีรายงานว่าสามารถสร้างสารระเหยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้ คือ *Muscodor* sp., *Hypoxylon* sp. และ *Daldinia* sp. โดยจำนวนและชนิดของเชื้อราทั้ง 96 ไอโซเลท แสดงในตาราง 28



ภาพ 39 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเอนโดไฟท์ซึ่งเป็นสกุลเด่นที่แยกได้จากใบปาล์มน้ำมัน โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ก) *Xylaria* spp. (ข) *Phomopsis* spp.

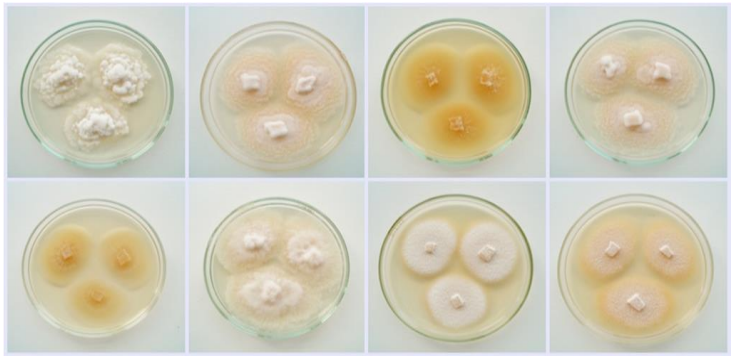
ตาราง 28 แสดงจำนวนและชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบปาล์มน้ำมันโดยวิธี Tissue transplanting

สกุล	จำนวนไอโซเลท	สกุล	จำนวนไอโซเลท
Cladosporium sp.	1	*Penicillium* sp.	1
Colletotrichum sp.1	2	*Phomopsis* sp.1	3
Colletotrichum sp.2	1	*Phomopsis* sp.2	3
Colletotrichum sp.3	4	*Phomopsis* sp.3	3
Colletotrichum sp.4	2	*Phomopsis* sp.4	2
Colletotrichum sp.5	1	*Phomopsis* sp.5	1
Colletotrichum sp.6	1	*Phomopsis* sp.6	5
Curvalaria sp.	2	*Phyllosticta* sp.1	3
Daldinia sp.	1	Unknown	14
Fusarium sp.1	2	*Xylaria* sp.1	3
Fusarium sp.2	1	*Xylaria* sp.2	17
Hypoxylon sp.	2	*Xylaria* sp.3	5
Muscodor sp.	3	*Xylaria* sp.4	3
Mycelia Sterilia 1	1	*Xylaria* sp.5	1
Mycelia Sterilia 2	3	*Xylaria* sp.6	3

การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์โดยเทคนิค half plate method

จากจำนวนตัวอย่างชิ้นพืช 150 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น veins, rachides และ petioles อย่างละ 50 ตัวอย่าง พบว่าใบพืชส่วน vein มีจำนวนไอโซเลทของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้

มากที่สุด โดยคิดเป็น 56 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด (ตาราง 27) จำนวนไอโซเลทที่เจริญออกมาจากชิ้นพืชทั้งหมด 118 ไอโซเลท ถูกแยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อเก็บไว้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคจำนวน 37 ไอโซเลท เมื่อทำการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์พบว่า ได้เชื้อราทั้งหมด 13 สกุล (ตาราง 29) รวมถึงเชื้อราที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ 4 สกุล โดยเชื้อราในกลุ่ม *Xylaria* spp., *Muscodor* spp. และ *Colletotrichum* spp. เป็นสกุลเด่นที่พบในใบปาล์มน้ำมันจากการแยกด้วยเทคนิค half plate method โดยมีจำนวน 8, 7 และ 5 ไอโซเลทตามลำดับ การแยกโดยเทคนิคนี้ทำให้ได้เชื้อราในสกุล *Muscodor* spp. (ภาพ 40) มากกว่าการแยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplanting ซึ่งเป็นเชื้อราสกุลที่มีรายงานถึงการสร้างสารระเหยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสาเหตุโรค โดยจำนวนและชนิดของเชื้อราทั้ง 37 ไอโซเลท แสดงในตาราง 29



ภาพ 40 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Muscodor* spp. เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน ในที่มืดสลับสว่างที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

ตาราง 29 จำนวนและชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบปาล์มน้ำมันโดยวิธี Half plate method

สกุล	จำนวนไอโซเลท	สกุล	จำนวนไอโซเลท
Cladosporium sp.	1	*Pestalotiopsis* spp.	4
Colletotrichum spp.	5	*Phomopsis* spp.	5
Fusarium sp.	1	*Phoma* sp.	1
Hypoxylon sp.	1	Unknown	4
Muscodor spp.	7	*Xylaria* spp.	8

2.3.2 ผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทรอบรากและการจัดจำแนก

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจำนวน 5 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยพลังงานชีวมวล พบลักษณะของดินเป็นดินเหนียวปนทราย มีสีน้ำตาลเข้ม ประกอบกับมีเศษรากพืชจำนวนมาก ดังแสดงในตาราง 30

ตาราง 30 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างดิน

ตัวอย่าง	ลักษณะดิน	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
B1	ดินร่วน สีน้ำตาลดำ มีรากพืชปน	6.535
B2	ดินร่วน สีน้ำตาลดำ มีรากพืชปน	7.083
B3	ดินร่วนปนทราย สีน้ำตาลดำ มีรากพืชปน	6.504
B4	ดินเหนียว สีน้ำตาลดำ มีรากพืชปน	6.421
B5	ดินเหนียว สีน้ำตาลดำ มีรากพืชปน	6.321

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยการปรับสภาพดินก่อนทำการ Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ SCA และ HVA ที่เติมสารปฏิชีวนะ พบว่าชนิดของอาหารมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่วิธีการปรับสภาพดินด้วยความร้อนแห้ง และชุดควบคุมให้ผลจำนวนแอคติโนมัยซีทที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงในตาราง 31 โดยได้ทำการคัดเลือกแอคติโนมัยซีททั้งหมด 226 ไอโซเลท ไว้สำหรับทดสอบต่อไป

ตาราง 31 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการปรับสภาพดินต่อจำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีท

ลักษณะ / ตัวอย่าง	อาหารเลี้ยงเชื้อ		วิธีการปรับสภาพดิน		
	SCA	HVA	ควบคุม	ความร้อน	ฟีนอล
B1	172*	122	72	91	131
B2	90	115	86	79	36
B3	38	32	24	32	14
B4	50	106	20	43	93
B5	67	48	40	37	37
จำนวนทั้งหมด	417a	423a	242a	282a	311b

* ไอโซเลท

การจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของแอคติโนมัยซีท

จากจำนวนแอคติโนมัยซีททั้งหมด 226 ไอโซเลท ทำการศึกษาลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างสปอร์ พบแอคติโนมัยซีทจำนวน 205 ไอโซเลท อยู่ในกลุ่มของ streptomycetes และ 21 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มของ non-streptomycetes จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ พบว่า แอคติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคปาล์มน้ำมัน จำนวน 24 ไอโซเลท ทั้งหมดมี *LL*-DAP เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (ตาราง 32) ทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็นสกุล *Streptomyces* ซึ่งสอดคล้องกับรูปร่างของสปอร์ที่มีลักษณะเป็นเกลียวและต่อกันเป็นสายยาว

เลือกทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและลักษณะทางพันธุกรรมของแอคติโนมัยซีท จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ AB21, AB24, AB83, AB168, AB204 และ AB225 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคสูงที่สุดเมื่อทดสอบโดยวิธี dual culture assay ต่อมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP เพื่อทำการยืนยันสกุลและบ่งชี้ชสปีชีส์ พบว่าในแต่ละอาหารปรากฏสีของ aerial mycelium, substrate mycelium และรงควัตถุที่ละลายได้ที่แตกต่างกัน (ตาราง 33) องค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อแอคติโนมัยซีท เช่น กรดไขมัน น้ำตาลและ menaquinone มีความคล้ายคลึงกัน ดังแสดงในตาราง 34 ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าทั้ง 6 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces*

เมื่อนำลำดับเบสของ *Streptomyces* spp. ไปเทียบกับฐานข้อมูลของ EMBL/GenBank/DDBJ พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลทมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้ออ้างอิงในฐานข้อมูลที่ต่างสปีชีส์กัน จากการวิเคราะห์ผังวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ประกอบกับเชื้อบางสายพันธุ์ได้ทำการศึกษาโดยเทคนิค DNA-DNA hybridization ทำให้สามารถระบุสปีชีส์ของ *Streptomyces* sp. ทั้ง 6 ไอโซเลทได้ และพบว่าไอโซเลท AB204 และ AB225 จัดเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ (ตาราง 35)

ตาราง 32 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค

ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2				DAP	สกุล
	ขนาด (มม.)	AM*	SM	PG		
AB12	5	Medium gray	Moderate olive brown	Light olive brown	LL	*Streptomyces*
AB13	6	Reddish black	Strong yellow	-	LL	*Streptomyces*
AB21	4	Light brownish gray	Brilliant yellow	-	LL	*Streptomyces*
AB22	3	White	Yellowish white	-	LL	*Streptomyces*
AB24	3	Grayish olive	Brilliant orange yellow	Vivid yellow	LL	*Streptomyces*
AB30	4	Yellowish gray	Strong yellow	-	LL	*Streptomyces*
AB44	5	Greenish gray	Deep yellow	Dark yellow	LL	*Streptomyces*
AB76	4	White-light gray	Light yellow	-	LL	*Streptomyces*
AB81	8	Yellowish white	Dark brown	-	LL	*Streptomyces*
AB83	3	Medium Gray	Brilliant yellow	-	LL	*Streptomyces*
AB88	3	White-dark gray	Strong yellow	-	LL	*Streptomyces*
AB91	6	Greenish gray	Deep yellow	Deep yellow	LL	*Streptomyces*
AB125	4	Light gray	Dark brown	-	LL	*Streptomyces*
AB158	3	Light gray	Deep yellow	-	LL	*Streptomyces*
AB163	2	White-gray	Strong yellow	-	LL	*Streptomyces*
AB164	6	Medium gray-black	Moderate olive brown	Dark greenish yellow	LL	*Streptomyces*
AB168	6	Light gray	Light yellow	-	LL	*Streptomyces*
AB174	4	Light gray	Dark brown	-	LL	*Streptomyces*
AB179	6	Medium gray	Moderate olive brown	Dark greenish yellow	LL	*Streptomyces*
AB188	5	Medium gray	Deep yellow	Dark yellow	LL	*Streptomyces*
AB195	5	Medium gray-black	Light olive	-	LL	*Streptomyces*
AB199	4	Purplish gray	Pale yellow	-	LL	*Streptomyces*
AB204	3	Dark gray	Pale yellow	-	LL	*Streptomyces*
AB225	4	Light greenish blue	Strong yellow	Light brown	LL	*Streptomyces*

*AM, สีของ aerial mycerium; SM, สีของ substrate mycerium; PG, สีของรงควัตถุที่ละลายได้; DAP, diaminopimelic acid

ตาราง 33 ลักษณะโคโลนีและการเจริญของแอคติโนมัยซีทบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

Strain no.	Medium	Growth	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Diffusible pigment
AB21	ISP2	Good	Covert gray, abundant	Bamboo, Buff	None
	ISP3	Good	Alabaster tint, moderate	Pearl pink shell	None
	ISP4	Good	Covert gray, abundant	Ivory	None
	ISP5	Moderate	Pearl shell tint, few	Ivory	None
AB24	ISP2	Good	Covert tan, moderate	Amber topaz	Brown
	ISP3	Good	State tan, moderate	Mustard tan	Brown
	ISP4	Good	Covert brown, abundant	Ivory	Brown
	ISP5	Moderate	Covert tan, few	Gold	Yellow
AB83	ISP2	Good	Ashes, abundant	Covert tan	None
	ISP3	Moderate	Beaver, few	Beige gray	None
	ISP4	Good	Ashes to dark brown, abundant	Putty	Yellow
	ISP5	Moderate	Chocolate, moderate	Parchment	Yellow
AB168	ISP2	Good	Oyster white, abundant	Light mustard tan	Yellow
	ISP3	Poor	White, few	Ivory	None
	ISP4	Moderate	Oyster white, moderate	Mustard tan	None
	ISP5	Moderate	White, few	Bamboo chamois	Brown
AB204	ISP2	Good	Lead, abundant	Light brown	None
	ISP3	Poor	Gray, few	Mustard tan	None
	ISP4	Good	Taupe brown, abundant	Covert gray	None
	ISP5	Poor	Bamboo, Buff, few	Light amber	None
AB225	ISP2	Good	Aqua gray, abundant	Bamboo, Buff	Brown
	ISP3	Moderate	Aqua green tint, moderate	White	None
	ISP4	Good	Aqua gray, abundant	Pearl, Shell tint	None
	ISP5	Poor	White, few	Pearl, Shell tint	Brown

ตาราง 34 ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน น้ำตาลและ menaquinone ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อ *Streptomyces* spp.

สายพันธุ์	กรดไขมัน		น้ำตาล		Menaquinones	
	ชนิด	เปอร์เซ็นต์	ชนิด	เปอร์เซ็นต์	ชนิด	เปอร์เซ็นต์
Streptomyces sp. AB21	iso-$C_{16:0}$	22.48	Ribose	3.31	MK-9(H6)	38.48
	anteiso-$C_{15:0}$	18.16	Mannose	28.20	MK-9(H4)	27.61
	iso-$C_{15:0}$	14.47	Galactose	3.59	MK-9(H8)	21.78
			Glucose	29.66	MK-9(H2)	4.08
Streptomyces sp. AB24	anteiso-$C_{15:0}$	29.13	Ribose	29.27	MK-9(H8)	59.24
	anteiso-$C_{17:0}$	15.78	Mannose	6.81	MK-9(H6)	19.43
	iso-$C_{15:0}$	13.65	Galactose	24.24	MK-9(H4)'	4.33
			Glucose	34.57	MK-9(H4)	2.56
					MK-9(H10)	2.46
Streptomyces sp. AB83	iso-$C_{16:0}$	27.66	Ribose	8.46	MK-9(H8)	58.80
	anteiso-$C_{15:0}$	23.21	Mannose	16.19	MK-9(H6)	19.40
	iso-$C_{14:0}$	9.58	Fucose	0.08	MK-9(H4)'	4.27
			Galactose	16.09	MK-9(H4)	2.62
			Glucose	38.92	MK-9(H10)	2.47
Streptomyces sp. AB168	iso-$C_{16:0}$	23.51	Ribose	5.95	MK-9(H8)	58.30
	iso-$C_{15:0}$	16.11	Mannose	2.64	MK-9(H6)	19.55
	anteiso-$C_{15:0}$	13.45	Arabinose	1.44	MK-9(H4)'	4.25
			Galactose	30.23	MK-9(H4)	2.71
			Glucose	42.29	MK-9(H10)	2.50
Streptomyces sp. AB204	iso-$C_{15:0}$	16.79	Ribose	10.96	MK-9(H4)	51.37
	iso-$C_{16:0}$	14.77	Galactose	3.44	MK-9(H6)	13.96
	anteiso-$C_{15:0}$	14.54	Glucose	76.46	MK-9(H2)	9.82
					MK-8(H4)	9.35
Streptomyces sp. AB225	iso-$C_{16:0}$	22.25	Ribose	11.78	MK-9(H6)	51.02
	$C_{16:0}$	19.66	Mannose	10.79	MK-9(H8)	15.61
	anteiso-$C_{15:0}$	15.88	Galactose	6.99	MK-9(H4)	12.50
			Glucose	58.72		

ตาราง 35 เชื้อสายพันธุ์อ้างอิงที่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *Streptomyces* sp.

Strain	Related species	Similarity (%)	Probably species
Streptomyces sp. AB21	*S. albulus*	99.72	
	S. noursei	99.72	*S. albulus*
	S. yunnanensis	99.59	
Streptomyces sp. AB24	*S. corchorusii*	99.79	
	S. olivaceoviridis	99.66	*S. corchorusii*
	S. canarius	99.66	
Streptomyces sp. AB83	*S. sioyaensis*	99.93	
	S. tubercidicus	99.52	*S. sioyaensis*
	S. nigrescens	99.38	
Streptomyces sp. AB168	*S. iranensis*	99.58	
	S. yogyakartensis	99.29	*S. iranensis*
	S. violaceusniger	99.29	
Streptomyces sp. AB204	*S. orinoci*	98.48	
	S. xinghaiensis	98.21	Novel species
	S. griseocarneus	98.07	
Streptomyces sp. AB225	*S. violaceus*	99.21	
	S. janthinus	99.21	Novel species
	S. koyaensis	98.96	

2.3.3 ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธี Dual culture assay

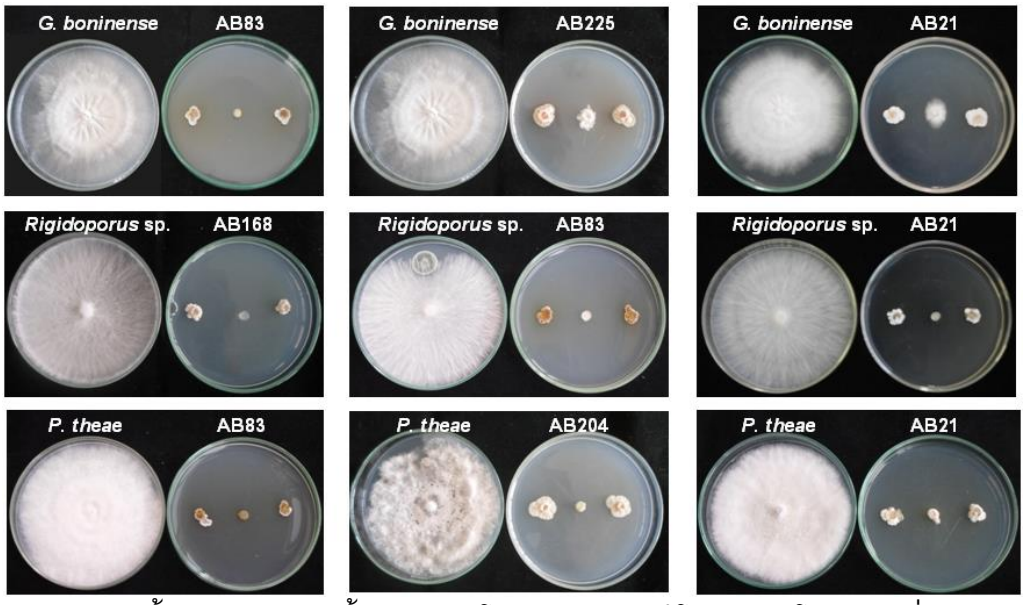
จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการควบคุมการเจริญของ *G. boninense* BCC21330 พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด คือเชื้อราในสกุล *Muscodor* spp. โดยให้ผลการยับยั้งมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตาราง 36

เมื่อนำแอคติโนมัยซีททั้งหมด 226 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค พบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ให้ผลการยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 24 ไอโซเลท (ตาราง 37) โดยมีเชื้อ *S. albulus* AB21, *S. corchorusii* AB24, *S. sioyaensis* AB83, *S. iranensis* AB168 และเชื้อสายพันธุ์ใหม่ *Streptomyces* sp. AB204 และ *Streptomyces* sp. AB225 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ดี แสดงผลการยับยั้ง

มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ในเชื้อทดสอบ 1 ใน 3 ชนิด ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญได้น้อย ดังภาพ 41

ตาราง 36 ผลการยับยั้งการเจริญของ *G. boninense* BCC21330 โดยเทคนิค Dual culture assay

ไอโซเลท	รูปแบบการยับยั้ง	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	SD
Myceria Sterilia BV3/2 9.3	Competition	86.5	1.5
Muscodor sp. BV1/2 10.1	Volatile	100.0	0.0
Muscodor sp. BR5/1 7.1	Volatile	100.0	0.0
Muscodor sp. BR3/1 8.1	Volatile	99.5	0.9
Muscodor sp. 2BV3 7.1	Volatile	99.5	0.9
Muscodor sp. 2BR3 4.1	Volatile	100.0	0.0
Muscodor sp. 2BR4 1.1	Volatile	99.7	1.1
Muscodor sp. 2BV5 9.1	Volatile	99.5	0.9
Muscodor sp. 2BP5 3.1	Volatile	99.5	0.9
Muscodor sp. 2BP5 3.2	Volatile	99.5	0.9



ภาพ 41 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค 3 สายพันธุ์ โดยแอคติโนมัยซีทที่แสดงผลการยับยั้งมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค dual culture assay

ผลการคัดกรองจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่สร้างสารระเหยที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคปาล์มน้ำมันโดยวิธี Dual culture volatile assay

เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Dual culture assay มาศึกษาการสร้างสารระเหยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *G. boninense* และ *P. theae* ด้วยวิธี Dual culture volatile assay พบว่าเชื้อราสกุล *Muscodor* spp. สร้างสารระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *G. boninense* ได้โดยให้ผลการยับยั้งการเจริญมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้ผลการยับยั้ง *P. theae* ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 38)

ตาราง 37 ผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคโดยแอคติโนมัยซีท เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Dual culture assay

ไอโซ	*G. boninense*		*Rigidoporus* sp.		*P. theae*	
เลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	SD	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	SD	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	SD
AB12	69.7	7.0	82.6	2.2	88.8	4.1
AB13	69.1	3.8	82.0	3.7	94.9	2.2
AB21	**88.2**	**2.2**	**98.3**	**3.4**	**95.5**	**1.8**
AB22	75.3	1.8	78.7	2.2	85.4	2.9
AB24	**87.6**	**1.3**	**84.3**	**1.8**	**81.5**	**2.2**
AB30	74.7	5.9	81.5	3.4	79.2	3.8
AB44	69.1	2.2	79.2	2.2	73.6	3.8
AB76	75.8	3.4	77.5	8.0	85.4	5.9
AB81	79.8	1.8	74.7	5.3	77.0	2.8
AB83	**99.4**	**1.1**	**98.9**	**1.3**	**97.8**	**1.8**
AB88	62.9	4.3	77.5	9.9	81.5	7.4
AB91	69.1	7.9	71.9	4.7	80.9	7.9
AB125	62.9	2.9	78.1	2.8	87.6	2.9
AB158	61.2	3.8	78.7	1.3	88.2	2.2
AB163	62.4	2.2	78.1	3.4	86.5	1.8
AB164	66.3	1.8	71.9	4.3	83.1	1.3
AB168	**61.2**	**2.2**	**100.0**	**0.0**	**88.8**	**3.2**
AB174	71.9	4.3	83.1	5.3	87.1	1.1
AB179	68.5	3.2	75.6	8.8	90.4	3.8
AB188	68.5	10.4	84.8	2.8	87.1	2.2
AB195	71.3	1.1	86.5	1.8	76.4	2.9
AB199	80.3	2.2	55.1	0.0	67.4	7.0

AB204	**72.5**	**2.2**	**91.6**	**7.4**	**97.2**	**2.2**
AB225	**88.8**	**0.0**	**87.1**	**3.4**	**70.8**	**3.2**

* แสดงเฉพาะไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 38 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค โดยเทคนิค Dual culture volatile assay

ไอโซเลท	*G. boninense*		*P. theae*	
	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	SD	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	SD
Muscodor sp. BV1/2 10.1	100.0	0.0	60.0	0.1
Muscodor sp. BR3/1 8.1	91.2	0.1	65.0	0.2
Muscodor sp. BR5/1 7.1	100.0	0.0	60.0	0.1
Muscodor sp. 2BV3 7.1	78.9	0.1	1.7	0.1
Muscodor sp. 2BR3 4.1	100.0	0.0	5.0	0.1
Muscodor sp. 2BR4 1.1	100.0	0.0	5.0	0.1
Muscodor sp. 2BV5 7.1	59.6	0.2	5.0	0.1
Muscodor sp. 2BV5 9.1	96.5	0.1	0.0	0.0
Muscodor sp. 3BP5 3.1	70.2	0.2	0.0	0.0
Muscodor sp. 2BP5 3.2	96.5	0.1	8.3	0.2
Unknown 2BR4 9.2	96.5	0.1	3.3	0.1

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค

ทำการเพาะเลี้ยง *S. albulus* AB21, *S. sioyaensis* AB83 และ *Streptomyces* sp. AB225 ด้วยเทคนิคการหมัก จากนั้นนำมาสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตทและระเหยตัวทำละลายออกด้วย evaporator เพื่อนำสารสกัดหยาบมาใช้ทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค (MIC) โดยวิธี paper disc agar diffusion assay พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเหลว ISP2 ให้ผลการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ดีกว่า โดยค่า MIC ของการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *G. boninense, R. microporus* และ *P. theae* ดังแสดงในตาราง 39 พบว่าสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. albulus* AB21 และ *S. sioyaensis* AB83 ให้ค่า MIC ต่อเชื้อรา *G. boninense* ที่ต่ำกว่าสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา nystatin แต่ *Streptomyces* sp. AB831 ให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *P. theae* ต่ำกว่า nystatin ในขณะที่การยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ค่า MIC ของ nystatin จะต่ำกว่า นอกจากนี้สารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* sp. AB225 มีค่า MIC ที่สูง เมื่อเทียบกับ nystatin

ตาราง 39 ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดจากจุลินทรีย์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค

เชื้อสาเหตุโรค	*S. albulus* AB21		*S. sioyaensis* AB83		*Streptomyces* sp. AB225		Nystatin
	SSF*	LSF	SSF	LSF	SSF	LSF	
G. boninense BCC21330	0.156**	0.039	0.039	0.039	5.00	5.00	0.312
P. theae CMU-ELA1	2.50	1.25	0.039	0.078	5.00	2.50	0.312
R. microporus	1.25	1.25	0.312	0.625	5.00	5.00	0.312

*SSF=การเลี้ยงเชื้อแบบการหมักบนอาหารแข็ง, LSF=การเลี้ยงเชื้อแบบการหมักบนอาหารเหลว

** หน่วยของ MIC คือ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3.4 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

การตรวจหาการผลิตไซเดอร์โรฟอร์และความสามารถในการละลายฟอสเฟตที่อยู่ในรูปของ Tricalcium phosphate โดยเป็นการวิเคราะห์ผลในเชิงคุณภาพ ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกก่อนที่จะทำการศึกษาในเชิงปริมาณ ในขณะที่การวิเคราะห์ผลการผลิต indole 3-acetic acid สามารถคำนวณหาปริมาณ IAA ที่เชื้อสร้างขึ้นได้ ดังแสดงในตาราง 40 โดยปริมาณ IAA ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น สามารถตรวจวัดและคำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน IAA เชื้อ *Streptomyces* sp. AB110 สร้าง IAA ได้สูงสุด รองลงมาคือ *Streptomyces* sp. AB46

ตาราง 40 การตรวจหาจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช

Isolate	**Taxa**	**การสร้างไซเดอร์โรฟอร์**		**การละลายฟอสเฟต**	**การสร้าง IAA**	
		การเกิดโซนใส	**สี**		**ปริมาณ***	**SD**
A49	*Phomopsis* sp.1	+	ชมพู	-	22.7	0.2
A74	*Xylaria* sp.2	+	เหลือง	-	21.0	0.1
A81	*Hypoxylon* sp.	+	ชมพู	-	11.9	0.8
A110	*Muscodor* sp.	+	เหลือง	+	6.9	0.1
A112	*Phomopsis* sp.4	+	ชมพู	-	49.4	0.1
A122	*Phomopsis* sp.4	+	ส้ม	-	17.4	0.6
A139	*Xylaria* sp.7	+	ชมพู	-	38.2	0.5
A146	*Nodulisporium* sp.4	-	-	-	31.8	0.3
A182	*Phomopsis* sp.5	+	ชมพู	-	26.3	0.2
A190	unknown	+	เหลือง	-	7.4	0.4
A192	*Xylaria* sp.4	+	ชมพู	-	31.5	0.3
A201	*Pestalotiopsis* sp.2	+	เหลือง	-	9.4	0.1
B4	*Hypoxylon* sp.	+	ชมพู	-	5.1	0.2
B9	*Muscodor* sp.	-	-	+	17.6	0.3

Isolate	Taxa	การสร้างไซเดอร์โรฟอร์		การละลายฟอสเฟต	การสร้าง IAA	
		การเกิดโซนใส	สี		ปริมาณ*	SD
B41	*Muscodor* sp.	+	ชมพู	+	6.5	0.1
B81	*Fusarium* sp.2	-	-	-	30.9	0.2
B87	*Muscodor* sp.	+	เหลือง	+	8.4	0.1
2B16	*Muscodor* sp.	+	เหลือง	-	9.2	0.1
2B20	*Muscodor* sp.	+	เหลือง	-	11.8	0.0
2B21	*Muscodor* sp.	+	เหลือง	-	9.4	0.2
2B27	*unknown*	+	เหลือง	-	11.8	0.2
2B31	*Muscodor* sp.	+	ชมพู	+	8.8	0.1
2B36	*Muscodor* sp.	+	ชมพู	+	11.6	0.1
2B37	*Muscodor* sp.	+	ชมพู	+	11.8	0.1
AB1	Actinomycetes	+	เหลือง	+	12.6	1.2
AB2	Actinomycetes	+	ชมพู	+	22.4	0.9
AB3	Actinomycetes	+	เหลือง	+	23.5	1.4
AB4	Actinomycetes	+	เหลือง	-	16.7	1.3
AB7	Actinomycetes	+	ชมพู	+	16.7	0.7
AB8	Actinomycetes	+	เหลือง	+	12.8	0.9
AB9	Actinomycetes	-	-	+	34.4	0.8
AB12	Actinomycetes	+	เหลือง	-	13.3	2.2
AB13	Actinomycetes	+	เหลือง	+	3.5	0.8
AB17	Actinomycetes	+	เหลือง	+	4.7	0.3
AB19	Actinomycetes	+	เหลือง	+	10.7	1.0
AB20	Actinomycetes	+	เหลือง	-	16.5	2.0
AB21	Actinomycetes	+	เหลือง	+	10.6	0.1
AB22	Actinomycetes	+	เหลือง	+	13.7	0.4
AB24	Actinomycetes	+	เหลือง	+	28.9	1.8
AB26	Actinomycetes	+	เหลือง	+	7.0	0.4
AB30	Actinomycetes	+	เหลือง	+	17.3	2.1
AB31	Actinomycetes	+	ชมพู	+	13.9	0.8
AB33	Actinomycetes	+	เหลือง	+	3.7	0.4
AB38	Actinomycetes	+	เหลือง	+	11.9	0.6
AB39	Actinomycetes	+	เหลือง	+	6.0	1.0
AB42	Actinomycetes	+	เหลือง	+	23.0	2.0
AB44	Actinomycetes	+	เหลือง	+	8.8	0.5
AB45	Actinomycetes	+	เหลือง	+	18.7	1.4

Isolate	Taxa	การสร้างไซเดอร์โรฟอร์		การละลายฟอสเฟต	การสร้าง IAA	
		การเกิดโซนใส	สี		ปริมาณ*	SD
AB46	Actinomycetes	+	ส้ม	+	40.3	2.9
AB50	Actinomycetes	+	เหลือง	+	18.8	2.0
AB53	Actinomycetes	+	เหลือง	+	14.8	1.0
AB56	Actinomycetes	+	เหลือง	+	4.4	0.4
AB58	Actinomycetes	+	เหลือง	+	27.0	2.3
AB59	Actinomycetes	+	ชมพู	+	19.6	1.8
AB61	Actinomycetes	-	-	+	22.0	0.6
AB63	Actinomycetes	+	ชมพู	+	12.4	1.4
AB71	Actinomycetes	+	เหลือง	+	12.5	1.5
AB73	Actinomycetes	+	เหลือง	-	39.4	1.3
AB76	Actinomycetes	+	ส้ม	+	15.1	0.7
AB77	Actinomycetes	+	เหลือง	-	24.5	0.7
AB79	Actinomycetes	+	ชมพู	-	19.1	1.5
AB81	Actinomycetes	+	เหลือง	+	17.1	1.3
AB83	Actinomycetes	+	เหลือง	+	35.7	3.8
AB84	Actinomycetes	+	เหลือง	-	28.2	1.4
AB85	Actinomycetes	-	-	-	29.1	1.3
AB88	Actinomycetes	+	เหลือง	+	8.3	0.4
AB89	Actinomycetes	+	เหลือง	+	9.9	0.9
AB92	Actinomycetes	+	เหลือง	-	17.1	0.4
AB95	Actinomycetes	+	ชมพู	-	36.0	0.4
AB96	Actinomycetes	+	เหลือง	+	23.4	2.5
AB99	Actinomycetes	+	เหลือง	+	12.2	0.8
AB100	Actinomycetes	+	เหลือง	+	6.9	1.2
AB102	Actinomycetes	+	เหลือง	+	27.5	1.7
AB104	Actinomycetes	+	เหลือง	-	17.8	1.1
AB108	Actinomycetes	+	เหลือง	-	14.6	0.1
AB109	Actinomycetes	+	เหลือง	-	36.6	2.9
AB110	Actinomycetes	+	เหลือง	+	58.7	4.7
AB111	Actinomycetes	+	เหลือง	+	4.8	0.4
AB115	Actinomycetes	+	ชมพู	-	16.1	1.0
AB116	Actinomycetes	+	เหลือง	-	16.6	1.5
AB122	Actinomycetes	+	เหลือง	-	25.9	1.5
AB125	Actinomycetes	+	เหลือง	+	15.0	1.0

Isolate	Taxa	การสร้างไซเดอร์โรฟอร์		การละลายฟอสเฟต	การสร้าง IAA	
		การเกิดโซนใส	สี		ปริมาณ*	SD
AB133	Actinomycetes	+	เหลือง	-	21.0	0.6
AB134	Actinomycetes	+	เหลือง	-	17.1	0.7
AB138	Actinomycetes	+	เหลือง	-	20.3	1.9
AB144	Actinomycetes	+	เหลือง	-	22.4	1.7
AB151	Actinomycetes	+	เหลือง	+	4.5	0.3
AB158	Actinomycetes	+	เหลือง	+	34.3	2.6
AB159	Actinomycetes	+	เหลือง	+	14.4	1.2
AB164	Actinomycetes	-	-	+	16.3	1.6
AB168	Actinomycetes	+	เหลือง	+	35.2	2.2
AB171	Actinomycetes	+	เหลือง	+	7.8	0.1
AB174	Actinomycetes	+	เหลือง	+	9.6	0.8
AB179	Actinomycetes	+	ชมพู	-	25.9	0.3
AB181	Actinomycetes	+	เหลือง	+	6.9	0.1
AB182	Actinomycetes	+	เหลือง	+	12.1	0.4
AB186	Actinomycetes	+	เหลือง	-	31.2	2.9
AB188	Actinomycetes	+	เหลือง	+	11.6	0.7
AB191	Actinomycetes	+	ส้ม	-	18.6	1.6
AB195	Actinomycetes	+	เหลือง	+	4.6	1.8
AB196	Actinomycetes	+	เหลือง	+	26.6	0.8
AB199	Actinomycetes	+	เหลือง	-	14.4	1.8
AB200	Actinomycetes	+	เหลือง	-	18.2	0.2
AB202	Actinomycetes	+	เหลือง	-	18.6	1.2
AB203	Actinomycetes	+	เหลือง	-	23.8	0.6
AB204	Actinomycetes	+	เหลือง	+	4.9	0.3
AB211	Actinomycetes	+	เหลือง	-	19.5	1.0
AB212	Actinomycetes	+	ชมพู	-	16.0	0.6
AB217	Actinomycetes	+	เหลือง	-	22.1	0.6
AB222	Actinomycetes	+	เหลือง	-	18.0	0.5
AB225	Actinomycetes	+	เหลือง	+	36.6	3.6

* หน่วยปริมาณ คือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการวัดปริมาณการละลายฟอสเฟตของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 35 ไอโซเลท และเชื้อรา จำนวน 14 ไอโซเลท โดยคำนวณหาปริมาณของฟอสฟอรัสที่ละลายได้เทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ KH_2PO_4 พบว่า *Streptomyces* sp. ไอโซเลท AB96, AB24 และ

AB110 แสดงค่าการละลายฟอสเฟตได้สูงสุด 3 อันดับแรก มีค่าความเข้มข้นของฟอสฟอรัสที่ละลายได้เท่ากับ 183.40, 177.60 และ 174.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3.5 การศึกษาผลของสารระเหยจากจุลินทรีย์ต่อการเจริญของพืช

การคัดเลือกจุลินทรีย์สร้างสารระเหยที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญของพืช

จากการทดสอบรมเมล็ด *A. thaliana* col-0 ด้วยเชื้อรา *Nodulisporium* sp. A75 และ A119 และ *S. albulus* AB21 และ *Streptomyces* sp. AB225 พบว่าต้นกล้า *A. thaliana* col-0 ที่ถูกรมด้วย *Nodulisporium* sp. ทั้งสองไอโซเลทมีการเจริญช้า ต้นเล็ก ใบเหลือง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงในภาพ 42A และ 42B แต่ต้นกล้าที่ถูกรมด้วย *S. albulus* AB21 และ *Streptomyces* sp. AB225 มีการเจริญเติบโตที่ดี (ภาพ 42C และ 42D) โดย *S. albulus* AB21 ให้ผลความยาวรากและลำต้น น้ำหนักรากและลำต้น รวมถึงปริมาณคลอโรฟิลล์ที่สูงกว่าต้นกล้าชุดควบคุม ดังแสดงในตาราง 41

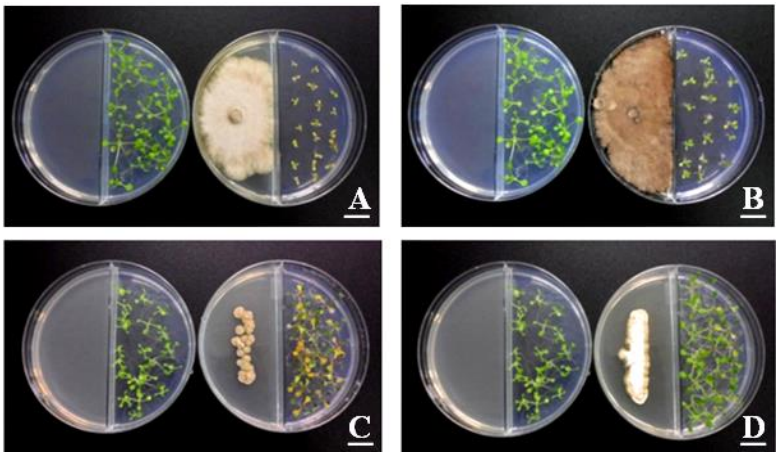
ตาราง 41 ผลของสารระเหยจากจุลินทรีย์ต่อการเจริญของ *Arabidopsis thaliana* col-0

การทดลอง	ความยาวลำต้น	ความยาวราก	จำนวนใบ	ความกว้างใบ	น้ำหนักสด	ปริมาณคลอโรฟิลล์
อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	2.6±0.6*	33.6±2.3*	6±1	1.8±0.8*	9.8±0.4**	0.42±0.09***
Nodulisporium sp. A75	1.0±0.5	4.6±2.1	4±1	1.0±0.3	3.1±0.1	0.31±0.05
Nodulisporium sp. A119	2.3±0.9	11.4±1.3	5±1	1.2±0.4	4.4±0.3	0.33±0.14
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2	3.9±1.3	33.3±2.5	6±1	1.9±0.5	10.1±0.2	0.44±0.09
S. albulus AB21	3.9±1.9	34.5±4.0	7±1	2.9±0.8	12.2±0.1	0.65±0.12
Streptomyces sp. AB225	2.7±0.9	27.6±3.3	7±1	2.6±1.0	11.1±0.2	0.58±0.18

* หน่วย มิลลิเมตร

** หน่วย มิลลิกรัม

***หน่วย มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสด



ภาพ 43 ผลของสารระเหยจากจุลินทรีย์ต่อการเจริญของ *Arabidopsis thaliana* col-0 (A) *Nodulisporium* sp. A75 (B) *Nodulisporium* sp. A119 (C) *Streptomyces albulus* AB21 (D) *Streptomyces* sp. AB225 (สเกล 1 เซนติเมตร)

สำหรับการทดสอบกับเมล็ดข้าวโพดหวานและถั่วลันเตาโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ *S. albulus* AB21, *S. corchorusii* AB24, *S. sioyaensis* AB83, *S. iranensis* AB168, *Streptomyces* sp. AB204 และ *Streptomyces* sp. AB225 พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลทให้ผลการเจริญของเมล็ดถั่วลันเตาที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่แสดงผลในการส่งเสริมการเจริญในต้นกล้าข้าวโพดหวาน โดย *S. albulus* AB21 และ *S. sioyaensis* AB83 ให้ผลการเจริญของต้นข้าวโพดหวานดีที่สุดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมดังแสดงในตาราง 42 ซึ่งเมล็ดข้าวโพดหวานที่ถูกรมด้วย *S. sioyaensis* AB83 มีความยาวของลำต้นและใบสูงที่สุดเท่ากับ 119.6 มิลลิเมตร (ภาพ 44)

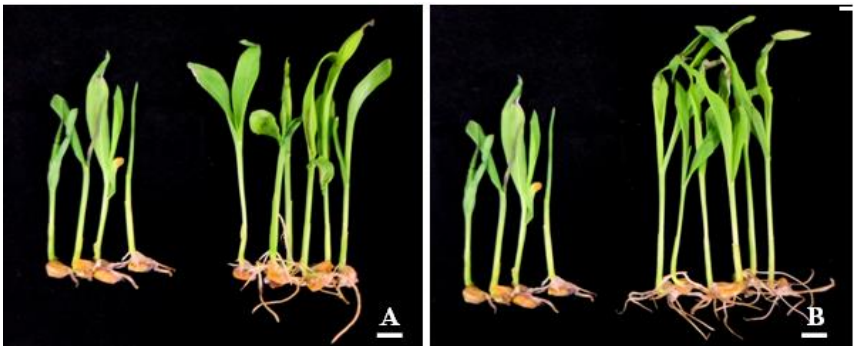
ตาราง 42 ผลของสารระเหยจากจุลินทรีย์ต่อการเจริญของเมล็ดข้าวโพดหวานและถั่วลันเตา

การทดลอง	ความยาวลำต้น	ความยาวราก	น้ำหนักสดของลำต้น	น้ำหนักสดของราก	ปริมาณคลอโรฟิลล์
เมล็ดถั่วลันเตา					
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2	79.2 ±6.3*	80.4±25.2*	302.5±10.1**	781.5±10.1**	1.55±0.07***
S. albulus AB21	80.4 ±7.1	72.4±18.2	347.7 ±9.2	978.7±21.3	1.56±0.19
S. corchorusii AB24	76.1 ±9.0	80.4±17.3	351.1±14.3	1034.1±14.6	1.43±0.24
S. sioyaensis AB83	76.7±11.2	89.3±25.1	256.0±16.9	822.8±15.9	1.48±0.14
S. iranensis AB168	76.3±12.0	102.3±13.7	312.5±20.1	908.5±22.1	1.36±0.23
Streptomyces sp. AB204	59.3 ±9.2	94.9 ±9.7	284.4±12.0	760.4±16.8	1.61±0.12
Streptomyces sp. AB225	74.6±12.4	111.3 ±8.0	303.4 ±9.8	824.0±19.4	1.61±0.02
เมล็ดข้าวโพดหวาน					
อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2	93.1 ±17.7	24.4±17.1	288.3±15.1	470.7±10.1	0.45±0.27
S. albulus AB21	118.1 ±19.1	56.3±17.9	435.7±11.0	599.2 ±9.2	0.56±0.19
S. corchorusii AB24	102.0 ±17.5	30.5±11.3	235.8 ±4.3	464.3±14.3	0.88±0.11
S. sioyaensis AB83	119.6 ±18.4	48.4±25.1	330.8±12.9	487.5±16.9	0.65±0.10
S. iranensis AB168	104.1 ±14.5	28.9±13.7	295.1±18.1	411.3±20.1	0.57±0.05
Streptomyces sp. AB204	92.5 ±21.7	40.3±15.2	338.2 ±9.5	503.2±12.0	0.60±0.30
Streptomyces sp. AB225	96.3 ±23.2	30.8±13.7	310.3 ±8.7	497.2±9.8	0.99±0.60

* หน่วย มิลลิเมตร

** หน่วย มิลลิกรัม

***หน่วย มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสด

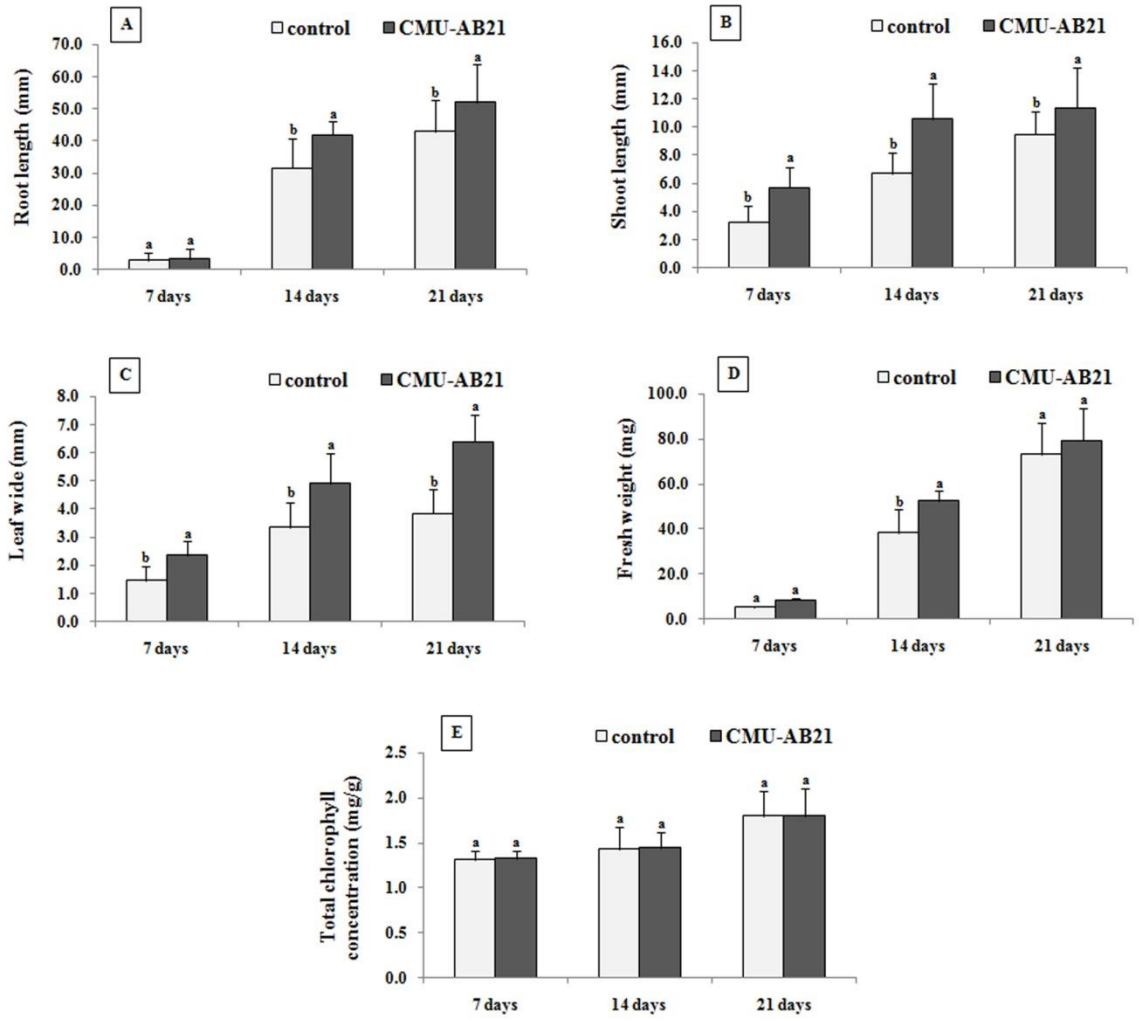


ภาพ 44 ต้นข้าวโพดหวานที่ถูกรมเมล็ดด้วยสารระเหยจากแอคติโนมัยซีท (A) *S. albulus* AB21 (B) *S. sioyaensis* AB83 (สเกล 1 เซนติเมตร)

ผลของสารระเหยจาก *S. albulus* AB21 ต่อการเจริญของ *Arabidopsis thaliana*

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *A. thaliana* col-0 เป็นเวลา 21 วัน โดยวัดผลการเจริญทุก 7 วัน และเปรียบเทียบการเจริญกับพืชควบคุมที่ไม่ได้รมด้วยสารระเหยจาก *S. albulus* AB21 ที่เวลาเดียวกัน พบว่า *A. thaliana* ที่ถูกรมด้วยสารระเหยจาก *S. albulus* AB21 มีความยาวรากและลำต้นที่สูงกว่า และขนาดใบที่ใหญ่กว่าพืชควบคุมดังแสดงในภาพ 45 โดยความยาวรากเฉลี่ยของพืชทดสอบที่อายุ 21 วัน เท่ากับ 52.00±12.11 mm และพืชควบคุมเท่ากับ 43.05±9.62 mm ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 46A) พืชที่ถูกรมด้วยสารระเหยจากจุลินทรีย์มีความยาวลำต้นยาวกว่าพืชควบคุมเมื่อเปรียบเทียบที่อายุ 7, 14 และ 21 วัน โดยค่าเฉลี่ยความยาวลำต้นที่อายุ 21 วัน ของพืชทดสอบและพืชควบคุมคือ 11.42±2.83 mm และ 9.54±1.65 mm ตามลำดับ (ภาพ 46B) นอกจากนี้สารระเหยที่ *S. albulus* AB21 สร้างขึ้นยังมีผลในการเพิ่มขนาดใบพืช 64.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชควบคุมที่อายุ 21 วัน โดยความกว้างของใบพืชทดสอบเท่ากับ 6.44±0.94 mm และพืชควบคุมเท่ากับ 3.94±0.84 mm (ภาพ 46C) น้ำหนักพืชที่ถูกรมด้วยสารระเหยคือ 79.54±13.95 mg และชุดควบคุมคือ 73.12±14.23 mg แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 46D) และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ทั้งหมดเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ทุกระยะเวลาของการวัดผลดังแสดงในภาพ 46E

ภาพ 45 ต้น *Arabidopsis thaliana* ที่เจริญบนอาหาร MS เป็นเวลา 21 วัน ด้านซ้ายคือพืชที่ไม่ได้รมด้วยสารระเหย ด้านขวาคือพืชที่ถูกรมด้วยสารระเหยจาก *Streptomyces albulus* AB21 (สเกล 1 เซนติเมตร)



ภาพ 46 การเจริญของ *Arabidopsis thaliana* ที่ถูกรมด้วยสารระเหยจาก *Streptomyces albulus* AB21 เป็นเวลา 21 วัน เปรียบเทียบกับพืชควบคุมที่ไม่ถูกรมด้วยสารระเหย (A) ความยาวราก (B) ความยาวลำต้น (C) ความกว้างของใบ (D) น้ำหนักสดของพืช (E) ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

2.3.6 ผลการบ่งชี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลสารระเหยอินทรีย์จากเชื้อราเอนโดไฟท์และแอคติโนมัยซีทที่ถูกคัดเลือก

ทำการบ่งชี้ชนิดของสารระเหยจากเชื้อราเอนโดไฟท์ 2 ไอโซเลท ได้แก่ *Muscodor* sp. A110 และ *Nodulisporium* sp. A75 และแอคติโนมัยซีท 2 ไอโซเลท คือ *Streptomyces albulus* AB21 และ *Streptomyces* sp. AB225 โดยเทคนิค GC/MS พบว่าสารระเหยหลักที่เชื้อแต่ละไอโซเลทสร้างขึ้นมีความแตกต่างกัน พบ 2-Methylpropanoic acid เป็นสารระเหยหลักที่สร้างโดย *Muscodor* sp. A110 ซึ่งตรวจพบที่เวลา 21.18 นาที (ตาราง 43) และสารที่พบในปริมาณ

รองลงมาคือ4,5-Dimethyl-1,3-cyclopentanedione ที่เวลา 19.51 นาที สำหรับ *Nodulisporium* sp. A75 พบการสร้างสาร 2,3-dihydro-5-hydroxy-2-methyl4H-1-benzopyran-4-one มากที่สุด ซึ่งตรวจพบที่เวลา 36.82 นาที (ตาราง 44) ในขณะที่สารระเหยหลักที่สร้างโดย *Streptomyces albulus* AB21 เป็นสาร 2-Methyl-2-bornene และ 1,3,2-Dioxaborolane,4,4-dimethyl-5-oxo,2-ethyl พบที่เวลา 8.60 และ 22.67 นาทีตามลำดับ (ตาราง 45) นอกจากนี้ยังพบสาร 2-Methyl-2-bornene เช่นเดียวกันในสารระเหยที่สร้างจาก *Streptomyces* sp. AB225 แต่พบมากเป็นอันดับสามที่เวลา 8.53 นาที โดยสารระเหยหลักที่พบมากที่สุดเป็นสาร 2-Methylisoborneol ซึ่งเป็นอนุพันธ์กับ 2-Methyl-2-bornene แต่ตรวจพบที่เวลา 35.35 นาที และสารที่พบมากเป็นอันดับสองโดยถูกตรวจพบที่เวลา 5.00 นาที เป็นสาร Butanoic acid, 2-methyl-, methyl ester ดังแสดงในตาราง 46

ตาราง 43 สารระเหยอินทรีย์จาก *Muscodor* sp. A110 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

RT (min)	TA (%)	Possible compounds	MW	Quality
10.83	2.05	2-Methyl-1-butanol	88	96
14.75	1.02	Methoxybenzene	108	86
16.19	3.97	2-Ethyl-1-hexanol acetate	172	92
16.26	3.82	4,4-dimethyl-1-Pentene	98	81
17.56	1.1	1-Methoxy-4-methyl-benzene	122	88
17.69	1.89	1-Methoxy-3-methyl-benzene	130	97
19.26	7.44	2-Ethyl-1-hexanol	130	97
19.51	18.56	4,5-Dimethyl-1,3-cyclopentanedione	126	88
21.18	25.31	2-Methylpropanoic acid	88	96
21.68	1.75	Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,4.alpha.,7.alpha.)]	204	86
22.40	4.7	Thujopsene	204	94
23.35	2.14	Dihydroxydimethylsilane	92	86
23.52	0.75	2-Furanmethanol	98	80
25.18	2.01	1H-Indene, 1-methylene-	128	94
27.07	0.89	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	164	81
28.26	2.06	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	216	88
28.56	1.8	Propanoic acid, 2-methyl-, 2,2-dimethyl-1-(2-hydroxy-1-methylethyl)propyl ester	216	85
31.73	5.76	2-Cyclohexen-1-one, 2-(2-methyl-2-propenyl)-	150	82
35.24	10.94	Cycloheptane, 4-methylene-1-methyl-2-(2-methyl-1-propen-1-yl)-1-vinyl-	204	86
38.23	0.77	Diethyl Phthalate	222	87

ตาราง 44 สารระเหยอินทรีย์จาก *Nodulisporium* sp. A75 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

RT (min)	TA (%)	Possible compounds	MW	Quality
5.69	0.24	Toluene	92	89
6.95	0.53	4-Methyl-3-hexanone	114	92
7.70	1.66	2-Methyl-1-propanol	74	98
11.51	16.66	3-Methyl-1-butanol	88	97
13.09	0.19	3-Octanone	128	92
13.27	1.23	3-Octanol	130	78
13.28	0.33	4-Methyl-4-hexen-3-one	112	86
16.53	0.24	1-Isobutoxy-2-ethylhexane	186	83
16.90	3.18	1,3,2-Dioxaborolane, 4,4-dimethyl-5-oxo-, 2-ethyl	142	86
17.37	0.12	4-Methyl-3-heptanol	130	82
19.05	0.71	1,3-Cyclopentanedione	126	86
19.19	0.88	4-Heptyn-2-ol	112	89
20.14	3.10	4,5-Dimethyl-1,3-cyclopentanedione	126	86
21.99	0.27	2-(Hydroxymethyl)-2-methyl-1,3-propanediol	120	85
21.99	0.73	3-Methyl-3-oxetanemethanol	102	88
25.38	8.11	Propanoic acid, 2,2-dimethyl-, heptyl ester	200	84
29.59	10.38	Phenylethyl Alcohol	122	98
36.31	3.19	1-(1-formylethyl)-4-(1-buten-3-yl)-benzene	188	81
36.82	44.17	2,3-Dihydro-5-hydroxy-2-methyl4H-1-benzopyran-4-one	178	100
37.11	0.39	3,4-Dimethoxyphenylacetone	194	80
46.63	3.61	3-Methoxy-2-naphthalenol	174	88

ตาราง 45 สารระเหยอินทรีย์จาก *Streptomyces albulus* AB21 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

RT (min)	TA (%)	Possible compounds	MW	Quality
2.41	1.02	(S)-l-Alanine ethylamide	116	89
2.92	2.15	2-Butanone	72	96
3.17	1.16	3-propoxy-1-Propene	100	81
3.31	1.13	Isopropyl Alcohol	60	92
3.31	2.59	4-Pentyn-2-ol	84	92
3.50	6.95	Benzene	78	95
5.15	0.26	Trichloromethane	118	85
5.31	0.09	Butanoic acid, 2-propenyl ester	128	86
5.90	3.09	3,7-Dimethyl-decane	170	91
6.08	0.17	Carbon disulfide	76	88
6.27	1.67	Glycolaldehyde dimethyl acetal	106	94
6.52	1.57	Disulfide, dimethyl	94	87
8.60	15.57	2-Methyl-2-bornene	150	86
9.65	3.37	1-Butanol	74	95
12.72	3.10	1-Pentanol	88	87
15.91	1.30	3-Hydroxy-2-butanone	88	93
22.67	15.05	1,3,2-Dioxaborolane, 4,4-dimethyl-5-oxo-, 2-ethyl	142	84
29.95	0.69	Ethanone, 2,2-dihydroxy-1-phenyl-	152	93
46.40	0.31	Butanamide	87	81

ตาราง 46 สารระเหยอินทรีย์จาก *Streptomyces* sp. AB225 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

RT (min)	TA (%)	Possible compounds	MW	Quality
2.40	0.74	l-Alanine ethylamide, (S)-	116	84
2.91	2.17	2-Butanone	72	94
3.49	2.03	2-Butenedinitrile, (E)-	78	92
3.51	2.41	Benzene	78	92
5.00	27.15	Butanoic acid, 2-methyl-, methyl ester	116	96
5.08	2.55	Acetic acid, 2-propenyl ester	100	88
5.18	1.04	2-Propanone, 1,1,3,3-tetrachloro-	194	82
5.23	1.17	Butanoic acid, 3-methyl-, methyl ester	116	85
8.53	20.71	2-Methyl-2-bornene	150	89
5.56	0.19	2-Propanol, 1-methoxy-	90	87
5.89	1.66	Acetyl valeryl	128	85
9.68	2.36	1-Butanol	74	94
10.83	1.10	Cyclopentanone	84	88
12.76	4.41	1-Pentanol	88	90
14.37	2.06	1-Hexanone, 5-methyl-1-phenyl-	190	93
14.65	1.31	3-Buten-1-ol, 3-methyl-	86	85
34.98	0.84	Pentanedioic acid, 2-oxo-, dimethyl ester	174	89
35.35	37.46	2-Methylisoborneol	168	95

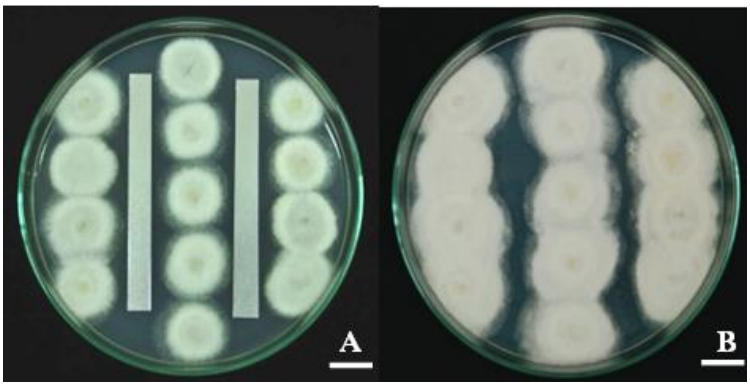
สารทุติยภูมิเมแทบอไลต์จากแอคติโนมัยซีท

เมื่อทำการแยกสารจากสารสกัดหยาบ (crude extract) ของ *S. albulus* AB21 โดยใช้เทคนิค TLC พบการเคลื่อนที่ของสารแยกออกจากกันโดยกำหนดเป็นตัวอักษร A-K สามารถแบ่งออกเป็นทั้งหมด 11 สาร ตามค่า Rf และสารสกัดหยาบจาก *S. sioyaensis* AB83 สามารถแยกออกเป็น 12 สาร โดยสารทั้งหมดกำหนดให้เป็นตัวอักษร A-L ดังแสดงในตาราง 47 จากนั้นนำแผ่น TLC มาทดสอบด้วยเทคนิค bioautography โดยวางบนจานอาหารที่มีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ภาพ 47) ให้สารแพร่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำแผ่น TLC ออก และทำการวัดค่าการยับยั้งการเจริญทุก 24 ชั่วโมง พบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค แต่ผลที่ได้ไม่ชัดเจนดังแสดงในภาพ 48 ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าสารใดคือสารออก

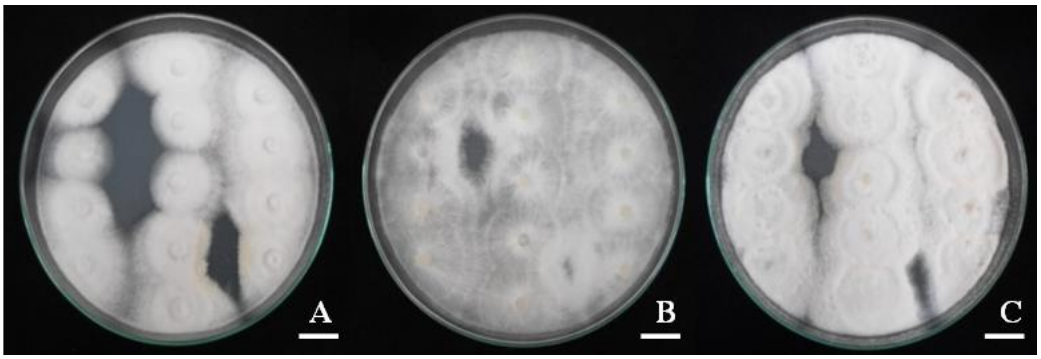
ฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเชื้อราสาเหตุโรค จึงต้องทำการแยกด้วยเทคนิค column chromatography ต่อไป

ตาราง 47 การแยกสารประกอบจากสารสกัดจากจุลินทรีย์โดยวิธี thin layer chromatography

S. albulus AB21		*S. sioyaensis* AB83	
สารประกอบ	ค่า Rf	สารประกอบ	ค่า Rf
K	0.88	L	0.87
J	0.80	K	0.82
I	0.75	J	0.69
H	0.70	I	0.65
G	0.63	H	0.57
F	0.49	G	0.52
E	0.44	F	0.49
D	0.33	E	0.44
C	0.23	D	0.26
B	0.14	C	0.21
A	0.07	B	0.14
		A	0.05



ภาพ 47 (A) การวางแผ่น TLC บนจานอาหารที่มีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคอายุ 2 วัน (B) การเจริญของเชื้อราหลังจาก 24 ชั่วโมง ของการวางแผ่น TLC (สเกล 1 เซนติเมตร)



ภาพ 48 การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคโดยเทคนิค bioautography หลังจากการวางแผ่น TLC แล้วบ่มต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การเจริญของ (A) *G. boninense* BCC21330 (B) *R. microporus* (C) *P. theae* CMU-ELA1 (สเกล 1 เซนติเมตร)

วิจารณ์ผลการการทดลอง

จากการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบปาล์มน้ำมันพบเชื้อราสกุล *Xylaria* spp., *Phomopsis* spp., *Colletotrichum* sp. และ *Muscodor* spp. เป็นสกุลเด่นที่พบในใบปาล์มน้ำมัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราเอนโดไฟท์ในใบปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) และปาล์มป่า (*Licuala* sp.) ของ Pinruan et al. (2010) และ Fröhlich et al. (2000) ซึ่งพบเชื้อราสกุล *Xylaria* spp, *Phomopsis* spp. และ *Colletotrichum* spp. เป็นสกุลเด่นในพืชตระกูลปาล์ม โดยเชื้อราสกุล *Muscodor* sp. สามารถสร้างสารระเหยยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งมี 2-Methylpropanoic acid เป็นสารระเหยหลักที่ตรวจพบในการศึกษานี้ Suwannarach et al. (2012) รายงานการพบเชื้อราเอนโดไฟท์สปีชีส์ใหม่ในสกุล *Muscodor* ได้แก่ *M. musae*, *M. oryzae*, *M. suthepensis* และ *M. equiseti* ซึ่งแยกได้จากพืชสมุนไพร *Musa acuminata*, *Oryza rufipogon*, *Cinnamomum bejolghota* และ *Equisetum debile* ตามลำดับ ตรวจพบ 2-Methylpropanoic acid เป็นสารระเหยหลักที่ *Muscodor* spp. ผลิตขึ้นโดยสารผสมของสารอินทรีย์ระเหยได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรค รายงานล่าสุดของ Siri-Udom et al. (2015) พบ *M. vitigenus* , *M. equiseti* และ *M. heveae* จัดเป็นเชื้อราเอนโดไฟท์สปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากใบของต้นยางพารา และสร้างสารระเหยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phellinus noxius* และ *R. microporus* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคทางรากที่เกิดขึ้นในต้นยางพารา

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณรอบรากปาล์มน้ำมัน เพื่อนำมาใช้สำหรับควบคุมทางชีวภาพ จากการทดลองนี้พบเชื้อ S*treptomyces* spp. เป็นสกุลเด่นที่แยกได้ โดย *Streptomyces albulus* AB21, *S. corchorusii* AB24, *S. sioyaensis* AB83, *S. iranensis* AB168, *Streptomyces* sp. AB204 และ *Streptomyces* sp. AB225 มีศักยภาพในการยับยั้งการ

เจริญของเชื้อรา *G. boninense* BCC21330, *P. theae* CMU-ELA1 ซึ่งเป็นสาเหตุโรคในปาล์มน้ำมันได้ดี โดยแสดงผลการยับยั้งการเจริญเมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงานของ Phitakkit et al. (2014) ที่ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินรอบโคนต้นปาล์มน้ำมัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อสกุล *Streptomyces* spp. เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุลอื่นมีน้อยและเจริญได้ช้ากว่า โดยพบว่า *S. hygroscopicus* NR8-2 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *G. boninense* เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture assay นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการใช้ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อสาเหตุโรคในต้นฝ้าย เมล่อน Oilseed rape และมะเขือเทศ (Xue et al. 2013; Zhao et al. 2012; Baharlouei et al. 2011; Baz et al. 2012) นับว่าเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 6 ไอโซเลท ในการศึกษานี้ มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งจะได้รับการศึกษาและพัฒนาเพื่อนำมาใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธีต่อไป

สารระเหยที่ *S. albulus* AB21สร้างขึ้นมีผลในการส่งเสริมการเจริญของ *Arabidopsis thaliana* col-0 และต้นกล้าข้าวโพดหวาน จากการวิเคราะห์ชนิดของสารระเหยพบการสร้าง 2-Methyl-2-bornene และ 1,3,2-Dioxaborolane, 4,4-dimethyl-5-oxo,2-ethyl เป็นสารระเหยหลัก ซึ่งมีรายงานการสร้างสาร 2-Methyl-2-bornene ในเชื้อ *Streptomyces* หลายสปีชีส์ (Wilkins and Schöller 2009) แต่มีการศึกษาพบว่าสารระเหย 2-Methylisoborneol และ geosmin ซึ่งพบได้ทั่วไปในแอคติโนมัยซีท มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดพืชวงศ์ผักกาด (Ogura et al. 2000) แต่ไม่พบสารดังกล่าวจาก *S. albulus* AB21การศึกษาผลของสารระเหยจากแอคติโนมัยซีทในการส่งเสริมการเจริญของพืชยังไม่มีข้อมูลการศึกษามากนัก โดยแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่จะส่งเสริมการเจริญของพืชผ่านทางการสร้างสารทุติยภูมิเมแทบอไลต์ในกลุ่มฮอร์โมนพืช หรือสร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลควบคุมโรคพืช จึงนับว่าผลการศึกษาครั้งนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการประยุกต์ใช้สารระเหยจากแอคติโนมัยซีทเพื่อกระตุ้นการเจริญของพืช

สรุปผลการการทดลอง

การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบปาล์มน้ำมันพบเชื้อรากลุ่ม *Xylaria* spp., *Phomopsis* spp., *Colletotrichum* sp. และ *Muscodor* spp. เป็นสกุลเด่นที่พบในใบปาล์มน้ำมัน โดยเชื้อราสกุล *Muscodor* sp. จำนวน 10 ไอโซเลท สามารถสร้างสารระเหยยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Ganoderma boninense* BCC21330, *Pestalotiopsis theae* CMU-ELA1 ได้ โดยให้ผลการยับยั้งการเจริญระหว่าง 70-100 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์สารระเหยโดยเทคนิค Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC/MS) พบ 2-Methylpropanoic acid เป็นสารระเหยหลักที่ *Muscodor* sp. A110 สร้างขึ้น

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทบริเวณดินรอบรากปาล์มน้ำมันได้ทั้งหมด 226 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคปาล์มน้ำมันและโรคอื่นๆ พบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ให้ผลการยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 24 ไอโซเลท โดยมี *Streptomyces* sp. AB21, AB24, AB83, AB168, AB204 และ AB225 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ดีโดยแสดงผลการยับยั้งมากกว่า 80% ทั้ง 6 ไอโซเลท สามารถระบุสปีชีส์ได้เป็น *Streptomyces albulus* AB21, S. *corchorusii* AB24, *S. sioyaensis* AB83, *S. iranensis* AB168 และ *Streptomyces* sp. AB204 และ AB225 จัดเป็นสปีชีส์ใหม่ จากนั้นได้ทำการทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal inhibitory concentrations, MICs) ของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซีทต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าสารสกัดหยาบจาก *S. albulus* AB21 และ *S. sioyaensis* AB83มีค่า MIC ต่ำที่สุดและสามารถยับยั้งได้ดีกว่าสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อรา nystatin จึงถูกคัดเลือกมาใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคปาล์มน้ำมันในระดับโรงเรือน แต่การบ่งชี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเทคนิค bioautography พบการเกิดวงใสของการยับยั้งเป็นวงกว้าง ทำให้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าสารใดคือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีผลยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งจะทำการแยกและระบุชนิดของสารด้วยเทคนิค Column chromatography และ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectrometry ต่อไป

การศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่าสารระเหยที่ *S. albulus* AB21 สร้างขึ้นมีผลในการส่งเสริมการเจริญของ *A. thaliana* col-0 และต้นกล้าข้าวโพดหวาน โดย *A. thaliana* col-0 ที่ถูกรมด้วยสารระเหยที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมีความยาวรากและลำต้นที่ยาวกว่าพืชควบคุม และมีขนาดใบที่ใหญ่กว่าโดยพบความแตกต่างได้ตั้งแต่อายุ 7 วัน จึงทำการวิเคราะห์ชนิดของสารระเหยโดยเทคนิค GC/MS พบว่า *S. albulus* AB21 สร้าง 2-Methyl-2-bornene และ 1,3,2-Dioxaborolane, 4,4-dimethyl-5-oxo,2-ethyl เป็นสารระเหยหลัก ซึ่งจะทำการทดสอบผลของสารระเหยต่อการเจริญของพืชชนิดอื่นๆ รวมถึงตรวจหาชนิดของสารออกฤทธิ์ที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญของพืชต่อไป

2.4 Indole-3-acetic acid (IAA) จากราเอนโดไฟท์ A109 ที่แยกได้จากกาแฟและการส่งเสริมการเจริญต่อพืชทดสอบ

การเก็บตัวอย่างกาแฟ

สุ่มเก็บตัวอย่างใบและก้านที่สมบูรณ์ 5 ต้น ของกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้า (*Coffea arabica*) และสายพันธุ์โรบัสต้า (*Coffea cenephora*) จากแปลงปลูกกาแฟในเดือนกรกฎาคมและพฤศจิกายน พ.ศ.2555 ณ หน่วยวิจัยและพัฒนาเกษตรที่สูงขุนช่างเคี่ยน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การแยกราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างกาแฟ

ล้างตัวอย่างกาแฟผ่านน้ำไหลประมาณ 15 นาที ทำ triple surface sterilization (70% เอทานอล 1 นาที, 3 % sodium hypochlorite 2 นาที และ 95% เอทานอล 30 วินาที ตามลำดับ) ตัดใบกาแฟให้มีขนาด 5 mm^2 ตัดก้านกาแฟให้ยาว 1 cm แยกเชื้อบนอาหาร Half-Potato Dextrose Agar (Half-PDA) และ Water Agar (WA) ที่เติม chloramphenicol 0.05 g L^{-1} และ rose bengal0.035 g L^{-1} (Santamaria and Bayman, 2004; Prihastuti et al. 2009; Suwannarach et al. 2012) จำนวน 5 ชิ้นต่อ 1 จานอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อราเอนโดไฟท์เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืชให้ตัดส่วนปลายเส้นใยราแล้วย้ายลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เก็บเชื้อราเอนโดไฟท์ในอาหารPDA slant ที่อุณหภูมิห้อง และ 20% กลีเซอรอล ที่ -20°C

การจัดกลุ่มราเอนโดไฟท์

เลี้ยงราบนอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะเส้นใยและโคโลนี รูปร่างและขนาดของสปอร์ (Ellis 1971; Carmichael et al. 1980)

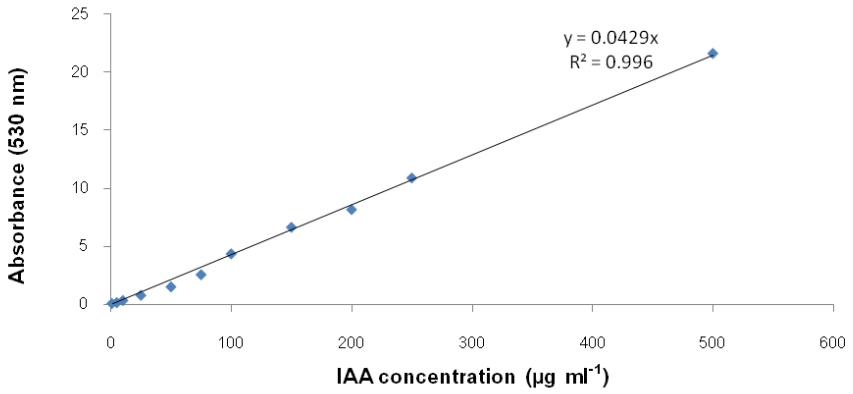
การบ่งชี้ชนิดราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 โดยวิธีทางอณูชีววิทยาและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การบ่งชี้ชนิดราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 โดยสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใย (FavorPrep™Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit) ทำการ amplify โดยใช้ไพเมอร์ ITS4 และ ITS5 ที่สภาวะ95°C 2 นาที, 30 รอบ ของ 95°C 30 วินาที, 50°C 30 วินาที, 72°C 1 นาที และ 72°C 10 นาที (Felsenstein, 1985) วิเคราะห์ผลและทำ phylogenetic tree โดยโปรแกรม Mega 6.06 และโครงสร้างต่างๆของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ

การคัดกรองราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต Indole-3-acetics acid(IAA) โดย Colorimetric assay (Tsavkelova et al. 2007)

เลี้ยงราเอนโดไฟท์ไอโซเลท 109 ใน 5 ml PDB และเติม 2 mg ml^{-1} L-tryptophan ทำ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง บ่มในที่มืดบนเครื่องเขย่า 120 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจาก supernatant ที่ 1,1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ปิเปต 2 ml Salkowski's reagent (1 ml ของ 0.5 M $FeCl_3$ ใน 50 ml ของ 35% $HClO_4$) ผสมกับ supernatant ราเอนโดไฟท์ปริมาตร 1 ml บ่มปฏิกิริยาในที่มืดนาน 30 นาที นำสารที่ปรากฏ

เหลือง สีชมพูม่วงถึงแดงไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm คำนวณปริมาณ IAA ที่ราเอนโดไฟท์ผลิตเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA (ภาพ 49)



ภาพ 49 กราฟมาตรฐาน Indole-3-acetic acid โดย colorimetric assay

การบ่งชี้ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109

7.1 การสกัด IAA จากราเอนโดไฟท์

ปรับค่า pH ของน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 ให้ค่า pH อยู่ระหว่าง 2.5-3.0 ทำการสกัด IAA จากน้ำเลี้ยง 2 ครั้ง โดยการเติม ethyl acetate ต่อ supernatant ในอัตราส่วน 1:1 นำสารสกัด ethyl acetate ไประเหยแห้งโดยเครื่อง evaporator ได้สารสกัดหยาบ IAA

7.2 การตรวจสอบ IAA โดยวิธี thin layer chromatography (TLC)

จุดสารสกัดหยาบ IAA ลงบนแผ่น TLC (Silica gel G F257, thickness 0.25 mm, Merk, Germany) และจุ่มลงสารละลาย mobile phase (chloroform: methanol: water (84:14:1)) จากนั้นตรวจสอบใต้แสง ultraviolet (UV) ความยาวคลื่น 254 nm และฉีดพ่น Salkowski's reagent (Ehmann 1977) เทียบกับจุดของสารมาตรฐาน IAA

7.3 การตรวจวัดปริมาณ IAA โดย HPLC

นำสารสกัดหยาบ IAA จากราเอนโดไฟท์ A109 ตรวจวัดปริมาณ IAA โดยเครื่อง HPLC column ที่ใช้คือMightysil RP-18 (250×4.6 mm, 5 µm) อุณหภูมิ column เท่ากับ 40°C โดยใช้ 45% solvent A (1% acetic acid) และ 55% solvent B (100% methanol) เป็น mobile phase อัตราการเคลื่อนของ mobile phase เท่ากับ 0.5 ml min^{-1} ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 10 µl ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm เปรียบเทียบกับ retention time ของสารมาตรฐาน IAA ปริมาณ IAA ที่ราเอนโดไฟท์CMU-A109 ผลิตขึ้นคำนวณจากสมการกราฟมาตรฐาน IAA ที่ได้จากการคำนวณ peak area (Chung et al., 2003)

การศึกษาผลของความเข้มข้นของ L-tryptophan, ระยะเวลาในการบ่ม และอุณหภูมิต่อการผลิต IAAของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 (Chutima and Lumyong 2012; Kumla et al. 2014)

การศึกษาผลของความเข้มข้นของ L-tryptophan โดยตัดชิ้นวุ้นราใสในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ปริมาตร 5 ml ที่เติม L-tryptophan ความเข้มข้นต่างๆ (0, 2, 4, 6, 8 และ 10 mg ml^{-1}) บ่มในที่มืดบนเครื่องเขย่านาน 7 วัน วัดปริมาณ IAA โดย colorimetric assay

จากนั้นทดสอบผลของระยะเวลาในการบ่มต่อการสร้าง IAA โดยเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหาร PDB ปริมาตร 5 ml ที่เติม 8 mg ml^{-1} L-tryptophan บ่มในที่มืดบนเครื่องเขย่านาน 30 วัน วัดปริมาณ IAA โดย colorimetric assay ทุกๆ 2 วัน

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต IAA โดยเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหาร PDB ปริมาตร 5 ml ที่เติม 8 mg ml^{-1} L-tryptophan บ่มในที่มืดบนเครื่องเขย่าอุณหภูมิ 22, 30 และ 37°C นาน 26 วัน วัดปริมาณ IAA โดย HPLC

การยืนยัน pathway การผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 โดย HPLC

เลี้ยงราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 8 และการตรวจวัดสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในวันที่ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 โดยการสกัด IAA ตามข้อ 7.1 และตรวจวัดโดยเครื่อง HPLC (ข้อ 7.3)

การตรวจสอบผลของสารสกัดหยาบ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 ต่อการยืดยาวของเนื้อเยื้อ coleoptile ของข้าว (*Oryza sativa* L.) ข้าวโพด (*Zea mays*) และข้าวไรย์ (*Secale cereal* L.) และการงอกของเมล็ดกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica*) (Chutima and Lumyong, 2012; Kumla et al. 2014)

สารสกัดหยาบ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 ต่อการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าว ข้าวโพด และข้าวไรย์

แช่เมล็ดพืชในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ฆ่าเชื้อบริเวณผิวของเมล็ดพืชโดยจุ่มลงสารละลาย 2% sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง หว่านเมล็ดพืชลงกระบะทราย เพาะในที่มืดอุณหภูมิห้อง 2-3 วัน เมื่อเมล็ดงอกทำการตัดปลายของ coleoptile ออก 1-2 mm ตัดเนื้อเยื่อ coleoptile ถัดจากที่ตัดออกยาว 10 mm นำไปแช่ในสารละลาย 50 µg ml^{-1} IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 ปริมาตร 10 ml ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm บ่มที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืดนาน 24 ชั่วโมง วัดขนาดการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของพืชเทียบกับเนื้อเยื่อ coleoptile ที่แช่ในสารละลาย 50 µg ml^{-1} ของสารมาตรฐาน IAA, IAM, IAA+IAM (อัตราส่วนเท่ากับที่ราเอนโด

ไฟท์ไอโซเลท A109 ผลิต) และ Deionized water ปราศจากเชื้อ

สารสกัดหยาบ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ A109 ต่อการงอกของเมล็ดกาแฟ

ฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดกาแฟที่กะเทาะเปลือกแล้วโดยจุ่มลงสารละลาย 0.2% Tween 80 และ 5% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดกาแฟที่ผ่านการฆ่าเชื้อบริเวณผิวแช่ในสารละลาย 50 µg ml^{-1} IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ A109 ปริมาตร 250 ml นาน 24 ชั่วโมง โดยใช้สารละลาย 50 µg ml^{-1} สารมาตรฐาน IAA เป็นตัวควบคุมผลบวก และ Deionized water ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ ทำการเพาะเมล็ดกาแฟลงในกระบะที่บรรจุวัสดุปลูก (ทราย:แกลบขี้เถ้า อัตราส่วน 1:1) กระบะละ 50 เมล็ด ทำ 3 ซ้ำ วางกระบะไว้ในโรงเรือนเพาะปลูกและรดน้ำวันละ 1-2 ครั้ง หลังจาก 30 วัน นับเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกาแฟและวัดความยาวราก ลำต้น น้ำหนักแห้งรากและลำต้นของกล้ากาแฟ

ผลการทดลอง

การแยกราและคัดกรองราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต IAA ได้

จากการเก็บตัวอย่างกาแฟจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ Arabica (ก.ค.), Arabica (พ.ย.) และ Robusta(พ.ย.) ตัวอย่างละ 5 ต้น เพื่อทำการแยกราเอนโดไฟท์จากก้านและใบของแต่ละตัวอย่าง ในจำนวนชิ้นพืชทั้งหมด 600 ชิ้น แยกได้ราเอนโดไฟท์จำนวน 740 ไอโซเลท แยกจาก Arabica (ก.ค.) จำนวน 237 ไอโซเลท Arabica (พ.ย.) จำนวน 281 ไอโซเลท และ Robusta (พ.ย.) จำนวน 222 ไอโซเลท สามารถจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมด 115 ไอโซเลท ซึ่งอยู่ใน Ascomycota, Basidiomycota และ Deuteromycota โดยจีนัสเด่นที่พบในตัวอย่างกาแฟคือ *Colletotrichum* และ *Xylaria*

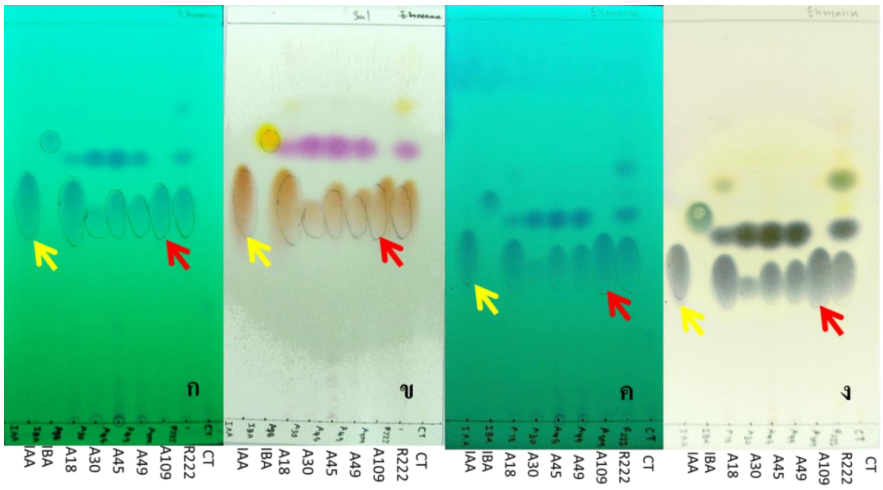
การคัดแยกราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต IAA จากราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 115 ไอโซเลท พบว่า 94 ไอโซเลท แสดงผลบวกกับ Salkowski's reagent และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 nm ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน IAA เพื่อหาปริมาณ IAA ที่ราเอนโดไฟท์ผลิต พบว่าราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A18, A30, A45, A49, A109 และ R222 สามารถผลิต IAA สูงกว่า 100 µg ml^{-1} (ตาราง 48) และราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุด (737.69±0.01 µg ml^{-1}) ดังนั้น ราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 จึงถูกนำไปศึกษาการผลิต IAA และผลของ IAA ต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชต่อไป

ตาราง 48 แสดงปริมาณ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์จำนวน 6 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ปริมาณ IAA (µg ml)
A45	402.10±0.01
A18	461.15±0.01
A49	649.18±0.01
A30	380.14±0.01
A109	737.69±0.01
R222	424.73±0.01

การบ่งชี้ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 โดยวิธี thin layer chromatography (TLC)

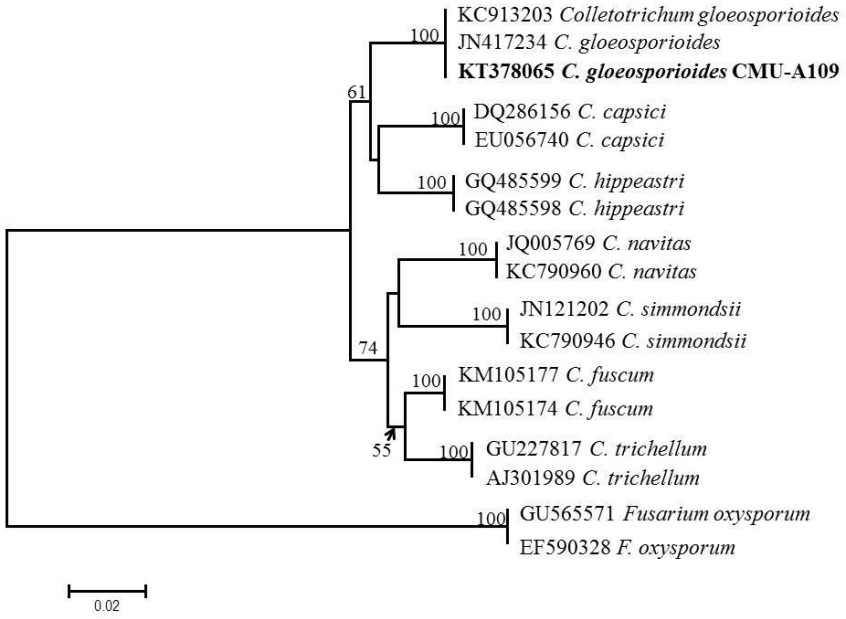
การบ่งชี้ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ A109 พบว่า เมื่อตรวจสอบภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm ปรากฏจุดเรืองแสงและเมื่อพ่นด้วยสารทดสอบ Salkowski's reagent จุดดังกล่าว เกิดสีแดงมี ค่า R_f เท่ากับ 0.52 ส่วนจุดเรืองแสงที่พ่นด้วย Ehmann's reagent เกิดสีน้ำเงินม่วง ค่า R_f เท่ากับ 0.38 ซึ่งค่า R_f ของจุดเรืองแสง UV และสีที่ปรากฏเมื่อพ่นสารทดสอบมีค่าเท่ากันและเท่ากับค่า R_f ของสารมาตรฐาน IAA (ภาพ 50)



ภาพ 50 การทำ TLC เพื่อบ่งชี้ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ A109, จุดเรืองแสงเมื่อตรวจสอบใต้รังสี UV ความยาวคลื่น 254 nm (ก,ค), จุดสีแดงที่เกิดขึ้นหลังจากพ่น Salkoeski's reagent (ข), จุดสีน้ำเงินม่วงที่เกิดขึ้นหลังจากพ่น Ehmann's reagent (ง), ลูกศรสีแดงชี้ตำแหน่ง IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ A109 ลูกศรสีเหลืองชี้ตำแหน่งสารมาตรฐาน IAA

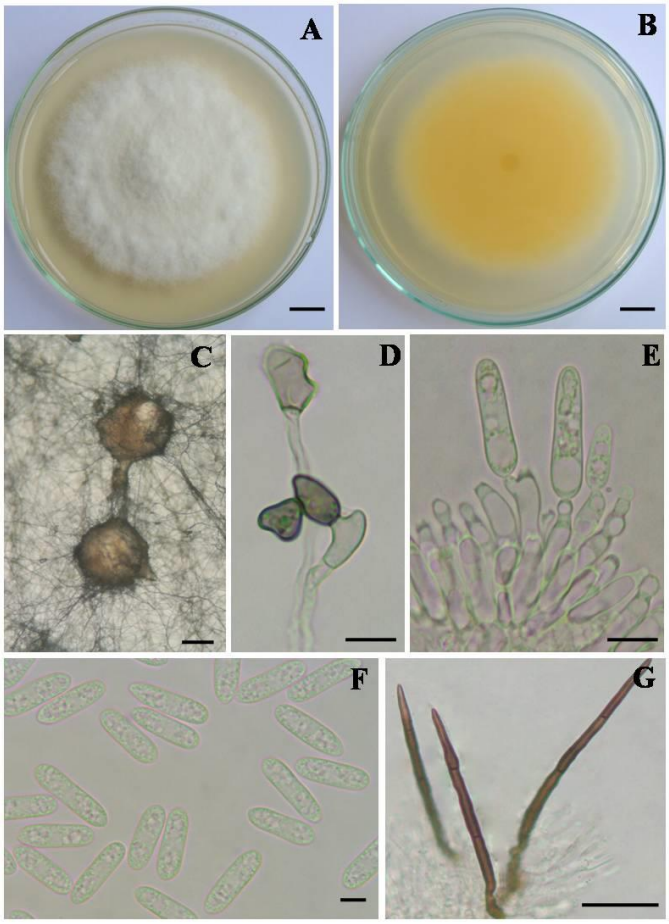
การบ่งชี้ชนิดของราเอนโดไฟท์ A109 โดยอณูชีววิทยาและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาระดับอณูชีววิทยาของราเอนโดไฟท์ A109 จากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree พบว่า ราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 มีความสัมพันธ์กับ *Colletotrichum gloeosporioides* โดยค่า bootstrap เท่ากับ 100% (ภาพ 51) และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร PDA มีขนาด 8-9 cm หลังจากปลูกเชื้อ 10 วัน โคโลนีมีสีขาว-เทา เมื่อตรวจสอบโครงสร้างต่างๆภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ พบการสร้างโคนิเดียเรียวทรงกระบอก เรียบ ปลายทู่ ใส ขนาด 4.53(4-5)×15.55(14-20) µm สร้างจากเซลล์กำเนิด(conidiogenous cell) appressorium สีน้ำตาล-น้ำตาลกลาง ขนาด 5.54(3-10) × 8(6-11) µm โดยมีรูปร่างต่างๆ ได้แก่ กลม รี จนถึงรูปร่างไม่แน่นอน นอกจากนี้พบว่าราเอนโดไฟท์ A109 สร้าง setae สีน้ำตาลดำ ซึ่งเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Colletotrichum gloeosporioides* (ภาพ 52)



ภาพ 51 แผนภูมิต้นไม้ (Maximum-parsimonious tree) ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 แสดง

ความสัมพันธ์กับราที่เกี่ยวข้องโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรม และมี *Fusarium oxysporium* เป็นราก; ค่า Bootstap ($\geq$ 50%) แสดงในแต่ละก้านของแผนภูมิ, Bar = 0.02 แสดงการแทนที่ต่อตำแหน่งนิวคลีโอไทด์

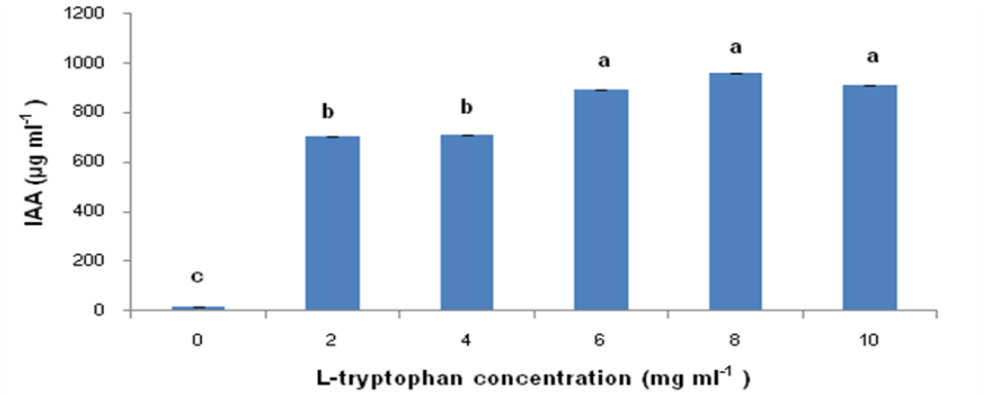


ภาพ 52 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109; ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นาน 7 วัน (A, B), conidiomata บนอาหาร PDA (C), appressoria (D), conidiogenous cell (E), conidia (F) และ dark brown setae (G). Bars: A, B = 1 cm; C = 0.15 mm; D, E, F, G = 10 µm.

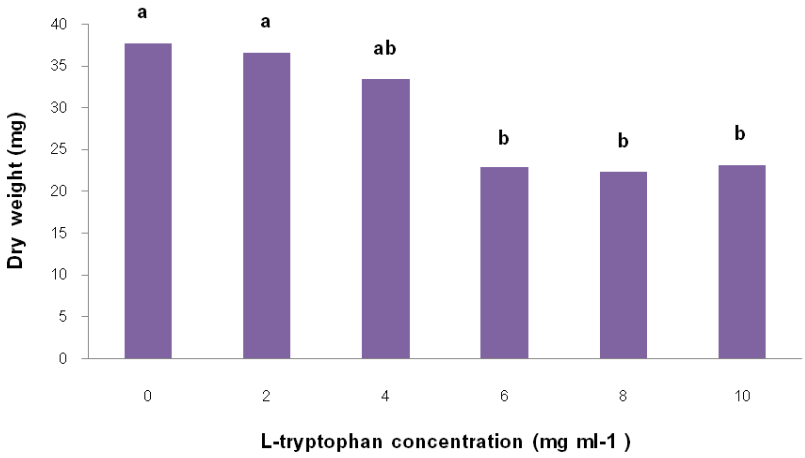
4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ A109 (ปริมาณความเข้มข้นของ tryptophan, ระยะเวลาในการบ่ม และ อุณหภูมิ)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 พบว่า ราเอนโดไฟท์สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดที่ความเข้มข้น L-tryptophan เท่ากับ 8 mg ml^{-1} (964.10±0.02 µg ml^{-1}) (ภาพ 53) ความเข้มข้นของ L-tryptophan ที่ทำให้ค่าน้ำหนักแห้งของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 มากที่สุดคือ 0-2 mg ml^{-1} (ภาพ 54) ระยะเวลาในการบ่ม คือ 26 วัน (1170.13±3.46 µg ml^{-1}) (ภาพ 55) ระยะเวลาในการบ่มที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งของราเอนโดไฟท์

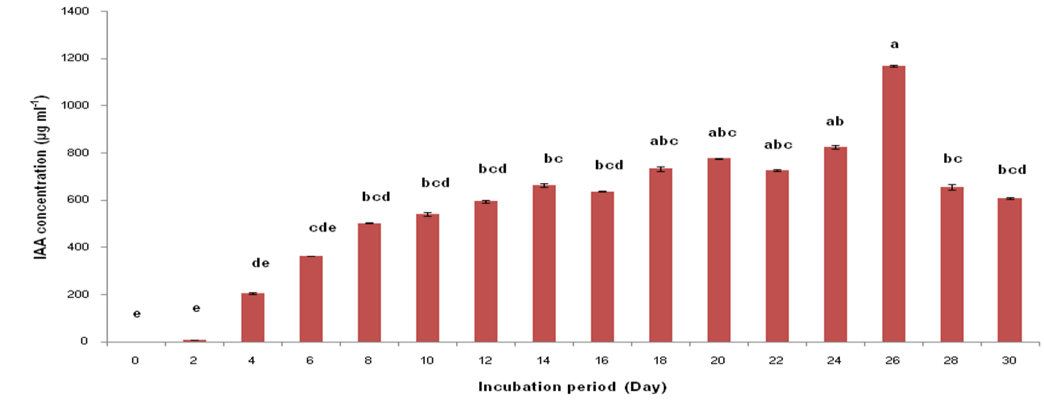
มากที่สุดคือ 6 วัน (ภาพ 56) และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ A109 คือ 30°C โดยปริมาณ IAA ที่ผลิตได้คือ1205.58±151.89 µg ml^{-1} (กราฟ 57) ที่อุณหภูมิ 22°C ทำให้ได้น้ำหนักแห้งของราเอนโดไฟท์มากที่สุด (ภาพ 58)



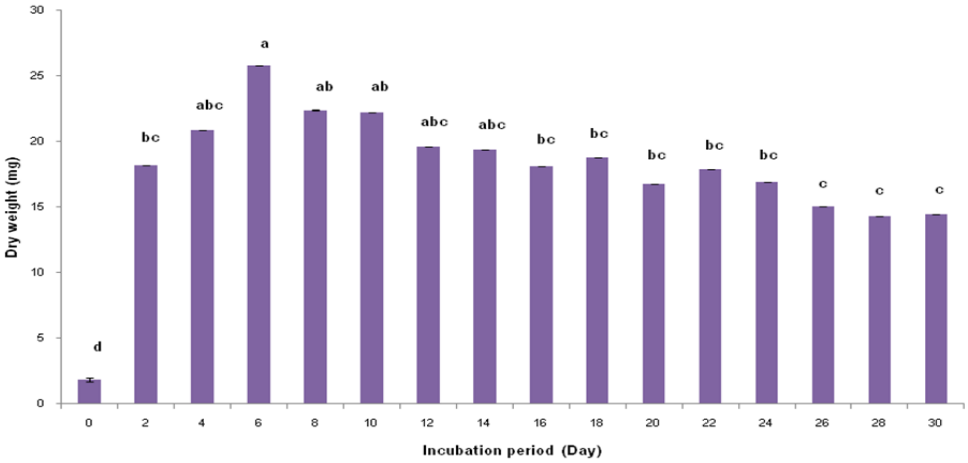
ภาพ 53 ผลของความเข้มข้นของ L-tryptophan ต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 (P<0.05)



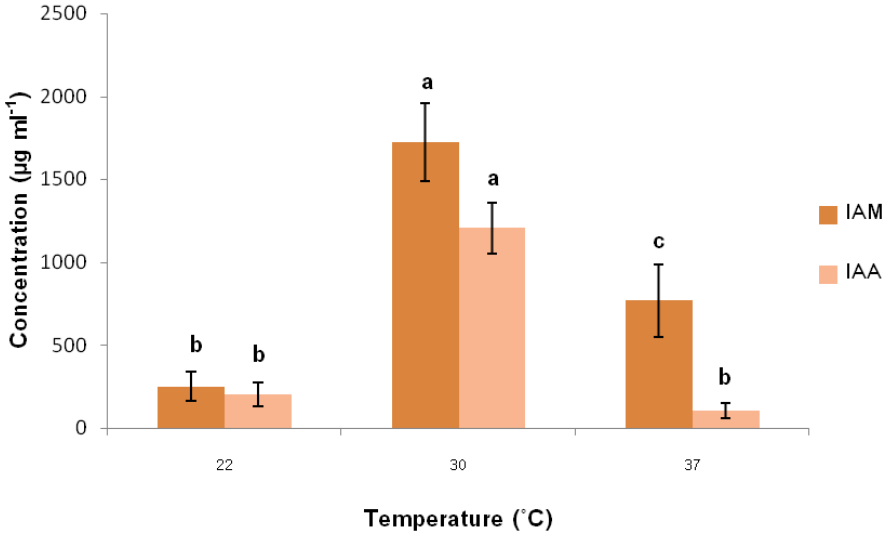
ภาพ 54 ผลของความเข้มข้นของ L-tryptophan ต่อน้ำหนักแห้งของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 (P<0.05)



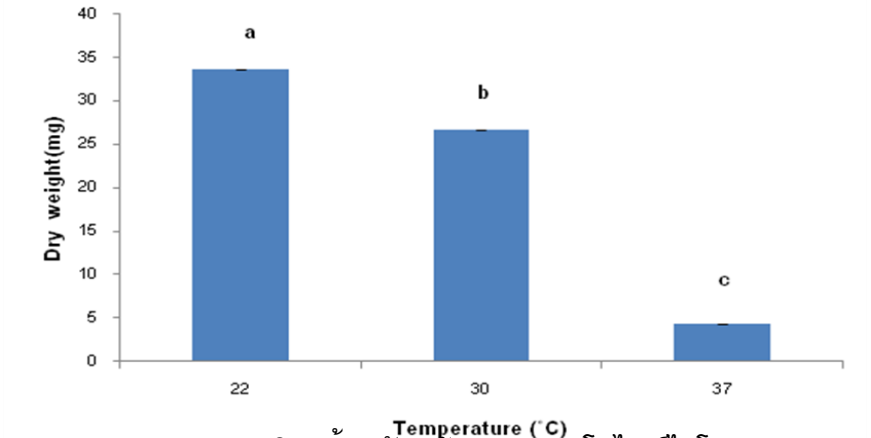
ภาพ 55 ผลของระยะเวลาในการบ่มต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 (*P*<0.05)



ภาพ 56 ผลของระยะเวลาในการบ่มต่อน้ำหนักแห้งของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 (*P*<0.05)



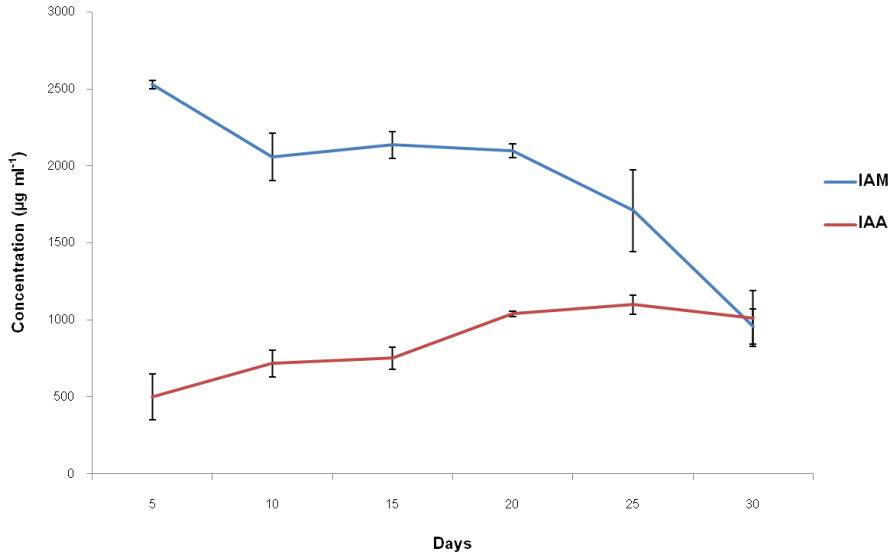
ภาพ 57 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 (*P*<0.05)



ภาพ 58 ผลของอุณหภูมิต่อน้ำหนักแห้งของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 (*P*<0.05)

5. การยืนยัน pathway การผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 โดย HPLC

จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 ผ่าน Indole-3-acetamide (IAM) pathway เนื่องจากความเข้มข้นของ IAM จะค่อยๆลดลงเมื่อระยะเวลาในการบ่มมากขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของ IAA จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาบ่ม IAM ถูกนำไปใช้เพื่อผลิต IAA (ภาพ 59)



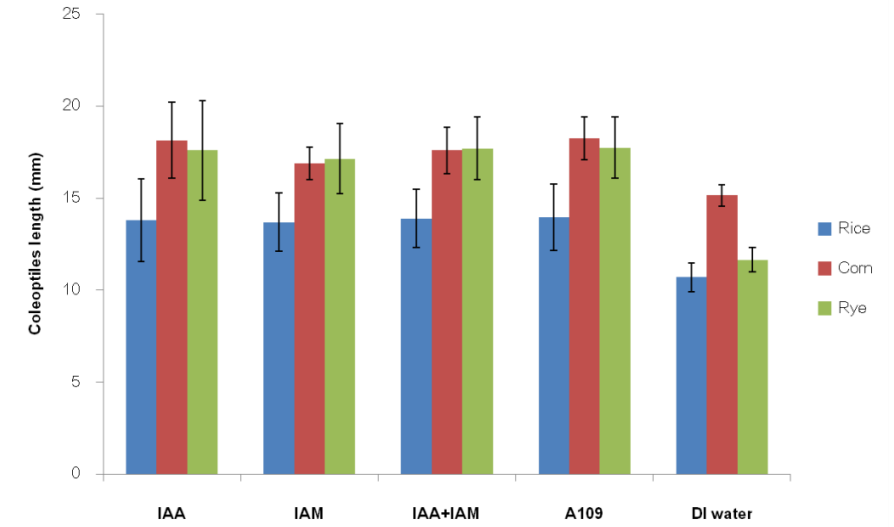
ภาพ 59 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง IAM และ IAA การผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 ผ่าน Indole-3-acetamide pathway

ตาราง 49 แสดงปริมาณ IAA และ IAM ที่เกิดขึ้น ในวันต่างๆ

	IAM	IAA
5	2528.65±25.66	499.70±150.50
10	2058.32±154.10	716.19±88.81
15	2136.36±88.52	750.15±72.91
20	2098.58±43.76	1037.71±16.80
25	1710.56±264.79	1099.18±63.36
30	871.39±115.97	841.07±181.27

6. สารสกัดหยาบ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 ต่อการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าว ข้าวโพด และข้าวไรย์

การทดสอบผลของสารสกัดหยาบ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ A109 ต่อการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าว, ข้าวโพด และข้าวไรย์ (ภาพ 60) พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 μg ml^{-1} สามารถกระตุ้นการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าว (13.95 mm) ข้าวโพด (18.25 mm) และ ข้าวไรย์(17.75 mm) ได้เทียบเท่าสารมาตรฐานและแตกต่างทางสถิติกับ deionized water ซึ่งเป็นตัวควบควบคุมผลลบ



กราฟ 60 ผลของสารสกัดหยาบ IAA จากราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 ต่อการยืดยาวเนื้อเยื่อ coleoptiles ของข้าว ข้าวโพด และข้าวไรย์

7. สารสกัดหยาบ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 ต่องอกของเมล็ดกาแฟ

สารสกัดหยาบ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ A109 (ตาราง 50) และ IAA ทางการค้าไม่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกาแฟได้ โดยไม่ต่างจาก deionized water

ตาราง 50 ผลของสารสกัดหยาบ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ A109 ต่อการงอกของเมล็ดกาแฟ

	การงอก (%)*	รากแขนง (ราก)*	ความยาว(mm)*		น้ำหนักแห้ง (mg)*	
			ราก	ต้น	ราก	ต้น
A109	41.33±5.51a	23.70±1.43a	39.79±0.52a	36.35±0.16a	16.29±2.14a	15.36±0.72a
IAA	42.67±5.51a	24.67±1.25a	45.14±0.48a	39.26±0.39a	16.15±1.22a	15.70±2.06a
Deionized	45.33±1.53a	20.76±22.63a	37.78±0.25a	34.82±0.11a	15.66±2.16a	15.14±0.57a

water

*ผล±ค่าเบี่ยงเบน; ตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงค่าทางสถิติ (*P<0.05*)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างใบและก้านของกาแฟสายพันธุ์อาราบิก้าและโรบัสต้า พบว่า ราเอนโดไฟท์ชนิดเด่นคือ *Colletotrichum* และ *Xylaria* เมื่อทำการคัดแยกราเอนโดไฟท์ที่สามารถผลิต IAA พบ *Colletotrichum* สามารถผลิต IAA ได้ในปริมาณสูง โดยราเอนโดไฟท์จำนวน 6 ไอโซเลทที่ผลิต IAA ได้สูงกว่า 100 µg ml^{-1} จากการเติม L-tryptophan 2 mg ml^{-1} ซึ่งเป็นสารตันต้นการผลิต IAA จัดอยู่ในจีนัส *Colletotrichum* และราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 สามารถสร้าง IAA ได้สูงสุดถึง 737.69±0.01 µg ml^{-1} เมื่อบ่งชี้ชนิดโดยอาศัยข้อมูลทางอณูชีววิทยาและลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น *Colletotrichum gloeosporioides* นอกจากนี้การตรวจสอบ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ A109 สามารถระบุได้ว่าสารที่ราเอนโดไฟท์ A109 ผลิตคือ IAA จากการทำ TLC เทียบกับสารมาตรฐาน IAA ดังนั้น ราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 จึงได้รับเลือกเพื่อนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA และผล IAA ต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชต่อไป

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ A109 ผลของความเข้มข้นของ L-tryptophan ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการเมทาบอลิซึมในการผลิต IAA พบว่า ความเข้มข้นของ L-tryptophan ที่ 6, 8 และ 10 mg ml^{-1} เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ A109 (ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ) ซึ่งมีปริมาณ 896.41±0.05, 964±0.02 และ 909.74±0.05 µg ml^{-1} ตามลำดับเมื่อตรวจสอบโดย colorimetric assay นอกจากนี้พบว่าราเอนโดไฟท์ A109 สามารถผลิต IAA ได้แม้ไม่เติม L-tryptophan ลงในอาหาร PDB อีกด้วย ดังนั้นจึงได้เลือกความเข้มข้นที่ 8 mg ml^{-1} L-tryptophan ในการหาระยะเวลาการบ่มของราเอนโดไฟท์ A109 ต่อการผลิต IAA เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ราเอนโดไฟท์ A109 สามารถผลิต IAA ได้สูงสุดและเป็นค่ากลางระหว่างช่วง 6-10 mg ml^{-1} L-tryptophan ที่ราเอนโดไฟท์ A109 สามารถผลิต IAA ได้ดีสุด การศึกษาระยะเวลาในการบ่มต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ A109 พบว่า แนวโน้มการผลิต IAA ราเอนโดไฟท์ A109 เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจากวันที่ 0 และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 26 คือ 1170.13±3.46 µg ml^{-1} จากนั้นจึงลดลง อาจเป็นไปได้ว่า L-tryptophan หมด รวมทั้งเมื่อความเข้มข้นของ IAA ที่ราเอนโดไฟท์ A109 ผลิตขึ้นมีปริมาณสูงมาก กลไกการผลิต IAA จะถูกยับยั้งเพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA ของราเอนโดไฟท์ A109 และเมื่อตรวจวัดปริมาณ IAA ของราเอนโดไฟท์ A109 โดย HPLC พบว่า ที่อุณหภูมิ 30°C ราเอนโดไฟท์ A109 ผลิต IAA ปริมาณสูงสุด คือ 1205.58±151.89 µg ml^{-1} ในวันที่อุณหภูมิ 22 และ 37°C ราเอนโดไฟท์ A109 สามารถผลิต IAA ได้ปริมาณ 202.98±72.52 และ 105.21±47.05 µg ml^{-1} ตามลำดับ ในขณะเดียวกันพบว่าราเอนโดไฟท์ A109 สามารถ

ผลิต Indole-3-acetamide (IAM) ซึ่งเป็น intermediate ของ IAA ดังนั้นในการทดสอบ IAA ที่ราเอนโดไฟท์ A109 ผลิตต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชต้องเทียบกับสารมาตรฐาน IAA, IAM, IAA+IAM(ในอัตราส่วนเท่ากับราเอนโดไฟท์ A109 ผลิต) และ Deionized water สำหรับตัวควบคุมผลบวกและลบ ตามลำดับ

การยืนยันการผลิต IAA ผ่าน IAM pathway ของราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 พบว่าในช่วงแรก ความสัมพันธ์ระหว่าง IAA และ IAM ที่เกิดขึ้นมีความผกผันกัน โดย IAM จะมีประมาณสูงกว่า IAA และเมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณ IAM จะลดเรื่อยๆขณะที่ปริมาณ IAA เพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่า ช่วงแรกราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 เปลี่ยน L-tryptophan ไปเป็น IAM ก่อน จากนั้นจึงเปลี่ยน IAM เป็น IAA ทำให้ช่วงแรก IAM สูงกว่า IAA และช่วงหลัง IAA สูงกว่า IAM ทำให้สรุปได้ว่า ราเอนโดไฟท์โซเลท A109 ผลิต IAA ผ่าน IAM pathway อย่างไรก็ตาม ในวันที่ 30 พบว่า กราฟ 8 แสดง ปริมาณ IAA ลดลง แสดงว่าปริมาณ IAA ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณสูงเกินไปทำให้ราเอนโดไฟท์หยุดเปลี่ยน IAM เป็น IAA เพื่อป้องกันเซลล์ที่อาจสูญเสียเนื่องจากความเข้มข้นของสารภายนอก และในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร IAA และ IAM อาจถูกราเอนโดไฟท์นำไปใช้เพื่อการเจริญได้เช่นกัน

การศึกษาผลของสารสกัดหยาบ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ A109 ต่อการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าว ข้าวโพด และข้าวไรย์ พบว่า ในข้าว IAA จากราเอนโดไฟท์ A109 สามารถกระตุ้นการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าวได้สูงสุด คือ 13.95±1.80 mm ซึ่งแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับ deionized water(10.70±0.79 mm) และไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน IAA(13.80±2.25), IAM(13.70±1.58 mm) และ IAA+IAM(13.90±1.58) ในข้าวโพด สามารถกระตุ้นการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าวโพดได้สูงสุดเท่ากับ 18.25±1.16 mm ซึ่งแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับ deionized water(15.15±0.58 mm) และไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน IAA(18.15±2.08), IAM(16.90±0.88 mm) และ IAA+IAM(17.60±1.26) เช่นเดียวกับการทดสอบการยืดยาวเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าวไรย์ พบว่า IAA จากราเอนโดไฟท์ A109 สามารถกระตุ้นการยืดยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile ได้สูงสุด คือ 17.75±1.65 mm ซึ่งแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับ deionized water(11.65±0.67 mm) และไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน IAA(17.60±2.71), IAM(17.15±1.88 mm) และ IAA+IAM(17.70±1.70) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าการทดสอบการกระตุ้นเนื้อเยื่อ coleoptile ของพืชทั้งสามชนิดคือ ข้าว ข้าวโพด และข้าวไรย์ มีการเพิ่มความยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile แตกต่างกันทั้งที่ความยาวของเนื้อเยื่อ coleoptile เริ่มต้นมีขนาด 10 mm เท่ากัน โดยเนื้อเยื่อ coleoptile ของข้าวไรย์เมื่อถูกกระตุ้นโดย IAA ที่ราเอนโดไฟท์ A109 ผลิต หรือสารมาตรฐานสามารถยืดยาวได้มากกว่าข้าวและข้าวโพด จากข้อมูลดังกล่าวสามารถบอกถึงความแตกต่างผลการตอบสนองในแต่ละพืชต่อ IAA ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำ IAA จากราเอนโดไฟท์ A109 ไปใช้ในอนาคต

จากผลการทดสอบสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ A109 ต่อการงอกของเมล็ดกาแฟ แสดงให้เห็นว่า เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกาแฟ จำนวนรากแขนง ความยาวของราก,ลำต้น และน้ำหนักแห้งราก,ลำต้นกาแฟ ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน IAA และ deionnized water ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมล็ดกาแฟมีขนาดใหญ่ รวมทั้งการที่ผนังเมล็ดกาแฟมีโครงสร้างแข็งทำให้สารสกัดหยาบ IAA จากเชื้อราเอนโดไฟท์ A109 และสารมาตรฐาน IAA ไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปกระตุ้นการงอกและส่งเสริมการเจริญของเมล็ดกาแฟได้ รวมทั้งภายในเมล็ดกาแฟมีการสะสมอาหารและฮอร์โมนพืชที่เพียงพอต่อการงอกและการพัฒนาของต้นกล้า จึงทำให้ผลการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับตัวควบคุมผลบวกและลบ นอกจากนี้ได้มีการทดสอบการย่อยเมล็ดกาแฟด้วยกรด และการใช้วิธีทางกายภาพ(ขูดเมล็ดกาแฟ) เพื่อให้สารสกัดหยาบ IAA สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกาแฟผลปรากฏว่าไม่สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกาแฟได้เช่นกัน

สรุปผลการทดลอง

จากราเอนโดไฟท์จำนวน 115 ไอโซเลทที่แยกได้จากต้นกาแฟ พบว่า 94 ไอไอโซเลท สามารถผลิต IAA ได้ และพบว่าราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 สามารถผลิต IAA ได้ปริมาณสูงสุด คือ 1205.58±151.89 $\mu g\ ml^{-1}$ เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต IAA และพบว่าสามารถผลิต IAA ผ่าน indole-3-acetamide pathway การศึกษาผลของ IAA ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ไอโซเลท A109 แสดงให้เห็นว่า IAA จากราเอนโดไฟท์มีประสิทธิที่ภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืชทดสอบเทียบเท่าสารมาตรฐาน IAA

2.5 การควบคุมเชื้อก่อโรคในยางพาราโดยราเอนโดไฟท์

การทดลองที่ 1 การคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์และเชื้อรา *Muscodor* sp.

การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรและยางพารา

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร 13 ชนิด ได้แก่ พญายอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau), ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz.), ลิ้นงูเห่า (*Clinacanthus siamensis* Bremek.) จาก สวนสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ดอยสุเทพ จ.เชียงใหม่, ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera* L.), ว่านสี่ทิศ (*Hippeastrum johnsonii* Bury.), ว่านตีนตะขาบ (*Muchlenbeckia platyclada* Meissn.), กุหลาบเมาะลำเลิง (*Pereskia grandiflora* Haw.), หนุมานนั่งแท่น (*Jatropha podagrica* Hook.), หนุมานประสานกาย (*Schefflera leucantha* R. Vig.) และมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) จากพื้นที่ในเขต อ.เมือง จ.เชียงใหม่, ย่านางแดง (*Bauhinia strychnifolia* Craib) และกำลังเสือโคร่ง (*Betula alnoides* Buch.-Ham.ex G.Don)

จาก จ.อุดรธานี, พญาวานร (*Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk) จาก จ. นครราชสีมา และตัวอย่างยางพารา (*Hevea brasiliensis*) จาก จ.หนองบัวลำภู และพะเยา

การคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

นำตัวอย่างใบ, ก้านและราก มาล้างโดยการผ่านน้ำประปาประมาณ 15 นาที และตัดส่วนของใบแบบสุ่มให้เป็นชิ้นขนาด 5 ตารางมิลลิเมตร โดยตัดให้ผ่านส่วนเส้นกลางใบ (vein) และระหว่างเส้นกลางใบ (inter vein) ส่วนรากและก้านให้ตัดแบบสุ่มให้มีขนาดความยาว 5 มิลลิเมตร นำตัวอย่างไปฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterile) ใน 75% ethanol นาน 30 วินาที, 1-2% sodium hypochlorite นาน 3 นาที และ95% ethanol นาน 30 วินาที ตามลำดับ (Suwannarach et al. 2010) นำตัวอย่างมาวางบนอาหาร 2% malt extract agar ที่เติม rose bengal (0.033 กรัม/ลิตร) และ chloramphenicol (50 มิลลิลิตร/ลิตร) (Theantana et al. 2007) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25±2 °C) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาในอาหาร potato dextrose agar (PDA)

การคัดแยกเชื้อรา *Muscodor* sp.

เชื้อรา *Muscodor* sp. เป็นเชื้อราที่สามารถสร้างไอระเหยและมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย (Strobel and Daisy 2003) สามารถแยกได้โดยนำชิ้นตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วตามวิธีในข้อ1.2 วางบนอาหาร ½ PDA ที่มีเชื้อรา *M. cinnamomi* CMU-Cib461 เจริญอีกด้านของอาหาร โดยตัดชิ้นวุ้นตรงกลางของอาหารออกไป แล้วนำไป โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อ *M. cinnamomi* CMU-Cib461เจริญอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25±2 °C) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาในอาหาร PDA (Strobel et al. 2001)

การทดลองที่ 2 การคัดแยกราก่อโรคในยางพาราและทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

การคัดแยกราก่อโรคในยางพารา

นำตัวอย่างส่วนที่เป็นโรคของยางพาราไปฆ่าเชื้อที่ผิว ตามวิธีในข้อ 1.2 นำตัวอย่างมาวางบนอาหาร 2% malt extract agar ที่เติม rose bengal (0.033 กรัม/ลิตร) และ chloramphenicol (50 มิลลิกรัม/ลิตร) (Theantana et al. 2007) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25±2 °C) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาในอาหาร PDA

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคในยางพารา

นำส่วนของยางพาราเช่น ใบ หรือกิ่ง ที่เป็นส่วนที่เชื้อทำให้เกิดโรคมาเช็ดทำความสะอาดด้วย 70% alcohol และพันด้วยสำลีชุบน้ำกลั่นที่ปลายก้านใบ หรือกิ่ง และวางใน moist chamber และวางชิ้นวุ้นโคโลนีเชื้อราบนตัวอย่างพืช โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อขูดชิ้นตัวอย่างให้เป็นแผล และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 อาทิตย์ สังเกตอาการของโรค

การทดลองที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคในยางพาราของราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Dual culture

วางชิ้นวุ้นโคโลนีเชื้อราก่อโรคที่มีอายุ 5 วัน ได้แก่ *C. gloeosporiodes*, *G. australe*, *F. oxysporum f*. sp. *vasinfectum* , *P. noxius, Ph. parasitica, R. microporus* และ *Rhizoctonia solani* ด้านใดด้านหนึ่งของอาหาร PDA แล้ววางชิ้นวุ้นเชื้อราเอนโดไฟท์ฝั่งตรงข้ามเชื้อราก่อโรค บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดโคโลนีของเชื้อราก่อโรคและคำนวณ % การยับยั้งการเจริญเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent inhibition of radial growth-PIRG) คำนวณได้ดังนี้

$$PIRG = \frac{(R_1-R_2)\ x100}{R_1}$$

R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานทดสอบ

การทดลองที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบ (crude extract) กับเชื้อราก่อโรคในยางพารา

การเตรียมสารสกัดหยาบ

วางชิ้นวุ้นโคโลนีเชื้อราเอนโดไฟท์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่มีอายุ 4 วัน จำนวน 3 ชิ้นบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีเชื้อราเจริญอยู่จะถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาสกัดด้วยสารละลายเอทิลอะซีเตท (ethyl acetate) จำนวน 3 ครั้ง ในอัตราส่วน 1:1 (w/v) แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator (Taechowisan et al. 2009)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ ด้วยวิธี Agar well diffusion

ละลายสารสกัดหยาบด้วยสารละลายเมธานอล (methanol) ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใส่สารละลาย

ปริมาตร 35 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดโคโลนีของเชื้อราก่อโรคเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและคำนวณ % การยับยั้งการเจริญ

การทดลองที่ 5 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentrations : MIC) ของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในยางพารา

ละลายสารสกัดหยาบด้วยสารละลายเมธานอลที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นระหว่าง 5-0.04 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามวิธี two-fold dilution (Taechowisan et al. 2009) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใส่สารละลายปริมาตร 35 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดโคโลนีของเชื้อราก่อโรคเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและคำนวณ % การยับยั้งการเจริญ

การทดลองที่ 6 การทำ TLC ของสารสกัดราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในยางพารา

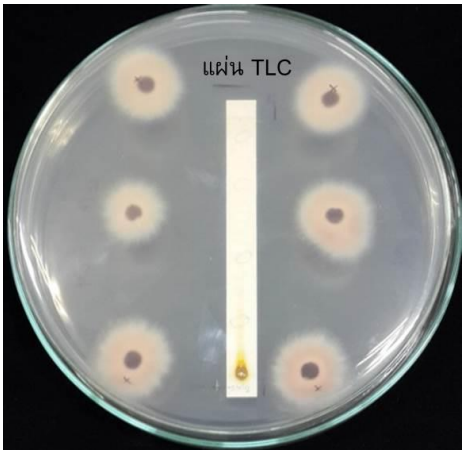
เตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ Dichloromethane : methanol ในอัตราส่วน 95:5 และ 96:4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้บรรยากาศภายในแท็งก์อิ่มตัวด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ ใช้แผ่น TLC silica gel 60GF 254 (Merck, Germany) ขนาด 1x10 เซนติเมตร จุดสารสกัดหยาบของไอโซเลต AVT1 และ AVT2 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC นำไปใส่ในแท็งก์ที่มีเฟสเคลื่อนที่ Dichloromethane : methanol อัตราส่วน 95:5 และ 96:4 ตามลำดับ จนเฟสเคลื่อนที่เดินทางถึงจุดสิ้นสุด นำแผ่น TLC ออกจากภาชนะแล้วเป่าให้แห้ง ตรวจดูตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร (Prakash et al. 2013) คำนวณหาค่า R_f ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นในเวลาเดียวกัน}}$$

การทดลองที่ 7 การทดสอบหาตำแหน่งของสารสกัดราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Bioautography

การเตรียมเชื้อราก่อโรค

วางชิ้นวุ้นเชื้อราก่อโรค *P. noxius* และ *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตร บนจานอาหาร PDA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นิ้ว โดยวาง 3 จุด จำนวน 2 แถว ดังภาพ 61 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ส่วนสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* ให้เตรียมสปอร์จำนวน $1x10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร



ภาพ 61 แสดงการวางแผ่น TLC บนจานอาหาร PDA เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อรา

การทำ Bioautography

นำแผ่น TLC ที่เป่าให้แห้งวางคว่ำหน้าบนกึ่งกลางจานอาหารระหว่างแถวโคโลนีเชื้อราก่อโรคในข้อ 7.1 โดยแผ่น TLC ของไอโซเลต AVT1 ทดสอบกับเชื้อ *P. noxius* และไอโซเลต AVT2 ทดสอบกับเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* นาน 1 ชั่วโมง ดึงแผ่น TLC ออกแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3-7 วัน ส่วนการทดสอบการงอกของสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* ให้ swab สารละลายสปอร์จากข้อ 7.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Peres et al. 2012) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารก่อนวางแผ่น TLC อ่านผลที่ได้โดยเปรียบเทียบโซนยับยั้งกับตำแหน่งของสารที่อยู่บนแผ่น TLC เพื่อระบุสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค

การทดลองที่ 8 การทดสอบการผลิต IAA (Indole-3-acetic acid)

การทดสอบการผลิต IAA เบื้องต้น

เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์และเชื้อ *Muscodor* ในอาหาร PDB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร L-Tryptophan เขย่าในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน แล้วเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงมาวัดปริมาณ IAA โดยใช้น้ำเลี้ยง 1 มิลลิลิตร เติม Salkowski reagent 2 มิลลิลิตร (0.5 โมลาร์ $FeCl_3$ 1 มิลลิลิตร+35% $HClO_4$ 50 มิลลิลิตร) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ IAA standard (10 – 250 ไมโครโมลาร์) (Hung and Annapurna 2004)

การทดสอบการผลิต IAA เพื่อยืนยันผล

การสกัดสารสกัดหยาบ IAA เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ในอาหาร PDB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร L-Tryptophan ตามวิธีในข้อ 8.1 แล้วกรองเอาน้ำเลี้ยงมาปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 2.5 ถึง 3.0 โดยใช้ 1 N HCl แล้วสกัดด้วยสารละลายเอทิลอะซีเตท ปริมาตร 2 เท่าของน้ำเลี้ยง จำนวน 2 ครั้ง แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator

การทดสอบด้วย Thin layer chromatography (TLC) ละลายสารสกัดหยาบ IAA ด้วยสารละลายเมธานอลแล้วหยดสารละลาย IAA บนแผ่น TLC รันในแท็งค์ที่มีไอระเหยอิ่มตัวของตัวทำละลาย chloroform : methanol : water (84:14:1) อ่านผลที่ได้ใต้แสง UV (254 นาโนเมตร) และพ่นด้วย Salkowski's reagent และ Ehmann's reagent วัดและคำนวณค่า Rf เปรียบเทียบกับ IAA, IBA มาตรฐาน (Admad et al. 2005)

การทดลองที่ 9 การทดสอบการผลิต Siderophore

เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์และเชื้อ *Muscodor* บนอาหาร CAS-substrates with modified Gaus No.1 (MGs-1) medium (Schwyn and Neilands 1987) และนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน บันทึกผล โคโลนีที่มีการสร้าง siderophore จะมีโซนสีเหลืองถึงชมพูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดลองที่ 10 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของไอระเหยอินทรีย์ *Muscodor* sp.

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค

เลี้ยงเชื้อ *Muscordor* sp. บนอาหาร PDA ด้านใดด้านหนึ่งเป็นเวลา 5 วัน แล้วตัดวุ้นให้เป็นแถบตรงกลางจานเพาะเชื้อและนำออกไป ก่อนวางชิ้นวุ้นโคโลนีเชื้อก่อโรคในยางพาราที่อีกด้านของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ *Aspergillus flavus A. niger C. gloeosporioides G. austral F. oxysporum f.* sp. *vasinfectum Ph. parasitica P. noxius R. microporus* และ *Rh. solani* ปิดด้วยพาราฟิล์มแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วันแล้ว วัดขนาดของโคโลนีเชื้อก่อโรคและและคำนวณ % การยับยั้งการเจริญ ในกรณีเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคได้ 100% ให้ทดสอบว่าเชื้อยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อก่อโรคได้ โดยวางชิ้นวุ้นโคโลนีเชื้อก่อโรคที่ไม่มีการเจริญไปวางบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน หากเชื้อไม่มีการเจริญออกมาแสดงว่าเชื้อทดสอบสามารถฆ่าเชื้อก่อโรคได้

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ก่อโรค

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร NB (Nutrient broth) และเชื้อยีสต์ก่อโรคในอาหาร Yeast extract Malt extract broth (YMB*)* ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 6 ชั่วโมง ปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ด้วย 0.85 % NSS (Sterile normal saline solution) หยดเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 5 ไมโครลิตร จำนวน 8 เชื้อทดสอบบนอาหาร NA (Nutrient Agar) ส่วนยีสต์ให้หยดบนอาหาร YMA ซึ่งอยู่อีกด้านหนึ่งของจานอาหารเดียวกันกับเชื้อ *Muscodor* sp. นำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ หากไม่มีการเจริญให้ยืนยันผลโดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะบริเวณที่ลงเชื้อไป streak บนอาหาร NA ใหม่เพื่อตรวจสอบการเจริญของเชื้อว่ายังมีการเจริญอยู่หรือไม่

การทดลองที่ 11 การทดสอบไอระเหยของเชื้อ *Muscodor* sp. ในการยับยั้งการงอกและเจริญของรากพืช

วางชิ้นวุ้นเชื้อรา *Muscodor* sp. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตร บนอาหาร PDA ด้านหนึ่งของจานอาหารแบบแบ่งครึ่ง บ่มเป็นเวลา 5 วัน ส่วนเมล็ดพืชที่ใช้ในการทดลองแบ่งเป็น พืชใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ข้าวมะลิ, หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis)* และข้าวโพด และพืชใบเลี้ยงคู่ คือ *Arabidopsis thaliana* col-0, มะเขือเทศ, ถั่วเขียวและถั่วลันเตา นำเมล็ดข้าวโพดมาฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterile) ตามวิธีของ Macías-Rubalcava และคณะ (2010) ส่วนเมล็ด *A. thaliana* col-0 ให้ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่เมล็ดในสารละลาย 70% เอทานอล นาน 3 นาที เทสารละลาย 70% เอทานอลออกแล้วเติมสารละลาย 10 % โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:4 (5-fold) ทิ้งไว้นาน 12-13 นาที เทสารละลายออกแล้วล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 5-7 ครั้ง เตรียมเมล็ดให้ลอยอยู่ใน 0.1% agar เพื่อความสะดวกในการวางเมล็ดบนอาหารเพาะเลี้ยง

วางเมล็ดพืชจำนวน 10 เมล็ดบนอาหาร 1% water agar ในด้านตรงข้ามเชื้อรา *Muscodor* sp. ยกเว้นเมล็ดข้าวโพดใช้ 5 เมล็ด และเมล็ด *A. thaliana* col-0 20 เมล็ด บนอาหาร Murashige and Skoog (MS medium) แล้วปิดจานอาหารด้วยพาราฟิล์มให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และ 21 องศาเซลเซียส โดยให้รับแสงและไม่รับแสง 12:12 ชั่วโมง และ 16:8 ชั่วโมง ตามลำดับ บันทึกการงอกของเมล็ดและการเจริญเมื่อครบ 10 วันและ 14 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบผลที่ได้กับชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อ *Muscodor* (Macías-Rubalcava et al. 2010) โดยทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

การทดลองที่ 12 การวิเคราะห์ไอระเหยของเชื้อ *Muscodor* sp. ด้วย SPME GC/MS (SPME Gas Chromatography /Mass Spectrometry)

ไอระเหยของเชื้อรา *Muscodor* sp. จะถูกเตรียมเพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและโครงสร้างสารตามวิธีของ Strobel และคณะ (2001) และ Ezra และคณะ (2004) โดยใช้เข็ม solid phase micro-extraction (SPME) fiber ดูดซับไอระเหยของเชื้อรา *Muscodor* ที่มีอายุ 7 วัน เป็นเวลานาน 45 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatograph GC 2010 (Shimadzu, Japan) และ mass spectrometer MS-QP2010 Plus (Shimadzu) ตามวิธีของ Suwannarach และคณะ (2013) แล้วนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST

การทดลองที่ 13 การควบคุมโรครากเน่าของยางพาราในระดับโรงเรือนด้วยวิธี Biofumigation โดยเชื้อ *Muscodor* sp. ที่สร้างไอระเหย (VOCs)

การเตรียมหัวเชื้อราก่อโรครากขาวและรากน้ำตาล

ผสมวัสดุปลูก ได้แก่ ขี้เลื่อย100 กรัม, รำข้าว 3 กรัมและน้ำตาล 2 กรัม ให้เข้ากันโดยปรับความชื้นด้วยน้ำให้เหมาะสม บรรจุถุงพลาสติกแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที โดยทำการพักให้เย็นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง (Kaewchai and Soytong 2010)

ใส่ชิ้นวุ้นเชื้อราก่อโรครากขาว (*R. microporus*) และโรครากน้ำตาล (*P. noxius*) จำนวน 1 ชิ้น ในอาหารเหลว PDB นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน นำมาเทลงบนวัสดุปลูกแล้วบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 เดือน (ภาพ 62)

ภาพ 62 แสดงการเตรียมหัวเชื้อราก่อโรคในยางพารา

การเตรียมหัวเชื้อรา *Muscodor* sp.

แช่เมล็ดข้าวไรน์ข้ามคืน บรรจุลงขวดเพาะเลี้ยงปริมาณ 80 กรัม/ขวด แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที โดยทำการพักให้เย็นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง เลี้ยงเชื้อรา *Muscodor* sp. ในอาหารเหลว PDB เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วันแล้วเติมเชื้อลงในเมล็ดข้าวไรน์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วัน

การควบคุมโรครากเน่าของยางพาราในระดับโรงเรือนด้วยวิธี Biofumigation

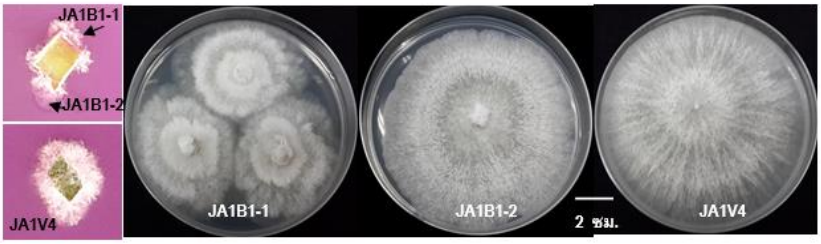
ปลูกกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 อายุ 6 เดือน ลงถุงปลูก โดยใช้ดินผสม (หน้าดิน+ดินปลูก อัตราส่วน 3:1) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จัดวางการทดลองเชิงสถิติแบบ CRD (Completely Randomized Design) ประกอบด้วย 11 ชุดทดลอง (treatment) ได้แก่ ชุดควบคุม, เชื้อก่อโรครากขาว, เชื้อก่อโรครากน้ำตาล, เชื้อ *Muscodor* sp. 40 กรัม/กิโลกรัม, เชื้อ *Muscodor* sp. 80 กรัม/กิโลกรัม, เชื้อก่อโรครากขาวและเชื้อ *Muscodor* sp. 40 กรัม/กิโลกรัม, เชื้อก่อโรครากน้ำตาลและเชื้อ *Muscodor* sp. 40 กรัม/กิโลกรัม, เชื้อก่อโรครากขาวและเชื้อ *Muscodor* sp. 80 กรัม/กิโลกรัม, เชื้อก่อโรครากน้ำตาลและเชื้อ *Muscodor* sp. 80 กรัม/กิโลกรัม, เชื้อก่อโรครากขาวและยาฆ่าเชื้อราคาลิกซิน (calixin) และเชื้อก่อโรครากน้ำตาลและยาฆ่าเชื้อราคาลิกซิน โดยปลูกต้นไม้จำนวน 4 ซ้ำ/ตัวแปรทดลอง

บันทึกผลการเกิดโรคหลังจากการปลูกในโรงเรือนนาน 5 เดือน โดยสังเกตอาการใบเหลืองแล้วรายงานค่า Disease index (DI) ให้ระดับอาการของโรค ดังนี้ 1 = ใบเขียวและไม่เป็นโรค, 2 = ใบเหลือง 1-25 เปอร์เซ็นต์, 3 = ใบเหลือง 26-50 เปอร์เซ็นต์, 4 = ใบเหลือง 51-75 เปอร์เซ็นต์ และ 5 = ใบเหลือง 76-100 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งสังเกตการณ์เจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคบนรากของพืชและตรวจสอบธาตุอาหารในดินทดลองทั้งก่อนและหลังการทดลอง (Kaewchai and Soytong 2010)

ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 การคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

จากตัวอย่างพืชสมุนไพร 13 ชนิดและยางพาราสามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 285 ไอโซเลต โดยแยกได้จากพญายอมากที่สุด คือ 66 ไอโซเลต รองลงมา คือ ทองพันชั่ง 28 ไอโซเลต และว่านหางจระเข้ 25 ไอโซเลต ตามลำดับ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อในสกุล *Colletotrichum, Phoma, Phomopsis* และ *Xylaria* เป็นต้น และราบางไอโซเลตไม่สร้างสปอร์อยู่ในกลุ่ม mycelia sterilia (ภาพ 63, ตาราง 51)



ภาพ 63 ราเอนโดไฟท์ไอโซเลต JP1B1-1, JP1B1-2 และJP1V4 ที่คัดแยกจากส่วนกิ่งก้านและใบของหนุมานนั่งแท่น

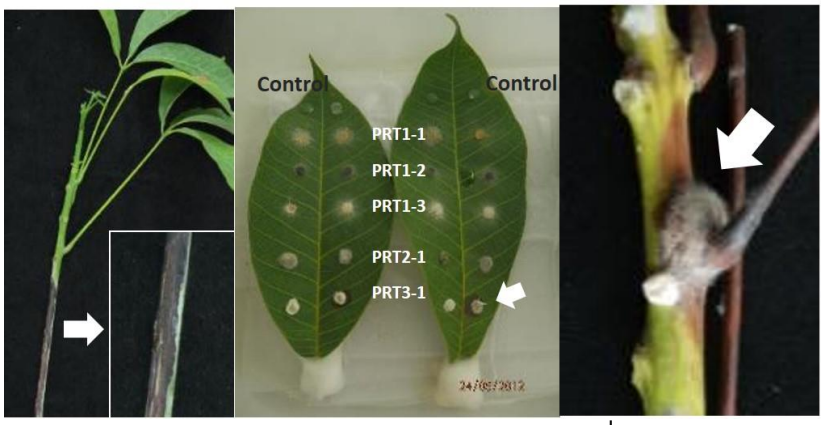
ตาราง 51 แสดงจำนวนไอโซเลตของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่คัดแยกได้จากพืชสมุนไพรและยางพารา

ตัวอย่างพืช	จำนวนไอโซเลต				จำนวนทั้งหมด
	ใบ (Intervein)	ใบ (Vein)	ก้าน/ลำต้น	ราก	
ย่านางแดง	3	1	5	*	9
กำลังเสือโคร่ง	1	2	3	*	6
พญายอ	17	14	29	6	66
ลิ้นงูเห่า	4	9	11	0	24
พญาวานร	3	5	2	*	10
ทองพันชั่ง	0	0	25	3	28
ยางพารา	0	3	20	*	23
ว่านหางจระเข้	3	*	7	15	25
ว่านตีนตะขาบ	8	3	0	*	11
ว่านสี่ทิศ	12	6	2	*	20
กุหลาบเมาะลำเลิง	3	6	0	*	9
หนุมานนั่งแท่น	12	2	8	*	22
หนุมานประสานกาย	0	9	4	*	13
มะกรูด	15	3	1	*	19

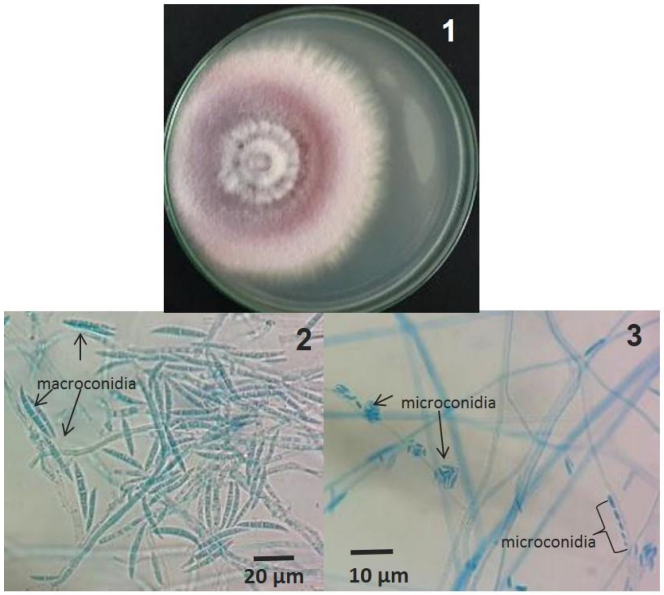
หมายเหตุ ; * คือ ไม่ได้แยกเชื้อ

ผลการทดลองที่ 2 การคัดแยกเชื้อราก่อโรคในยางพาราและทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

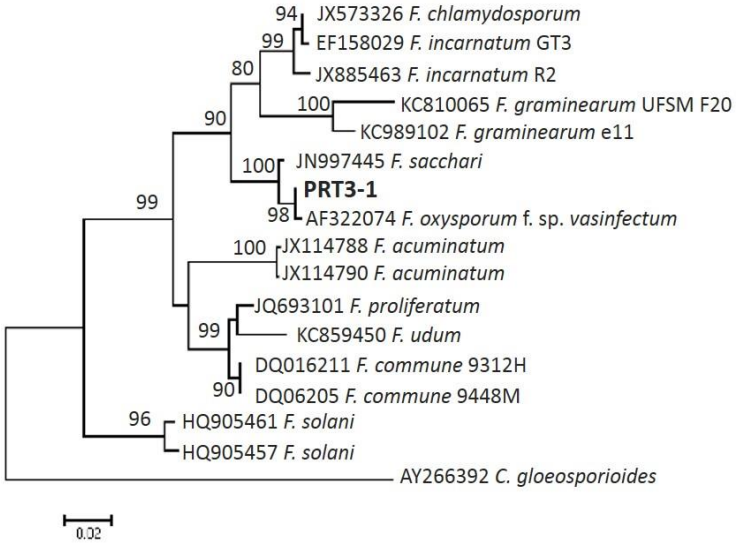
จากการคัดแยกเชื้อสาเหตุโรคที่ทำให้เกิดอาการเน่าที่กิ่งของกล้ายางพารา โดยมีลักษณะเน่าและเป็นรอยไหม้สีดำที่ก้าน ส่วนใบมีสีเหลือง โดยสามารถแยกเชื้อราจากชิ้นส่วนของก้านที่เป็นโรคได้ 5 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบการก่อโรคบนใบและก้านยางพาราพบว่าไอโซเลต PRT5 สามารถทำให้พืชแสดงอาการของโรคได้ โดยเมื่อนำมาตรวจสอบสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อมีเส้นใยฟูสีขาวเมื่อยังอ่อน เส้นใยแบบมีผนังกั้น เมื่อแก่เส้นใยมีสีม่วง และสร้าง macrospore ขนาด 25 ไมครอน เมื่อเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาและจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลให้สกัดดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี ITS-rDNA amplification โดยใช้ universal ITS4 และ ITS5 primer พบว่าเป็นเชื้อ *F. oxysporum f.* sp. *vasinfectum* (ภาพ 64-66)



ภาพ 64 แสดงการทดสอบการเกิดโรคบนใบและกิ่งของยางพารา



ภาพ 65 แสดงลักษณะโคโลนี (1) macroconidia (2) และ microconidia (3) ของเชื้อรา *F. oxysporum f.* sp. *vasinfectum*



ภาพ 66 Phylogenetic tree ของเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* อ้างอิงจากข้อมูล rDNA ITS sequences (ITS4, ITS5) โดยใช้วิธี Neighbor Joining

ผลการทดลองที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรค

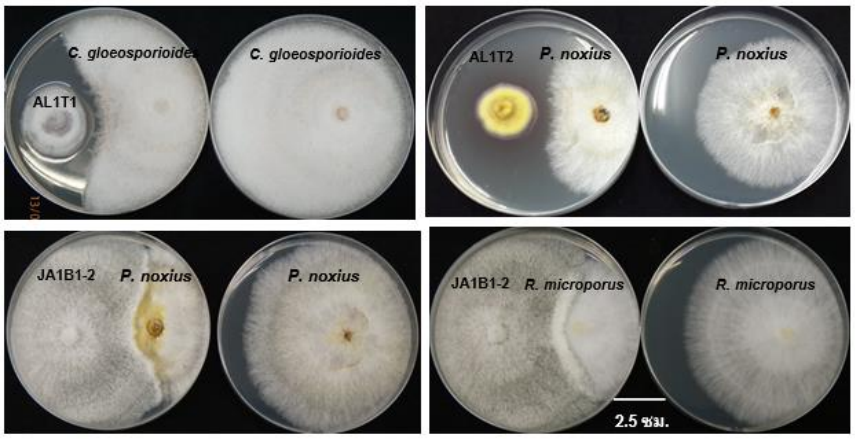
จากตัวอย่างราเอนโดไฟท์จำนวน 285 ไอโซเลต พบว่ามีราเอนโดไฟท์จำนวน 11 ไอโซเลตที่มีเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป โดยราเอนโดไฟท์ที่สร้างโซนยับยั้งและให้เปอร์เซนต์ยับยั้งสูงสุดต่อเชื้อ *R. microporus* คือ ไอโซเลต SC1V1 และ *C. gloeosporioides* คือไอโซเลต AL1T1 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 57.8 และ 60.0 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต AL1T2 สร้างโซนยับยั้งและให้เปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงสุดต่อเชื้อ *P. noxius* และ *F.* oxysporum *f.* sp. *vasinfectum* โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 60.7และ 65.0 ตามลำดับ นอกจากนี้ไอโซเลต JA1B1-2 สามารถเจริญแข่งขันและมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงกับเชื้อก่อโรคทุกชนิด และเชื้อมีการสร้างไอระเหยเมื่อมีอายุ 3 วัน (ตาราง 52, ภาพ 67)

ตาราง 52 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคของราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Dual culture

ตัวอย่างพืช	ไอโซเลต	เปอร์เซนต์ยับยั้งการเจริญ					
		R. microporus	*P. noxius*	*F. oxysporum*	*C. gloeosporioides*	*P. parasitica*	*R. solani*
ว่านหางจระเข้	AL1T1	58.3	59.4	-	60.0	20.4	51.0
	AL1T2	54.4	60.7	65.0	44.0	42.0	40.5
	AL1R2	53.3	52.4	25.0	48.0	32.5	44.5
หนุมานประสานกาย	SC1V1	57.8	54.7	40.0	56.4	40.0	60.0
ว่านสี่ทิศ	HI1V3	70.2*	78.3*	67.2*	50.0*	63.8*	44.5*
	HI5IV1-1	65.5*	32.4*	56.4*	45.0*	57.5*	55.3*
	HI5IV1-2	63.1*	32.4*	55.3*	45.4*	56.7*	45.6*
หนุมานนั่งแท่น	JA1B1-1	51.8*	61.1*	28.6*	47.4*	41.5*	44.2*
	JA1B1-2	82.1*	81.5*	71.4*	60.4*	80.8*	65.9*
	JA1B1-6	53.6*	55.6*	28.6*	42.1*	53.7*	53.8*

หมายเหตุ; * คือ ไม่มีโซนยับยั้ง แต่เชื้อมีการเจริญแข่งขัน

- คือ ไม่มีโซนยับยั้ง



ภาพ 67 แสดงฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคของไอโซเลต AL1T1, AL1T2 และ JA1B1-2 กับเชื้อราก่อโรค *P. noxius, C. gloeosporioides* และ *R. microporus*

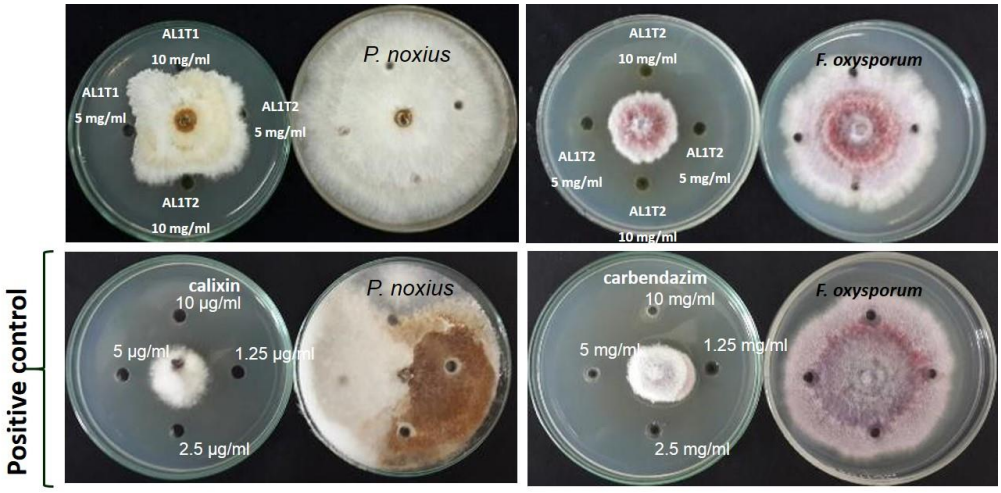
ผลการทดลองที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบกับเชื้อราก่อโรคในยางพารา

เมื่อคัดเลือกเชื้อที่สร้างโซนยับยั้งและมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงไปสกัดสารสกัดหยาบและทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง พบว่า สารสกัดหยาบของไอโซเลต AL1T1 และ AL1T2 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *R. microporus*, และ *F.* oxysporum *f.* sp. *vasinfectum* โดยไอโซเลต AL1T1 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง *P. noxius* สูงสุดเท่ากับ 65.8±5.7ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และไอโซเลต AL1T2 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *F.* oxysporum *f.* sp. *vasinfectum* สูงสุด เท่ากับ 63.5±1.8 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 53, ภาพ 68)

ตาราง 53 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ไอโซเลต AL1T1 และ AL1T2

เชื้อก่อโรค	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ			
	AL1T1		AL1T2	
	10 มก./มล.	5 มก./มล.	10 มก./มล.	5 มก./มล.
R. microporus	57.7±1.8	55.8±3.0	54.7±2.3	50.7±1.8
P. noxius	65.8±5.7	63.3±3.8	57.5±4.3	55.0±4.3
F. oxysporum	-	-	63.5±1.8	58.4±1.8

หมายเหตุ ; - คือ ไม่ได้ทดสอบ



ภาพ 68 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. noxius* และ *F.* oxysporum *f.* sp. *vasinfectum* ของไอโซเลต AL1T1 และ AL1T2 ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

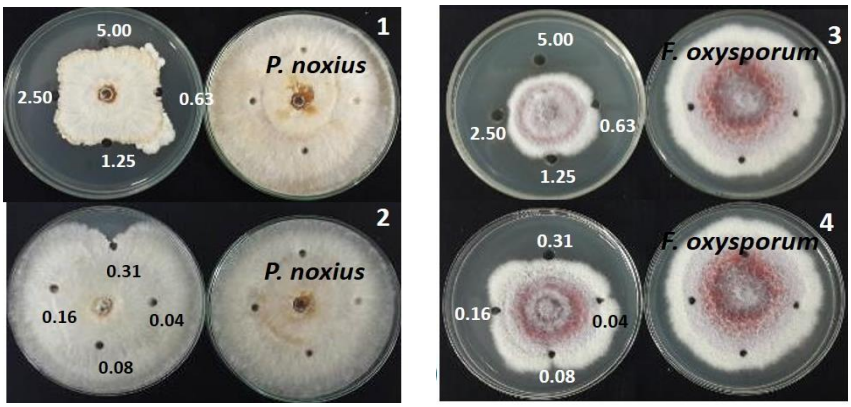
ผลการทดลองที่ 5 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในยางพารา

สารสกัดหยาบของไอโซเลต AL1T1 และ AL1T2 มีค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. noxius* ที่ก่อโรครากน้ำตาลในยางพารา เท่ากับ 0.31 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.63 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่สารสารสกัดหยาบของไอโซเลต AL1T2 มีค่า MIC ในการยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F.* oxysporum *f.* sp. *vasinfectum* เท่ากับ 0.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตาราง 54, ภาพ 69)

ตาราง 54 แสดงความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในยางพารา

ไอโซเลต	MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	
	P. noxius	*F. oxysporum*
AL1T1	0.31	-
Al1T2	0.63	0.16

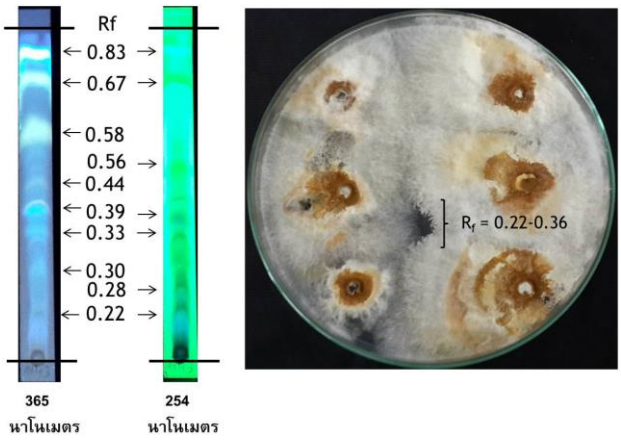
หมายเหตุ ; - คือ ไม่ได้ทดสอบ



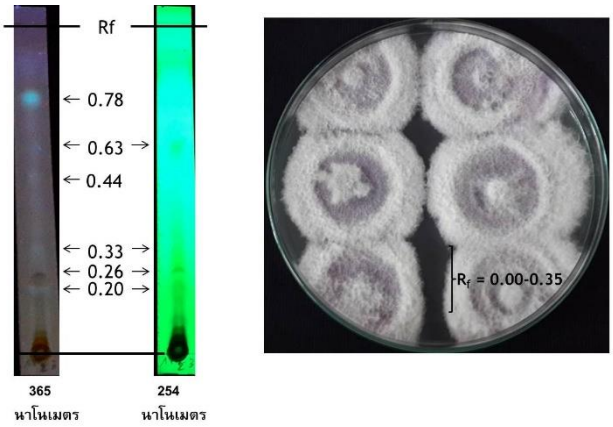
ภาพ 69 แสดงค่า MIC ของสารสกัดหยาบไอโซเลต AL1T1 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. noxius* (1)(2) และ ค่า MIC ของสารสกัดหยาบไอโซเลต AL1T2 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F.* oxysporum *f.* sp. *vasinfectum* (3)(4)

ผลการทดลองที่ 6 การทำ TLC และ Bioautography ของสารสกัดราเอนโดไฟท์

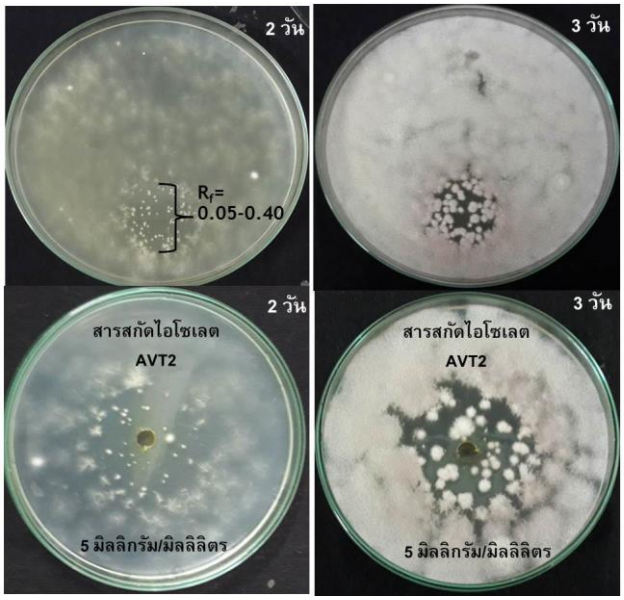
เมื่อนำแผ่น TLC มาตรวจสอบชนิดสารสกัดโดยสังเกตภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดของไอโซเลต AL1T1 มีแถบเกิดขึ้นหลายแถบโดยมีค่า R_f ระหว่าง 0.22-0.83 และมีค่า R_f ระหว่าง 0.22-0.33 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. noxius* (ภาพ 70) ส่วนสารสกัดของไอโซเลต AL1T2 มีแถบเกิดขึ้นจำนวน 6 แถบ โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.20, 0.26, 0.33, 0.44, 0.63 และ 0.78 โดยมีค่า R_f ระหว่าง 0.20-0.33 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (ภาพ 71-72)



ภาพ 70 แสดงค่า R_f ของสารสกัดไอโซเลต AL1T1 บนแผ่น TLC เมื่อสังเกตใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และตำแหน่งค่า R_f ระหว่าง 0.22-0.33 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. noxius*



ภาพ 71 แสดงค่า R_f ของสารสกัดไอโซเลต AL1T2 บนแผ่น TLC เมื่อสังเกตใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และตำแหน่งค่า R_f ระหว่าง 0.20-0.33 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

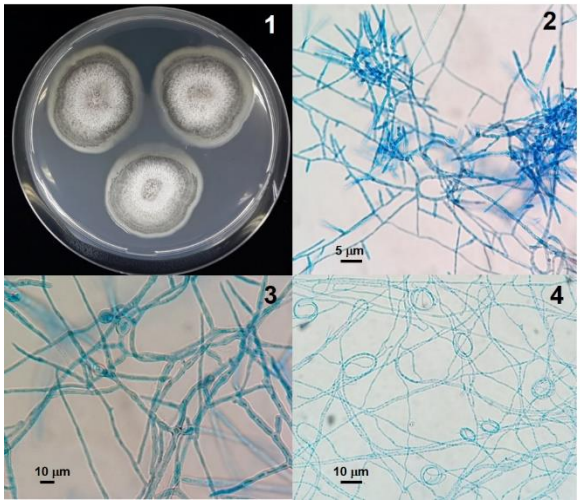


ภาพ 72 แสดงตำแหน่งค่า R_f ระหว่าง 0.20-0.33 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Bioautography และการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดก่อนนำมาทดสอบ

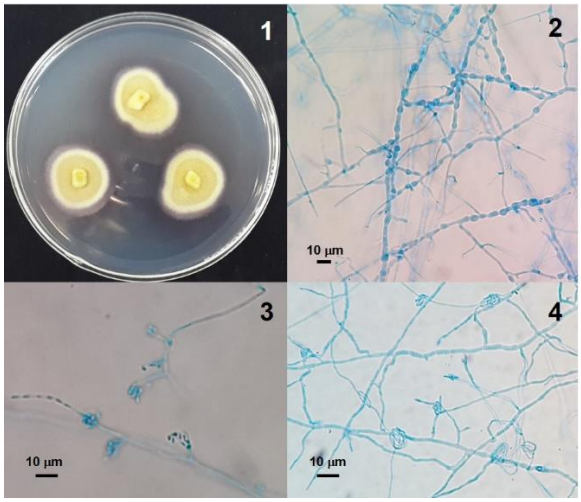
ผลการทดลองที่ 7 สัณฐานวิยาและการจัดจำแนกเชื้อราเอนโดไฟท์

เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์ไอโซเลต AL1T1 และ AL1T2 มาตรวจสอบสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าไอโซเลต AL1T1 มีลักษณะโคโลนีขอบสีเขียว ตรงกลางมีสีขาว เส้นใยหนา 1.3 ไมโครเมตร มีการรวมกันเป็นมัดเส้นใยขนาด 5.1-7.7 ไมโครเมตร สร้างขดเส้นใยขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลาง 11.9-21.3 ไมโครเมตร และเส้นใยที่มีอายุมากจะมีลักษณะโป่งพอง (swollen cell) ไม่พบการสร้างสปอร์ (ภาพ 73) ส่วนไอโซเลต AL1T2 มีโคโลนีสีเหลือง เมื่อเจริญบนอาหาร PDA จะสร้างสารสีแดงละลายในอาหาร เส้นใยมีขนาด 2.6-5.1 ไมโครเมตร เส้นใยพบลักษณะโป่งพอง (swollen cell) จำนวนมากบนเส้นใย สร้างสปอร์ (conidia) ต่อกันเป็นเส้นสาย จำนวน 2-6 สปอร์ สปอร์มีขนาด 1.3x2.6 ไมโครเมตร (ภาพ 74) เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบส rDNA ITS sequences (ITS4, ITS5) กับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าเชื้อทั้งสองไอโซเลตอยู่ในกลุ่ม Sordariomycetes



ภาพ 73 แสดงโคโลนีของไอโซเลต AL1T1 (1) ลักษณะเส้นใย (2) swollen cell (3) และ ขดเส้นใย (4)



ภาพ 74 แสดงโคโลนีของไอโซเลต AL1T2 (1) swollen cell (2) สปอร์ (3) และ ลักษณะเส้นใย (4)

ผลการทดลองที่ 8 การทดสอบการผลิต IAA และ siderophore

พบว่าเมื่อตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์ IAA เบื้องต้นมีเชื้อราในกลุ่มราเอนโดไฟท์ที่ไม่สร้างไอระเหยอินทรีย์จำนวน 11 ไอโซเลตที่ผลิต IAA ได้ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 9.4±1.2-95.0±2.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเชื้อไอโซเลต SYV1 สามารถผลิต IAA ได้มากที่สุด และมีเชื้อจำนวน 13 ไอโซเลตที่สามารถผลิต siderophore ได้ในการทดสอบเบื้องต้น โดยมีไอโซเลต BS1B201, C4V202(1), JA1B1-6, PS1IV102 และ SYV1 ที่ให้ halo diameter มากกว่า 30 มิลลิเมตร ขณะที่มีเชื้อราเอนโดไฟท์กลุ่มสร้างไอระเหยอินทรีย์จำนวน 3 ไอโซเลต สามารถผลิต IAA ได้ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 13.9±0.2-18.8±0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตสามารถผลิต siderophore ได้ในการทดสอบเบื้องต้น (ตาราง 55)

ตาราง 55 แสดงการผลิต IAA และ Siderophore ของเชื้อราเอนโดไฟท์

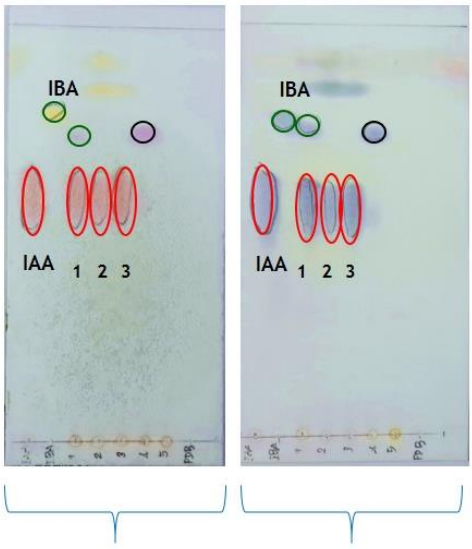
ไอโซเลต		IAA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	CAS positive	
			halo diameter (มิลลิเมตร)	สี
เชื้อไม่สร้างไอระเหยอินทรีย์	AL1T1	22.6±6.0	++	ชมพู
	AL1T2	-	+	เหลือง
	BS1B201	40.7±0.5	++++	เหลือง
	C4V202(1)	29.4±0.2	++++	เหลือง
	C4V501	-	++	ชมพู
	C4IV301	23.4±0.1	+++	เหลือง
	C4R301	19.6±1.1	+++	เหลือง
	C4R401	-	++	ชมพู
	JA1B1-1	19.9±2.0	+++	ชมพู
	JA1B1-2	14.7±2.4	+++	ชมพู
	JA1B1-6	9.4±1.2	++++	ชมพู
	PS1IV102	16.8±0.1	++++	เหลือง
	SC1V1	33.6±5.0	-	-
	SYV1	95.0±2.0	++++	ชมพู
เชื้อสร้างไอระเหยอินทรีย์	RTM5-IV1	13.9±0.2	++	เหลือง
	RTM5-IV2	-	++	ชมพู
	RTM5-IV3	18.8±0.2	+	เหลือง
	RTM5-IV4	18.8±0.1	++	ชมพู

หมายเหตุ ; halo diameter = +, <10 มิลลิเมตร; ++, 10-20 มิลลิเมตร; +++, 21-30 มิลลิเมตร; ++++, >30 มิลลิเมตร

เมื่อนำเชื้อราทั้ง 14 ไอโซเลตที่ให้ผลบวกในการตรวจสอบการผลิต IAA เบื้องต้นมายืนยันผลด้วย TLC พบว่า ไอโซเลต BS1B201, C4IV301 และ PS1IV102 และ ให้ค่า Rf ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน IAA เมื่อตรวจสอบด้วย Salkowski's reagent และ Ehmann's reagent โดยเชื้อสามารถผลิต IAA ได้ 40.7±0.5, 23.4±0.1 และ 16.8±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตสามารถผลิต siderophore ได้โดยเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองในการทดสอบเบื้องต้น (ตาราง 56, ภาพ 75)

ตาราง 56 ค่า Rf ของสารสกัดหยาบ IAA เมื่อทดสอบด้วย TLC

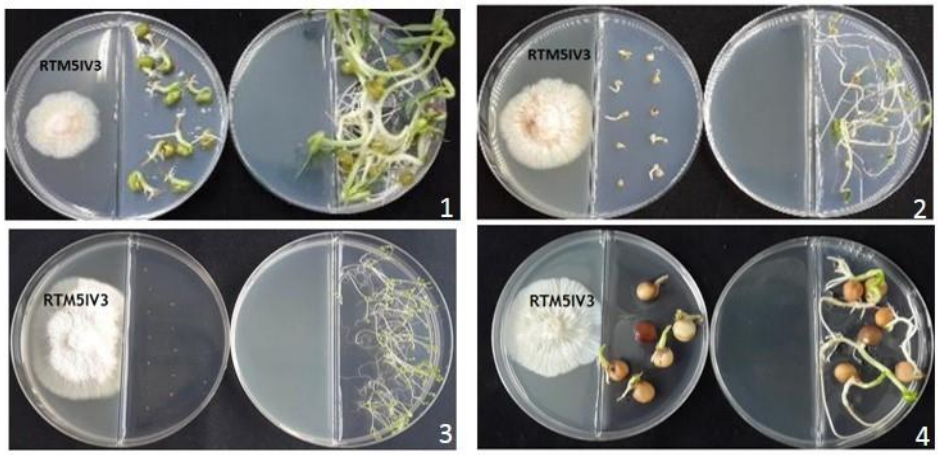
ตัวอย่าง	Salkowski's reagent	Ehmann's reagent
IAA	0.71	0.75
IBA	0.88	0.91
C4IV301	0.70,0.84	0.75
PS1IV102	0.70	0.74
BS1B201	0.70	0.74



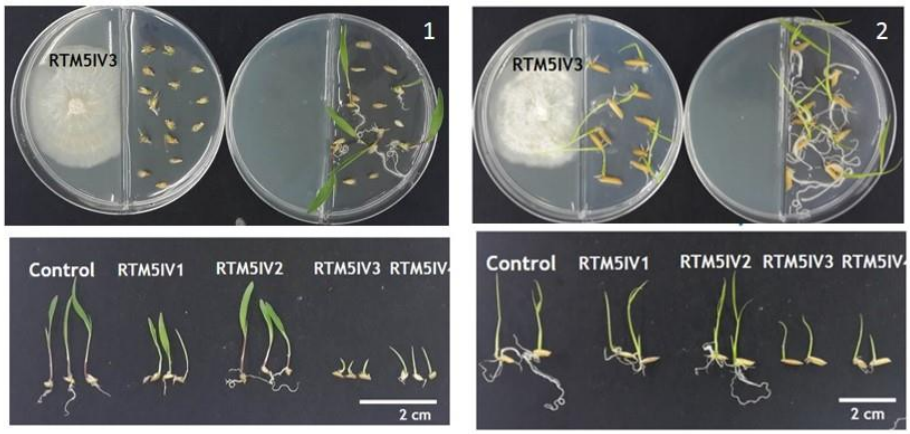
ภาพ 75 แสดงผลการผลิต IAA ของไอโซเลต C4IV301, PS1IV102 และ BS1B201 (ตัวอย่างหมายเลข 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) เมื่อทดสอบด้วย TLC

ผลการทดลองที่ 11 การทดสอบไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อ *Muscodor* sp. ต่อการงอกและเจริญของเมล็ดพืช

ไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อ *Muscodor* ทุกไอโซเลตมีฤทธิ์ยับยั้งการงอกและเจริญของรากลำต้นของพืชใบเลี้ยงคู่ที่ใช้ในการทดลอง ยกเว้นถั่วลันเตาที่ไอระเหยอินทรีย์จากไอเลต RTM5IV3 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกและเจริญของรากเมล็ดถั่วลันเตาและลำต้นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนพืชใบเลี้ยงเดี่ยวไอระเหยอินทรีย์ของ *Muscodor* มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกและเจริญของรากและต้นเช่นเดียวกับพืชใบเลี้ยงคู่ที่ใช้ในการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นไอระเหยอินทรีย์จากไอโซเลต RTM5IV2 ซึ่งไม่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือส่งเสริมการเจริญของรากและต้นของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ใช้ในการทดลอง (ตาราง 59-60, ภาพ 78-79)



ภาพ 78 แสดงความยาวรากและลำต้นของเมล็ดถั่วเขียว (1), มะเขือเทศ (2), *A. thaliana* col-0 (3) และ ถั่วลันเตา (4) เนื่องจากผลของไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อ *Muscodor* ไอโซเลต RTM5IV3



ภาพ 79 แสดงความยาวรากและต้นของหญ้ารูซี่ (1) และข้าวมะลิ (2) เนื่องจากผลของไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อ *Muscodor* ไอโซเลต RTM5IV3

ตาราง 59 แสดงผลของไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อ *Muscodor* ต่อการงอกและเจริญของเมล็ดพืชใบเลี้ยงคู่

ไอโซเลต	*Arabidopsis thaliana* col-0		มะเขือเทศ		ถั่วเขียว		ถั่วลันเตา	
	ราก (เซนติเมตร)	ลำต้น (เซนติเมตร)	ราก (เซนติเมตร)	ลำต้น (เซนติเมตร)	ราก (เซนติเมตร)	ลำต้น (เซนติเมตร)	ราก (เซนติเมตร)	ลำต้น (เซนติเมตร)
ชุดควบคุม	1.2±0.4	1.2±0.1	4.8±2.0	2.6±0.9	7.1±1.3	4.2±0.2	4.1±0.7	1.2±0.4
RTM5IV1	0.3±0.1	0	0.4±0.1	1.0±0.2	1.0±0.1	1.5±0.2	4.7±1.3	1.1±0.2
RTM5IV2	0	0	0.3±0.1	1.0±0.2	6.1±0.3	6.1±0.7	4.5±1.4	1.2±0.6
RTM5IV3	0	0	0.1±0.1	0.4±0.2	0.6±0.2	0.9±0.2	0.9±0.2	0.4±0.4
RTM5IV4	0	0	0.4±0.2	1.3±0.2	1.4±0.3	1.7±0.3	3.8±0.7	2.2±0.5

ตาราง 60 แสดงผลของไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อ *Muscodor* ต่อการงอกและเจริญของเมล็ดพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

ไอโซเลต	ข้าวมะลิ		หญ้ารูซี่		ข้าวโพด	
	ราก (เซนติเมตร)	ต้น (เซนติเมตร)	ราก (เซนติเมตร)	ต้น (เซนติเมตร)	ราก (เซนติเมตร)	ต้น (เซนติเมตร)
ชุดควบคุม	3.3±0.5	3.3±0.4	1.8±0.6	3.1±0.3	8.2±2.0	6.8±2.3
RTM5IV1	2.0±0.1	3.4±0.4	0.6±0.2	1.7±0.3	4.0±0.1	3.5±0.1
RTM5IV2	2.5±0.7	3.1±1.3	1.8±0.3	2.8±0.3	7.1±1.7	5.8±2.7
RTM5IV3	0.7±0.5	2.4±0.1	0.2±0.1	1.0±0.3	3.6±0.9	3.1±1.1
RTM5IV4	0.7±0.7	1.3±1.4	0.6±0.1	1.5 ±0.3	3.8±1.4	4.9±0.1

ผลการทดลองที่ 12 การวิเคราะห์ไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3) ด้วย SPME-GC/MS

พบว่าสารประกอบไอระเหยหลัก คือ 3-Methylbutan-1-ol โดยมีเปอร์เซนต์ Total area สูงสุด คือ 11.26 สารประกอบไอระเหยรองลงมา คือ 3-Methylbutyl acetate และ 2-Methylpropanoic acid มีเปอร์เซนต์ Total area เท่ากับ 6.92 และ 4.73 ตามลำดับ (ตาราง 61)

ตาราง 61 แสดงสารประกอบไอระเหยของเชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3) เมื่อวิเคราะห์ด้วย SPME-GC/MS

RT(min:s)	Possible compound	Molecular formula	M/z	Total area (%)	% Q
5.602	2-Methylpropan-1-ol	$C_4H_{10}O$	74	0.76	86
6.031	3-Methylbutyl acetate	$C_7H_{14}O_2$	130	6.92	90
8.291	3-Methylbutan-1-ol	$C_5H_{12}O$	88	11.26	83
17.133	2-Methylpropanoic acid	$C_4H_8O_2$	88	4.73	91
19.036	(1*R*,4*E*,9S)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo[7.2.0] undec-4-ene	$C_{15}H_{24}$	204	0.41	93
19.769	1,1,9-trimethyl-5-methylidenespiro[5.5]undec-9-ene	$C_{15}H_{24}$	204	0.51	95
20.749	azulene, 1,2,3,5,6,7,8,8 α-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1*S* (1.α.,7.α.,8α.β.)]-	$C_{15}H_{24}$	204	2.03	99
21.919	methyl (*Z*)-*N*-hydroxybenzenecarboximidate	$C_8H_9NO_2$	151	0.31	83
22.611	2-phenylethyl acetate	$C_{10}H_{12}O_2$	164	0.90	83
24.716	2-phenylethanol	$C_8H_{10}O$	122	1.28	97
30.179	azulene, 1,2,3,5,6,7,8,8 α-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1*S* (1.α.,7.α.,8α.β.)]-	$C_{15}H_{24}$	204	3.30	95

หมายเหตุ ; สารประกอบที่พบในอาหาร PDA ควบคุมจะไม่รายงานในตารางนี้

ผลการทดลองที่ 13 การควบคุมโรครากเน่าของยางพาราในระดับโรงเรือนด้วยวิธี Biofumigation โดยเชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3)

การทดลองมีขึ้นในระหว่างเดือน กรกฎาคม ถึง พฤศจิกายน พ.ศ.2557 โดยมีค่าความชื้นสัมพัทธ์ ระหว่าง 50-60 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิระหว่าง 28.4 ถึง 33.5 องศาเซลเซียส และระดับความเข้มแสง ระหว่าง 2,840 ถึง 8,170 ลักซ์ พบว่าไอระเหยอินทรีย์เชื้อรา *M. heveae* (RTM5IV3) สามารถควบคุมการเกิดโรครากขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีค่า DI เท่ากับ 1 เมื่อใช้หัวเชื้อในปริมาณ 40

กรัม/ดิน 1 กิโลกรัม และหัวเชื้อ 80 กรัม/ดิน 1 กิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่ใช้ยาฆ่าเชื้อราคาลิกซิน โดยที่ไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อรา *M. heveae* (RTM5IV3) ในปริมาณดังกล่าวไม่มีผลต่อการเจริญของพืชซึ่งในชุดที่เติมเฉพาะหัวเชื้อรา *M. heveae* (RTM5IV3) มีค่า DI เท่ากับ 1 เช่นกัน ขณะที่ชุดที่เติมเฉพาะเชื้อก่อโรครากขาวมีค่า DI เท่ากับ 4 (ตาราง 62) เมื่อสังเกตการเจริญของเชื้อก่อโรคและเข้าทำลายรากพืช พบว่าเชื้อรามีการสร้างเส้นใยสีขาวปกคลุมรากพืชในชุดทดลองที่เติมเฉพาะเชื้อก่อโรคและมีการแสดงอาการรุนแรง แต่ไม่พบในชุดทดลองอื่น (ภาพ 80-81)

ส่วนการควบคุมเชื้อก่อโรครากน้ำตาลพบว่า ชุดทดลองที่เติมเฉพาะเชื้อก่อโรคไม่แสดงอาการของโรคและไม่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนรากพืช โดยมีค่า DI เท่ากับ 1 ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าไอระเหยอินทรีย์เชื้อรา *M. heveae* (RTM5IV3) มีผลต่อการควบคุมโรครากน้ำตาลในระดับโรงเรือนได้หรือไม่

ตาราง 62 แสดงค่า Disease index (DI) ในควบคุมโรครากเน่าของยางพาราในระดับโรงเรือนด้วยวิธี Biofumigation โดยเชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3)

ชุดทดลอง	DI
ชุดควบคุม	1
เชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3) 40 กรัม/กิโลกรัม	1
เชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3) 80 กรัม/กิโลกรัม	1
เชื้อก่อโรครากขาว	4
เชื้อก่อโรครากขาวและยาฆ่าเชื้อราคาลิกซิน	1
เชื้อก่อโรครากขาวและเชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3) 40 กรัม/กิโลกรัม	1
เชื้อก่อโรครากขาวและเชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3) 80 กรัม/กิโลกรัม	1
เชื้อก่อโรครากน้ำตาล	1
เชื้อก่อโรครากน้ำตาลและยาฆ่าเชื้อราคาลิกซินและยาฆ่าเชื้อราคาลิกซิน	2
เชื้อก่อโรครากน้ำตาลและเชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3) 40 กรัม/กิโลกรัม	2
เชื้อก่อโรครากน้ำตาลและเชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3) 80 กรัม/กิโลกรัม	1

Disease index (DI) ; 1 = ใบเขียวและไม่เป็นโรค, 2 = ใบเหลือง 1-25 เปอร์เซ็นต์, 3 = ใบเหลือง 26-50 เปอร์เซ็นต์, 4 = ใบเหลือง 51-75 เปอร์เซ็นต์ และ 5 = ใบเหลือง 76-100 เปอร์เซ็นต์

(1) (2) (3) (4) (5)

ภาพ 80 การควบคุมเชื้อก่อโรครากขาวในระดับโรงเรือนด้วยวิธี Biofumigation โดยเชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3)

(1) ชุดควบคุม
(2) เชื้อก่อโรครากขาว
(3) เชื้อก่อโรครากขาวและยาฆ่าเชื้อราคาลิกซิน
(4) เชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3) 40 กรัม/กิโลกรัม
(5) เชื้อ *M. heveae* (RTM5IV3) 40 กรัม/กิโลกรัมและเชื้อก่อโรครากขาว

ภาพ 81 การเจริญของเส้นใยเชื้อก่อโรครากขาวบนรากของกล้ายางพาราหลังจากเก็บผลนาน 5 เดือนในชุดทดลองเชื้อก่อโรครากขาว

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากตัวอย่างพืชสมุนไพร 13 ชนิดและยางพาราพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในยางพาราได้ โดยเฉพาะเชื้อก่อโรครากขาวและรากน้ำตาลซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายที่รุนแรงสำหรับการปลูกยางพาราในประเทศไทย โดยราเอนโดไฟท์กลุ่มสร้างสารออกฤทธิ์ไอโซเลต AL1T1 และ AL1T2 เป็นราในกลุ่ม Sordariomycetes และคัดแยกจากส่วนใบของว่านหางจระเข้สร้างสารออกฤทธิ์สูงสุดต่อเชื้อก่อโรครากน้ำตาลและเชื้อก่อโรคใบไหม้ในกล้ายางพาราตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jalgaonwala และคณะ (2011) ที่รายงานว่าว่านหางจระเข้เป็นแหล่งของราเอนโดไฟท์ที่มีฤทธิ์ในการสร้างสารต้านจุลชีพ โดยพบว่ามีราเอนโดไฟท์หลายสกุลที่อาศัยอยู่ในว่านหางจระเข้โดยราสกุลเด่นที่พบได้บ่อย ได้แก่ *Alternaria, Colletotrichum, Phoma, Phomopsis*, ราในออเดอร์ Xylariales และรากลุ่ม mycelia sterilia (Cai et al. 2004) นอกจากนี้เป็นครั้งแรกที่สามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์สร้างไอระเหยอินทรีย์สกุล *Muscodor* ได้จากยางพาราซึ่งปกติราเอนโดไฟท์เด่นที่สามารถพบได้ในยางพาราจะเป็นสกุล *Colletotrichum, Penicillium, Pestaloiopsis* และ *Trichoderma* (Gazis and Chaverri 2010; Gazis 2012) อีกทั้งเป็นครั้งแรกที่พบว่าไอระเหยอินทรีย์ของ *Muscodor* สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในยางพาราสำคัญทั้งเชื้อรากขาวและรากน้ำตาลได้อีกด้วย และในการศึกษานี้สามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์สปีชีส์ใหม่ โดยพบว่า *Muscodor* ไอโซเลต RTM5IV3 ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนกับเชื้อสกุล *Muscodor* และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ *Muscodor* ไอโซเลต RTM5IV3 กับเชื้อ *Muscodor* สปีชีส์อื่นใน phylogenetic tree บนพื้นฐานข้อมูล 18S rDNA ITS1-5.8-ITS2 sequences พบว่าเชื้อ *Muscodor* ไอโซเลต RTM5IV3 ซึ่งอยู่ใน clade A ได้แยกออกมาจากเชื้อ *Muscodor* อีก 12 สปีชีส์ใน clade เดียวกัน และจากข้อมูลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของไอระเหยอินทรีย์ด้วยวิธี SPME GC/MS เมื่อเปรียบเทียบ *Muscodor* สปีชีส์อื่น ดังนั้นจัดจำแนกเป็นเชื้อ *Muscodor heveae* sp. nov. ซึ่งเดิมทีการจัดจำแนกชนิดของ *Muscodor* จะตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นสำคัญ เช่น ดูลักษณะโคโลนี เส้นใย เป็นต้น (Zhang et al. 2010) และปัจจุบันการวิเคราะห์และเปรียบเทียบส่วนประกอบของไอระเหยอินทรีย์ที่สังเคราะห์โดย *Muscodor* เป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยจัดจำแนกชนิดของราในสกุลนี้ แม้ว่าเชื้อ *Muscodor* แต่ละชนิดจะสร้างสารประกอบไอระเหยอินทรีย์ที่หลากหลายแตกต่างกันแต่บ่อยครั้งที่สร้างสารประกอบหลักชนิดเดียวกันได้ (Kudalkar et al. 2011; Suwannarach et al. 2013) เนื่องจาก *Muscodor* อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยกันและมีรายงานว่าเชื้อสร้างไอระเหยอินทรีย์และปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมรอบๆพืชเพื่อป้องกันพืชจากเชื้อก่อโรค (Mitchell et al. 2010; Zhang et al. 2010) ดังนั้นจึงมีประโยชน์ที่จะนำมาใช้ในการป้องกันโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้ ไอระเหยอินทรีย์ของ *Muscodor* มีกลไกในการฆ่าเชื้อราก่อโรคโดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนและเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อรา (Humphris et al. 2002; Fialho et al. 2011) สำหรับวิธี biofumigation เป็นวิธีที่ประยุกต์ใช้ไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อราให้เป็นประโยชน์ในการควบคุมเชื้อก่อโรคหรือเชื้อปนเปื้อนผลผลิตทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว เช่น เชื้อรา *Botrytis cinerea, Penicillium expansum* และ *Sclerotinia sclerotiorum* (Ramin et al. 2005) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *M. heveae* สามารถ

ควบคุมเชื้อก่อโรครากขาวได้ในระดับโรงเรือนด้วยวิธี biofumigation สอดคล้องกับการศึกษาของ Worapong และ Strobel (2009) และ Suwannarach และคณะ (2012) ที่ประยุกต์ใช้เชื้อ *Muscodor* ควบคุมโรคที่เกิดกับรากพืชด้วยวิธี biofumigation ได้สำเร็จ ดังนั้นเชื้อ *Muscodor* มีประโยชน์ที่จะนำไปศึกษาต่อและพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ไม่ใช่เฉพาะด้านเกษตรกรรม แต่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการแพทย์และอุตสาหกรรมต่อไปได้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าไอระเหยอินทรีย์ของ *M. heveae* ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยางพาราและไม่ก่อโรคกับกล้ายาง และสามารถควบคุมโรครากขาวในยางพาราได้ แต่ในการศึกษาผลของไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อ *Muscodor* ต่อการงอกและเจริญของเมล็ดพืช พบว่าไอระเหยอินทรีย์ของ *M. heveae* มีผลยับยั้งการงอกและการเจริญของเมล็ดพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยวที่ใช้ในการทดลอง ดังนั้นการนำไปใช้งานอาจต้องคำนึงถึงชนิดของพืชที่จะนำไปใช้งานด้วยเช่นกัน

สรุปผลการทดลอง

สามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 289 ไอโซเลตจากพืช 14 ชนิด แบ่งเป็นเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. noxius* ก่อโรครากน้ำตาลได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลต AL1T1 มีค่า MIC เท่ากับ 0.31 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และไอโซเลต AL1T2 สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* ก่อโรคใบไหม้ในกล้ายางพาราได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 0.16 มิลลกรัม/มิลลิลิตร สามารถคัดแยกเชื้อที่สร้างไอระเหยอินทรีย์ในสกุล *Muscodor* จากใบของยางพารา จัดจำแนกเป็นเชื้อ *M. vitigenus, M. equiseti* และ *M. heveae* sp. nov. โดยเชื้อ *M. heveae* สร้างไอระเหยอินทรีย์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย, ยีสต์และเชื้อรา) รวมทั้งเชื้อก่อโรคในยางพารา มีสาร 3-methylbutan-1-ol เป็นสารประกอบหลัก และมีสาร 3-methylbutyl acetate และอนุพันธ์ azulene เป็นสารประกอบรองลงมา ไอระเหยอินทรีย์ของ *M. heveae* สามารถใช้ควบคุมเชื้อก่อโรครากขาวในยางพาราในระดับโรงเรือนได้

2.6 การควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาวโดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากพืชตระกูลส้ม

การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาว

เก็บตัวอย่างใบและผลของมะนาวที่มีอาการของโรคแคงเกอร์เพื่อแยกเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ทำความสะอาดโดยล้างผ่านน้ำไหล ใช้มีดผ่าตัดตรงบริเวณแผล ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 5 × 5 มิลลิเมตร แช่ใน Clorox 10% นาน 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปบดในโกร่งที่ฆ่าเชื้อใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะนำสารแขวนลอยของแบคทีเรีย และ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose agar (NA) บ่มเชื้อที่ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน เก็บในหลอดอาหารเอียงแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°c

ตรวจสอบการเกิดโรคแคงเกอร์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณแผลของใบมะนาว

ตรวจสอบเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ที่แยกได้จากบริเวณที่มีอาการของโรคแคงเกอร์ในมะนาว โดยการปลูกเชื้อบนใบมะนาวที่ไม่เป็นโรค และใบไม่แก่หรืออ่อนจนเกินไป โดยล้างทำความสะอาดผ่านน้ำไหล นำไปแช่แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% เป็นเวลา 1 นาที แช่ใน Clorox 10% นาน 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นวางใบมะนาวในจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษทิชชู่ชุ่มน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำการทดลอง คว่ำใบให้ด้านหลังใบอยู่ด้านบน และหงายให้ด้านหน้าใบอยู่ด้านบน แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ โดยใช้เข็มทำให้เกิดแผล (pricking method) ที่ผิวใบ โดยใช้เข็มสะกิดผิวให้เกิดแผล แล้วหยดเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1×10^{8} CFU/ml ในน้ำเกลือ (Nacl) 0.85% ลงบนแผล และชุดควบคุมหยด 0.85% Nacl ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วบริเวณแผล หลังจากปลูกเชื้อบนใบแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ สังเกตอาการของโรคที่เกิดขึ้นบนใบ

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตรวจสอบชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากแผลของใบมะนาว

นำเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ที่แยกได้ มาเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Schaad, 2006) โดยตรวจสอบการติดสีแกรม (Gram staining) การย่อยแป้ง gelatin, casein และ arginine ความสามารถในการทนทานต่อ 3% , 5% และ 7% NaCl การทดสอบการใช้น้ำตาล arabinose, xylose, glucose, fructose, galactose, mannose, maltose, lactose, trehalose, sucrose, mannitol, starch, raffinose และ inositol

การแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากพืชตระกูลส้ม

ตัวอย่างพืชที่ใช้แยกเชื้อเอนโดไฟท์ ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ มะนาว (*Citrus aurantiifolia*) มะกรูด (*C. hystrix*) ส้มโอ (*C. maxima*) ส้มเกลี้ยง (*C. sinensis*) ส้มจุก (*C. nobilis*) และส้มเขียวหวาน (*C. reticulata*) ที่เก็บจากแปลงของเกษตรกรที่ปลูกมะนาว และปลูกส้มเขียวหวานในอำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ และเก็บจากสวนของชาวบ้านในอำเภอดอยเต่า อำเภอเชียงดาว และอำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่

การแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์และเชื้อราเอนโดไฟท์

นำตัวอย่างใบ กิ่ง และ ราก ของพืชตระกูลส้มที่ไม่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์ มาล้างด้วยน้ำสะอาด ส่วนของกิ่งจะตัดเป็นท่อนๆ ท่อนละประมาณ 1 cm ส่วนใบจะทำการตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 5×5 mm และฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวของตัวอย่างพืช โดยแช่ใน เอทานอล 70 % เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่ใน Clorox 5% นาน 3 นาที จากนั้นแช่ใน เอทานอล 70 % เป็นเวลา 1 นาที และล้างในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำมาวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เป็นเวลา 7 วัน แยกเส้นใยของเชื้อราที่เจริญออกมา เพาะเลี้ยง

บน PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ส่วนเชื้อแบคทีเรียแยกเชื้อบน NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อเพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์

นำตัวอย่าง ใบ กิ่ง และราก ของพืชตระกูลส้มซึ่งไม่แสดงอาการของโรคแคงเกอร์ โดยใช้วิธีดัดแปลงจากวิธีการของ Coombs and Franco (2002) โดยนำชิ้นส่วนของพืชมาล้างด้วยน้ำสะอาด ตัดชิ้นส่วนพืชให้เล็กลง แช่ชิ้นส่วนพืชในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ที่มี 0.01% Tween 20 เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างสิ่งสกปรกที่ผิวของชิ้นส่วนพืช จากนั้นย้ายไปแช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายไปแช่ใน Clorox 5% นาน 3 นาที จากนั้นล้างในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นส่วนพืชที่ฆ่าเชื้อแล้ว ไปบดในโกร่งปลอดเชื้อและเติม ¼ Ringer solution (0.9 % NaCl, 0.042 % KCl, 0.048 % CaCl2, 0.02 % $NaHCO_3$) ปริมาตร 3 ml จากนั้นดูดสารละลายมาเกลี่ยบนอาหาร starch casein agar (SCA) และ humic acid vitamin agar (HVA) ที่เติมยาปฏิชีวนะ 50 µg/ml streptomycin เพื่อกำจัดแบคทีเรีย และ 50 µg/ml cyclohexamide เพื่อกำจัดเชื้อรา และนำชิ้นส่วนของรากและกิ่งที่ผ่านการบดแล้วมาวางบนอาหาร SCA และ HVA ที่เติมยาปฏิชีวนะดังกล่าวข้างต้น และบ่มที่ 30 ^{o}C เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* โดยวิธี agar well diffusion method

เตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้ โดยใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ลนไฟ เขี่ยเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) เวลา 24 ชั่วโมง แล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อ ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 ml ปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland Standard (ประมาณ 10^{8} CFU/ml) จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ทำการปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland Standard ใช้ sterile cotton swab จุ่มในสายแขวนลอยของเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ทำการ swab ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร NA จากนั้นจึงทำการเจาะวุ้นอาหาร ด้วยอุปกรณ์เจาะตัดชิ้นวุ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm หลังจากนั้นหยอดสารแขวนลอยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ปริมาตร 30 µl ลงในหลุมที่เจาะไว้แล้ว และบ่มเชื้อ 28 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่หยดอาหารเหลว NB ที่ไม่ได้เพาะเชื้อ (negative control) และ จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่หยด streptomycin ความเข้มข้น 50 µl/ml (positive control) ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบันทึกผล

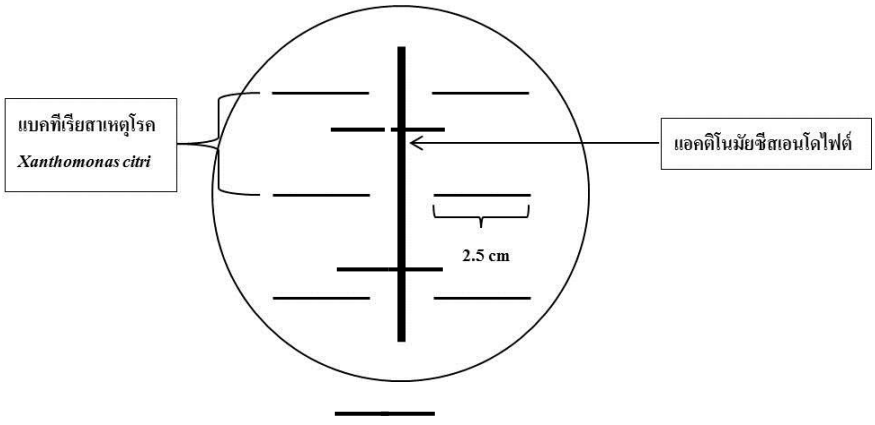
การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาว

เตรียมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาว โดย streak เชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* บนอาหาร NGA บ่มที่อุณหภูมิ 28^{o}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ loop ลนไฟ เขี่ยเชื้อลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่า

เชื้อปริมาตร 5 ml หลังจากนั้นนำมาปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland Standard (ประมาณ 10^8 CFU/ml) ใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อ แล้วบิดให้หมาด ทำการ swab ให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ บนอาหาร NGA เจาะวุ้นอาหารด้วยด้วยอุปกรณ์เจาะตัดชิ้นวุ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm หลังจากนั้นหยอดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 7 วัน ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้แล้ว และบ่มเชื้อ 28 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่หยด PDB ที่ไม่ได้เพาะเชื้อ (negative control) และ จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่หยด streptomycin ความเข้มข้น 50 µl/ml (positive control) บันทึกผลตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบันทึกผล

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาวโดยวิธี cross streak method ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาวโดยวิธี cross streak method โดยนำแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้มา streak ตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ เป็นเส้นตรงบนอาหาร NA ยาว 7 เซนติเมตร ห่างจากขอบเพลท 1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 ^{O}C เป็นเวลา 4 วัน เพื่อให้เชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์สร้างสารปฏิชีวนะ ทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีทที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดย streak เชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยขีดเป็นเส้นตรง และตั้งฉากกับเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่ streak ตรงกลางเพลท ให้ยาว 2.5 cm ห่างจากเชื้อเอนโดไฟต์ 0.5 เซนติเมตร (ภาพ 82) บ่มที่ อุณหภูมิ 28 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ streak ด้วยอาหารเหลว NB (negative control) และ จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ streak ด้วย streptomycin ความเข้มข้น 50 µl/ml (positive control) สังเกตประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ โดยตรวจสอบจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการวัดขนาดความยาวของการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* บริเวณรอย streak



ภาพ 82 วิธีการทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* โดยวิธี cross streak method

การคัดเลือกอาหารเพาะเลี้ยงเอนโดไฟท์ที่เหมาะสมในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การคัดเลือกอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟท์

นำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* ได้สูงสุด มา 3 ไอโซเลต ได้แก่ *Bacillus* ไอโซเลต LE 24, PO 80 และ PO 109 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 4 ชนิด ได้แก่ nutrient broth (NB), nutrient glucose broth (NGB), modified soluble starch broth (MSSB), Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) ปริมาตร 50 ml ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-30^{O}C) เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ทำการปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland Standard ใช้ sterile cotton swab จุ่มในสายแขวนลอยของเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ทำการ swab ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร NA จากนั้นจึงทำการเจาะวุ้นอาหารด้วยอุปกรณ์เจาะตัดชิ้นวุ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร หลังจากนั้นหยอดสารแขวนลอยเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ปริมาตร 30 µl ลงในหลุมที่เจาะไว้แล้ว และบ่มเชื้อ 28^{O}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่หยดอาหารเหลวที่ไม่ได้เพาะเชื้อ (negative control) และจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่หยด streptomycin ความเข้มข้น 50 µg/ml (positive control) ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบันทึกผล

การคัดเลือกอาหารเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์

นำราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* สูงสุด มา 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต *Pestalotiopsis* TA 018, *Fusarium* SO 021 และ *Fusarium* PO 055 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 4ชนิด potato dextrose broth (PDB), double malt extract broth (DMEB), yeast malt glucose modified broth (YMGB) และ Czapek Dox broth ปริมาตร 200 ml ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28-30 ^{O}C) เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ทำการปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland Standard ใช้ sterile cotton swab จุ่มในสายแขวนลอยของเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ทำการ swab ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร NA จากนั้นจึงทำการเจาะวุ้นอาหาร ด้วยอุปกรณ์เจาะตัดชิ้นวุ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร หลังจากนั้นหยอดสารแขวนลอยเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ปริมาตร 30 µl ลงในหลุมที่เจาะไว้แล้ว และบ่มเชื้อ 28 ^{O}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่หยดอาหารเหลวที่ไม่ได้เพาะเชื้อ (negative control) และจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่หยด streptomycin ความเข้มข้น 50 µg/ml (positive control) ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบันทึกผล

การคัดเลือกอาหารเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์

นำแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง *X. citri* pv. *citri* 3 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces* NO37 , NO42 และ NO43 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ได้แก่ international

streptomyces project yeast malt extract agar (ISP2), international streptomyces project inorganic salts starch agar (ISP4), modified soluble starch (MSSB), glucose soybean broth (GSB) ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ^{O}C เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ทำการปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland Standard ใช้ sterile cotton swab จุ่มในสายแขวนลอยของเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ทำการ swab ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร NA จากนั้นจึงทำการเจาะวุ้นอาหาร ด้วยอุปกรณ์เจาะตัดชิ้นวุ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm หลังจากนั้นหยอดสารแขวนลอยแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ ปริมาตร 30 µl ลงในหลุมที่เจาะไว้แล้ว และบ่มเชื้อ 28 ^{O}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่หยดอาหารเหลวที่ไม่ได้เพาะเชื้อ (negative control) และจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่หยด streptomycin ความเข้มข้น 50 µg/ml (positive control) ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบันทึกผล

การทดสอบหาค่าหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดหยาบ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* โดยวิธี agar well diffusion method

การสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟท์

หลังจากคัดเลือกอาหารเพาะเลี้ยงเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุดแล้ว ทำการเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ในอาหารที่เหมาะสม ประมาณ 5 L แล้วทำการกรองเอาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้แล้ว นำไปสกัด 2 ครั้ง ด้วย ethyl acetate (EtOAc) โดยใช้อัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อ ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำส่วนที่สกัดได้มาทำให้เข้มข้น ด้วยวิธี evaporation ภายใต้ความดันและอุณหภูมิ 45 ^{O}C จนแห้ง แล้วละลายด้วย methanol 1 ml แล้วนำไปเก็บที่ 4 ^{O}C

การทดสอบหาค่าหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri*

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* โดยการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สกัดได้ ด้วยวิธี agar well diffusion method โดยทำการเจือจางสารสกกัดหยาบที่ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.50 และ 0.78 mg/ml และใช้ methanol เป็นชุดควบคุม เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland ทำการ swab ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร NA เจาะวุ้นอาหารด้วยอุปกรณ์เจาะตัดชิ้นวุ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร หลังจากนั้นหยอดสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 30 µl ลงในหลุมที่เจาะไว้แล้ว และบ่มเชื้อ 28^{O}C เป็นเวลา 48 ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบันทึกผล โดยอ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ *X. citri* pv. *citri* เป็นค่า MIC

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ต่อการเกิดโรคแคงเกอร์บนต้นมะนาว

เตรียมต้นมะนาวที่ได้จากกิ่งตอน และเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ทำการปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 McFarland Standard ปลูกเชื้อบนใบมะนาวที่ไม่เป็นโรค และใบไม่แก่หรืออ่อนเกินไป ทำความสะอาดใบมะนาวที่ใช้ทดสอบโดยเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ โดยใช้เข็มทำให้เกิดแผลผิวใบ โดยใช้เข็มสะกิดผิวให้เกิดแผลแล้วหยดสารละลายเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลงบนแผล ซึ่งกรรมวิธีที่ใช้ในการทดสอบ มีดังนี้

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์จะมี 11 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 : *X. citri* pv. *citri* + น้ำเลี้ยงและเชื้อ *Bacillus* LE 24
กรรมวิธีที่ 2 : *X. citri* pv. *citri* + น้ำเลี้ยงและเชื้อ *Bacillus* PO 80
กรรมวิธีที่ 3 : *X. citri* pv. *citri* + น้ำเลี้ยงและเชื้อ *Bacillus* PO 109
กรรมวิธีที่ 4 : *X. citri* pv. *citri* + น้ำเลี้ยงและเชื้อ *Pestalotiopsis* TA 18
กรรมวิธีที่ 5 : *X. citri* pv. *citri* + น้ำเลี้ยงและเชื้อ *Fusarium* SO 21
กรรมวิธีที่ 6 : *X. citri* pv. *citri* + น้ำเลี้ยงและเชื้อ *Fusarium* PO 55
กรรมวิธีที่ 8 : *X. citri* pv. *citri* + น้ำเลี้ยงและเชื้อ *Streptomyces* NO 37
กรรมวิธีที่ 8 : *X. citri* pv. *citri* + น้ำเลี้ยงและเชื้อ *Streptomyces* NO 42
กรรมวิธีที่ 9 : *X. citri* pv. *citri* + น้ำเลี้ยงและเชื้อ *Streptomyces* NO 43
กรรมวิธีที่ 10 : *X. citri* pv. *citri* + อาหารที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ (Negative control)
กรรมวิธีที่ 11 : *X. citri* pv. *citri* + Streptomycin 50 µg/ml (Positive control)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อเอนโดไฟท์จะมี 11 กรรมวิธี ดังนี้

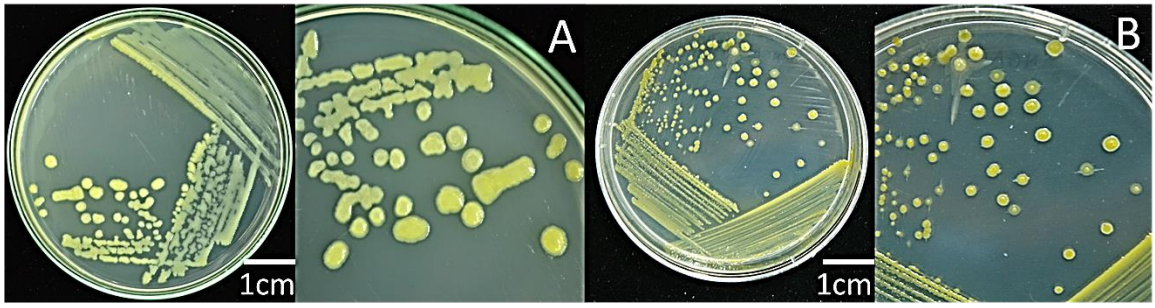
กรรมวิธีที่ 1 : *X. citri* pv. *citri* + สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยง *Bacillus* LE 24
กรรมวิธีที่ 2 : *X. citri* pv. *citri* + สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยง *Bacillus* PO 80
กรรมวิธีที่ 3 : *X. citri* pv. *citri* + สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยง *Bacillus* PO 109
กรรมวิธีที่ 4 : *X. citri* pv. *citri* + สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยง *Pestalotiopsis* TA 18
กรรมวิธีที่ 5 : *X. citri* pv. *citri* + สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยง *Fusarium* SO 21
กรรมวิธีที่ 6 : *X. citri* pv. *citri* + สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยง *Fusarium* PO 55
กรรมวิธีที่ 8 : *X. citri* pv. *citri* + สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยง *Streptomyces* NO 37
กรรมวิธีที่ 8 : *X. citri* pv. *citri* + สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยง *Streptomyces* NO 42
กรรมวิธีที่ 9 : *X. citri* pv. *citri* + สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยง *Streptomyces* NO 43
กรรมวิธีที่ 10 : *X. citri* pv. *citri* + Methanol (Negative control)
กรรมวิธีที่ 11 : *X. citri* pv. *citri* + Streptomycin 50 µg/ml (Positive control)

ผลการทดลอง

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์

จากการเก็บตัวอย่างใบและผลมะนาวที่แสดงลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ จากแปลงปลูกของเกษตรกรที่มีการระบาดของโรค โดยทำการเก็บตัวอย่างอาการของโรคทั้งบนใบและผล ที่มีลักษณะอาการเป็นแผลจุดนูนสีน้ำตาล มีลักษณะคล้ายฟองน้ำนูนนูนขึ้นมา ตรงกลางแผลจะแตกบุ๋มลงไปข้างในบริเวณรอบๆแผลมีวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบ (ภาพ 83) นำมาแยกเชื้อ *X. citri* pv. *citri* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ NGA แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28^{O}C นาน 24 ชั่วโมง จะได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนี กลม ขอบเรียบ สีเหลือง นูนมันเยิ้ม บนอาหาร NA และ ได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีเหลือง นูนมันเยิ้ม และเมื่อเลี้ยงบนอาหาร NGA โคโลนีมีลักษณะเป็นสีเหลืองเข้ม (ภาพ 84)

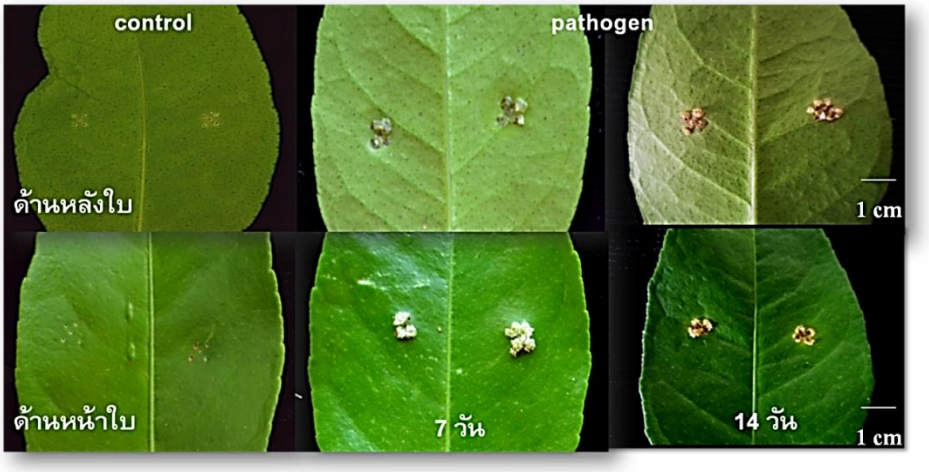
ภาพ 83 ใบและผลมะนาวที่แสดงลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์



ภาพ 84 A) เชื้อ *Xanthomonas citri* pv. *citri* บนอาหาร NA, B) เชื้อ *Xanthomonas citri* pv. *citri* บนอาหาร NGA

2. ผลการตรวจสอบเกิดโรคแคงเกอร์

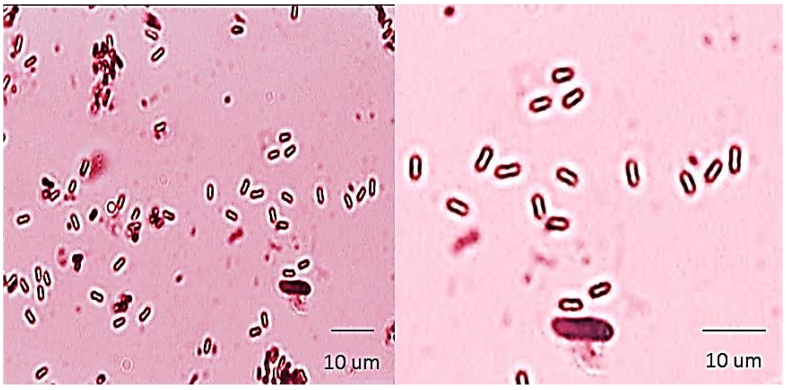
การตรวจสอบการเกิดโรคแคงเกอร์บนใบมะนาว ทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ พบว่า สามารถทำให้พืชที่ทดสอบแสดงอาการของโรคได้ภายใน 7 วัน (ภาพ 85) แผลที่แสดงอาการโรคจะมีอาการฉ่ำน้ำและเป็นขุยสีขาวฟูขึ้นมาจากผิวใบตรงส่วนที่ปลูกเชื้อไว้



ภาพ 85 อาการของโรคแคงเกอร์บนใบมะนาวหลังการปลูกเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน และ14 วัน

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *X. citri* pv. *citri*

ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *X. citri* pv. *citri* พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้าง spore มี flagella เดียวเส้นเดียวที่ส่วนปลาย มีรูปร่างท่อนตรง (rod shape) มีขนาด 0.5 x 2.7 μm (ภาพ 86) สามารถย่อยแป้ง ย่อย gelatin, และย่อย casein ได้ แต่ไม่ใช้ arginine สามารถทนต่อ 3%, 5% ถึง 7% NaCl ผลการทดสอบการใช้น้ำตาล (utilization of carbohydrates) พบว่า สามารถใช้น้ำตาล arabinose, xylose, glucose, fructose, galactose, mannose, maltose, lactose, trehalose, sucrose, mannitol และ starch, แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล raffinose และ inositol (ตาราง 63)



ภาพ 86 ลักษณะรูปร่างของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri pv. citri* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตาราง 63 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *X. citri* pv. *citri*

ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	ผลการทดสอบเชื้อ *X. citri* pv. *citri*
starch	+
gelatin	+
casein	+
arginine	-
NaCl 3%	+
NaCl 5%	+
NaCl 7%	+
arabinose	+
xylose	+
glucose	+
fructose	+
galactose	+
mannose	+
maltose	+
lactose	+
trehalose	+
sucrose	+
mannitol	+
raffinose	-
inositol	-

หมายเหตุ : + = สามารถเจริญได้, - = ไม่สามารถเจริญได้

ผลการแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากพืชตระกูลส้ม

จากการแยกเชื้อเอนโดไฟท์จากตัวอย่างพืชตระกูลส้ม 6 ชนิด จากแปลงปลูกของเกษตรกรที่ปลูกมะนาว และปลูกส้มเขียวหวานใน อำเภอดอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ และเก็บจากสวนของชาวบ้านใน อำเภอดอยเต่า อำเภอเชียงดาว และอำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกเชื้อเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 315 ไอโซเลต เป็นเชื้อราเอนโดไฟท์ 65 ไอโซเลต แอคติโนมัยซีท 80 ไอโซเลตและแบคทีเรียจำนวน 170 ไอโซเลต (ตาราง 64)

ตาราง 64 จำนวนเชื้อเอนโดไฟท์ที่แยกได้ จำแนกตามชนิดของพืช

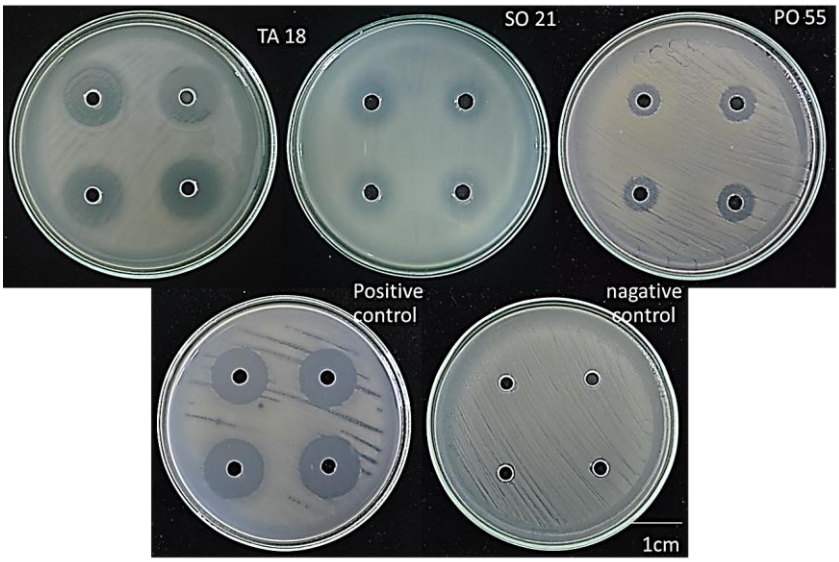
จำนวนเชื้อเอนโดไฟท์ที่แยกได้ จำแนกตามส่วนต่าง ๆของพืช							
ชนิดพืช / เอนโดไฟท์	**มะนาว**	**ส้มโอ**	**ส้มจุก**	**ส้มเขียวหวาน**	**มะกรูด**	**ส้มเกลี้ยง**	**รวม**
แบคทีเรีย	28	29	42	12	25	34	170
รา	18	12	9	5	7	14	65
แอคติโนมัยซีท	20	14	18	10	9	9	80
รวม	66	55	69	27	41	57	315

ผลการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาว

จากการทดสอบเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมด 65 ไอโซเลต พบว่า มี 3 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* ได้ (ตาราง 65) และ (ภาพ 87) โดยเชื้อรา *Pestalotiopsis* TA 18 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* ได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 23.50 mm รองลงมาคือ *Fusarium* SO21และ *Fusarium* PO55 โดยมีค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 17.83 mm และ 14.33 mm ตามลำดับ

ตาราง 65 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ของราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri*

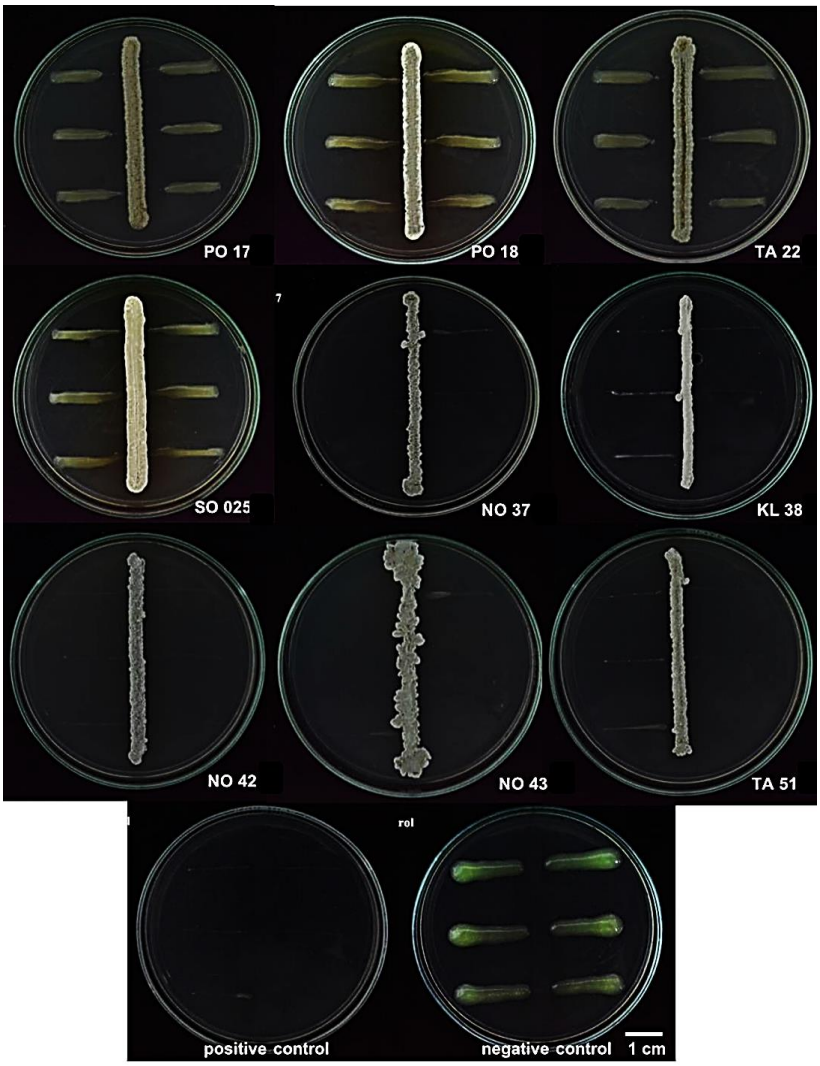
ไอโซเลตที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (mm)			ค่าเฉลี่ย (mm)
	1	2	3	
streptomycin (positive control)	25.00	25.00	25.50	25.16
PDB ที่ไม่เพาะเชื้อ (negative control)	0.00	0.00	0.00	0.00
Pestalotiopsis TA 18	23.00	24.00	23.50	23.50
Fusarium SO 21	18.00	17.50	18.00	17.83
Fusarium PO 55	14.00	15.00	14.00	14.33



ภาพ 87 ราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri*

ผลการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาว

จากการทดสอบเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลต พบว่ามี 9 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* ได้ โดย มี 3 ไอโซเลต คือ NO 37, NO 42 และ NO 43 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* ได้ดีที่สุด ซึ่งเมื่อตรวจสอบจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการวัดความยาวของการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* บริเวณรอย streak พบว่า ไม่มีการเจริญของเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนไอโซเลตอื่นๆ ยังพบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* พบว่า (ภาพ 88)



ภาพ 88 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาวโดยวิธี cross streak method

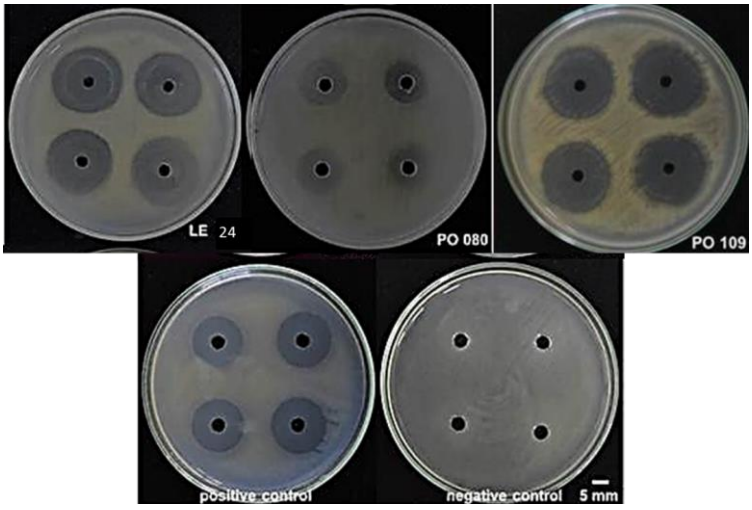
ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri*

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มทั้งหมด 170 ไอโซเลต มีแบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาวโดยวิธี dual culture ในสภาพห้องปฏิบัติ จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ พบว่า มี 3 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* ได้ มาทดสอบความสามารถของในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยวิธี agar well diffusion method พบว่า *Bacillus* PO 109 มีผลการยับยั้งดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 26.66 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *Bacillus* LE 24 และ *Bacillus* PO 80 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) 25.16 mm และ 23.50 mm ตามลำดับ (ตาราง 66) (ภาพ 89)

ตาราง 66 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri*

ลำดับที่	ไอโซเลตที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (mm)			ค่าเฉลี่ย (mm)
		1	2	3	
1	Streptomycin (positive control)	24.00	25.00	25.00	24.66 ± 0.57^{ab}
2	NB (negative control)	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00^{g}
3	*Bacillus* LE 24	23.00	23.50	24.00	23.50 ± 0.50^{b}
4	*Bacillus* PO 80	25.50	25.00	25.00	25.16 ± 0.28^{ab}
5	*Bacillus* PO 109	26.00	27.00	27.00	26.66 ± 0.57^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่มีตัวอักษรกำกับในแนวตั้งต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$) เมื่อ ทดสอบโดยวิธี Duncan's multiple range test (แต่ละหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม 5 มิลลิเมตร)



ภาพ 89 การทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* โดยวิธี agar well diffusion method

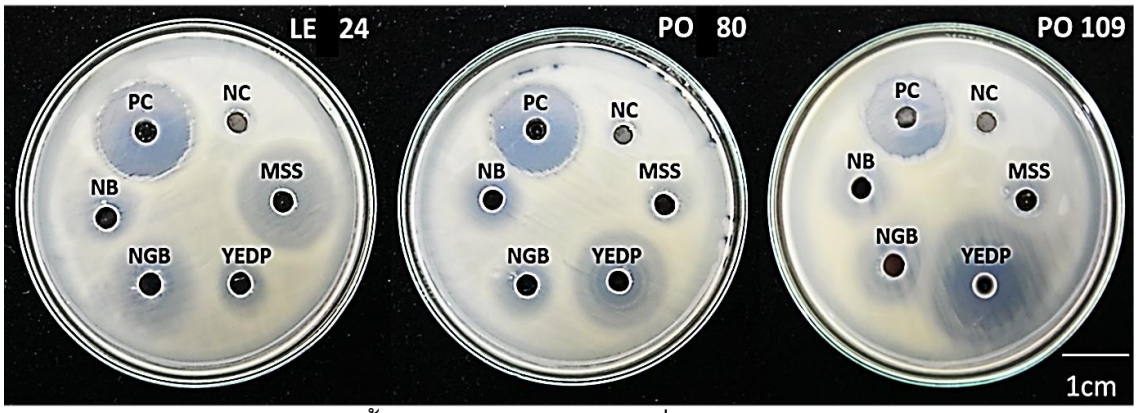
ผลการคัดเลือกอาหารเพาะเลี้ยงเอนโดไฟท์ที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* โดยวิธี agar well diffusion method

จากการคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟท์ที่สามารถการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* พบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหาร YEPDB และ MSSB สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ได้มากที่สุด ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 25.25 24.87 และ 22.75 มิลลิเมตร (ตาราง 67 ภาพ 90) ส่วนเชื้อราเอนโดไฟท์ ที่เลี้ยงในอาหาร PDB และ YMGB สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุด ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 21.12, 20.37 และ 20.12 มิลลิเมตร (ตาราง 68 ภาพ 91) ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ ที่เลี้ยงในอาหาร MSSB และ GSB สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุดซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 20.12 19.37 และ 19.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตาราง 69 ภาพ 92)

ตาราง 67 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในอาหารแต่ละสูตร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* โดยวิธี agar well diffusion method

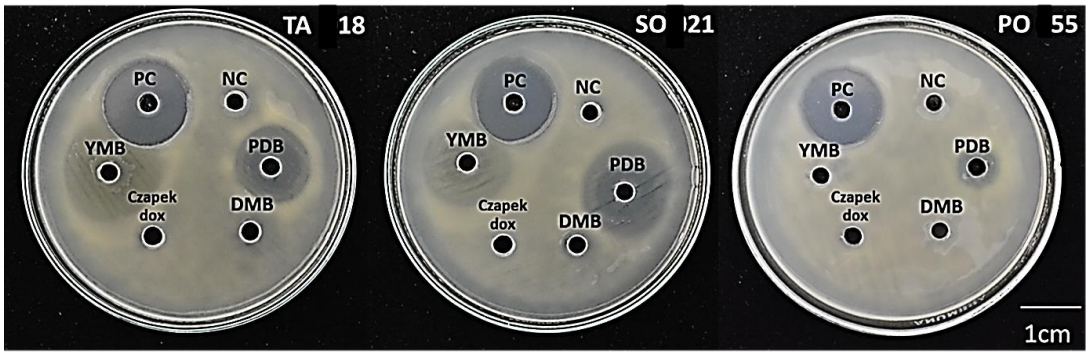
ไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (mm)			
	NB	NGB	YEPDB	MSSB
Bacillus LE 024	10.25	18.50	12.12	24.37
Bacillus PO 080	15.37	16.12	11.16	22.75
Bacillus PO 109	15.75	17.25	25.25	7.00



ภาพ 90 การคัดเลือกอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* PC = Streptomycin NC = อาหารที่ไม่เพาะเชื้อ

ตาราง 68 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของเชื้อราเอนโดไฟท์ในอาหารแต่ละสูตร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri*

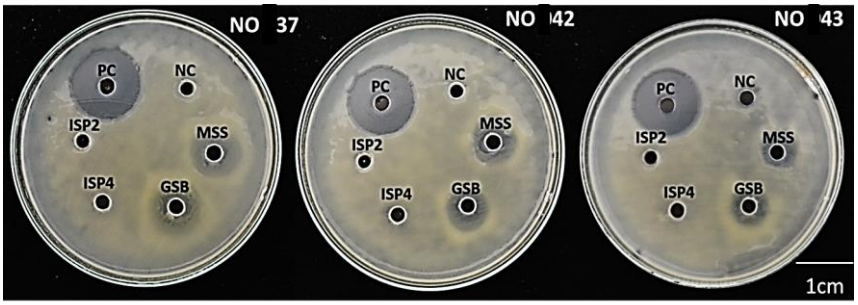
ไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (mm)			
	PDB	DMB	YMGB	Czapek Dox
Pestalotiopsis TA 018	20.87	0	21.12	0
Fusarium SO 021	20.12	8.37	0	0
Fusarium PO 055	11.75	0	0	0



ภาพ 91 การคัดเลือกอาหารเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* PC = Streptomycin NC = อาหารที่ไม่เพาะเชื้อ

ตาราง 69 ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ในอาหารแต่ละสูตร ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri*

ไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (mm)			
	ISP2	ISP4	GSB	MSSB
Streptomyces NO 37	10.25	0	10.25	19.37
Streptomyces NO 42	0	0	19.25	20.12
Streptomyces NO 43	0	0	14.12	11.00



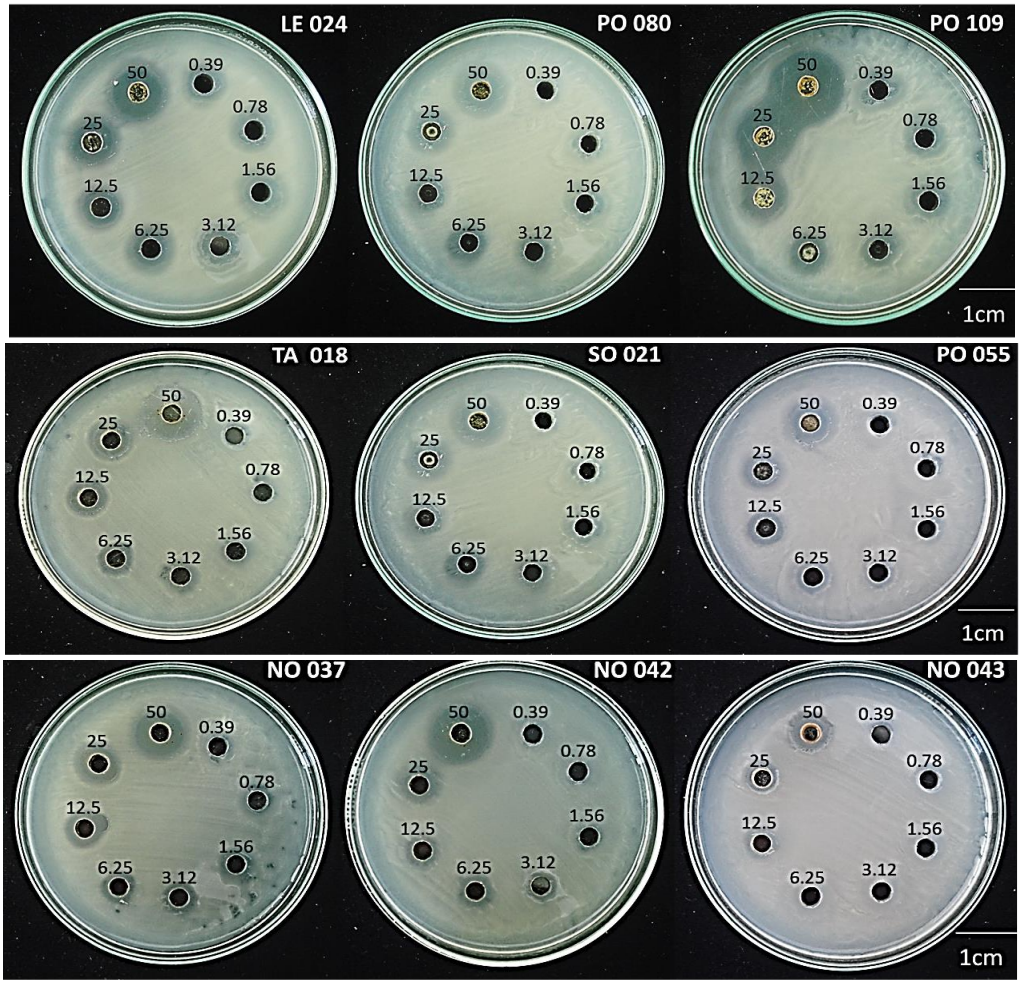
ภาพ 92 การคัดเลือกอาหารเพาะเลี้ยงแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ที่เหมาะสมในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* PC = Streptomycin NC = อาหารที่ไม่เพาะเชื้อ

ผลการทดสอบหาค่าหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดหยาบ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* โดยวิธี

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.39-1.56 (mg/ml) ส่วนเชื้อราเอนโดไฟท์ มีค่าอยู่ระหว่าง 1.56-6.25 (mg/ml) ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.78-12.5 (mg/ml) (ตาราง 70 ภาพ 93)

ตาราง 70 ค่าหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri*

ไอโซเลต	ค่าหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบ (mg/ml)
Bacillus LE 024	0.39
Bacillus PO 080	1.56
Bacillus PO 109	0.39
Pestalotiopsis TA 018	1.56
Fusarium SO 021	3.12
Fusarium PO 055	6.25
Streptomyces NO 37	0.78
Streptomyces NO 42	1.56
Streptomyces NO 43	12.5



ภาพ 93 การทดสอบหาค่าหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri*

10. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ต่อการเกิดโรคแคงเกอร์บนต้นมะนาว ในระดับโรงเรือน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ต่อการเกิดโรคแคงเกอร์บนต้นมะนาว ในระดับโรงเรือนโดยใช้ต้นมะนาวที่ได้จากกิ่งตอนปลูกเชื้อบนใบมะนาวที่ไม่เป็นโรคและใบ ไม่แก่หรืออ่อนจนเกินไป ใช้เข็มทำให้เกิดแผล ที่ผิวใบ พบว่าทั้งน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบจากจุลินทรีย์เอนโดไฟท์สามารถควบคุมการเกิดโรคแคงเกอร์ในมะนาวได้ โดยไม่ทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ

วิจารณ์ผลการการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากตัวอย่างใบและผลมะนาวที่แสดงลักษณะอาการของโรคแคงเกอร์ ที่มีลักษณะอาการเป็นแผลจุดนูนสีน้ำตาล มีลักษณะคล้ายฟองน้ำนูนนูนขึ้นมา ตรงกลางแผลจะแตกบุ๋มลงไปข้างใน บริเวณรอบๆแผลมีวงสีเหลือง (halo) ล้อมรอบ จากแปลงปลูกของเกษตรกรที่มีการระบาดของโรค เมื่อนำมาแยกเชื้อ นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า จะได้เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนี กลม ขอบเรียบ สีเหลือง นูนมันเยิ้ม เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้าง spore มี flagella เดียวเส้นเดียวที่ส่วนปลาย มีรูปร่างท่อนตรง (rod shape) มีขนาด 0.5 × 2.7 µm สามารถย่อยแป้ง (starch) ย่อย gelatin, และย่อย casein ได้ แต่ไม่ใช้ arginine สามารถทนทานต่อเกลือ NaCl ได้ตั้งแต่ 3 5 ถึง 7% และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 36°C และสามารถใช้น้ำตาล arabinose, xylose, glucose, fructose, galactose, mannose, maltose, lactose, trehalose, sucrose, mannitol และ starch, แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล raffinose และ inositol ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Goto et al. (1980) ที่รายงานว่าเชื้อ *X. citri* pv. *citri* ที่เป็นสายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น ไม่สามารถใช้น้ำตาล raffinose และ inositol แต่สามารถมีปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลอื่นๆได้

การทดสอบการเกิดโรคในระดับห้องปฏิบัติการกับต้นมะนาวที่สมบูรณ์ไม่มีโรค สามารถทำให้พืชที่ทดสอบแสดงอาการของโรคได้ภายใน 7 วัน แผลที่แสดงอาการโรคจะมีอาการฉ่ำน้ำและเป็นขุยสีขาวฟูขึ้นมาจากผิวใบตรงส่วนที่ปลูกเชื้อไว้ ซึ่งจากการรายงานของ Brunings and Gabriel (2003) รายงานว่า เชื้อ *X. citri* pv. *citri* สามารถทำให้พืชทดสอบเกิดโรคได้ภายใน 5 วัน โดยพบว่า กลุ่มสายพันธุ์ canker A สามารถทำให้เกิดโรครุนแรงกับมะนาว

จากการแยกเชื้อเอนโดไฟท์ จากตัวอย่างพืชตระกูลส้มทั้งหมด 6 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย มะนาว มะกรูด ส้มโอ ส้มเกลี้ยง ส้มจุก และส้มเขียวหวาน เก็บจากแปลงปลูกของเกษตรกรที่ปลูกมะนาว และปลูกส้มเขียวหวานใน อำเภอดอยเต่า และเก็บจากสวนของชาวบ้านในอำเภอดอยเต่า อำเภอเชียงดาว และอำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าสามารถแยกเชื้อเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 315 ไอโซเลต เป็นเชื้อราเอนโดไฟท์ 65 ไอโซเลต (48.14 %) แอคติโนมัยซีท 80 ไอโซเลต (25.39 %) และแบคทีเรียจำนวน 170 ไอโซเลต (53.96 %) ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์และราได้เอนโดไฟท์ ได้จากตัวอย่างใบ กิ่ง และ ราก พืชตระกูลส้มทั้ง 6 ชนิด ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ทั้งหมด สามารถแยกได้เฉพาะจากส่วนรากของพืชตระกูลส้มเท่านั้น ไม่สามารถแยกได้จากส่วนของกิ่งและใบ โคโลนีของเชื้อแอคติโนมัย

ซีทที่แยกได้จะอยู่บนชิ้นส่วนของราก และเมื่อนำน้ำที่ล้างน้ำสุดท้าย หลังจากการฟอกฆ่าเชื้อ มาทดสอบโดยการเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ไม่มีเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้น เชื้อแอคติโนมัยที่แยกได้จึงเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในพืช ซึ่งการที่สามารถแยกแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ได้เฉพาะส่วนของรากนั้น อาจเนื่องมาจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในดิน และอยู่บริเวณรอบ ๆรากพืช ดั้งนั้นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่อยู่ในดินและอยู่บริเวณรอบ ๆรากพืชจึงสามารถเข้าสู่พืชจากบริเวณ rhizosphere ได้ง่ายกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ (Sardi et al. 1992; Teachowisan et al. 2003) เมื่อนำเชื้อเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่แยกได้ มาทำการคัดเลือกหาเชื้อเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *X. citri* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของมะนาว ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า เชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมด 65 ไอโซเลต มี 4 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* ได้ เชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลต มี 9 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* ได้ โดย มี 5 ไอโซเลต คือ NO037 KL038 NO042 NO043 และTA051 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* ได้ดีที่สุด และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมด 170 ไอโซเลต มี 11 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *X. citri* pv. *citri* และคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมที่สามารถทำให้เชื้อเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารได้มากขึ้น โดยการเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลตในอาหารคัดเลือกทั้ง 4 ชนิด พบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหาร YEPD Medium และ MSS Medium สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุด ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 25.25 24.87 และ 22.75 มิลลิเมตร ส่วนเชื้อราเอนโดไฟท์ ที่เลี้ยงในอาหาร PDB และ YMB สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุด ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 21.12, 20.33 และ 20.12 มิลลิเมตร ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์ ที่เลี้ยงในอาหาร MSS และ GSB สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากที่สุด ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 20.12 19.37 และ19.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีการศึกษาเกี่ยวกับการนำจุลินทรีย์เอนโดไฟท์มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ช่วยเพิ่มความแข็งแรง ความต้านทานต่อโรค และแมลงศัตรูพืชได้(Belanger 1996) โดยมีกลไกการแข่งขันเจริญกับเชื้อราโรคพืช สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา สาเหตุโรคพืช หรือกระตุ้นให้พืชอาศัยสร้างกลไกป้องกันตัวเอง (Brown et al. 2003) และจากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบจากจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่มีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาทดสอบกับต้นมะนาวในระดับโรงเรือนก็พบว่า ทั้งน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบจากจุลินทรีย์เอนโดไฟท์สามารถควบคุมการเกิดโรคแคงเกอร์ในมะนาวได้ จึงน่าจะเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่อาจเป็นประโยชน์ใ นทางการอุตสาหกรรม และเกษตรกรรม

สรุปผลการการทดลอง

จากการแยกเชื้อเอนโดไฟท์ จากตัวอย่างพืชตระกูลส้มทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ มะนาว มะกรูด ส้มโอ ส้มเกลี้ยง ส้มจุก และ พบว่า สามารถแยกเชื้อเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 315 ไอโซเลต เป็นเชื้อราเอนโดไฟท์ 65 ไอโซเลต (20.63%) แอคติโนมัยซีท 80 ไอโซเลต (25.40%) และแบคทีเรียจำนวน 170 ไอโซเลต (53.97%) จุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มที่พบมากที่สุด ได้แก่ แบคทีเรียและพบ

มากที่สุดในส้มจุก พบจุลินทรีย์เอนโดไฟท์น้อยสุดในส้มเขียวหวาน ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์สามารถแยกได้เฉพาะจากส่วนรากของพืชตระกูลส้มเท่านั้น ไม่สามารถแยกได้จากส่วนของกิ่งและใบ เอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพ ได้แก่ เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.TA18 *Fusarium* sp.SO21 และ *Fusarium* sp. PO55 แอคติโนมัยซีท ได้แก่ *Streptomyces* ไอโซเลต NO37 NO42 และ NO43 ส่วนแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต LE24 PO80 และ PO109 อาหารที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ช่วยทำให้จุลินทรีย์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากขึ้น ซึ่งทุกไอโซเลตที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการควบคุมโรคแคงเกอร์ในมะนาว โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทดสอบกับต้นมะนาวทั้งน้ำเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบจากจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ สามารถควบคุมการเกิดโรคแคงเกอร์ในมะนาวได้ ซึ่งมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาใช้ควบคุมโรคแคงเกอร์โดยชีววิธี

2.7 การผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่แยกจากข้าวและแมลงที่สัมพันธ์กับข้าว

การแยกเชื้อ การบ่งบอกชนิด และการรวบรวมสายพันธุ์บริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ เอนโดไฟท์จากข้าวและจุลินทรีย์จากแมลงที่มีความสัมพันธ์กับข้าว

ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากข้าวป่า (*Oryza rufipogon*) ข้าวปลูก (*O. rsativa*) และหญ้าวัชชพืชในแปลงปลูกข้าว โดยเก็บตัวอย่างพืชจากแปลงสาธิตคณะเกษตร- ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ การแยกเชื้อเอนโดไฟท์ทำโดยนำตัวอย่างพืช จากต้นที่สมบูรณ์ดีมาแยกเชื้อ ทั้งส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อใบ ลำต้นเหนือดิน และราก นำตัวอย่างมา ล้างน้ำและฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization (Bussaban et al. 2001; Naik et al. 2009) วางตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร half potato dextrose agar (½ PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27–32°C) 1–2 สัปดาห์ เมื่อเส้นใยเจริญออกมา ทำการถ่ายเชื้อจาก ปลายเส้นใยลงในอาหาร ½ PDA ที่เตรียมใหม่และบ่มไว้เพื่อสังเกตการสร้างสปอร์ หากมี แบคทีเรียที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช streak บน nutrient agar (NA) จนได้โคโลนีเดี่ยว

สำหรับจุลินทรีย์จากแมลงที่มีความสัมพันธ์กับข้าว แยกเชื้อด้วยวิธี serial dilution (Bidochka 2004) นำตัวอย่างเศษสะสมบริเวณที่อาศัยของด้วงกระดิ่งเงิน (*Martinus dermestoides*) 5 g จากสาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ มาใส่ในสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 45 ml ทำ elbow-shaking 1 นาที จากนั้นทำ 10-fold dilution จนถึง 10-4 ปิเปตสารแขวนลอยที่ได้ 100 µl ใส่ในจานที่มี อาหาร NA แล้วทำ spread plate technique แต่ละความเจือจางทำ 5 จาน สำหรับตัวเต็มวัย ของผีเสื้อข้าวสาร (*Corcyra cephalonica*) เก็บมา 10 ตัว จากหน่วยอารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ นำมาแช่ในสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 9 ml จากนั้นทำ elbow-shaking 1 นาที ปิเปตส่วนสารแขวนลอยที่ได้ 100 µl ใส่ในจานที่มีอาหาร NA แล้วทำ spread plate technique จำนวน 5 จาน ส่วนตัวแมลงที่เหลือนั้นนำมาฆ่าเชื้อต่อไปด้วย 70% ethanol นาน 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 30 วินาที จากนั้นบดตัวแมลงให้ละเอียดในสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 9 ml ทำ 10-fold dilution จนถึง 10-3

ปิเปตสารแขวนลอยที่ได้ 100 µl ใส่ในจานที่มีอาหาร NA แล้วทำ spread plate technique แต่ละความเจือจางทำ 5 จาน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24–48 ชั่วโมง เมื่อปรากฏโคโลนีของแบคทีเรียขึ้น re-streak บน NA ที่เตรียมใหม่ หากมีโคโลนีราเจริญขึ้น ถ่ายเชื้อจากปลายเส้นใยลงในอาหาร ½ PDA และบ่มไว้เพื่อสังเกตการสร้างสปอร์

การบ่งบอกชนิดเชื้อรา ในระดับสกุลหรือ สปีชีส์ ใช้ลักษณะสัณฐานของสปอร์ ได้แก่ ขนาดและรูปร่าง ลักษณะโคโลนี และลักษณะอื่นๆ พิจารณาเปรียบเทียบกับหนังสือและงานตีพิมพ์ที่มีมาตรฐาน (เช่น Ellis 1971, 1976; Carmichael et al. 1980; Sutton 1980; von Arx 1981; Hyde et al. 2000) สำหรับเชื้อที่ไม่สร้างสปอร์จะชักนำให้สร้างสปอร์ (Guo et al. 1998; Umali et al. 1999) โดยการใส่ชิ้นพืชอาศัยลงในอาหาร การขูดเส้นใย การกระตุ้นด้วยรังสี UV เป็นเวลาสั้นๆ สำหรับแบคทีเรียใช้การย้อมสีแกรม การทดสอบทางชีวเคมี (Garrity et al. 2005) เพื่อบ่งบอกชนิดในเบื้องต้น เชื้อราและแบคทีเรียที่ยังไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้จะใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา คือ หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ribosomal RNA genes และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank (Bussaban et al. 2005; Thongkantha et al. 2008; Fredriksson et al. 2013) ซึ่งจะทำกับไอโซเลทที่ให้ผลบวกที่น่าสนใจเมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

รวบรวมสายพันธุ์บริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ที่แยกได้แบบเก็บระยะยาวในรูปที่มีชีวิต โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหาร ½ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 สัปดาห์ ใช้มีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อตัดเส้นใยให้มีขนาดประมาณ 0.6 cm × 0.6 cm แล้วถ่ายเชื้อ 10–15 ชิ้น ลงในหลอดแก้วขนาด 15 mm × 100 mm ที่บรรจุ mineral oil 3 ml และถ่ายเชื้อ 6–8 ชิ้น ลงในหลอดพลาสติกขนาด 2 ml ที่บรรจุ 10% glycerol นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ –20 °C ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 24–48 ชั่วโมง แล้วใช้ห่วงถ่ายเชื้อลงในหลอดพลาสติกขนาด 2 ml ที่บรรจุ 15% glycerol นำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 °C ทำการบันทึกข้อมูลต่างๆ เช่น รหัสเชื้อ ชนิดเชื้อ ประวัติเชื้อ ลักษณะเชื้อ เป็นต้น ลงในโปรแกรม Microsoft Excel

การคัดกรองหาจุลินทรีย์ที่สร้างสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

การเพาะเลี้ยงรา

เพาะเลี้ยงราที่แยกได้จากพืชและแมลง จำนวน 64 ไอโซเลท บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5-7 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร 2 ชนิด คือ glucose soybean meal broth (F1) และ potato dextrose broth (PDB) โดยใช้ Pasture pipette ที่ปลอดเชื้อ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 mm) ตัดบริเวณปลายเส้นใยนำไปใส่ในอาหาร 25 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ขวดละ 5 ชิ้น บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 14 วัน เขย่าด้วยมือวันละสองครั้งทุกวัน จากนั้นกรองน้ำเลี้ยงเชื้อ นำไปสกัดสามครั้งด้วย ethyl acetate ในปริมาตรที่เท่ากัน แล้วระเหยแห้งด้วย rotary evaporator ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้และละลายด้วย methanol ก่อนนำไปเก็บที่ –20 °C เพื่อรอทดสอบสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้วยวิธี agar diffusion assay

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากพืชและแมลง จำนวน 50 ไอโซเลท บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 24-48 ชั่วโมง ก่อนใช้ในการทดสอบกับจุลินทรีย์ก่อโรคพืชด้วย spot plate technique

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ เชื้อแบคทีเรียและราก่อโรคในข้าว จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยเชื้อเหล่านี้แยกได้มาจากอาการของโรคที่เกิดในส่วนต่างๆ ของข้าว (ตาราง 71) นำเชื้อราก่อโรคพืชมาเลี้ยงในอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5-7 วัน ตัดบริเวณปลายเส้นใยโดยใช้ Pasture pipette ที่ปลอดเชื้อ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 mm) เพื่อเตรียมเป็น inoculum สำหรับแบคทีเรียก่อโรคพืช นำมา streak บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเตรียม inoculum โดยขูดแบคทีเรียแต่ละชนิดใส่ในสารละลาย 0.85% NaCl ที่ปลอดเชื้อ วัดความขุ่นปรับเทียบให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland เบอร์ 0.5 แล้วเจือจางลงไปอีกเท่าตัวก่อนนำไปใช้

ตาราง 71 เชื้อก่อโรคในข้าว *Oryza sativa* ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อก่อโรค	รหัสสายพันธุ์	โรค	แหล่งเกิดโรค
แบคทีเรีย			
Xanthomonas oryzae	XPK1	Bacterial leaf blight	Chiang Mai
Xanthomonas oryzae	XPK3	Bacterial leaf blight	Chiang Mai
เชื้อรา			
Cercospora oryzae	BS124	Brown spot	Chiang Mai
Curvularia lunata	PKC2	Dirty panicle	Chiang Mai
Fusarium sp.	PKF1	Dirty panicle	Chiang Mai
Pyricularia oryzae	BS265	Blast	Chiang Rai
Pyricularia oryzae	BS306	Blast	Chiang Rai
Pyricularia oryzae	BS308	Blast	Chiang Rai
Rhizoctonia sp.	PKR	Sheath blight	Chiang Mai

การทดสอบด้วย agar diffusion assay

ปลูกเชื้อด้วย inoculum ของเชื้อราก่อโรคพืชแต่ละชนิด ตรงกลางจานอาหาร PDA บ่มเชื้อให้โคโลนีเจริญขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20 mm แล้วจึงใช้ Pasture pipette ปลอดเชื้อ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm) เจาะให้ได้จานละ 4 well จากนั้นหยดสารสกัดหยาบของราจากพืชและแมลงที่เตรียมไว้ลงใน well ปริมาตร 30 µl สำหรับแบคทีเรียก่อโรคพืชทำการปลูกเชื้อโดยดูด inoculum ของเชื้อแต่ละชนิด 100 µl หยดบนอาหาร NA แล้ว swab ให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยสำลีก้านที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้

Pasture pipette ปลอดเชื้อ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm) เจาะให้ได้จานละ 7 well จากนั้นหยดสารสกัดหยาบของราจากพืชและแมลงที่เตรียมไว้ลงใน well ปริมาตร 30 µl ใช้ methanol เป็น negative control ใช้สารเคมีฆ่าเชื้อราและ streptomycin sulphate เป็น positive control นำจานทดสอบทั้งหมดไปบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อก่อโรคแต่ละชนิด วัดผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสหลังจากบ่มเชื้อ 24–48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อราก่อโรคบ่มเชื้อ 7–9 วัน ขึ้นอยู่กับอัตราเร็วในการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิด แล้ววัดขนาดรัศมีของราก่อโรคดังกล่าวในจาน negative control (r1) และในจานทดสอบ (r2) นำมาคำนวนเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตร ((r1-r2)/r1)(100) ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ

การทดสอบด้วย spot plate technique

ปลูกเชื้อด้วย inoculum ของเชื้อแบคทีเรียหรือราก่อโรคพืชแต่ละชนิดเช่นเดียวกับการทดสอบด้วย agar diffusion assay เมื่อโคโลนีของเชื้อราก่อโรคเจริญจนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20 mm หรือหลังจาก swab เชื้อแบคทีเรียก่อโรคเรียบร้อยแล้ว ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากพืชและแมลงที่เตรียมไว้ ปลูกเชื้อด้วยการ spot ลงไปบนจานอาหารห่างจากขอบจาน 20 mm แต่ละจาน spot เชื้อ 4 ไอโซเลท ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อและวัดผลการยับยั้งของจุลินทรีย์ก่อโรคเช่นเดียวกับการทดสอบด้วย agar diffusion assay

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกและการบ่งบอกชนิดของราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือก

นำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุดสองลำดับแรกจากข้อ 2 คือ 3N5 และ 3S1 ซึ่งสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. oryzae* BS124 และ *X. oryzae* XPK1 ได้ดีที่สุด ตามลำดับ มาเจือจางลำดับส่วนแบบสองเท่าด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ จากนั้นทำการทดสอบด้วย agar diffusion method เหมือนกับวิธีการข้อ 2

บ่งบอกชนิดเชื้อราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือก คือ 3N5 และ 3S1 โดยใช้ลักษณะสัณฐาน เช่น ลักษณะโคโลนี การเจริญเติบโต ชนิดของสปอร์ที่เชื้อสร้าง ขนาดและรูปร่างของสปอร์ ลักษณะสัณฐานอื่นๆ พิจารณาเปรียบเทียบกับหนังสือและรูปวิธานของเชื้อรา และยืนยันชนิดด้วยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5.8S-ITS 18S และ 28S ribosomal RNA genes โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

ผลการทดลอง

การแยกเชื้อ การบ่งบอกชนิดและการรวบรวมสายพันธุ์บริสุทธิ์ของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากข้าวและ จุลินทรีย์จากแมลงที่มีความสัมพันธ์กับข้าว

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อพืชของข้าวป่า ข้าวปลูก และหญ้าวัชชพืชในแปลงปลูกข้าวที่เก็บจากแปลงสาธิตคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน

265 ชิ้น พบจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ทั้งหมด 110 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรีย 42 ไอโซเลท และรา 68 ไอโซเลท และพบเปอร์เซ็นต์ความชุกของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ในข้าวป่า (41.6%) มากกว่าข้าว (24.4%) และหญ้าวัชชพืช (28.0%) ในแปลงปลูก (ตาราง 72) ซึ่งราที่แยกได้นั้นเมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานของสปอร์แล้วพบว่าจัดอยู่ใน 8 จีนัส ต่อไปนี้ *Cladosporium*, *Cylindrocladium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Humicola*, *Nigrospora* และ *Sarocladium*

ตาราง 72 การแพร่กระจายของสายพันธุ์แบคทีเรียและเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวปลูก ข้าวป่า และหญ้าต่างๆ

	ข้าวปลูก	**ข้าวป่า**	**หญ้า**
No. of samples	90	125	50
No. of bacterial isolates recovered	10	9	1
Bacterial isolate prevalence (%)	11.1	7.2	2.0
No. of fungal isolates recovered	12	43	13
Fungal isolate prevalence (%)	13.3	34.4	26.0
Total isolate prevalence (%)	**24.4**	**41.6**	**28.0**

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างเศษสะสมบริเวณที่อาศัยของด้วงกระดิ่งเงิน (*M. dermestoides*) และตัวเต็มวัยของผีเสื้อข้าวสาร (*C. cephalonica*) ได้จุลินทรีย์ทั้งหมด 61 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรีย 31 ไอโซเลท และรา 30 ไอโซเลท และพบจุลินทรีย์จากตัวเต็มวัยของผีเสื้อข้าวสาร (39 ไอโซเลท) มากกว่าเศษสะสมบริเวณที่อาศัยของด้วงกระดิ่งเงิน (22 ไอโซเลท) (ตาราง 73) ซึ่งการตรวจสอบลักษณะสัณฐานของสปอร์ของเชื้อรา พบว่าจัดอยู่ใน 4 จีนัส ต่อไปนี้ *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Nomuraea* และ *Paecilomyces*

ตาราง 73 จำนวนแบคทีเรียและเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากแมลงที่เกี่ยวข้องกับข้าว *Corcyra cephalonica* และ *Martinus dermestoides*

	Corcyra cephalonica	***Martinus dermestoides***	**ทั้งหมด**
No. of bacterial isolates recovered	11	20	31
No. of fungi isolates recovered	28	2	30
Total no. of microbes recovered	**39**	**22**	**61**

การคัดกรองหาจุลินทรีย์ที่สร้างสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหาร PDB และ F1 จำนวน 64 ไอโซเลท และ และราจากแมลงที่มีความสัมพันธ์กับข้าว จำนวน 28 ไอโซเลท ด้วยวิธี agar diffusion

assay พบว่าไม่มีสารสกัดหยาบของราไอโซเลทใดที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคไหม้ในข้าว *Pyricularia oryzae* และราก่อโรคใบจุดสีน้ำตาล *Cercospora oryzae* ได้เกิน 50% (ตาราง 74 และตาราง 75) อย่างไรก็ตาม พบว่าสารสกัดของราเอนโดไฟท์ 1 ไอโซเลท คือ *Sarocladium* sp. 3S1 ที่เลี้ยงทั้งในอาหาร PDB และ F1 ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกาบใบแห้ง *Xanthomonas oryzae* XKP1 ได้ดีมากโดยให้ค่าเฉลี่ยวงใส 20.5 ± 1.3 mm และ 23.75 ± 2.50 mm ตามลำดับ (ภาพ 94 และ ตาราง 76)

ตาราง 74 ปริมาณกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคข้าว

ศักยภาพกิจกรรมต้านจุลินทรีย์*	**จำนวนสายพันธุ์ (และเปอร์เซ็นต์) ของเชื้อราที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคข้าว**						
	PDB				**F1**		
	BS124	**BS265**	**BS308**	**XPK1**	**BS124**	**BS265**	**XPK1**
+++	0	0	0	1 (1.6)	0	0	1 (1.56)
++	30 (46.9)	0	0	26 (40.6)	0	0	11 (17.19)
+	34 (53.1)	0	0	37 (57.8)	39 (60.94)	22 (34.38)	50 (78.13)
-	0	64 (100.0)	64 (100.0)	0	25 (39.06)	42 (65.63)	2 (3.13)

BS124 = *Cercospora oryzae*, BS265, BS308 = *Pyricularia oryzae*

XPK1 = *Xanthomonas oryzae*

*Bacteria:

+++: inhibition zone diameter (X) ≥15 mm

++: 15 mm > X ≥ 10 mm

+: 10 mm > X > 5 mm

–: X = 5 mm

Fungi:

+++: > 50% inhibition

++: 26–50% inhibition

+: 1–25% inhibition

–: no inhibition

ตาราง 75 ปริมาณกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ของเชื้อราเอนโดไฟท์จากแมลงที่มีความ สัมพันธ์กับข้าวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคข้าว

ศักยภาพกิจกรรมต้านจุลินทรีย์*	**จำนวนสายพันธุ์ (และเปอร์เซ็นต์) ของเชื้อราจากแมลงใน F1 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคข้าว**		
	BS124	**BS265**	**XPK1**
+++	0	0	0
++	2 (7.14)	1 (3.57)	4 (14.29)
+	17 (60.71)	14 (50.00)	24 (85.71)
-	9 (32.14)	13 (46.43)	0

BS124 = *Cercospora oryzae*, BS265 = *Pyricularia oryzae*

XPK1 = *Xanthomonas oryzae*

*Bacteria:

+++: inhibition zone diameter (X) ≥ 15 mm

++: 15 mm > X ≥ 10 mm

+: 10 mm > X > 5 mm

–: X = 5 mm

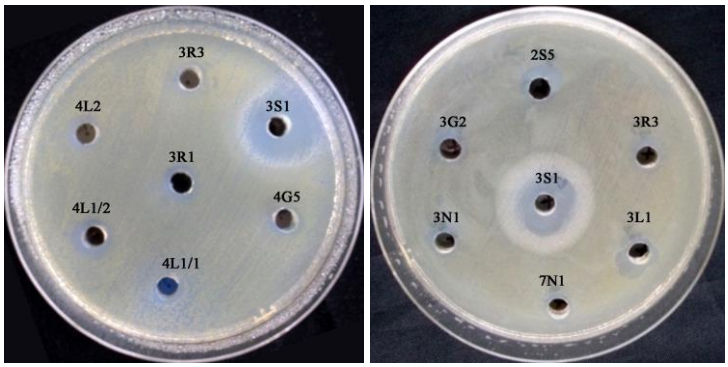
Fungi:

+++: > 50% inhibition

++: 26–50% inhibition

+: 1–25% inhibition

–: no inhibition



ภาพ 94 โซนการยับยั้งของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างโดยเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญในอาหารเหลว potato dextrose broth (ซ้าย) และ F1 (ขวา), 3S1 = *Sarocladium* sp. 3S1

ตาราง 76 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (≥ 40%) หรือเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (≥ 15 mm) ต่อต้านเชื้อก่อโรคในข้าว

เชื้อราเอนโดไฟท์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%) หรือเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (มม.)*						
	PDB				F!		
	BS124	BS265	BS308	XPK1	BS124	BS265	XPK1
3N5	43.2±1.0	9.5±1.3	5.4±1.3	10.2±2.3	20.0±1.0	0.0±0.0	9.3±1.0
3S1	31.2±1.2	8.2±0.6	10.3±1.0	20.5±1.3	23.3±0.6	0.0±0.0	23.8±2.5
4S1	27.2±0.3	4.9±1.4	5.4±0.8	10.0±0.0	20.0±1.0	0.0±0.0	15.0±3.9
9L2	40.8±0.3	11.4±1.0	4.8±0.3	9.8±1.0	23.3±0.6	1.3±0.6	8.3±1.0

*Mean ± SD from three replicates BS124 = *Cercospora oryzae*, BS265, BS308 = *Pyricularia oryzae*, XPK1 = *Xanthomonas oryzae*

จากการทดสอบกับจุลินทรีย์ก่อโรคพืช ด้วยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเอนโดไฟท์และแบคทีเรียที่แยกได้จากแมลง จำนวน 30 และ 20 ไอโซเลท ตามลำดับ โดย spot plate technique บนอาหาร NA พบว่ามีแบคทีเรียเอนโดไฟท์จำนวน 1 ไอโซเลท ที่ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคไหม้ในข้าวได้เกิน 60% (ตาราง 77) และพบว่ามีแบคทีเรียที่แยกได้จากแมลงจำนวน 3 ไอโซเลท ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคกาบใบแห้ง ได้ดีมากโดยให้ค่าเฉลี่ยวงใสมากกว่า 15 mm (ตาราง 78) โดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์ B-1R3 ยับยั้งเชื้อสาเหตุ *Pyricularia oryzae* BS265 และ BS306 ได้ดีที่สุด 66.0±2.8% และ 67.3±3.1% ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียที่แยกได้จากแมลง YMB13 ยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas oryzae* XKP3 ได้ดีที่สุดให้ค่าเฉลี่ยวงใส 15.8±0.3 mm (ตาราง 79)

ตาราง 77 ปริมาณกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคข้าว

ศักยภาพกิจกรรมต้านจุลินทรีย์*	จำนวนสายพันธุ์ (และเปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคข้าว						
	PKC2	PKF1	PKR	BS265	BS306	XPK1	XPK3
+++	0	0	0	1 (5.0)	1 (5.0)	0	0
++	1 (5.0)	0	0	0	2 (10.0)	0	3 (15.0)
+	0	2 (10.0)	5 (25.0)	4 (20.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	0
-	19 (95.0)	18 (90.0)	15 (75.0)	15 (65.0)	16 (80.0)	19 (95.0)	17 (85.0)

PKC2 = *Curvularia lunata*, PKF1 = *Fusarium* sp., PKR = *Rhizoctonia* sp.,

BS265, BS306 = *Pyricularia oryzae*, XPK1, XPK3 = *Xanthomonas oryzae*

*Bacteria:

+++: inhibition zone diameter (X) ≥ 15 mm

++: 15 mm > X ≥ 10 mm

+: 10 mm > X > 5 mm

–: X = 5 mm

Fungi:

+++: > 60% inhibition

++: 51–60% inhibition

+: 10–50% inhibition

–: no inhibition

ตาราง 78 ปริมาณกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียจากแมลงที่มีความสัมพันธ์กับข้าวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคข้าว

ศักยภาพกิจกรรมต้านจุลินทรีย์*	**จำนวนสายพันธุ์ (และเปอร์เซ็นต์) ของแบคทีเรียจากแมลงต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคข้าว**						
	PKC2	**PKF1**	**PKR**	**BS265**	**BS306**	**XPK1**	**XPK3**
+++	0	0	0	0	0	0	3 (10.0)
++	1 (3.3)	2 (6.7)	2 (6.7)	0	0	0	1 (3.3)
+	1 (3.3)	0	1 (3.3)	1 (3.3)	1 (3.3)	6 (20.0)	0
-	28 (93.3)	28 (93.3)	27 (90.0)	29 (96.7)	29 (96.7)	24 (80.0)	26 (86.7)

PKC2 = *Curvularia lunata*, PKF1 = *Fusarium* sp., PKR = *Rhizoctonia* sp.,

BS265, BS306 = *Pyricularia oryzae*, XPK1, XPK3 = *Xanthomonas oryzae*

*Bacteria:

+++: inhibition zone diameter (X) ≥ 15 mm

++: 15 mm > X ≥10 mm

+: 10 mm > X > 5 mm

–: X = 5 mm

Fungi:

+++: > 60% inhibition

++: 51–60% inhibition

+: 10–50% inhibition

–: no inhibition

ตาราง 79 เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (≥ 40%) หรือเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (≥ 15 mm) ต่อต้านเชื้อก่อโรคในข้าวของแบคทีเรียเอนโดไฟท์และแบคทีเรียจากแมลง

แบคทีเรีย	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%) หรือเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (มม.)***						
	PKC2	**PKF1**	**PKR**	**BS265**	**BS306**	**XPK1**	**XPK3**
แบคทีเรียเอนโดไฟท์							
B-1L4	53.3±3.3	38.9±5.1	45.3±2.3	32.0±6.6	60.0±4.0	0.0±0.0	12.2±0.8
B-1N2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	50.7±2.3	0.0±0.0	0.0±0.0
B-6N3	0.0±0.0	0.0±0.0	44.0±4.0	40.0±5.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
B-1R2/1	0.0±0.0	0.0±0.0	48.4±4.0	26.7±8.3	26.7±6.1	0.0±0.0	0.0±0.0
B-1R3	0.0±0.0	0.0±0.0	35.3±5.0	66.0±2.8	67.3±3.1	0.0±0.0	0.0±0.0
แบคทีเรียที่แยกจากแมลง							
YMB4	0.0±0.0	0.0±0.0	56.0±4.0	50.0±7.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
YMB5	54.4±1.9	53.3±3.3	48.0±4.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
YMB7	42.2±3.8	58.9±1.9	56.0±4.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
YMB11	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	7.2±0.3	15.5±0.5
YMB13	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	6.8±0.3	15.8±0.3
YMB16	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	6.8±0.5	15.2±0.7

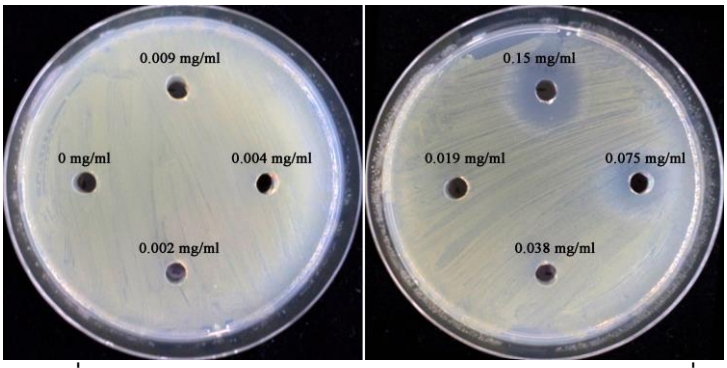
*Mean ± SD from three replicates

PKC2 = *Curvularia lunata*, PKF1 = *Fusarium* sp., PKR = *Rhizoctonia* sp.,

BS265, BS306 = *Pyricularia oryzae*, XPK1, XPK3 = *Xanthomonas oryzae*

ความเข้มข้นต่ำสุดของสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวที่ผลิตโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือก

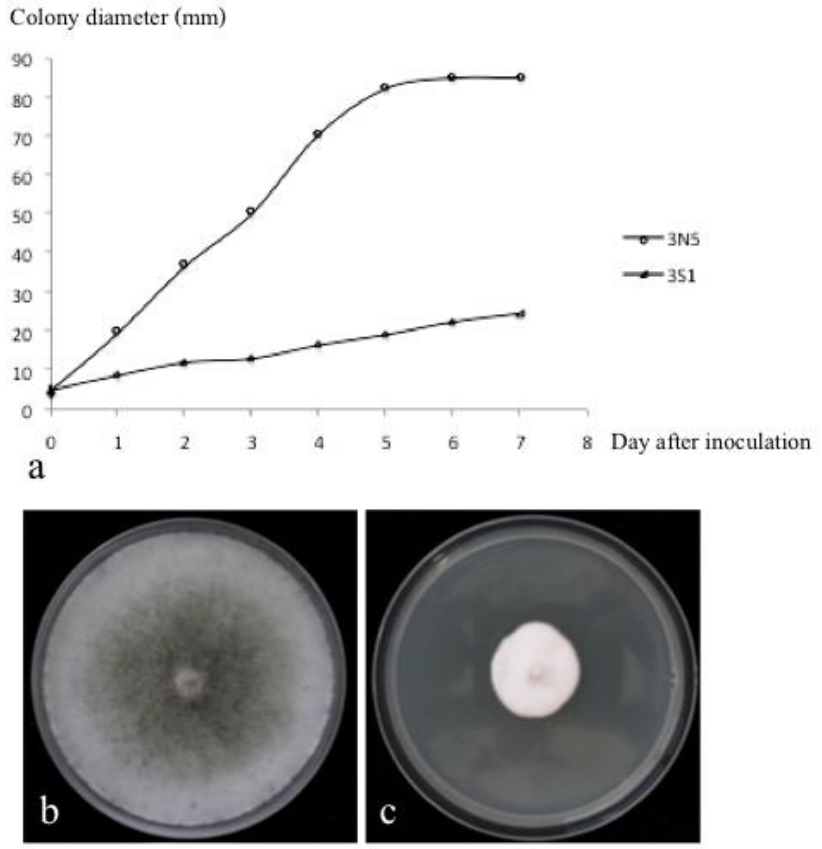
จากการคัดเลือกสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุดสองชนิดแรก คือ 3N5 และ 3S1 ซึ่งสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. oryzae* BS124 และ *X. oryzae* XPK1 ได้ดีที่สุด ตามลำดับ มาเจือจางลำดับส่วนแบบสองเท่าด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ จำนวน 8 ความเข้มข้น และทดสอบด้วย agar diffusion method พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบของ *Gaeumannomyces* sp. 3N5 ที่สามารถยับยั้ง *C. oryzae* BS124 ได้ มีค่าเท่ากับ 2 mg/ml และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบของ *Sarocladium* sp. 3S1 ที่ยับยั้ง *X. oryzae* XPK1 ได้มีค่าเท่ากับเท่ากับ 0.075 mg/ml (ภาพ 95)



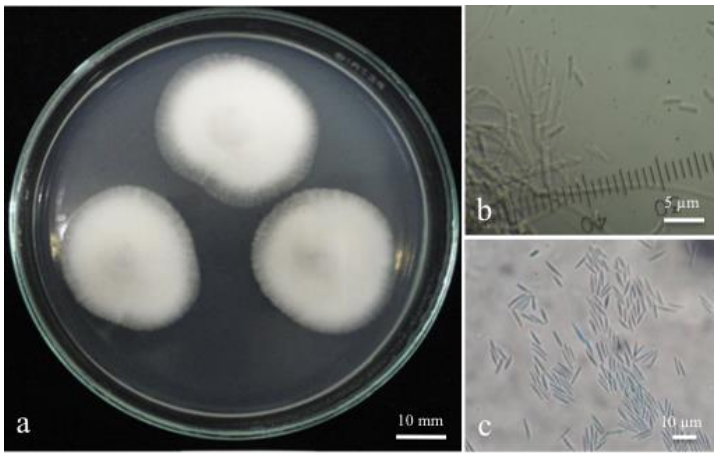
ภาพ 95 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบของ *Sarocladium* sp. 3S1 ที่ยับยั้ง *X. oryzae* XPK1

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานของราเอนโดไฟต์สองไอโซเลต พบว่า 3N5 มีการเจริญเร็วกว่า 3S1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง โดย 3N5 เจริญเต็มจานอาหาร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 85 mm) ในวันที่ 6 ส่วน 3S1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเพียง 24.67±1.5 mm (ภาพ 96) โคโลนีด้านบนมีสีขาว ด้านล่างสีเขียวอ่อน เส้นใยมีผนังกั้นตามขวาง ขดเป็นเกลียว สร้าง conidiogenous cells แบบ monophialidic สร้าง conidiophores ใส แตกกิ่งก้านเป็นช่อ conodia ใส รูปร่างรียาว ขนาด 4-8×1-1.25 µm (n=50) ยังไม่พบการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนส์ 5.8S-ITS 16S และ 28S rRNA กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นราในจีนัส *Sarocladium* (ภาพ 97) สำหรับ 3N5 สร้างโคโลนีสีน้ำตาลเข้มอมเขียวมะกอก เส้นใยมีผนังกั้นตามขวาง เมื่ออ่อนใส เมื่อแก่มีสีน้ำตาลเข้มขึ้น และมีเส้นใยมักจะมาสานรวมกันคล้ายฟั่นเชือก สร้าง conidiogenous cells แบบ monophialidic สร้าง conodia ใส มีทั้งรูปร่างตรงและโค้ง ขนาด 5-8.5×1-2 µm (n=50) สร้าง chlamydospores และสร้าง ascospores ใสเรียวยาวโค้งเล็กน้อย ขนาด 75.0-100×4-5 µm (n=20) จำนวน 8 อัน ภายใน ascus ที่ด้านปลายมนและมี refractive cylindrical apical ring ซึ่งเป็นลักษณะของรา *Gaeumannomyces* (ภาพ 98) และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนส์ 5.8S-ITS 16S และ 28S rRNA กับฐานข้อมูล GenBank ก็ยืนยันว่าเป็นราในจีนัสดังกล่าวซึ่งเมื่อ

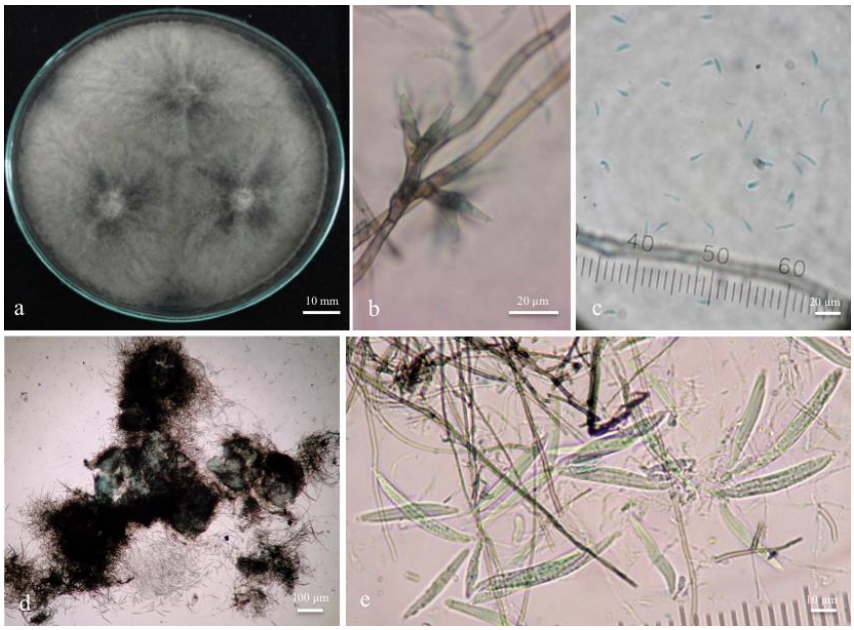
เปรียบเทียบทั้งลักษณะสัณฐานและข้อมูลนิวคลีโอไทด์พบว่าใกล้เคียงกับ *G. graminis* และ *G. amomi* แต่มีความแตกต่างกับทั้งสองชนิด จึงระบชนิดเป็น *G. oryzae* sp. nov. (ภาพ 99)



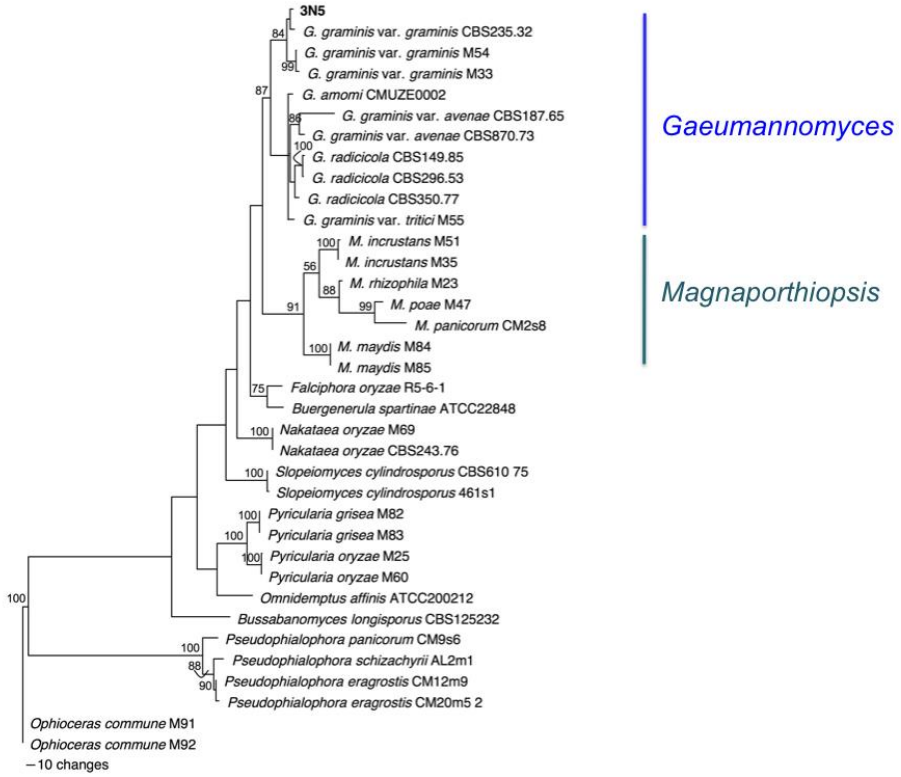
ภาพ 96 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (a) และโคโลนีของ *G. oryzae* sp. nov. 3N5 (b) และ *Sarocladium* sp. 3S1 (c) เจริญบน potato dextrose agar



ภาพ 97 โคโลนี (a), conidiophores (b) และ conidia (c) ของ *Sarocladium* sp. 3S1 ที่เจริญบน potato dextrose agar



ภาพ 98 โคโลนี (a), conidiophores (b) และ conidia (c) , ascomata (d) asci และ ascospores (e) ของ *Gaeumannomyces oryzae* 3N5 ที่เจรอญบน potato dextrose agar



ภาพ 99 Parsimonious trees ที่อ้างอิงจากลำดับเบสของ SSU, 5.8S-ITS และ LSU จาก 36 taxa ของ *Gaeumannomyces* และสกุลที่เกี่ยวข้อง โดยใช้ *Ophioceras commune* เป็นรากของแผนภูมิวิวัฒนาการ ด้วยค่า 1000 bootstrap replications

วิจารณ์ผลการการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้แยกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อพืชของข้าวป่า ข้าวปลูก และหญ้าวัชชพืช จากตัวอย่าง 265 ชิ้น แต่พบจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ทั้งหมดเพียง 110 ไอโซเลท ซึ่งเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความชุกของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์แล้ว ค่อนข้างน้อยกว่าในพืชชนิดอื่นๆ เช่น ในพืชวงศ์ขิงที่พบราเอนโดไฟต์ 70.0-83.0% (Bussaban et al., 2001) และในพืชสกุลอบเชยที่มีราเอนโดไฟต์สูงถึง 94.8-99.7% (Suwannarach et al., 2010) อย่างไรก็ตามความชุกของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ในข้าวป่า *Oryza rufipogon* (41.6%) มีมากกว่าข้าวปลูก *O. sativa* (24.4%) และมีมากกว่าที่พบในข้าวป่า *O. granulata* ที่พบเอนโดไฟท์เพียง 11.7% (Yuan et al. 2011) นอกจากนี้ยังพบราเอนโดไฟต์ในจีนัส *Gaeumannomyces* ซึ่งมักมีรายงานว่าเป็นเชื้อที่พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Bussaban et al. 2001a, b; Yuan et al. 2011) โดยในการศึกษาครั้งนี้พบชนิดใหม่คือ *G. oryzae* ซึ่งมีลักษณะสัณฐานและข้อมูลนิวคลีโอไทด์ (5.8S-ITS 16S และ 28S rRNA) ใกล้เคียงกับ *G. graminis* และ *G. amomi*

สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ *G. oryzae* 3N5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคใบขีดสีน้ำตาล *C. oryzae* BS124 ได้ดีที่สุด โดยพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งเชื้อได้คือ 2 mg/ml นอกจากนี้ ราเอนโดไฟท์ *Sarocladium* sp. 3S1 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง *X. oryzae* XPK1 ได้ดีที่สุดและใช้ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งเชื้อได้คือ 0.075 mg/ml อย่างไรก็ตาม *G. graminis* เป็นสาเหตุของโรค take-all ในข้าวสาลี โรค brow sheath rot ในข้าว และโรคที่เกี่ยวกับระบบรากในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอีกหลายชนิด (Walker 1981) แต่เมื่อทำการปลูกเชื้อเอนโดไฟท์ทั้งสองกับกล้าข้าวหอมมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และสันป่าตอง 1 ไม่พบว่าทำให้ข้าวแสดงอาการโรค (ไม่ได้แสดงผล) จะเห็นได้ว่าราทั้งสองชนิด *C. oryzae* BS124 และ *Sarocladium* sp. 3S1 นี้มีศักยภาพในการควบคุมโรคในข้าว หากมีการศึกษาคุณสมบัติของสารหรือชนิดของสารที่ราเหล่านี้สร้าง อาจเป็นแหล่งของสารชนิดใหม่ๆที่อาจนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไปได้

สรุปผลการการทดลอง

แยกจุลินทรีย์เอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อพืชของข้าวป่า ข้าวปลูก หญ้าวัชชพืช ได้ทั้งหมด 110 ไอโซเลท (แบคทีเรีย 42 ไอโซเลท และรา 68 ไอโซเลท) และแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างเศษสะสมบริเวณที่อาศัยของด้วงกระดิ่งเงิน (*Martinus dermestoides*) และตัวเต็มวัยของผีเสื้อข้าวสาร (*Corcyra cephalonica*) ได้ 61 ไอโซเลท (แบคทีเรีย 31 ไอโซเลท และรา 30 ไอโซเลท)

คัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคข้าว โดยเลี้ยง 110 ไอโซเลท ใน PDB และ F1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27-30 °C) 14 วัน กรองเพื่อแยกส่วนน้ำเลี้ยงเตรียมเป็นสารสกัดหยาบ และทดสอบกับเชื้อก่อโรคในข้าว 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 พบว่าสารสกัดหยาบของ 3N5 (เลี้ยงใน PDB) ยับยั้งการเจริญของ *C. oryzae* BS124 ได้ดีที่สุด

43.2±1.0% ส่วนสารสกัดหยาบของ 3S1 (เลี้ยงใน PDB และ F1) ยับยั้ง *X. oryzae* XKP1 ได้ดีที่สุดให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 20.5±1.3 mm และ 23.75±2.50 mm ตามลำดับ

คัดเลือกราเอนโดไฟท์ 3N5 และ 3S1 มาศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค (MIC) พบว่ามีค่า MIC ยับยั้ง *C. oryzae* BS124 และ *X. oryzae* XKP1 เท่ากับ 2 mg/ml และ 0.075 mg/ml ตามลำดับ และเมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนส์ 5.8S-ITS 16S และ 28S rRNA พบว่าทั้งสองเป็นราในจีนัส *Gaeumannomyces* และ *Sarocladium* ตามลำดับ ซึ่ง *G. oryzae* 3N5 จัดเป็นราเอนโดไฟท์ชนิดใหม่

2.8 แบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน: การครอบครองและการแสดงออกของยีนในพืชอาศัยและไม่ใช่พืชอาศัย

ผลของการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

ทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นต่างกันดังนี้ Ampicillin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Tetracycline ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $mg.mL^{-1}$ ส่วน Spectinomycin และ Streptomycin ที่ความเข้มข้น 100 และ 300 $mg.mL^{-1}$ จากนั้นทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วันบันทึกการเจริญเติบโตของเชื้อ

การติดฉลากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยใช้ยีนโปรตีนเรืองแสง (Florescent Protein gene) ร่วมกับยีนบีต้ากูลคูโรนิเดส (β-glucuronidase, gus gene)

ยีนติดตาม (reporter gene) ได้แก่ ยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP: Green Florescent Protein gene) หรือยีนโปรตีนเรืองแสงสีแดง (DsRed: Red Fluorescent protein gene) และ ยีนบีต้ากูลคูโรนิเดส (β-glucuronidase, gus gene) โดยการสร้างพลาสมิดลูกผสมและถ่ายพลาสมิดลูกผสมทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ Competent cell *E.coli* DH5α ทำการติด reporter gene สู่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน GFP หรือ DsRed และ Gus ที่ได้ส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่ผ่านการเตรียมให้อยู่ในสภาพเป็น Competent cell จากนั้นทรานส์ฟอร์มด้วยวิธี electroporation หลังจากถ่าย พลาสมิดลูกผสมได้แล้วทำการคัดเลือกยีนที่ถูกทรานส์ฟอร์มสมบูรณ์โดยการคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ทำการตรวจสอบความสามารถในการเรืองแสงของเชื้อที่ถูกใส่ยีนเรืองแสง (GFP หรือ DsRed) ภายใต้กล้อง Inverted microscope (IX51, Olympus, USA) ซึ่งเมื่อปรากฏการเรืองแสงของโปรตีนเรืองแสงของแบคทีเรียภายใต้กล้องจะนำเชื้อดังกล่าวไปทำการทดสอบต่อไป ส่วนแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสม Gus จะถูกนำไปคัดเลือกบนอาหารที่มีส่วนผสมของ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc)

การตรวจติดตามแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในพืชอาศัย (ข้าว) และพืชอาศัยอื่น (ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วเหลือง งา และอ้อย)

นำแบคทีเรียที่ถูกติดด้วย reporter gene นำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการล้างเซลล์เชื้อดังกล่าวด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นวัดปริมาณเชื้อให้มีความเข้มข้น 1×10^{8} cfu.mL^{-1} จากนั้นนำเมล็ดข้าว (control) ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วและงาที่กำลังงอกราก และต้นอ้อยที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาแล้วเป็นเวลา 1 เดือน ไปทำการฆ่าเชื้อที่อยู่ตามผิวภายนอก (surface sterilization) ด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ในสารละลายเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด จากนั้นนำไปเจริญต่อภายในสารละลายธาตุอาหารพืชและติดตามการเข้าครอบครองของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน โดยการตรวจสอบลักษณะการเข้าครอบครองพืชหลังจากทำการแช่ในสารละลายเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยย้อมด้วยสารที่มีส่วนผสมของ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 180 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในที่มืด นำตัวอย่างไปตัดด้วยเครื่องตัดไมโครโตรมด้วยวิธีเปอมาแนทสไลส์ (permanent slide) ตรวจสอบหาตำแหน่งที่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเข้าไปอาศัยอยู่ในพืช

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Reverse Transcription (RT) – PCR *ของ*แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในข้าว

การศึกษาการแสดงออก*ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนของ*แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจน ได้แก่ *Sphingomonas* sp. PS-5, *Klebsiella variicola* SS-2 และ *Burkholderia kururiensis* SS-5 โดยมีกรรมวิธีในการทดลองดังนี้ 1) แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนที่เลี้ยงในอาหารที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน 2) เมล็ดข้าวที่กำลังงอกรากในสภาพปลอดเชื้อแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำข้าวที่ได้ไปเจริญต่อภายในสารละลายธาตุอาหารพืชไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 3 และ 14 วัน 3) เมล็ดข้าวที่กำลังงอกรากในสภาพปลอดเชื้อแช่ในแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนความเข้มข้น 1×10^{8} cfu ต่อมิลลิลิตร นำข้าวที่ได้ไปเจริญต่อภายในสารละลายธาตุอาหารพืชไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 3 และ 14 วัน 4) แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจน 5) เมล็ดข้าวที่กำลังงอกรากในสภาพปลอดเชื้อไปแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำข้าวที่ได้ไปเจริญต่อภายในสารละลายธาตุอาหารพืชที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 3 และ 14 วัน 6) เมล็ดข้าวที่กำลังงอกรากในสภาพปลอดเชื้อนำไปแช่ในแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนความเข้มข้น 1×10^{8} cfu ต่อมิลลิลิตร นำข้าวที่ได้ไปเจริญต่อภายในสารละลายธาตุอาหารพืชมีแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 3 และ 14 วัน

นำตัวอย่างมาสกัด total RNA จากตัวอย่างข้าว โดยนำข้าวแยกออกเป็น *2* ส่วนคือ ส่วนรากและส่วนลำต้นและใบ นำ total RNA ที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรม และโปรตีนปริมาตรน้อย (NonoDrop Spectrophotometer) และสร้างสาย

cDNA ด้วย Reverse Transcription (RT) ทำการเก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมาย

เพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ไพรเมอร์ fD1 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') และ rP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT3') เพื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียในแต่ละการทดลอง และใช้ไพรเมอร์ forward primer PolF (5'TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC') และ reverse primer AQER (5'GAC GAT GTA GAT YTC CTG') *เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน* (*nifH*) โดยใช้เทคนิค reverse-transcription PCR นำผลที่ได้มาอ่านผลบนด้วยวิธี gel eletrophoresis ตรวจดูแถบของขนาด DNA ที่ปรากฏบนเจล ผ่านเครื่อง Gel documation (Biorad; USA) เพื่อดูการแสดงออกของยีนและวัดความเข้มของแถบ DNA เป้าหมาย

ผลการทดลอง

ผลของการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

การศึกษาความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์อ่อนแอต่อยาในกลุ่ม Gentramicin, Kanamycin, Tetracycline และ Spectinomycin ในระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ ส่วนยาปฏิชีวนะที่แบคทีเรียความต้านทาน ได้แก่ Ampicillin และ Neomycin ส่วนยาปฏิชีวนะจำพวก Streptomycin พบว่าแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. PS-5 และ *Burkholderia kururiensis* SS-5 อ่อนแอ แต่ *Klebsiella variicola* SS-2 ต้านทานต่อยาดังกล่าว (ตาราง 80)

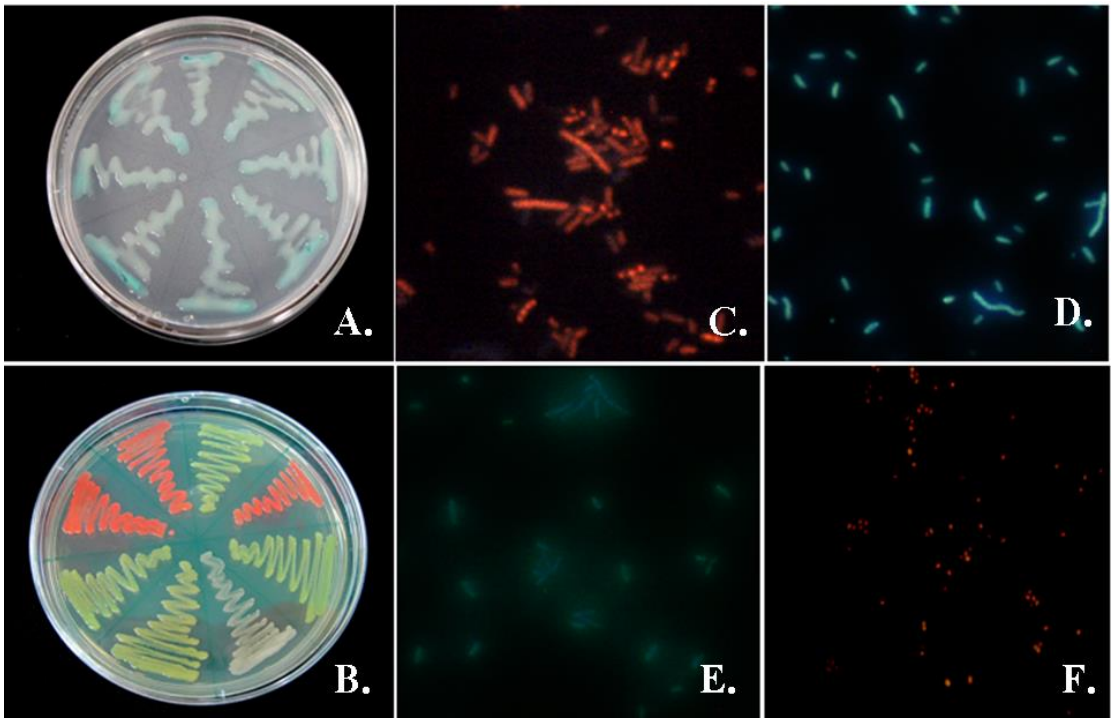
การใช้ยีนโปรตีนเรืองแสงร่วมกับยีนบีต้ากูลคูโรนิเดสในการติดตามแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในข้าว

การนำ reporter gene สู่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนโดยนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน GFP, DsRed และ Gus ที่ได้ส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. PS-5, *Klebsiella* sp. SS-2 และ *Burkholderia* sp. SS-5 พบว่าพลาสมิดลูกผสมที่มียีน Gus สามารถส่งผ่านได้อย่างสมบูรณ์โดยแบคทีเรียสร้างสารสีฟ้าบนอาหาร LB ที่มีส่วนผสมของ X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt) และ spectinomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพ 100A) และแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ 3 ชนิดสามารถนำ พลาสมิดลูกผสมที่มียีน GFP หรือ DsRed ได้สำเร็จโดยปรากฏการเปลี่ยนสีของเชื้อบนอาหาร LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะปฏิชีวนะ tetracycline 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพ 100B) โดยที่แบคทีเรีย *Sphingomonas sp.* PS-5 สามารถนำ พลาสมิดลูกผสมที่มียีน DsRed และ GFP เข้าสู่แบคทีเรียได้ (ภาพ 100C และ 100D) ส่วน *Klebsiella sp.* SS-2 สามารถนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน DsRed (ภาพ 100F) และ *Burkholderia* sp. SS-5 สามารถนำพลาสมิดลูกผสมที่มียีน GFP (ภาพ 100E) และเมื่อทำการตรวจสอบภายใต้กล้อง Inverted microscope

ตาราง 80 ผลของการตอบสนองต่อยาปฏิชีวนะในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

ชื่อสายพันธุ์	LB	Amp^{20}	Amp^{50}	Gen$_{25}$	Gen$_{50}$	Kan^{25}	Kan$_{50}$	Neo$_{25}$	Neo$_{50}$	Tet^{50}	Tet$_{100}$	Spe$_{100}$	Spe$_{300}$	Str^{100}	Str^{300}
Sphingomonas sp. PS-5	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Klebsiella variicola SS-2	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Burkholderia kururiensis SS-5	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

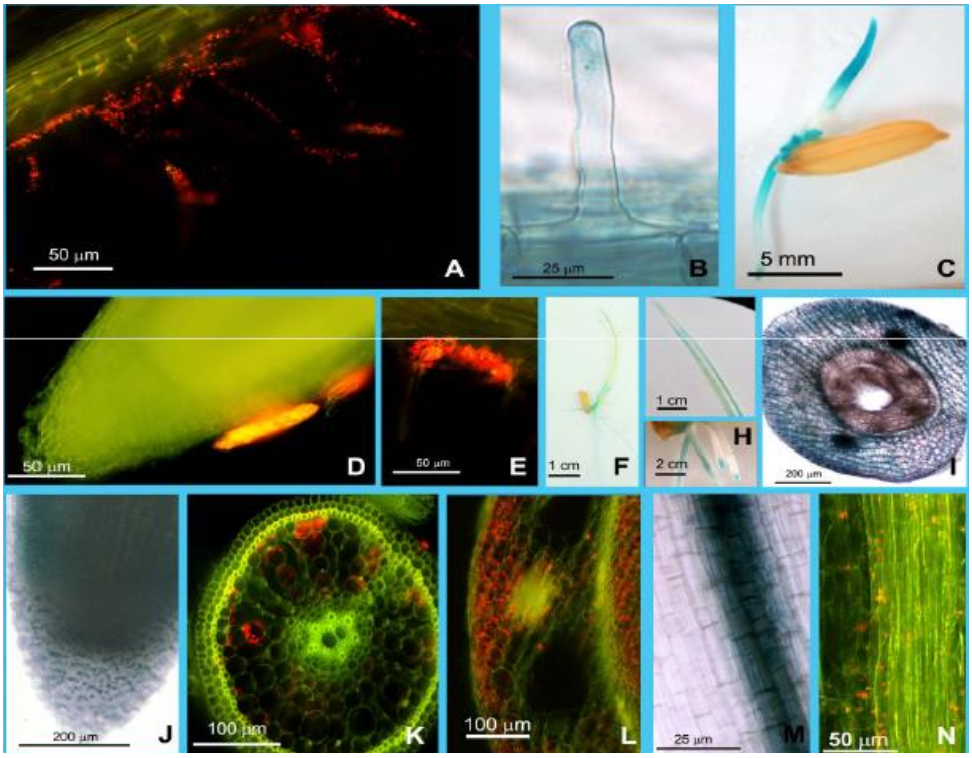
หมายเหตุ: Amp = Ampicillin, Gen = Gentamicin, Kan = Kanamycin, Neo = Neomycin, Spe = Spectinomycin, Str = Streptomycin, Tet = Tetracycline



ภาพ 100 ผลการนำ reporter gene สู่แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน A) การแสดงออกของยีน Gus บนอาหาร LB+X-Gluc+spe 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร B) การแสดงออกของยีน GFP และ DsRed บนอาหาร LB +Tet 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร C และ D) เซลล์เชื้อ *Sphingomonas sp.* PS-5 ที่มียีน DsRed และ GFP E) เซลล์เชื้อ *Burkholderia sp.* SS-5 ที่มียีน GFP F) เซลล์เชื้อ *Klebsiella sp.* SS-2 ที่มียีน DsRed

การติดตามแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ในข้าวของเชื้อ *Sphingomonas* sp. ไอโซเลท PS-5 พบว่าหลังจากทำการปลูกเชื้อลงสู่ข้าวที่กำลังออกได้ 1 วัน พบว่าแบคทีเรียสามารถเข้าครอบครองรากโดยยึดติดอยู่บริเวณชั้น epidermis ของรากข้าวโดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ root hair ด้านบนติดกับส่วนของเมล็ด ส่วนถัดลงไปทางปลายรากพบกลุ่มแบคทีเรียเกาะอยู่บริเวณผนัง epidermis cell ของรากข้าว (ภาพ 101A) ทั้งยังพบเกาะอยู่บริเวณ root cap (ภาพ 101D) และบริเวณหนึ่งที่พบการยึดเกาะของแบคทีเรียจำนวนมากคือบริเวณ lateral root (ภาพ 101E) หลังจากปลูกเชื้อ *Sphingomonas* sp. ไอโซเลท PS-5 สู่ข้าวเป็นเวลาเป็นเวลา 2 วัน ทำการย้อมสีด้วย X-Glu พบว่าเชื้อสามารถเข้าครอบครองข้าวได้ทั้งในส่วนของรากและลำต้น ซึ่งพบความหนาแน่นของเชื้อมากบริเวณรอยต่อกับส่วนของเมล็ด (ภาพ 101B และ 101C) โดยจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Sphingomonas* sp. ไอโซเลท PS-5 สามารถเข้าครอบครองภายใน root hair อยู่เป็นจำนวนมาก และสามารถเข้าไปอยู่ภายใน root cap (ภาพ 101F, 101H และ 101J) และอีกบริเวณที่พบแบคทีเรียอยู่มากคือบริเวณปลายยอด (ภาพ 101G) และเมื่อศึกษาภายในเนื้อเยื่อพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญอยู่ได้ทั้งในส่วนของ inter- และ intra- space ทั้งในส่วน

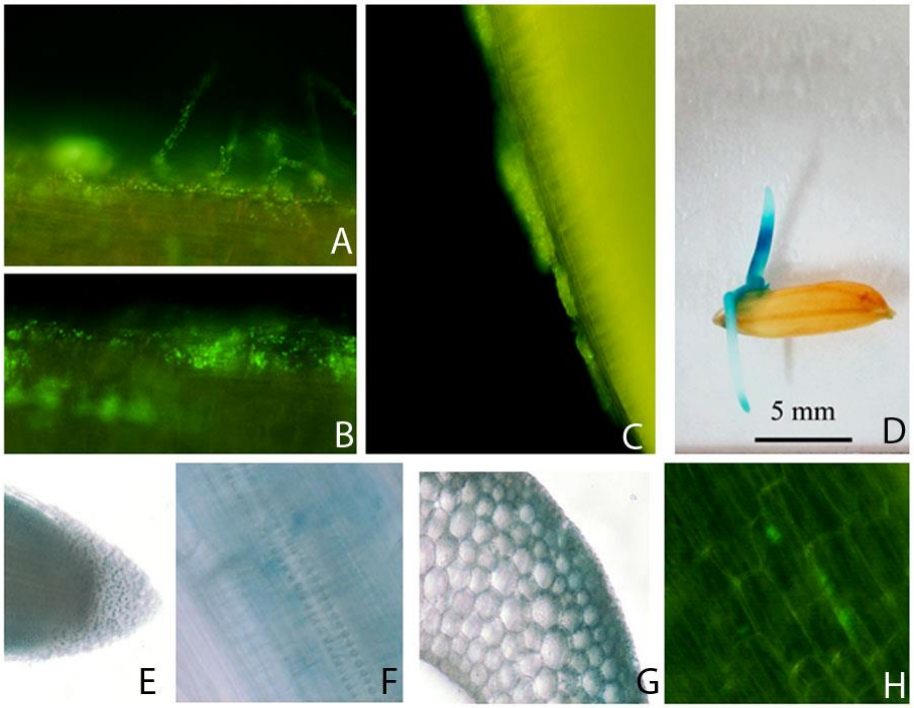
ของ ราก (ภาพ 101K) ต้น (ภาพ 101L) และยังพบหนาแน่นบริเวณท่อลำเลียง (ภาพ 101M และ 101N)



ภาพ 101 การ colonization ของ *Sphingomonas sp.* PS-5 A: บริเวณ root hair B: บริเวณรอยต่อกับส่วนของเมล็ด C: บริเวณที่แบคทีเรียเข้าครอบครองข้าวทั้งในส่วนของรากและลำต้น D: บริเวณ root cap E: บริเวณ lateral root F: บริเวณที่มีการเข้าครอบครองภายใน root hair H: บริเวณ root hair I: บริเวณเนื้อเยื่อของรากข้าว J: บริเวณ root cap K: บริเวณรากข้าวที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ในส่วนของ inter- และ intra- space L: บริเวณของใบข้าวที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ทั้งใน inter- และ intra- space M: บริเวณท่อลำเลียง N: บริเวณท่อลำเลี้ยงของข้าวที่มีการเข้าครอบครองของแบคทีเรีย

การเข้าครอบครองรากของแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ *Burkholderia sp.* SS-5 พบว่าหลังจากทำการปลูกเชื้อลงสู่ข้าวที่กำลังออกได้ 1 วัน พบว่าแบคทีเรียสามารถเข้าครอบครองรากโดยยึดติดอยู่บริเวณชั้น epidermis (ภาพ 102B) ของรากข้าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ root hair (ภาพ 102A) ด้านบนติดกับส่วนของเมล็ด ส่วนถัดลงไปทางปลายรากพบกลุ่มแบคทีเรียเกาะอยู่บริเวณผนัง epidermis cell ของรากข้าว (ภาพ 102C) หลังจากปลูกเชื้อ *Burkholderia sp.* SS-5 สู่ข้าวเป็นเวลาเป็นเวลา 2 วันทำการย้อมสีด้วย X-Glu พบว่าเชื้อสามารถเข้าครอบครองข้าวได้ทั้งในส่วนของราก และส่วนของลำต้น (ภาพ 102D) ซึ่งพบความหนาแน่นของเชื้อมากบริเวณรอยต่อกับส่วนของเมล็ด บริเวณ root cap (ภาพ 102E และ

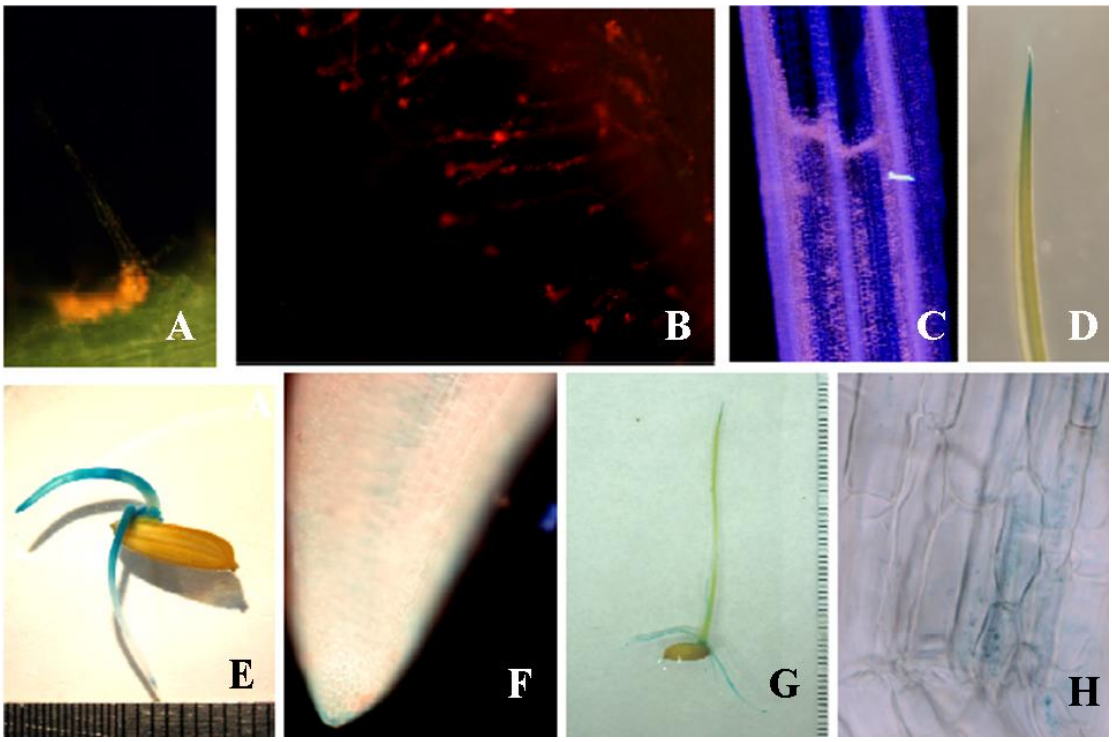
102F) และส่วนกลางของบริเวณที่จะเจริญเป็นลำต้น (ภาพ 102G) และใบ (ภาพ 102H) โดยจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Burkholderia sp.* SS-5 สามารถเข้าครอบครองภายใน root hair อยู่เป็นจำนวนมาก และสามารถเข้าไปอยู่ภายใน root cap ส่วนของข้าวที่จะเจริญเป็นลำต้นและใบนั้น *Burkholderia sp.* SS-5 สามารถแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์และภายในเซลล์ของข้าวได้ แต่ไม่พบการรวมตัวในลักษณะ micro-colonies



ภาพ 102 การ colonization ของ *Burkholderia sp.* SS-5 ของข้าว, A: บริเวณ root hair, B: บริเวณ epidermis, C: กลุ่มแบคทีเรียเกาะอยู่บริเวณผนัง epidermis cell ของรากข้าว, D: ส่วนต่างที่สามารถเข้า colonization ในข้าวบริเวณ root hair, E: บริเวณ root cap, F: บริเวณภายใน root cap, G: บริเวณภายในส่วนเนื้อเยื่อเจริญของต้นข้าว H: บริเวณภายในส่วนเนื้อเยื่อเจริญของใบข้าว

การติดตามแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ในข้าวของเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลท SS-2 พบว่าหลังจากทำการปลูกเชื้อลงสู่ข้าวที่กำลังออกได้ 1 วัน พบว่าแบคทีเรียสามารถเข้าครอบครองรากโดยยึดติดอยู่บริเวณชั้น epidermis (ภาพ 103A) ของรากข้าวโดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ root hair (ภาพ 103B) ด้านบนติดกับส่วนของเมล็ด ส่วนบริเวณถัดไปทางปลายรากพบกลุ่มแบคทีเรียเกาะอยู่บริเวณผนัง epidermis cell ของรากข้าว หลังจากปลูกเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลท SS-2 ลงไปในข้าวเป็นเวลาเป็นเวลา 2 วันทำการย้อมสีด้วย X-Glu พบว่าเชื้อสามารถเข้าครอบครองข้าวได้ทั้งในส่วนของราก และลำต้นข้าวโดยพบความหนาแน่นของเชื้อบริเวณรอยต่อของเมล็ดเป็นจำนวนมาก โดยจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลท SS-2 สามารถ

เข้าครอบครองภายใน root hair (ภาพ 103E) อยู่เป็นจำนวนมาก และสามารถเข้าไปอยู่ภายใน root cap (ภาพ 103F) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียบริเวณปลายยอด (ภาพ 103C และ 103D) อยู่เป็นจำนวนมาก และเมื่อศึกษาภายในเนื้อเยื่อพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญอยู่ระหว่างเซลล์และภายในเซลล์ของข้าว (ภาพ 103G และ 103H)

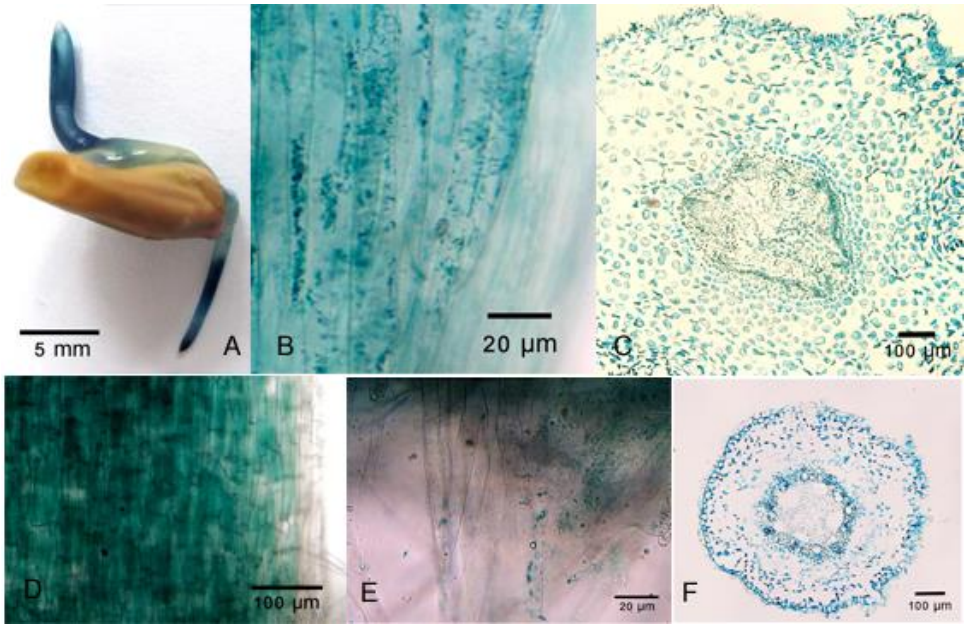


ภาพ 103 การ colonization ของ *Klebsiella sp.* SS-2 A: บริเวณชั้น epidermis, B: บริเวณ root hair, C: กลุ่มแบคทีเรียเกาะอยู่บริเวณผนัง epidermis cell บริเวณต้นของข้าว, D: บริเวณปลายยอด E: บริเวณ root hair, F: บริเวณ root cap G: กลุ่มแบคทีเรียที่เข้าครอบครองข้าวทั้งในส่วนของราก และลำต้นของข้าว, H: กลุ่มแบคทีเรียสามารถเจริญอยู่ระหว่างเซลล์และภายในเซลล์ของข้าว

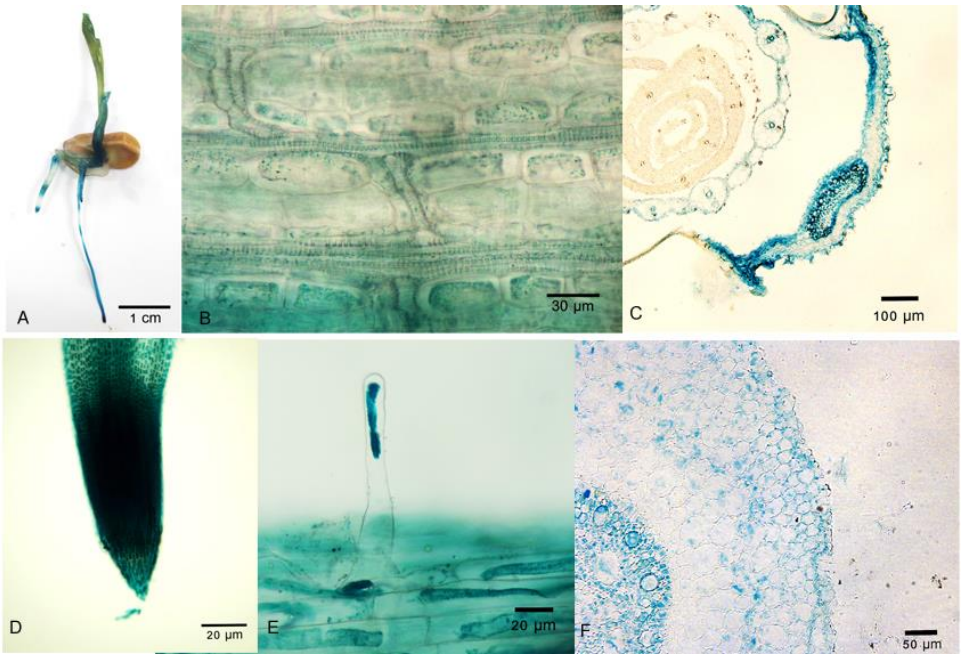
การใช้ยีนบีต้ากูลคูโรนิเดสในการติดตามแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนในพืช (non-host) ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วและงา

การติดตามแบคทีเรียเอนโดไฟท์แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Burkholderia* sp.SS-5 หลังจากทำการปลูกแบคทีเรียทดสอบลงใน ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วและงา พบว่า แบคทีเรีย *Burkholderia* sp.SS-5 หลังจากทำการปลูกลงสู่ข้าวโพดที่กำลังออกได้ 1 วัน พบว่า แบคทีเรียสามารถเข้าครอบครองส่วนที่จะพัฒนาไปเป็นราก ลำต้นและใบ (ภาพ 104A) โดยสามารถเข้าไปอาศัยอยู่ได้ทั้งในส่วนของ inter- และ intra- space ของ epicotyl (ภาพ 104B) และ radical (ภาพ 104D) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ root hair (ภาพ 104E) เมื่อนำเนื้อเยื่อที่ติดสีไปตัดตามขวาง พบว่า มีการเข้าครอบครองของแบคทีเรียในบริเวณเนื้อเยื่อ epidermis, cortex และ vascular tissue ทั้งใน epicotyle (ภาพ 104C) และ radical (ภาพ 104F) และเมื่อทำการปลูก

แบคทีเรียดังกล่าวได้ 7 วัน พบว่าเชื้อยังมีความหนาแน่นและเจริญอยู่ในในทุกๆส่วนของพืช (ภาพ 105)

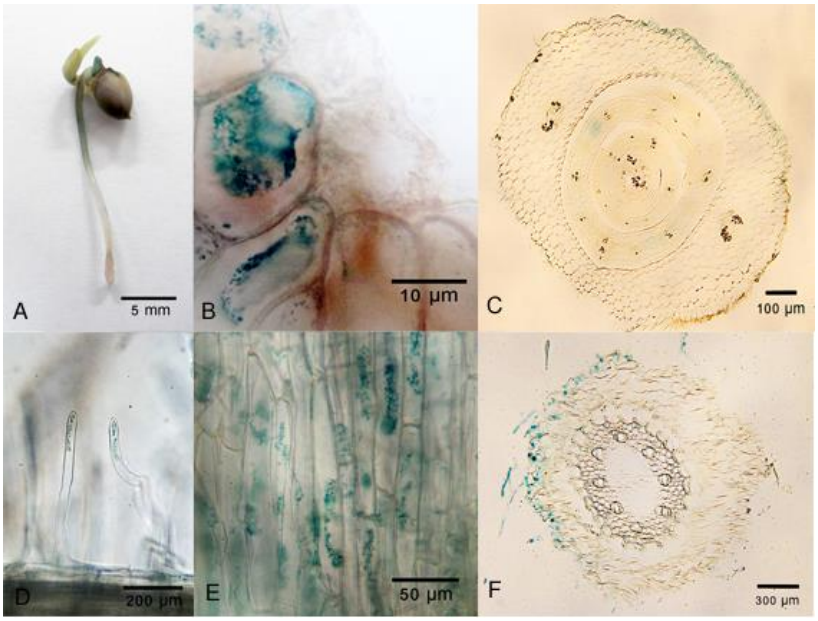


ภาพ 104 การเข้าครอบครองข้าวโพด 1 วันหลังปลูกแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 บริเวณเนื้อเยื่อ epicotyle และ radical (A), บริเวณ epicotyle มีแบคทีเรียเจริญอยู่ในส่วนของ inter- และ intra- space (B), บริเวณ epidermis, cortex และ vascular tissue ใน epicotyle (C), บริเวณ radical มีแบคทีเรียเจริญอยู่ในส่วนของ inter- และ intra- space (D), บริเวณขนราก (E) และบริเวณ epidermis, cortex และ vascular tissue ใน radical (F)

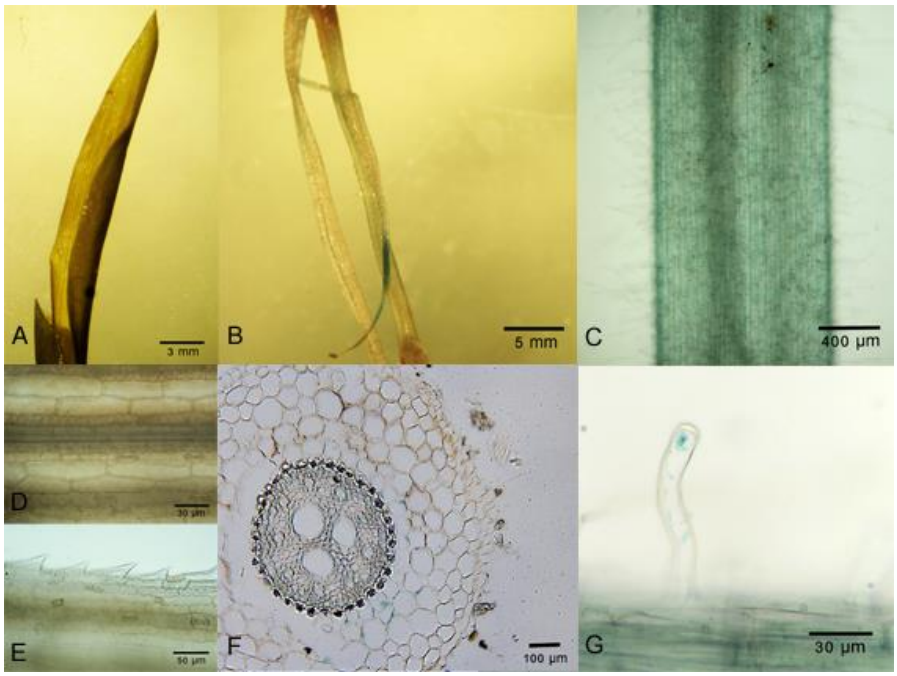


ภาพ 105 การเข้าครอบครองข้าวโพด 7 วันหลังปลูกแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 บริเวณส่วนที่จะเจริญไปเป็นใบ ลำต้น และราก (A), บริเวณที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ในส่วนของ inter- และ intra- space ของใบ (B), บริเวณใบ (C), บริเวณ ปลายราก (D), บริเวณขนราก (E) และบริเวณ epidermis, cortex และ vascular tissue ใน บริเวณราก (F)

หลังจากปลูกแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 ในข้าวฟ่าง 1 วัน พบว่า สามารถเข้าครอบครองได้ทั้งในส่วนที่จะพัฒนาไปเป็นราก ลำต้น และใบ (ภาพ 106A) แต่จะปรากฏการติดสีหลังจากย้อมไม่มากนัก ซึ่งสามารถพบได้ในบริเวณส่วนที่จะเจริญไปเป็นใบซึ่งจะพบได้ในชั้นของ epidermis (ภาพ 106C) โดยเชื้อสามารถเข้าไปอยู่ในบริเวณ inter- และ intra- space ของใบ (ภาพ 106B) ส่วนบริเวณรากพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเข้าไปได้โดยพบในชั้นของ epidermis (ภาพ 106F) และบริเวณของขนรากพบชุมชนของแบคทีเรียเจริญอยู่ (ภาพ 106D) โดยเข้าไปอยู่ในบริเวณ inter- และ intra- space ภายในรากได้อีกด้วย (ภาพ 106E) แต่หลังจากปลูกแบคทีเรียได้ 7 วัน พบว่า เชื้อมีการเข้าครอบครองต้นข้าวฟ่างได้น้อยลงโดยสังเกตจากบริเวณการติดสีที่บริเวณใบแทบจะไม่เห็นเลย (ภาพ 107A) แต่จะพบได้บางในบริเวณของราก (ภาพ 107B และ C) เมื่อนำมาทำการตัด section พบว่าบริเวณส่วนที่จะเจริญไปเป็นใบไม่พบว่ามีแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 อาศัยอยู่เลย (ภาพ 107D และ E) แต่จะพบแบคทีเรียดังกล่าวบริเวณรากในชั้นของ cortex และบริเวณขนราก (ภาพ 107G)

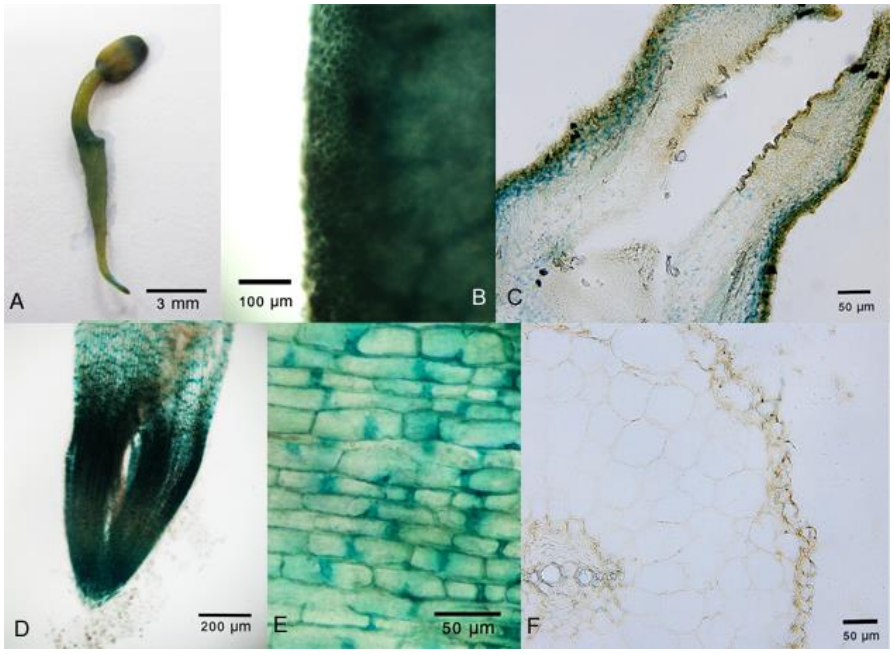


ภาพ 106 การเข้าครอบครองข้าวฟ่าง 1 วันหลังปลูกแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 บริเวณส่วนที่จะเจริญไปเป็นใบ ลำต้น และราก (A), บริเวณที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ในส่วนของ inter- และ intra- space ของใบ (B), บริเวณใบ (C), บริเวณขนราก (D), บริเวณรากที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ในส่วนของ inter- และ intra- space (E) และบริเวณราก (F)

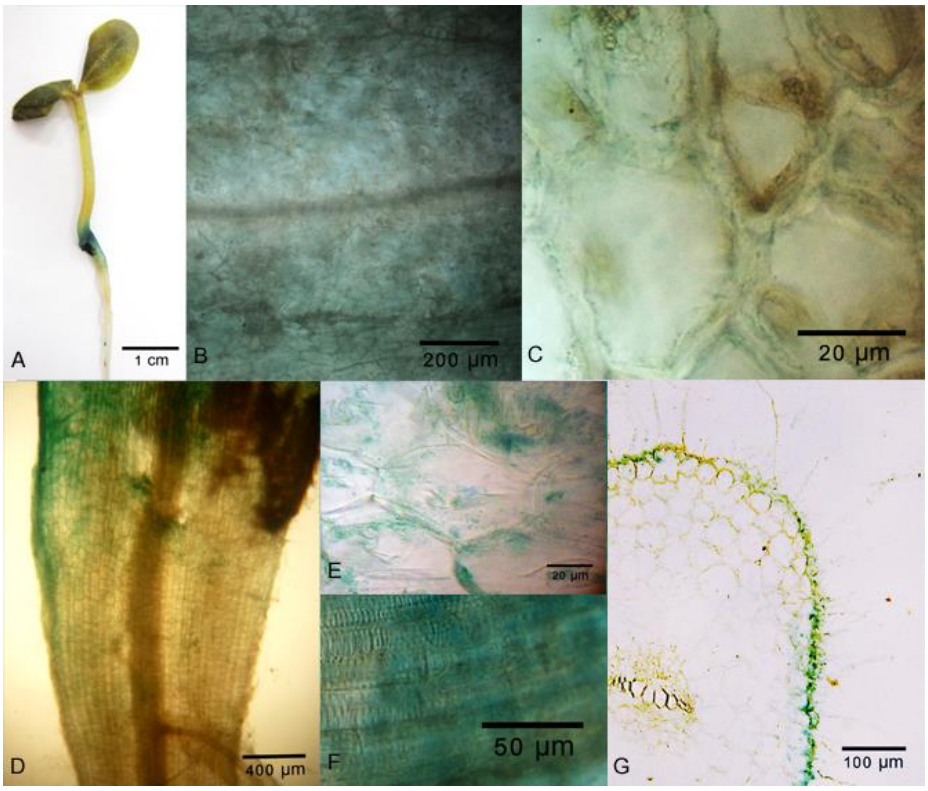


ภาพ 107 การเข้าครอบครองต้นข้าวฟ่าง 7 วันหลังปลูกแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 บริเวณส่วนที่จะเจริญไปเป็นใบ (A) และราก (B และ C), บริเวณเนื้อเยื่อภายในใบ (D และ E), บริเวณเนื้อเยื่อภายในราก (F), บริเวณขนราก (G)

แบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 สามารถเข้าครอบครองในงา โดยในวันที่ 1 หลังจากการปลูกแบคทีเรีย ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในส่วนที่จะพัฒนาไปเป็นราก ลำต้น และใบโดยเฉพาะบริเวณรอยต่อระหว่างลำต้นกับราก (ภาพ 108A) สามารถสังเกตได้จากการเข้าไปอาศัยอย่างหนาแน่นบริเวณใบ (ภาพ 108B) ซึ่งจะหนาแน่นอยู่ในชั้น epidermis (ภาพ 108C) ส่วนบริเวณปลายรากพบการเข้าไปอาศัยอยู่ของแบคทีเรียหนาแน่นเช่นกัน (ภาพ 108D) ซึ่งเข้าไปอยู่ทั้งในบริเวณ inter- และ intra- space ของราก (ภาพ 108E) ส่วนบริเวณชั้นของเนื้อเยื่อจะพบได้ที่บริเวณขนรากและและบริเวณของท่อลำเลี้ยง (ภาพ 108F) เมื่อข้าวฟ่างหลังปลูกแบคทีเรีย 7 วันมาตรวจดูการเข้าสู่พืช (ภาพ 109A) พบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน *Burkholderia* sp. SS-5 สามารถเคลื่อนย้ายไปได้ทั้งในส่วนใบ (ภาพ 109B) โดยเข้าไปอยู่ทั้งในบริเวณ inter- และ intra- space (ภาพ 109C) และบริเวณรอยต่อระหว่างรากกับต้น (ภาพ 109D) โดยพบในบริเวณเนื้อเยื่อของราก (ภาพ 109E และ F) และบริเวณชั้น epidermis และบริเวณขนราก (ภาพ 109G)

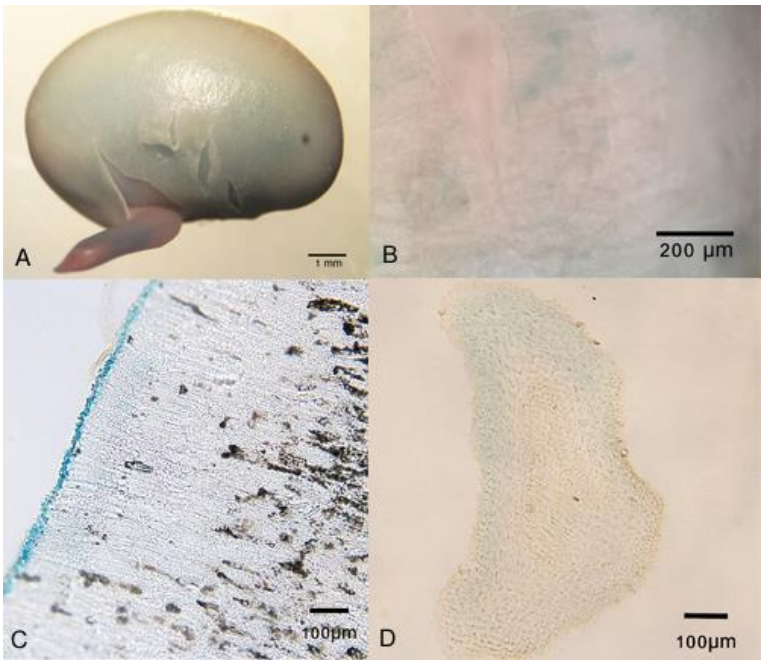


ภาพ 108 การเข้าครอบครองในงา 1 วันหลังปลูกแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 วันที่ 1 ในงา (A), ในส่วนของราก (B), ส่วนของใบ (C), ส่วนของลำต้น (D), บริเวณใบ (E) และบริเวณราก (F) ส่วนบริเวณลำต้น (G) ไม่พบการเข้าครอบครอง



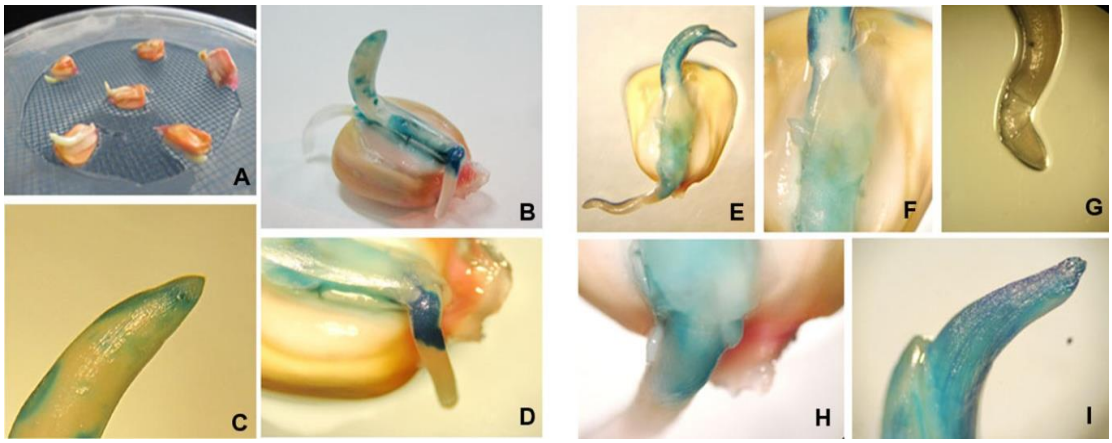
ภาพ 109 การเข้าครอบครองงา 7 วันหลังปลูกแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 (A), บริเวณเนื้อเยื่อของใบโดยเข้าไปอยู่ทั้งในบริเวณ inter- และ intra- space (B และ C) และบริเวณรอยต่อระหว่างรากกับต้น (D), บริเวณเนื้อเยื่อของราก (E และ F), บริเวณราก (G)

หลังปลูกแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 1 วันพบว่าสามารถเข้าครอบครองในถั่วเหลือง (ภาพ 110A) ได้ในบริเวณ cotyledon (ภาพ 110B) ซึ่งจะอยู่ในชั้นของ epidermis (ภาพ 110C) และพบได้ในบริเวณส่วนที่จะพัฒนาไปเป็นราก (ภาพ 110D) แต่เมื่อทำการตรวจสอบหลังจากการปลูก *Burkholderia* sp. SS-5 7 วัน พบว่าแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 สามารถเข้าครอบครองในถั่วเหลืองเฉพาะในส่วนของ cotyledon เท่านั้น

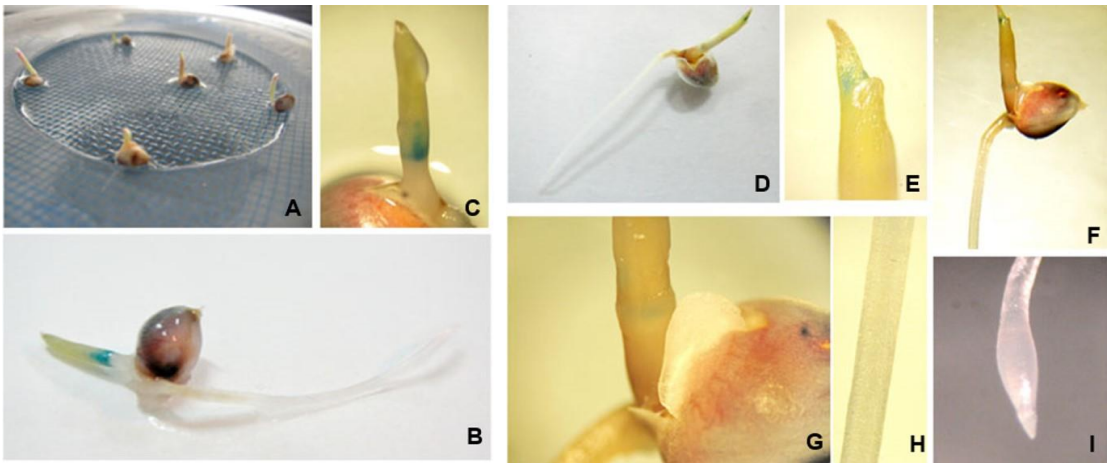


ภาพ 110 การเข้าครอบครองถั่วเหลือง 1 วันหลังปลูกแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. SS-5 (A) บริเวณเนื้อเยื่อ (B) และบริเวณ epidermis (C) ใน cotyledon, บริเวณเนื้อเยื่อของราก (D)

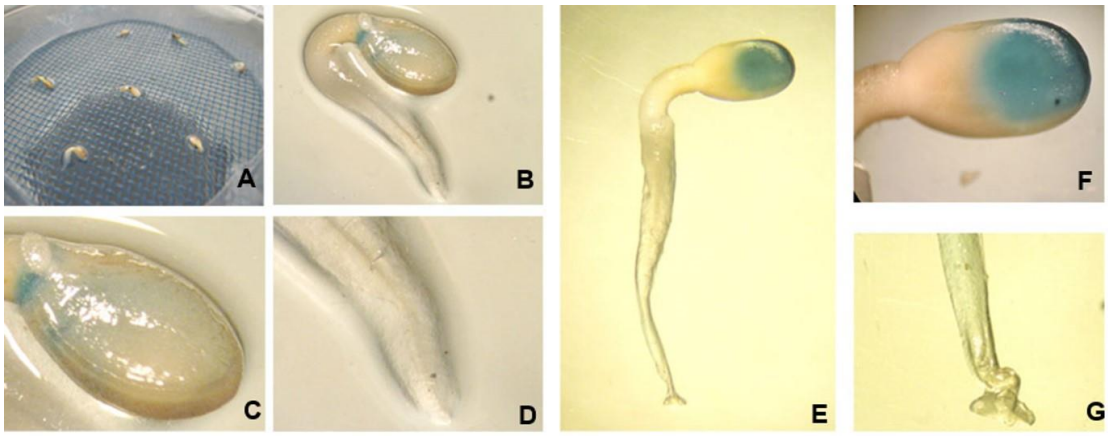
การติดตามแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลท SS2 พบว่าหลังจากทำการปลูกเชื้อลงใน ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วและงา พบว่าแบคทีเรียสามารถเข้าครอบครองในข้าวโพดในวันที่ 1 (ภาพ 111A-D) และวันที่ 3 (ภาพ 111E-I) โดยจะพบการเข้าครอบครองส่วนที่เจริญเป็นลำต้นและ และบริเวณรอยต่อระหว่างรากและลำต้นจะพบการเข้าครอบครองเป็นจำนวนมาก ส่วนในข้าวฟ่างในวันที่ 1 (ภาพ 112A-C) แบคทีเรียสามารถเข้าครอบครองเฉพาะบริเวณส่วนของลำต้น แต่ในวันที่ 3 (ภาพ 112D-I) พบแบคทีเรียสามารถเข้าครอบครองบริเวณลำต้นและปลายยอด ส่วนในงา ในวันที่ 1 (ภาพ 113A-D) มีการเข้าครอบครองแบคทีเรียบริเวณใบ และรอยต่อระหว่างต้นกับราก แต่ในวันที่ 3 (ภาพ 113E-G) พบแบคทีเรียเข้าครอบครองบริเวณปลายใบและปลายราก ในขณะที่ถั่วเหลืองไม่พบการเข้าครอบครองของแบคทีเรียในวันที่ 1 (ภาพ 114A-D) แต่ในวันที่ 3 (ภาพ 114E-I) พบการครอบครองของแบคทีเรียบริเวณลำต้น ราก และบริเวณรอยต่อระหว่างลำต้นและราก



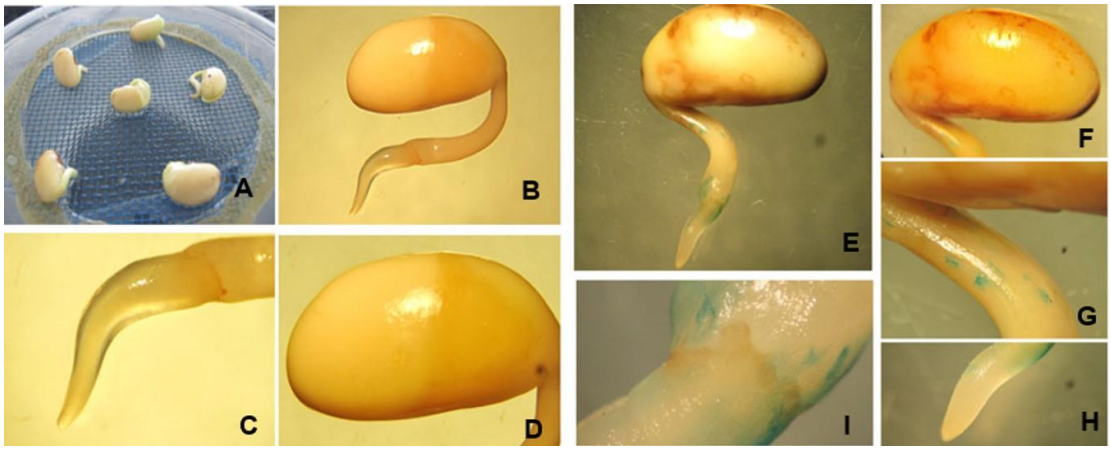
ภาพ 111 การ colonization ของเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลต SS2 ในต้นข้าวโพด A-D; การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 1 ในต้นข้าวโพด A: การเพาะกล้าพืชหลังแช่ในสารละลายเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลท SS2 B: บริเวณที่มีการเข้าครอบครองของแบคทีเรียในข้าวโพด C: บริเวณปลายยอด D: บริเวณรอยต่อระหว่างต้นและราก E-I; การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 3 ในต้นข้าวโพด E: บริเวณที่มีการเข้าครอบครองของแบคทีเรียในข้าวโพด F: บริเวณรอยต่อระหว่างต้นและราก G: บริเวณปลายราก H: บริเวณโคลนราก I: บริเวณปลายยอด



ภาพ 112 การ colonization ของเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลต SS2 ในต้นข้าวฟ่าง A-C; การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 1 ในต้นข้าวฟ่าง A: การเพาะกล้าพืชหลังแช่ในสารละลายเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลท SS2 B: บริเวณที่มีการเข้าครอบครองของแบคทีเรียในข้าวฟ่าง C: บริเวณลำต้น D-I; การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 3 ในต้นข้าวฟ่าง D: บริเวณที่มีการเข้าครอบครองของแบคทีเรียในข้าวฟ่าง E: บริเวณปลายยอด F-G: บริเวณลำต้น H: บริเวณราก I: บริเวณปลายราก



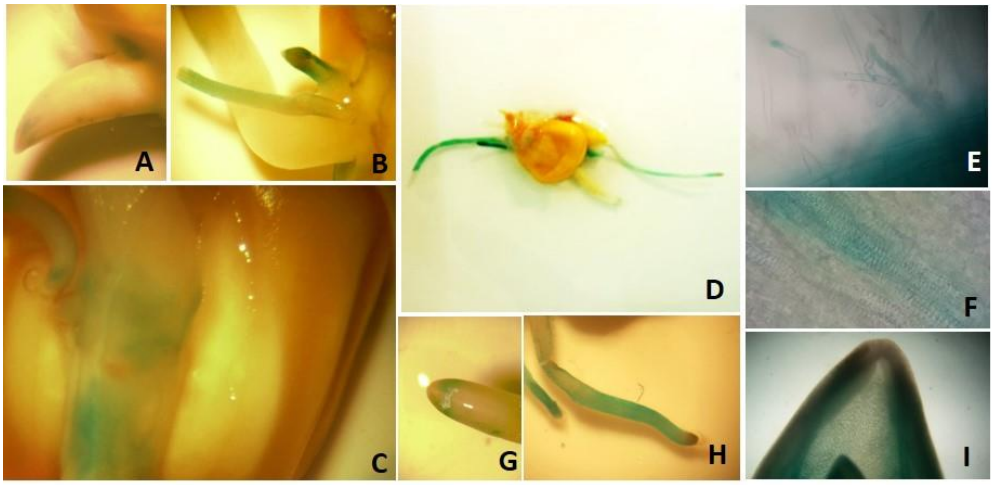
ภาพ 113 การ colonization ของเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลต SS2 ในงา A-D; การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 1 ในงา A: การเพาะกล้าพืชหลังแช่ในสารละลายเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลท SS2 B: บริเวณที่มีการเข้าครอบครองของแบคทีเรียในงา C: บริเวณใบ และบริเวณรอยต่อระหว่างใบกับลำต้น D: บริเวณปลายราก E-G; การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 3 ในงา E: บริเวณที่มีการเข้าครอบครองของแบคทีเรียในงา F: บริเวณปลายใบ G: บริเวณปลายราก



ภาพ 114 การ colonization ของเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลต SS-2 ในงา A-D; การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 1 ในถั่ว A: การเพาะกล้าพืชหลังแช่ในสารละลายเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลท SS-2 B: ไม่พบบริเวณที่มีการเข้าครอบครองของแบคทีเรียในงา C: บริเวณปลายราก D: บริเวณใบ E-I; การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 3 ในถั่ว E: บริเวณที่มีการเข้าครอบครองของแบคทีเรียในถั่ว F: บริเวณใบ G: บริเวณลำต้น H: บริเวณปลายราก I: บริเวณรอยต่อระหว่างลำต้นกับราก

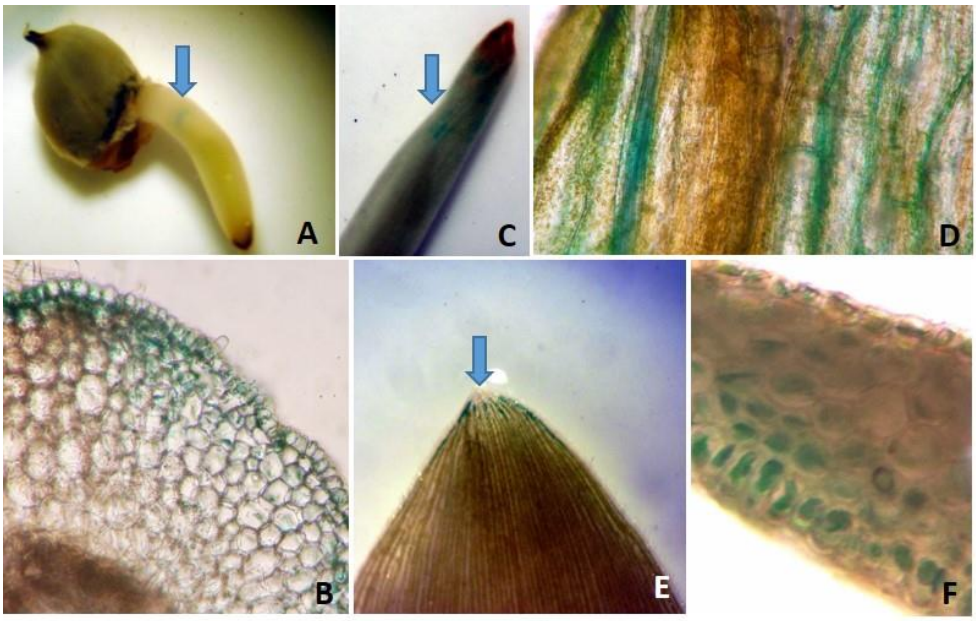
การติดตามแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Sphingomonas* sp. PS-5หลังจากทำการปลูกเชื้อลงใน ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วและงา

แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. PS-5 สามารถเข้าครอบครองในข้าวโพด (ภาพ 115) ได้ชัดเจนในวันที่ 1 หลังจากการปลูกเชื้อ ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในส่วนที่จะพัฒนาไปเป็นราก (ภาพ 115A) ราก (ภาพ 115B) และรอยต่อระหว่างรากลำต้น (ภาพ 115C) รวมไปถึงเมื่อข้าวโพดเจริญเป็นระยะเวลา 7 วันหลังจากการปลูกเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน *Sphingomonas* sp. PS-5 สามารถเคลื่อนย้ายไปได้ทั้งทุกส่วนของข้าวโพด (ภาพ 115D) ตั้งแต่ขนราก (ภาพ 115E) ราก (ภาพ 115F และ G) ปลายราก (ภาพ 115H) จนกระทั่งในส่วนของปลายใบ (ภาพ 115I)



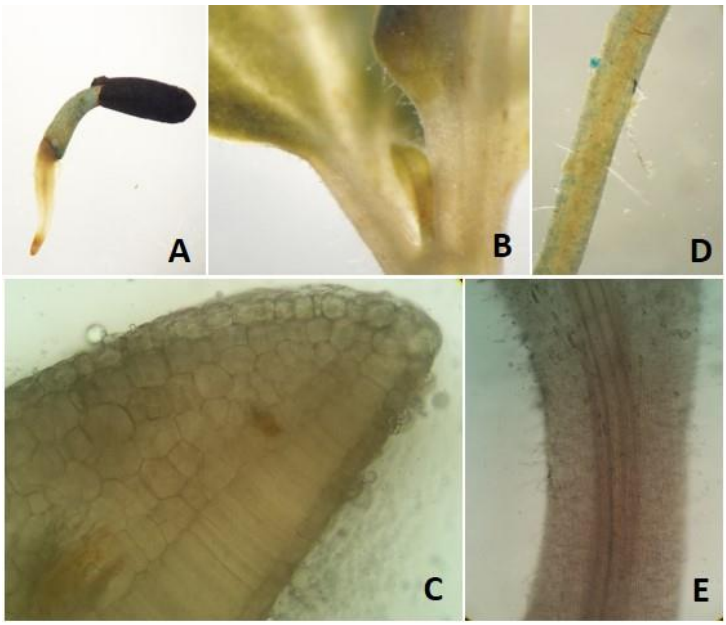
ภาพ 115 การ colonization ของ *Sphingomonas* sp. PS-5 ในข้าวโพด: การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 1 ในต้นข้าวโพด บริเวณปลายยอด (A), ราก (B), รอยต่อระหว่างรากลำต้น (C); การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 7 ในข้าวโพด (C); บริเวณขนราก (E) ราก (F และ G) ปลายราก (H) และปลายใบ (I)

แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. PS-5 สามารถเข้าครอบครองในข้าวฟ่าง (ภาพ 116) โดยในวันที่ 1 หลังจากการปลูกเชื้อ ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในส่วนที่จะพัฒนาไปเป็นราก (ภาพ 116A) เมื่อเจริญเป็นระยะเวลา 7 วันหลังจากการปลูกเชื้อ พบว่า เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน *Sphingomonas* sp. PS-5 สามารถเคลื่อนย้ายไปได้ทั้งในจากส่วนของราก (ภาพ 116B) และเคลื่อนย้ายไปยังใบ (ภาพ 116C และ D) และปลายใบ (ภาพ 116E และ F)



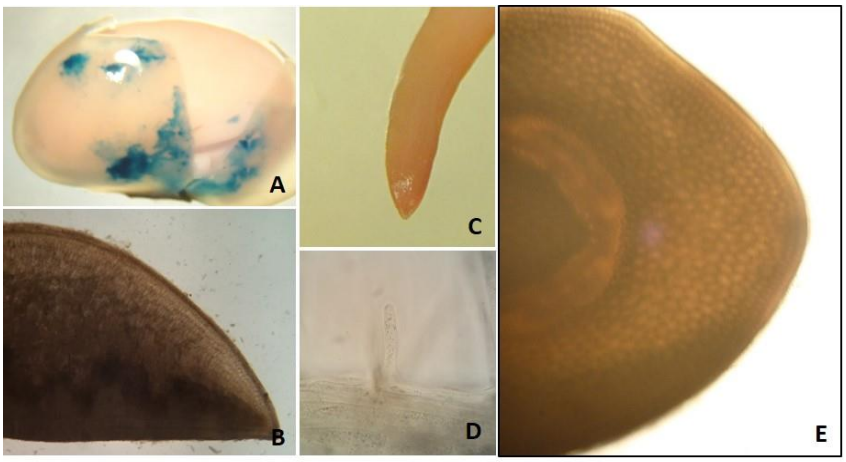
ภาพ 116 การ colonization ของ *Sphingomonas* sp. PS-5 ในข้าวฟ่าง: การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 1 ในต้นข้าวฟ่างในส่วนที่จะพัฒนาไปเป็นราก (A), และเคลื่อนย้ายการเข้าครอบครองจากราก (B) ไปยังบริเวณใบ (C และ D) หลังปลูกเชื้อได้ 7 วันและยังพบที่บริเวณปลายยอดอีกด้วย (E และ F)

แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. PS-5 สามารถเข้าครอบครองในงา (ภาพ 117) โดยในวันที่ 1 หลังจากการปลูกเชื้อ ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในส่วนที่จะพัฒนาไปเป็นลำต้น (ภาพ 117A) เมื่อข้าวฟ่างเจริญเป็นระยะเวลา 7 วันหลังจากการปลูกเชื้อ พบว่า บริเวณราก (ภาพ 117B และ C) และใบ (ภาพ 117D และ E) ไม่พบการเข้าครอบครองของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน *Sphingomonas* sp. PS-5 เลย



ภาพ 117 การ colonization ของ *Sphingomonas* sp. PS-5 ในงา: การเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 1 ในงาในส่วนที่จะพัฒนาไปเป็นลำต้น (A) เมื่อข้าวฟ่างเจริญเป็นระยะเวลา 7 วันหลังจากการปลูกเชื้อ ไม่พบการเข้าครอบครองของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน *Sphingomonas* sp. PS-5 บริเวณราก (B และ C) และใบ (18D และ E)

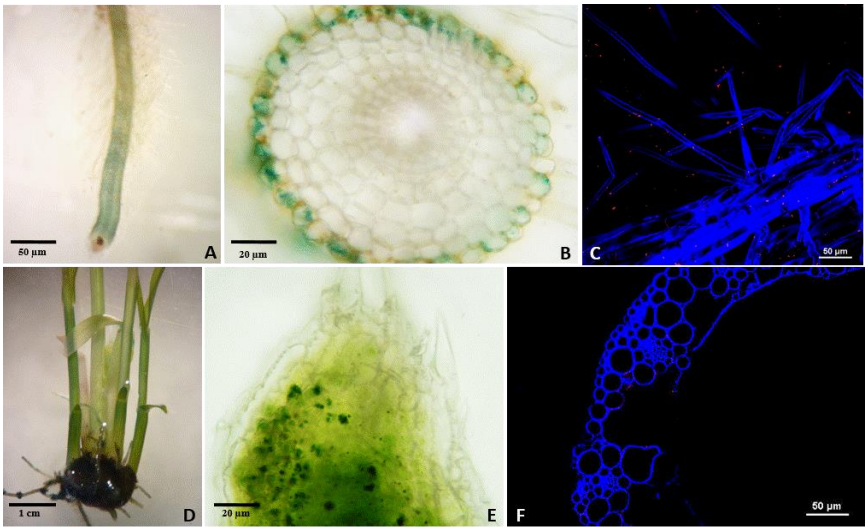
แบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. PS-5 ไม่สามารถเข้าครอบครองในถั่วเหลืองได้เลย นอกจากบริเวณที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ด (ภาพ 118A) ดังนั้นในบริเวณ cotyledon (ภาพ 118B) ราก (ภาพ 118C และ E) และขนราก (ภาพ 118D) ไม่พบการเข้าครอบครองของ *Sphingomonas* sp. PS-5 หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 1 และ 7 วัน



ภาพ 118 การ colonization ของ *Sphingomonas* sp. PS-5 ในถั่วเหลือง: ไม่พบการเข้าครอบครองของแบคทีเรียวันที่ 1 และ 14 วันในถั่วเหลือง บริเวณ cotyledon (B) ราก (C) และ (E) และขนราก (D) แต่พบที่เปลือกหุ้มเมล็ด (A)

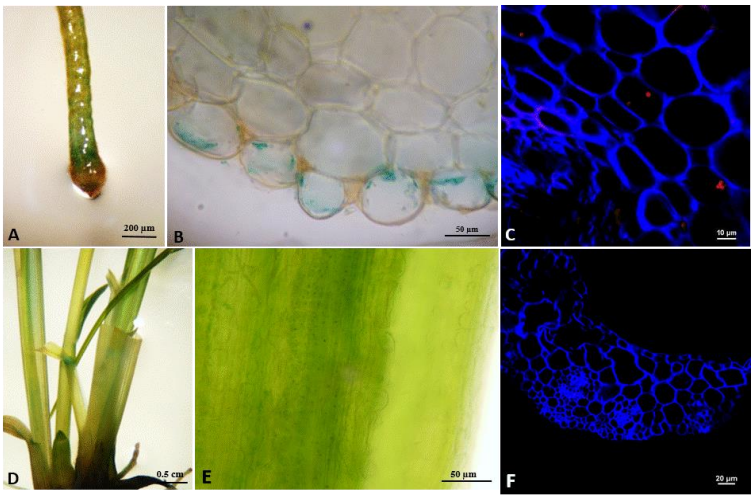
การใช้ยีนโปรตีนเรืองแสง (Florescent Protein gene) ร่วมกับยีนบีต้ากูลคูโรนิเดส (β-glucuronidase, gus gene) ในการติดตามแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในอ้อย

การติดตามแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ในอ้อยของเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลท SS-2 หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลาเป็นเวลา 7 วันทำการย้อมสีด้วย X-Glu ทำการปลูกเชื้อลงสู่เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงอ้อย พบว่า แบคทีเรียสามารถเข้าครอบครองราก (ภาพ 119A) โดยยึดติดอยู่บริเวณชั้น epidermis (ภาพ 119B) ของรากอ้อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณในส่วนของขนราก และสามารถพบกลุ่มของแบคทีเรียเป็นจำนวนมากบริเวณลำต้น (ภาพ 119D) และใบ (ภาพ 119E) อ้อย และเมื่อทำการติดตามด้วยยีนโปรตีนเรืองแสง DsRed พบการเข้าครองรากของเชื้อ *Klebsiella* sp. ไอโซเลท SS-2 ได้ทั่วบริเวณของราก (ภาพ 119C) แต่จะพบเชื้อได้เป็นจำนวนน้อยในส่วนของบริเวณใบ (ภาพ 119F)



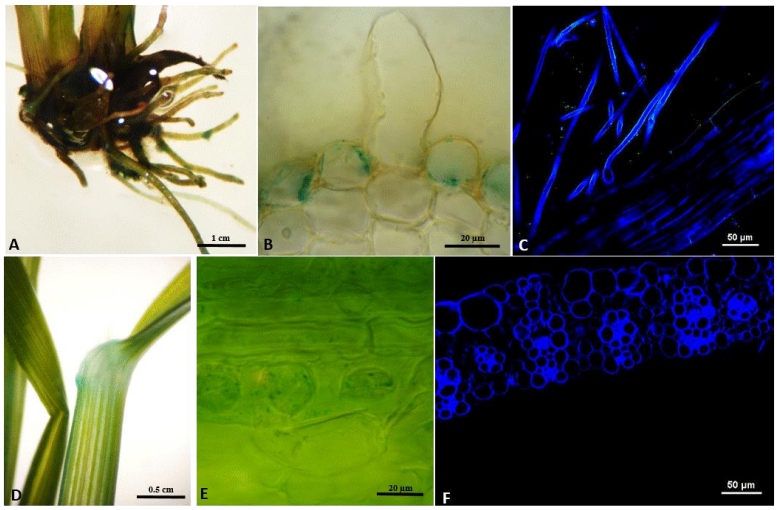
ภาพ 119 การ colonization ของ *Klebsiella sp.* SS-2 บริเวณราก (A) โดยสามารถพบการการเข้าครอบครอง epidermis cell (B) และ บริเวณขนราก (C) ส่วนบริเวณต้นอ้อย (D) สามารถพบการเข้าครอบครองบริเวณใบ (E และ F)

การติดตามแบคทีเรียเอ็นโดไฟท์ในอ้อยของเชื้อ *Burkholderia* sp. ไอโซเลท SS-5 หลังจากทำการปลูกเชื้อลงสู่เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงอ้อย และทำการย้อมสีด้วย X-Glu พบว่าเชื้อสามารถเข้าครอบครองข้าวได้ทั้งในส่วนของราก (ภาพ 120A) และลำต้นอ้อย (ภาพ 120D) โดยแบคทีเรียสามารถเข้าครอบครองรากโดยทำการยึดติดอยู่บริเวณชั้น epidermis cell และ cortex (ภาพ 120B) ของรากอ้อย และสามารถพบกลุ่มของแบคทีเรียได้ทั่วทั้งรากอ้อย แต่ส่วนบริเวณใบอ้อยจะพบการเข้าครอบครองได้ในปริมาณที่น้อยดังนั้นจะพบการเข้าครอบครองเฉพาะการย้อมสีด้วย X-Glu แต่จะไม่พบการเข้าครอบครองโดยการติดตามด้วยยีนโปรตีนเรืองแสง (ภาพ 120C และ F)



ภาพ 120 การ colonization ของ *Burkholderia* sp. SS-5 บริเวณราก (A) โดยสามารถพบการการเข้าครอบครอง epidermis cell และ บริเวณขนราก (B) ส่วนบริเวณต้นอ้อย (D) สามารถการเข้าครอบครองในปริมาณน้อยโดยการย้อมสีด้วย X-Glu (E) และจะไปพบการเข้าครอบครองโดยการติดตามด้วยยีนโปรตีนเรืองแสงทั้งในราก (C) และใบ (F)

การติดตามแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในอ้อยของเชื้อ *Sphingomonas* sp. ไอโซเลท PS-5 หลังจากทำการปลูกเชื้อลงสู่เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงอ้อย พบว่า แบคทีเรียสามารถเข้าครอบครองบริเวณราก (ภาพ 121A) โดยยึดติดอยู่บริเวณชั้น epidermis cell (ภาพ 121B) และขนรากอ้อย (ภาพ 121C) และสามารถพบกลุ่มของแบคทีเรียเป็นจำนวนมากบริเวณโคนรากของอ้อย หลังจากปลูกเชื้อ *Sphingomonas* sp. ไอโซเลท PS-5 ลงไปในอ้อยเป็นเวลาเป็นเวลา 7 วัน และจะพบเชื้อได้ในปริมาณที่น้อยในบริเวณใบอ้อย (ภาพ 121D,E และ F)



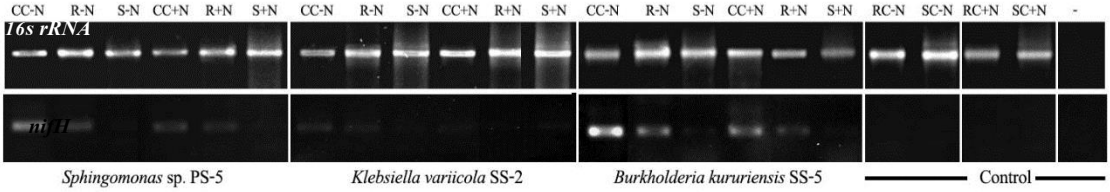
ภาพ 121 การ colonization ของ *Sphingomonas* sp. PS-5 บริเวณราก (A) โดยสามารถพบการการเข้าครอบครอง epidermis cell (B) และ บริเวณขนราก (C) ส่วนบริเวณใบอ้อยจะพบได้ในปริมาณที่น้อยมากหรือแทบไม่พบเลย (D,E,F)

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในข้าว

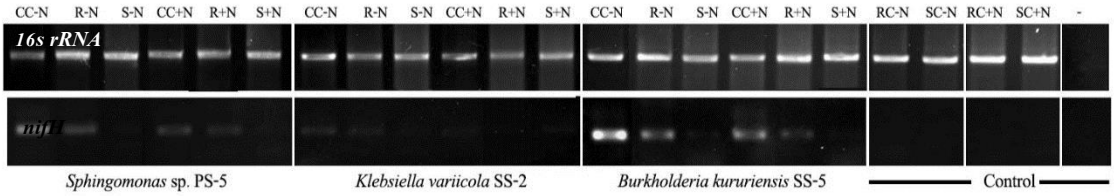
ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *ที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน* ของแบคทีเรีย *Sphingomonas* sp. PS-5, *Klebsiella variicola* SS-2 และ *Burkholderia kururiensis* SS-5 หลังจากปลูกลงข้าวเป็นเวลา 3 และ 14 วัน โดยเทคนิค semi quantitative RT-PCR เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนเพื่อยืนยันว่าในเนื้อเยื่อข้าวระหว่างทำการศึกษายังมีกิจกรรมของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ทั้งนี้พบว่ายีน 16S rRNA มีการแสดงออกในทุกเชื้อที่ทำการทดสอบ และทุกการทดลอง คือพบว่ามีการแสดงออกของยีน 16S rRNA ในแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนที่เลี้ยงในอาหารที่ปราศจากแหล่งในโตรเจน ข้าวอายุ 3 และ 14 วันที่เจริญในสารละลายธาตุอาหารพืชที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการปลูกเชื้อ, ข้าวอายุ 3 และ 14 วันที่เจริญในสารละลายธาตุอาหารพืชไม่มีแหล่งไนโตรเจน หลังแช่แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนความเข้มข้น $1x10^8$ cfu ต่อมิลลิลิตร, แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจน, ข้าวอายุ 3 และ 14 วัน ที่เจริญในสารละลายธาตุอาหารพืชมีแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีการปลูกเชื้อ และ ข้าวอายุ 3 และ 14 วันที่เจริญในสารละลายธาตุอาหารพืชมีแหล่งไนโตรเจน หลังแช่แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนความเข้มข้น $1x10^8$ cfu ต่อมิลลิลิตร (ภาพ 122A และ 123A) ซึ่งในกลุ่มการทดลองข้าวอายุ 3 และ 14 วันที่เจริญในสารละลายธาตุอาหารพืชไม่มี และมีแหล่งไนโตรเจนแต่ไม่มีการปลูกเชื้อสามารถพบการแสดงออกของยีน 16S rRNA นั้นอาจเป็นผลมาจากแบคทีเรียท้องถิ่นที่อาศัยอยู่ในเมล็ดข้าว ซึ่งไม่ใช่ผลจากการปนเปื้อนในระหว่างการทำ RT-PCR เนื่องจากจาก negative control ที่ใช้น้ำกลั่น ไม่พบ RT-PCR product

การแสดงของยีน *nifH* ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (การสังเคราะห์ Fe-protein การสังเคราะห์ FeMoco และ การสังเคราะห์ flavodoxin ซึ่งเมื่อปลูกเชื้อ *Sphingomonas* sp. PS-5, *Klebsiella variicola* SS-2 และ *Burkholderia kururiensis* SS-5 หลังจากปลูกลงข้าวเป็นเวลา 3 และ 14 วัน พบว่าวันที่ 3 หลังการปลูกเชื้อ แบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถแสดงออกในข้าวที่ปลูกในสภาพไม่มีแหล่งไนโตรเจน และมีแหล่งไนโตรเจนทั้งในส่วนของ ราก รวมไปถึงส่วนของ ต้นและใบ ส่วนเมื่อปลูกเชื้อ 14 วัน แบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถแสดงออกในข้าวที่ปลูกในสภาพไม่มีแหล่งไนโตรเจนและมีแหล่งไนโตรเจน ยกเว้น เชื้อ *Sphingomonas* sp. PS-5 และ *Burkholderia kururiensis* SS-5 ไม่พบการแสดงออกในส่วนของยีน *nifH* บริเวณใบและลำต้น ทั้งข้าวที่ปลูกในสภาพไม่มีแหล่งไนโตรเจน และมีแหล่งไนโตรเจน แต่อย่างไรก็ตามหลังจากการปลูกเชื้อลงข้าวทั้ง 3 และ 14 วันพบการแสดงออกได้ชัดเจนในข้าวที่ปลูกในสภาพไม่มีแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่า และเพื่อเป็นการยืนยันการแสดงออกของยีน *nifH* พบว่าข้าวที่ไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในข้าวลงไปก็ไม่ปรากฏ RT-PCR product หรือ ไม่พบการแสดงออกของยีนนั้นเอง อีกทั้งทำให้บอกได้ว่าแบคทีเรียท้องถิ่นที่ตรวจพบจากการแสดงออกของยีน 16S rRNA

ในกลุ่มการทดลองข้าวอายุ 3 และ 14 วันที่เจริญในสารละลายธาตุอาหารพืชไม่มี และมีแหล่งไนโตรเจนแต่ไม่มีการปลูกเชื้อนั้นไม่พบการแสดงออกของยีน *nifH* (ภาพ 23B และ 24B)



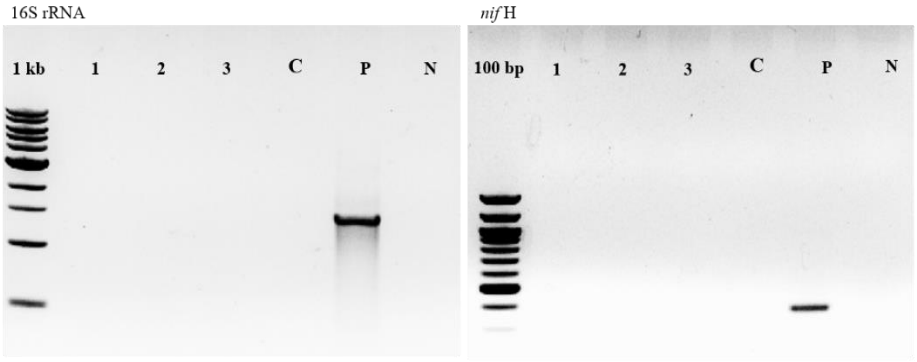
ภาพ 122 ผล RT-PCR ของ 16S rRNA ขนาด amplicon ประมาณ 1,500 bp และ *nifH* ขนาด amplicon 320 bp *ของ*แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในข้าวหลังการปลูกเชื้อ 3 วันโดย *อักษรย่อที่ปรากฏ* CC *คือ* แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนที่เลี้ยงในอาหาร; -N คือ ที่ปราศจากแหล่งในโตรเจน; +N คือ เติมแหล่งในโตรเจน, R คือ ราก, S คือ ส่วนลำต้นและใบ, RC คือ ส่วนของรากที่ไม่มีการปลูกเชื้อ และ SC คือ ส่วนของลำต้นและใบที่ไม่มีการปลูกเชื้อ



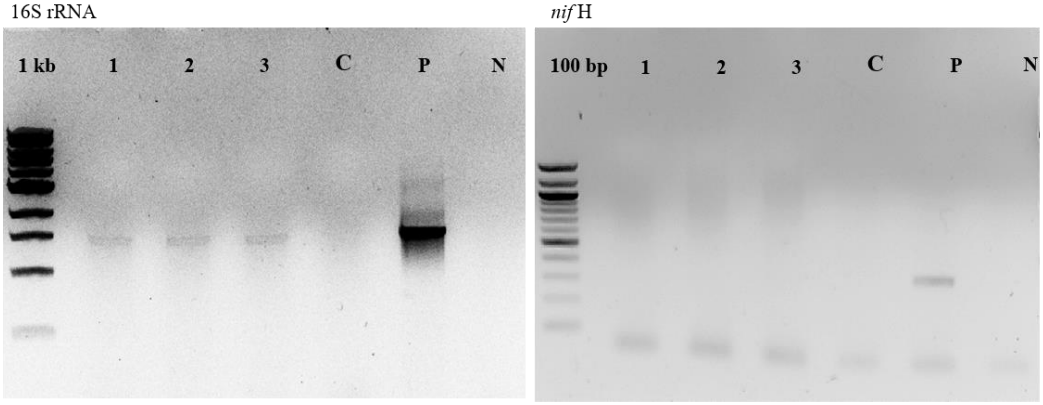
ภาพ 123 ผล RT-PCR ของ 16S rRNA ขนาด amplicon ประมาณ 1,500 bp และ *nif H* ขนาด amplicon 320 bp *ของ*แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนในข้าวหลังการปลูกเชื้อ 14 วันโดย *อักษรย่อที่ปรากฏ* CC *คือ* แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจนที่เลี้ยงในอาหาร; -N คือ ที่ปราศจากแหล่งในโตรเจน; +N คือ เติมแหล่งไนโตรเจน, R คือ ราก, S คือ ส่วนลำต้นและใบ, RC คือ ส่วนของรากที่ไม่มีการปลูกเชื้อ และ SC คือ ส่วนของลำต้นและใบที่ไม่มีการปลูกเชื้อ

***การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนของ*แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ตรึงไนโตรเจน *Sphingomonas* sp. PS-5 ในรากข้าวโพด**

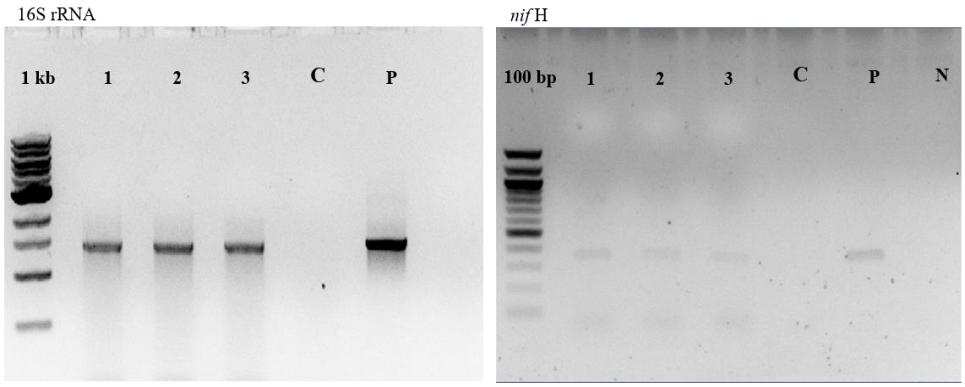
การศึกษาการแสดงออกของยีน *nifH* ของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน *Sphingomonas* sp. PS-5 ของรากข้าวโพด ในสภาวะที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน KNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 11.7 ppm ในอาหาร N-free เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR ที่แสดงถึงความสามารถในการแสดงออกของกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนด้วยลายพิมพ์แถบดีเอนเอในวันที่ 0 DAI (ภาพ 124), 3 DAI (ภาพ 125) และ 14 DAI (ภาพ 126) โดยนำมาเปรียบเทียบกับชุดยีนควบคุม 16S rRNA



ภาพ 124 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *nifH* ด้วยเทคนิค RT-PCR จากแถบลายพิมพ์ดีเอนเอ หลังจากปลูกเชื้อได้ 0 วัน โดยนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมของยีน 16S rRNA ในสภาวะที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน KNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 11.7 ppm

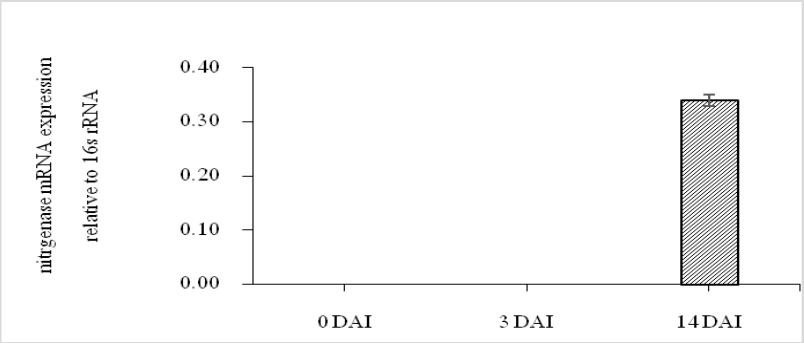


ภาพ 125 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *nifH* ด้วยเทคนิค RT-PCR จากแถบลายพิมพ์ดีเอนเอ หลังจากปลูกเชื้อได้ 3 วัน โดยนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมของยีน 16S rRNA ในสภาวะที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน KNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 11.7 ppm



ภาพ 126 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *nifH* ด้วยเทคนิค RT-PCR จากแถบลายพิมพ์ดีเอนเอ หลังจากปลูกเชื้อได้ 14 วัน โดยนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมของยีน 16S rRNA ในสภาวะที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน KNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 11.7 ppm

เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนไนโตรจีเนส ด้วยวิธี RT-PCR เทียบเคียงจากความเข้มแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ของรากข้าวโพดในสภาวะที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน KNO_3 ที่ระดับความเข้มข้น 11.7 ppm ในอาหาร N-free เป็นระยะเวลา 0, 3 และ 14 DAI พบว่ารากข้าวโพดที่ระยะเวลา 0 และ 3 DAI ไม่พบการแสดงออกของยีนไนโตรจีเนส แต่พบระดับการแสดงออกของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในวันที่ 14 DAI โดยอัตราส่วนระหว่างการแสดงของยีนไนโตรจีเนสต่อชุดยีนควบคุมของยีน 16S rRNA เท่ากับ 0.34±0.01 เท่าของกับชุดควบคุมของยีน 16S rRNA ดังแสดงดังภาพ 127



ภาพ 127 สัดส่วนการแสดงออกของยีน *nifH* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 16S rRNA ของรากข้าวโพดที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน KNO_3 ด้วยระดับความเข้มข้น 11.7 ppm ในอาหาร N-free เป็นระยะเวลา 0, 3 และ 14 DAI

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาการครอบครองและการแสดงออกของยีนในพืชอาศัยและไม่ใช่พืชอาศัยของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน พบว่าการติดตามด้วยยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP: Green Florescent Protein gene) หรือยีนโปรตีนเรืองแสงสีแดง (DsRed: Red Fluorescent protein gene) และ ยีนบีต้ากูลคูโรนิเดส (β-glucuronidase, gus gene) ของแบคทีเรียทั้งสามชนิดคือ *Sphingomonas* sp. PS-5, *Klebsiella* sp. SS-2 และ *Burkholderia* sp. SS-5 สามารถเข้าครอบครองพืชอาศัยข้าวได้ และสามารถเข้าไปเกาะที่บริเวณผิวราก เพิ่มจำนวนและเข้าครอบครองภายในเนื้อเยื่อทั้งอาศัยอยู่ในชั้น เอพิเดอร์มิส คอร์เทค รวมไปถึงท่อมัดลำเลียง นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถอาศัยอยู่ภายในเซลล์และระหว่างเซลล์ได้อีกด้วย ในขณะที่ทำการตรวจติดตามแบคทีเรียทั้งสามในพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัยที่เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และอ้อย ส่วนพืชใบเลี้ยงคู่ คือ ถั่วเหลือง และงา พบว่าการติดตามด้วยยีนบีต้ากูลคูโรนิเดส (β-glucuronidase, gus gene) สามารถย้อมติดสีฟ้าได้ดีในพืชที่เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวคือข้าวโพดและอ้อย แต่ในข้าวฟ่างพบการย้อมติดสีฟ้าได้น้อยมากเช่นเดียวกับพืชใบเลี้ยงคู่ของถั่วเหลืองและงา โดยพบเป็นบางบริเวณเท่านั้นที่มีการติดสี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อพืชอาศัยถึงแม้จะมีลักษณะของโครงสร้างของพืชคล้ายกันแต่ก็ไม่สามารถเข้า

ครอบครองพืชได้ทุกชนิด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rosenblueth และ Martínez-Romero (2006) ซึ่งได้รวบรวมแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถเข้าครอบครองในพืชอาศัยแต่ละชนิด แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดเดียวกันสามารถเข้าครอบครองกับพืชได้หลายชนิด ในขณะที่พืชชนิดเดียวก็สามารถพบแบคทีเรียเอนโดไฟท์ได้หลายชนิดในพืชเดียวกันก็ได้ และสามารถพบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Kobayashi และ Plumbo 2000; Zinniel et al. 2002) ดังนั้นความสามารถในการเข้าครอบครองของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในถั่วอัลฟัลฟา ผักกาดฝรั่ง ข้าวโพด พืชตระกูลฟักทอง ฝ้าย และมันฝรั่ง พบว่า มีปริมาณของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตามธรรมชาติมีอยู่ประมาณ 2.0-6.0 $\log_{10}$ CFU/g โดยทำการแพร่ขยายและเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในพืชอาศัยได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม อายุของพืช ชนิดของพืช ยังพบอีกว่าแบคทีเรียแบคทีเรียเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่จะอาศัยอยู่บริเวณรากมากกว่าในลำต้นและใบ (Kobayashi และ Palumbo 2000)

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่นำมาศึกษาทั้งสามชนิดล้วนแล้วแต่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนได้ดี แต่เมื่อทำการเข้าครอบครองพืชได้แต่กลับพบว่าระยะเวลาในการเข้าครอบครอง ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ และบริเวณที่แบคทีเรียเอนโดไฟท์เข้าครอบครองในพืชอาศัยเป็นปัจจัยทำให้มีความสามารถในการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน (Sessitsch et al. 2012; Ali et al. 2014) ได้รายงานถึงการแสดงออกของยีนที่ไปมีผลกระทบต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆ ของแบคทีเรียโดยไปมีผลต่อระบบและกลไกการอยู่รอดและการดำรงชีวิต เช่น การสื่อสารระหว่างเซลล์ กลไกการกำจัดของเสียออกจากเซลล์ กลไกการป้องกันตัวเองของแบคทีเรียจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม รวมไปถึงกลไกที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ และจากการศึกษาและตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจนยืนยันให้เห็นว่า การแสดงออกของยีนตรึงไนโตรเจนในพืชชนิดอาศัยสามารถเกิดขึ้นได้ดีกว่าพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัย และจะแตกต่างกันหลังจากมีการเรียนรู้และจดจำระหว่างแบคทีเรียกับพืชอาศัย ดังนั้นยีนควบคุมการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนในปัจจุบันพบว่ามีการใช้เมตาจีโนมิกส์ในการวิเคราะห์ *nifH* เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาความสัมพันธ์และการแสดงออกของยีนที่มีต่อพืชอาศัยได้อีกด้วย

จากการศึกษาวิจัยติดตามแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการตรึงไนโตรเจนและการแสดงออกของยีนแล้วหวังเป็นอย่างยิ่งว่าส่วนที่จะมีความเป็นไปได้และส่งผลต่อพืชอาศัย คือ การเปลี่ยนแปลงของธาตุแต่ละชนิดที่มีความจำเป็นต่อพืชต่อการเข้าครอบครองของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน และอาจจะต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อให้สามารถนำแบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจนนำไปใช้ได้จริงในอนาคตต่อไป

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียเอนโดไฟท์ตรึงไนโตรเจน *Klebsiella variicola* SS-2, *Burkholderia kururiensis* SS-5 และ *Sphingomonas* sp. PS-5 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการ

ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ก่อนนำมาติดฉลากด้วยยีน *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 สามารถเข้าครอบครองในพืชอาศัยข้าวทั้งในส่วนที่เป็นรากและต้น โดยเข้าครอบครองทั้งในชั้นเอพิเดอร์มิส คอร์เทกซ์ และมัดท่อลำเลี้ยง แต่สามารถเข้าครองครองข้าวฟ่าง ถั่วเหลืองและงา ได้น้อยมาก มีการแสดงออกยีนตรึงไนโตรเจน (*nifH*) ในพืชอาศัยข้าวได้ชัดเจนในข้าวที่ปลูกในสภาพไม่มีแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าที่มีแหล่งไนโตรเจน และพบการแสดงได้ดีในบริเวณรากข้าวของทุกเชื้อ

3. การศึกษาจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายฟอสฟอรัสและโปแตสเซี่ยม

3.1 จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพื่อให้ธาตุโพแทสเซียม

แยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการละลายและปลดปล่อยโพแทสเซียมจากตัวอย่างดินแปลงเกษตร ด้วยวิธี serial dilution plate count method บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่จาก Aleksandrov medium (ดัดแปลงจาก Parmar and Sindhu 2013) ที่ประกอบด้วย glucose 5 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม, $CaCO_3$ 0.1 กรัม, $FeCl_3$ 0.006 กรัม, Ca_3PO_4 2 กรัม, K_2HPO_4 3 กรัม, Agar 15 กรัม ในน้ำ deionized ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และผสมสี Bromthymol blue 5 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอช เป็น 7.0±0.2 เพื่อใช้เป็นดัชนีในการวัดความสามารถในการผลิตกรดของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเมื่อผสมสี Bromthymol blue ลงในอาหารจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเขียวและจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อมีสภาพเป็นกรด (ปิยะมาศ 2546)

การทำ dilution โดยชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในขวดน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่านาน 15 นาที ใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดน้ำ 9 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็น dilution ที่ 2 (10^{-2}) ทำเช่นเดียวกันจนถึง 10^{-6} ดูดสารละลายจาก dilution ที่ 10^{-6} , 10^{-5} และ 10^{-4} มา dilution ละ 0.1 มิลลิลิตร ทำการ spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถทำให้อาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง โดยใช้ loop แตะที่โคโลนีนั้นนำมา steak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Aleksandrov medium ที่ไม่ผสมสี Bromthymol blue เพื่อคัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์พร้อมทั้งบันทึกลักษณะ และเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ไว้ใน slant agar medium เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดินในแต่ละพื้นที่ตัวอย่าง ได้แก่ ค่าพีเอชของดินและธาตุอาหารในดิน เช่น อินทรีย์วัตถุ ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม

ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการละลายธาตุโพแทสเซียมด้วยวิธีการ spot test method (Sindhu et al. 1999) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับปรุงสูตรอาหาร ซึ่งประกอบด้วย glucose 5 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม, $CaCO_3$ 0.1 กรัม, $FeCl_3$ 0.006 กรัม, Ca_3PO_4 2 กรัม, แหล่งโพแทสเซียมจากธรรมชาติ 5 กรัม, Agar 15 กรัม ในน้ำ deionized

ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยแหล่งโพแทสเซียมที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่ ดินขาวระนอง และผงแร่ K-feldspar (ดัดแปลงจาก Girgis et al. 2008) บันทึกผลการสร้างโซนใส (solubilization zone) บริเวณรอบโคโลนีของเชื้อ (Parmar and Sindhu 2013)

ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการละลายและปลดปล่อยโพแทสเซียมโดยการนำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหาร nutrient broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อจากความขุ่น นำมาเทียบกับ Mcfarland No.0.5 จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{8} เซลล์/มล. ใช้เชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ส่วนเชื้อราเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar เป็นเวลา 3-5วัน แล้วใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. คอร์กเส้นใยเชื้อรา 1 ชิ้นลงในอาหาร Aleksandrov medium broth ที่เติมแร่โพแทสเซียม 1% บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 7,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที (Parmar and Sindhu 2013) แล้วดูดเอาเฉพาะส่วนใสในชั้น supernatant ไปวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียมที่พืชนำไปใช้ได้ (K^{+}) โดยใช้เครื่อง flame photometer

ทำการบ่งชี้เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ขนาดและรูปร่างของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของเส้นใย สีของสปอร์ ส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูโครงสร้างเส้นใย ลักษณะโครงสร้างและขนาดของสปอร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังนำเทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เพื่อบ่งชี้จุลินทรีย์ในระดับสปีชีส์ โดยใช้โปรแกรม BLAST และเปรียบเทียบข้อมูลดีเอ็นเอในฐานข้อมูล NCBI แล้วนำข้อมูลที่ได้มาจัดลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การทดสอบคุณสมบัติอื่นๆของเชื้อราที่คัดเลือก คือ *Aspergillus brasiliensis* SC301-1 เพื่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ การสร้างกรดอินทรีย์ การละลายฟอสเฟต การสร้างไซเดอโรฟอร์ และการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

การหาสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญและความสามารถในการละลายโพแทสเซียมของเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 โดยใช้ความแตกต่างของชิดอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ค่าพีเอช แหล่งคาร์บอน และแหล่งโพแทสเซียม

ผลการทดลอง

แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายและปลดปล่อยโพแทสเซียม

การสร้างกรดอินทรีย์เป็นกลไกสำคัญที่เชื้อจุลินทรีย์ใช้ละลายโพแทสเซียม จากการทดลองได้ทำการคัดแยกหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างกรด โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Aleksandrov medium (MA) ที่เติม bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ดังภาพ 128 ซึ่งจากผลการทดลองพบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างกรดได้ดังตาราง 81

ภาพ 128 เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

ตาราง 81 แสดงจำนวนไอโซเลตของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากสถานที่ต่างๆ

ตัวอย่างดิน	**จำนวนไอโซเลต**
ดินรอบรากต้นกาแฟ	2
ดินรอบรากต้นมันสำปะหลัง	7
ดินรอบรากต้นอ้อย	18
ดินรอบรากต้นข้าว	12
ดินรอบรากต้นข้าวโพด	3
ดินรอบรากต้นแตงร้าน	7
ดินรอบรากต้นยางพารา	4
ดินพื้นที่สำรวจแร่โปรแตซ จ.อุดรธานี 1	8
ดินพื้นที่สำรวจแร่โปรแตซ จ.อุดรธานี 2	6
เชื้อจากห้องปฏิบัติการ	12
รวม	**79**

การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของตัวอย่างดิน

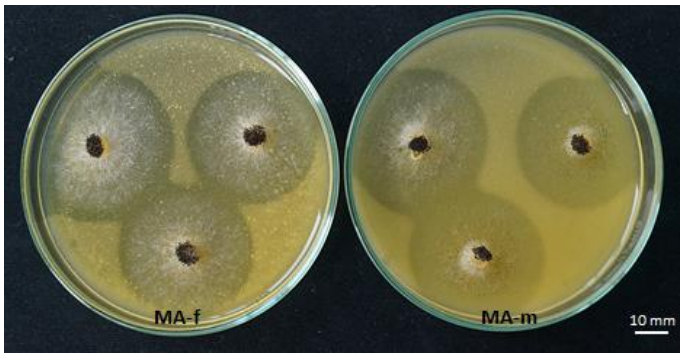
จากการเก็บตัวอย่าง 9 ตัวอย่าง คือ ดินรอบรากต้นกาแฟ, ดินรอบรากต้นมันสำปะหลัง, ดินรอบรากต้นอ้อย, ดินรอบรากต้นข้าว, ดินรอบรากต้นข้าวโพด, ดินรอบรากต้นแตงร้าน, ดินรอบรากต้นยางพารา และดินรอบต้นไม้บริเวณสำรวจแร่โปรแตซจังหวัดอุดรธานี 2 แห่ง นำมาตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติพื้นฐานทางเคมี ดังแสดงในตาราง 82

ตาราง 82 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติพื้นฐานทางเคมีของดินตัวอย่าง

ตัวอย่างดิน	พีเอช (pH)	อินทรียวัตถุ (OM) g/100g	ฟอสฟอรัส (P) mg/kg	โพแทสเซียม (K) mg/kg
ดินรอบรากต้นกาแฟ	3.60	5.77	87.46	109.57
ดินรอบรากต้นมันสำปะหลัง	5.09	1.43	14.80	19.13
ดินรอบรากต้นอ้อย	4.15	1.15	27.19	34.78
ดินรอบรากต้นข้าวโพด	4.84	1.82	15.34	109.57
ดินรอบรากต้นแตงร้าน	4.32	1.26	1.19	46.96
ดินรอบรากต้นข้าว	4.03	1.54	24.78	58.94
ดินรอบรากต้นยางพารา	5.11	1.21	32.52	26.29
ดินพื้นที่สำรวจแร่โปรแตซ จ.อุดรธานี 1	4.13	2.03	13.44	122.55
ดินพื้นที่สำรวจแร่โปรแตซ จ.อุดรธานี 2	4.36	1.95	24.36	114.85

ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการละลายโพแทสเซียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับปรุงสูตรอาหาร ซึ่งมีแหล่งโพแทสเซียมมาจากธรรมชาติ

การทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการละลายโพแทสเซียมได้ทำการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการที่เชื้อผลิตกรดออกมา โดยสังเกตลักษณะการสร้างโซนใส (solubilization zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแหล่งโพแทสเซียมที่ได้มาจากดินขาวระนองที่ประกอบด้วยแร่ไมกา 10% ผสมอยู่กับแร่คาโอลิไนต์และควอตซ์ (MA-m) และผงแร่ K-feldspar (MA-f) แทนการใช้สารเคมี K_2HPO_4 ดังภาพ 129 พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายธาตุโพแทสเซียมที่มีในแร่ดินจากธรรมชาติ จำนวน 33 ไอโซเลท ดังตาราง 83



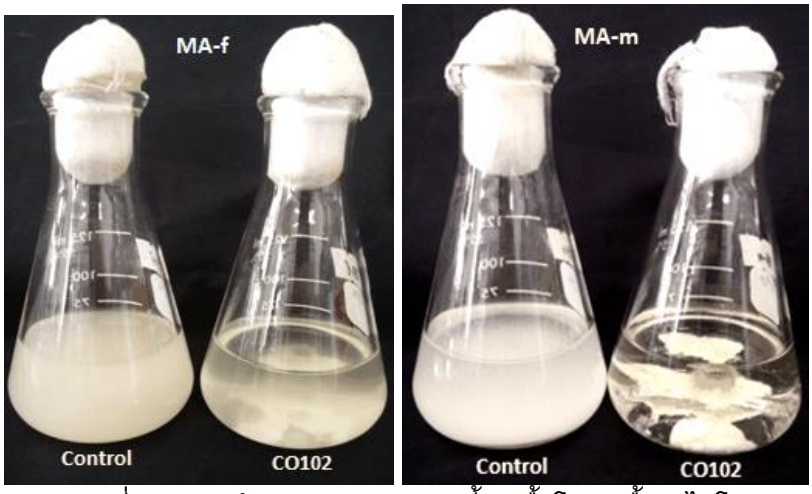
ภาพ 129 แสดงลักษณะการสร้างโซนใสในการย่อยสลายธาตุโพแทสเซียมโดยปรับปรุงสูตรอาหารของเชื้อรา ไอโซเลท CO102; MA-f เป็นการเติมผงแร่ K-feldspar และ MA-m เป็นการเติมดินขาวระนองที่ประกอบด้วยแร่ไมกา 10% ผสมอยู่กับแร่คาโอลิไนต์และควอตซ์

ตาราง 83 ผลการทดสอบของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถละลายแร่โพแทสเซียมที่มาจากธรรมชาติ

ตัวอย่างดิน	ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	ไอโซเลต	ขนาดของโซนใส (cm)	
			MA-f	MA-m
ดินรอบรากต้นกาแฟ	เชื้อรา	CO102	3.1	3.2
	เชื้อรา	CO103	3.0	3.1
ดินรอบรากต้นมันสำปะหลัง	แบคทีเรีย	CA303	0.5	0.5
ดินรอบรากต้นอ้อย	เชื้อรา	SC204	1.8	1.7
	เชื้อรา	SC301-1	4.1	4.1
	แบคทีเรีย	SC401	1.1	1.1
	แบคทีเรีย	SC402	0.6	0.9
ดินที่มีการทับถมของฟางข้าว	แบคทีเรีย	RS101	0.5	0.5
ดินรอบรากต้นข้าวโพด	เชื้อรา	MA101	1.8	1.8
ดินรอบรากต้นแตงร้าน	แบคทีเรีย	CU102	0.9	1.1
	แบคทีเรีย	CU107	0.8	1.2
ดินรอบรากต้นยางพารา	แบคทีเรีย	PR101	0.9	1.1
	แบคทีเรีย	PR102	1.1	1.3
	แบคทีเรีย	PR103	1.3	1.3
ดินรอบรากต้นข้าว	แบคทีเรีย	RI101	0.8	1.1
	แบคทีเรีย	RI102	0.8	1.1
ดินพื้นที่สำรวจแร่โปรแตซ	แบคทีเรีย	PM201	1.1	1.3
จ.อุดรธานี 1	แบคทีเรีย	PM202	1.1	1.3
	แบคทีเรีย	PM203	1.1	1.2
	แบคทีเรีย	PM204	1.0	1.3
	แบคทีเรีย	PM205	1.0	1.4
	แบคทีเรีย	PM301	0.9	1.1
	แบคทีเรีย	PM302	0.8	1.0
	แบคทีเรีย	PM303	1.0	1.2
ดินพื้นที่สำรวจแร่โปรแตซ	แบคทีเรีย	PM401	1.0	1.0
จ.อุดรธานี 2	แบคทีเรีย	PM402	0.9	1.3
	แบคทีเรีย	PM403	0.7	1.1
	แบคทีเรีย	PM404	0.6	0.8
	แบคทีเรีย	PM501	1.1	1.3
เชื้อจากห้องปฏิบัติการสู่ความเป็นเลิศ	เชื้อรา	FB9	1.2	1.3
ทางวิชาการด้านการพัฒนาแบบยั่งยืน	เชื้อรา	FB12	1.4	1.6
ของทรัพยากรชีวภาพ คณะ	แบคทีเรีย	B2	0.5	0.7
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	แบคทีเรีย	B3	1.0	1.2
รวม		**33**		

ทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการละลายและปลดปล่อยโพแทสเซียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *(in vitro)*

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการสร้างโซนใสกว้างที่สุด 3 อันดับแรกของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ไอโซเลต PR103 PM501 PM202 และเชื้อรา ไอโซเลต SC301-1 CO102 และ MA101 โดยนำมาทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ละลายธาตุโพแทสเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อปรับปรุงสูตรอาหาร Aleksandrov medium broth ที่เติมแร่โพแทสเซียม 1% แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียม (K^+) ที่พืชนำไปใช้ได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เป็นเวลา 10 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชลดลง (ตาราง 84) และมีลักษณะเปลี่ยนแปลง ดังภาพ 130 (ตาราง 85)



ภาพ 130 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อโดย เชื้อราไอโซเลต CO102; MA-f เป็นการเติมผงแร่เฟลด์สปาร์, MA-m เป็นการเติมดินขาวระนอง

ตาราง 84 ผลการวัดค่าพีเอชเมื่อเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร Aleksandrov medium broth ที่เติมแร่โพแทสเซียม 1% เป็นเวลา 10 วัน

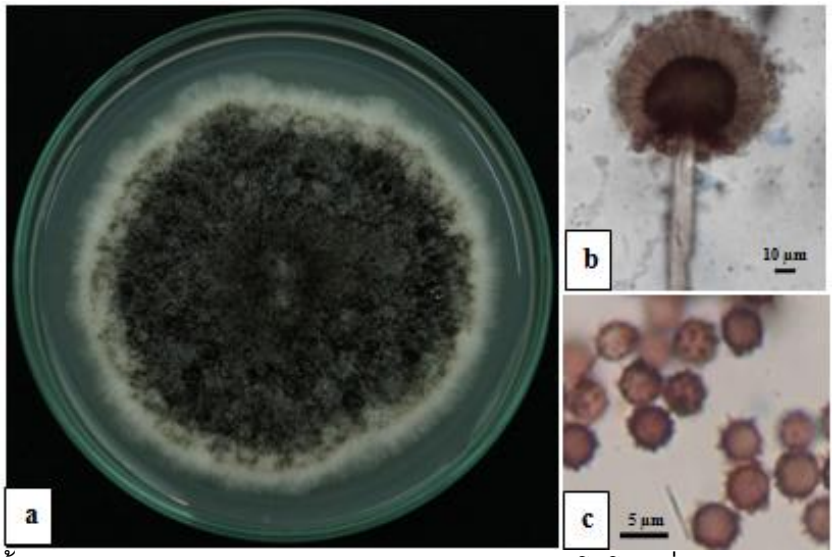
ตัวอย่าง	ค่าพีเอช	
	MA-f	MA-m
ควบคุม	6.73±0.12	6.33±0.06
PR103	6.31±0.15	6.13±0.13
PM202	6.28±0.15	4.45±0.15
PM501	3.32±0.12	3.45±0.14
SC301-1	3.42±0.14	3.68±0.12
CO102	3.27±0.14	3.35±0.12
MA101	5.34±0.12	3.51±0.13

ตาราง 85 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียมที่พืชนำไปใช้ได้ (K^+) โดยทดสอบในอาหาร Aleksandrov medium broth ที่เติมแร่โพแทสเซียม 1%

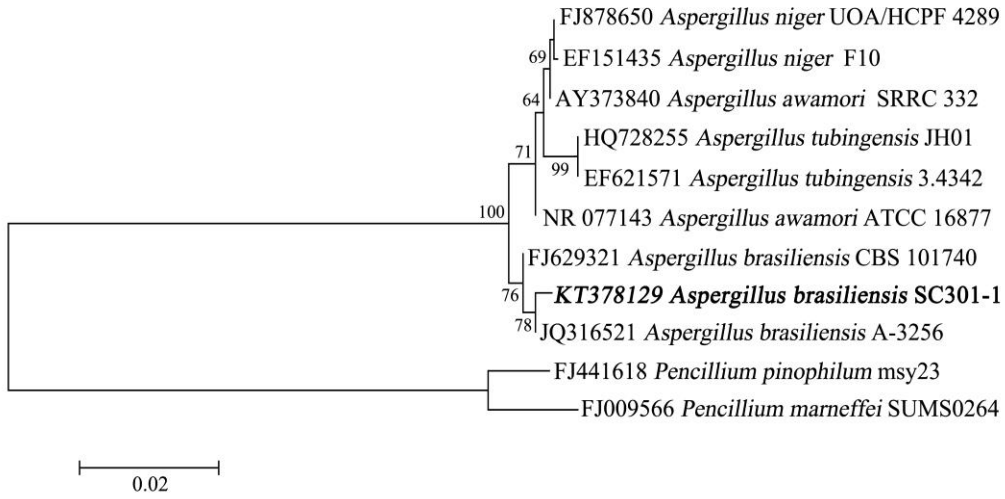
ตัวอย่าง	โพแทสเซียม (มิลลิกรัม/กิโลกรัมของดิน)	
	MA-f	MA-m
ควบคุม	2.05±0.05	0.56±0.06
PR103	5.15±0.04c	1.25±0.02ab
PM202	2.92±0.05f	0.97±0.05d
PM501	3.20±0.04e	1.15±0.04c
SC301-1	7.34±0.04a	1.28±0.03a
CO102	7.20±0.03b	1.17±0.03bc
MA101	4.40±0.08d	0.87±0.08e

การบ่งชี้ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกในระดับ species โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา เทคนิคทางชีวโมเลกุลและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ในการศึกษาได้ทำการเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายธาตุโพแทสเซียมได้ดีที่สุด คือ เชื้อรา ไอโซเลต SC301-1 นำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยวิธี macroscopic และ microscopic พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 71-76 มิลลิเมตร สังเกตในวันแรกที่เส้นใยเจริญออกมา จะมีสีขาวจนเมื่อครบ 7 วัน จะมีการสร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ และไม่มีการสร้าง exudates ลักษณะโคโลนีด้านหลังมีสีครีมจนถึงสีเหลืองอ่อน เมื่อส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตเห็นเส้นใยที่มีผนังกั้น conidial heads มีลักษณะทรงกลมแบบ globose ผิวด้านนอกของ conidia มีลักษณะเป็นหนามแหลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ conidia 3.5-4.8 ไมโครเมตร (ภาพ 131) นอกจากนี้ยังนำเทคนิคทางชีวโมเลกุล เพื่อบ่งชี้เชื้อราในระดับ species โดยการสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แล้วใช้โปรแกรม BLAST และเปรียบเทียบข้อมูลดีเอ็นเอในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อราไอโซเลท SC301-1 ใกล้เคียงกับเชื้อ *Aspergillus brasiliensis* A3256 (ภาพ 132) โดยมีค่า identity 100% และค่า query coverage 95%



ภาพ 131 เชื้อรา *Aspergillus brasiliensis* SC301-1: (a) โคโลนีที่เจริญบนอาหาร Potato dextrose agar บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน; (b) ลักษณะ conidial heads; (c) ลักษณะ conidiaเป็นหนามแหลม

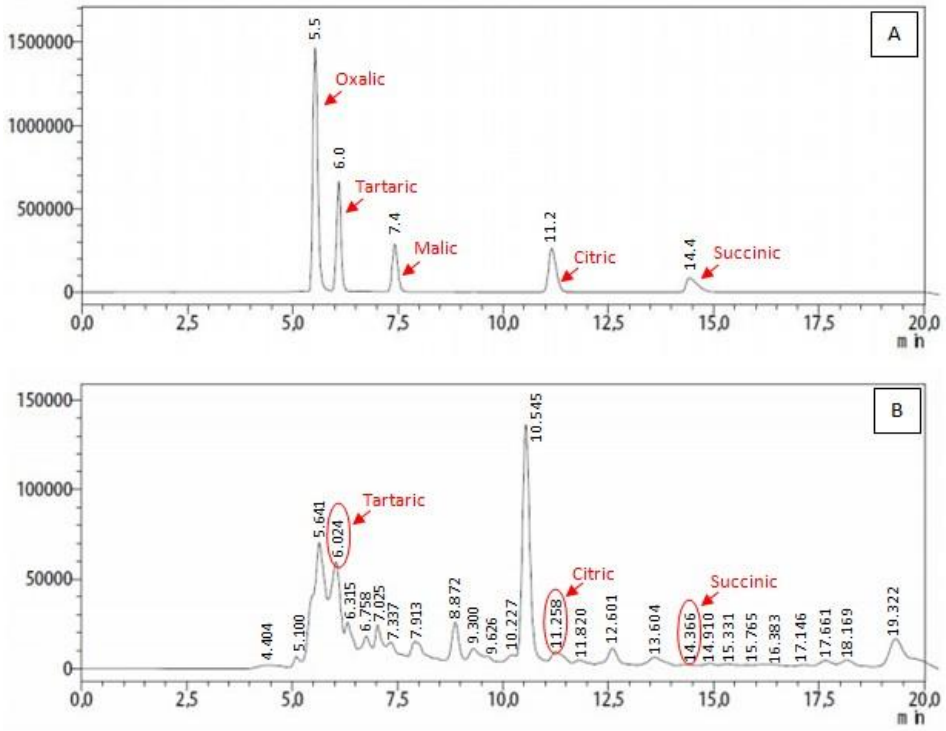


ภาพ 132 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Aspergillus* sp. ที่ได้จาก ลำดับเบสในบริเวณ ITS ของไพรเมอร์ ITS4 และ ITS5

การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 ต่อการส่งเสริมการเจริญของพืช

การสร้างกรดอินทรีย์

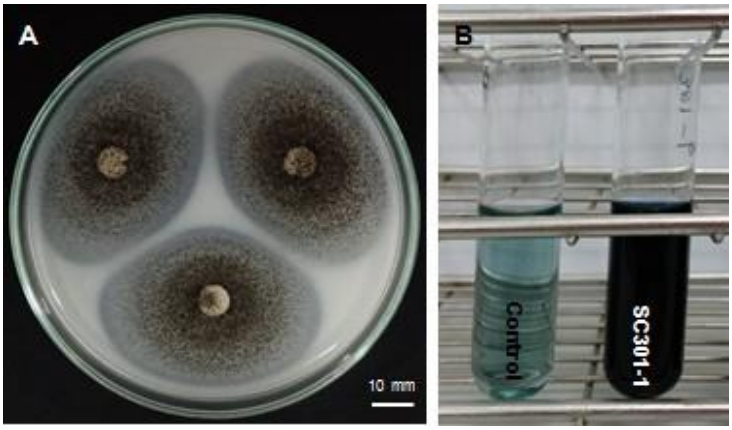
การวิเคราะห์ชนิดของกรดด้วยเทคนิค HPLC พบว่า เชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 สร้างกรดทาร์ทาริก, กรดซิตริก และกรดซักซินิก (ภาพ 133) เท่ากับ 5.5±1.43, 0.605±0.28 และ 0.33±0.17 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ



ภาพ 133 การวิเคราะห์ชนิดของกรดด้วยเทคนิค HPLC: (A) กราฟมาตรฐาน, (B) กราฟแสดง retention time ของกรดที่สร้างโดยเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1

การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต

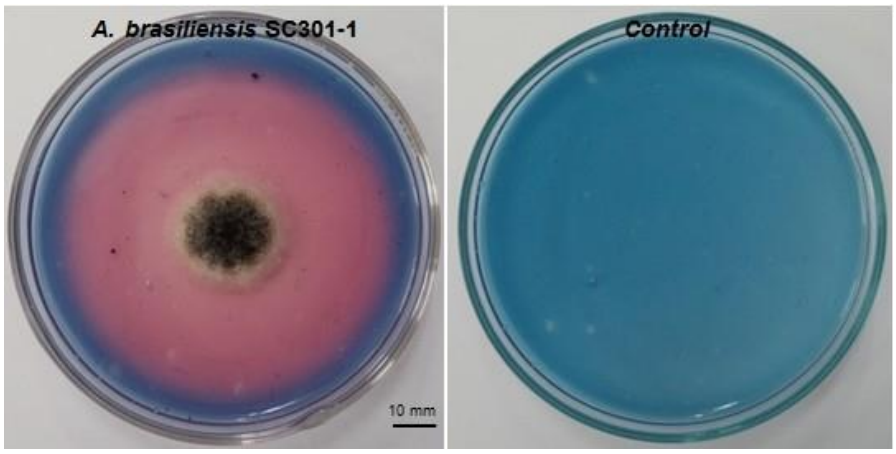
การทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟต โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Pikovskaya's agar เป็นเวลา 5 วัน แล้ววัดขนาดของโซนใส และในอาหาร Pikovskaya's broth วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 820 nm แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน พบว่า *A. brasiliensis* SC301-1 สามารถละลายฟอสเฟต วัดขนาดโซนใสได้ 75.33 มิลลิเมตร (ภาพ 134A) และวัดปริมาณฟอสเฟตในรูปที่ละลายได้ เท่ากับ 167.82 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



ภาพ 134 การละลายฟอสเฟตโดยเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1: (A) การละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya's agar, (B) การละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya's broth

การทดสอบการสร้างไซเดอโรฟอร์

ทดสอบการสร้างไซเดอโรฟอร์ โดยการเลี้ยงเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 บนอาหาร chrome azurol S (CAS) agar เป็นเวลา 3 วัน แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและวัดขนาดของโซนที่เปลี่ยนสีรอบๆโคโลนี พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีชมพู วัดขนาดของโซนสีชมพูได้ 82.33 มิลลิเมตร (ภาพ 135)



ภาพ 135 การทดสอบการสร้างไซเดอโรฟอร์ โดยเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 บนอาหาร CAS agar

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

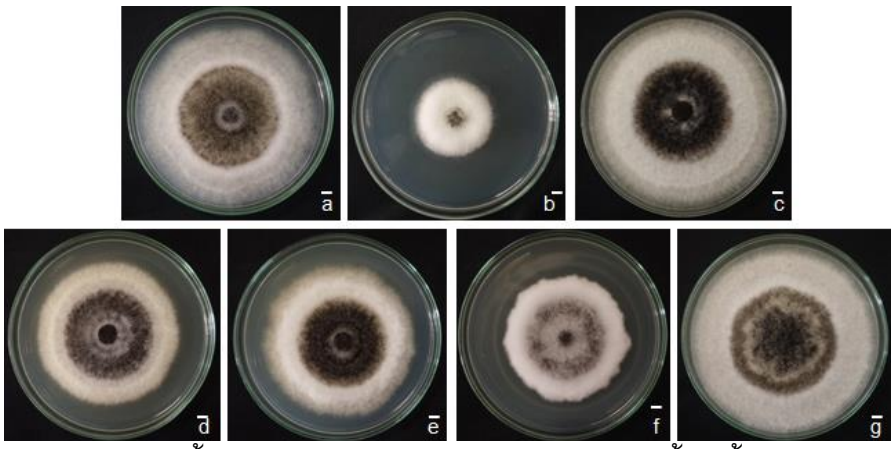
ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคด้วยวิธี dual culture โดยการเลี้ยงเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 และเชื้อก่อโรคบนอาหาร Potato dextrose agar (ภาพ 136) ซึ่งการเลือกเชื้อก่อโรค จะเลือกเชื้อก่อโรคในดิน จากการทดลองพบว่า เชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. SBG2 และเชื้อ *Rhizoctonia solani* AG-2 เชื้อทั้งสองเป็นสาเหตุของโรครากเน่า โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 55% และ 55.08% ตามลำดับ

ภาพ 136 การทดสอบของเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคด้วยวิธี dual culture

การหาสภาวะที่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อรา *A. brasiliensis* SC301-1

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน มีผลทำให้เชื้อรามีการเจริญที่แตกต่างกัน (ภาพ 137) จากการทดลองพบว่า เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน เชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek yeast extract agar (CYA) ดังตาราง 86



ภาพ 137 การเจริญของเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ: (a) อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA; (b) อาหารเลี้ยงเชื้อ G25N (c) อาหารเลี้ยงเชื้อ CYA; (d) อาหารเลี้ยงเชื้อ LYA; (e) อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA; (f) อาหารเลี้ยงเชื้อ MEA; (g) อาหารเลี้ยงเชื้อ CMA; บาร์เท่ากับ 5 มิลลิเมตร

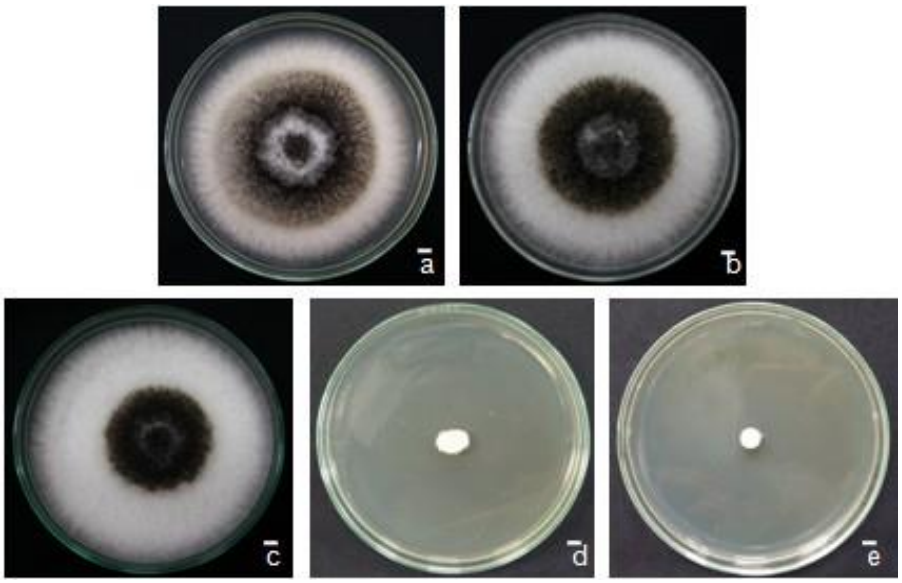
ตาราง 86 การเจริญของเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)
Sabouraud dextrose agar (SDA)	84.7±0.12c	119.6±9c
25% glycerol nitrate agar (G25N)	42.7±0.06f	212.5±13b
Czapek yeast extract agar (CYA)	90.0±0.00a	245.9±6a
Lactose yeast extract agar (LYA)	71.7±0.15d	119.7±14c
Potato dextrose agar (PDA)	74.0±0.10d	132.7±26c
Malt extract agar (MEA)	54.7±0.25e	71.6±16d
Corn meal agar (CMA)	87.3±0.12b	132.6±18c

*$P<0.05$

อุณหภูมิ

เชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CYA แล้วบ่มอุณหภูมิที่แตกต่างกัน (ภาพ 138) มีผลทำให้เชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 มีการเจริญของแตกต่างกัน จากการทดลองพบว่า เชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ตาราง 87)



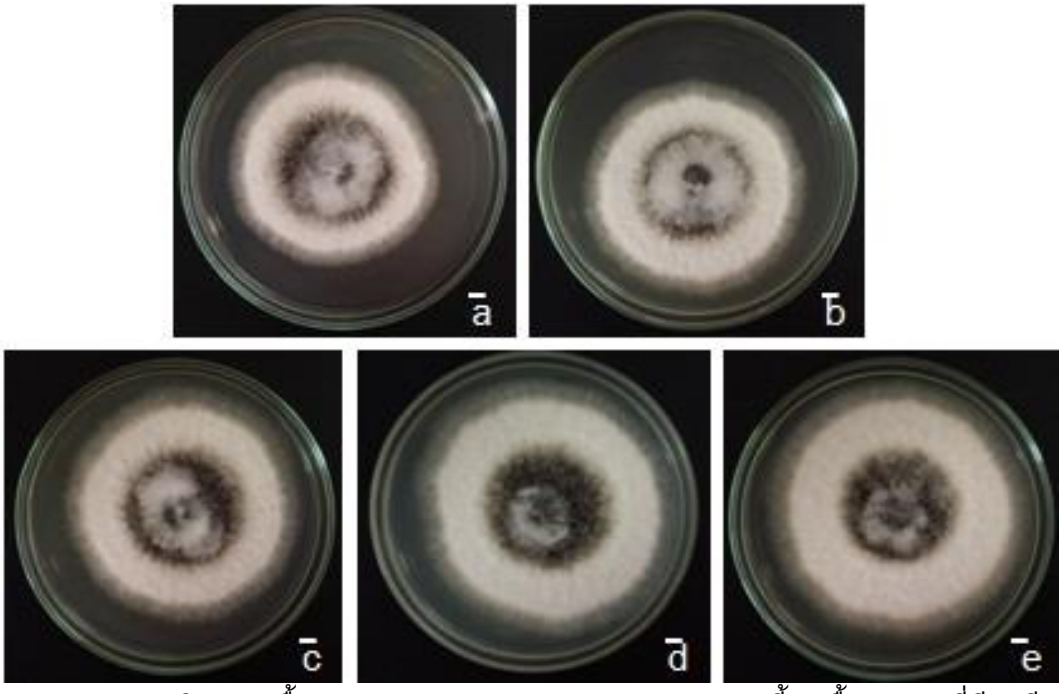
ภาพ 138 การเจริญของเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CYA ที่บ่มอุณหภูมิที่แตกต่างกัน: (a) 25 องศาเซลเซียส; (b) 30 องศาเซลเซียส; (c) 35 องศาเซลเซียส; (d) 40 องศาเซลเซียส; (e) 45 องศาเซลเซียส; บาร์เท่ากับ 5 มิลลิเมตร

ตาราง 87 การเจริญของเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิต่างกัน

อุณหภูมิ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)
25	83.3±0.58c	193.7±6c
30	90.0±0.00a	361.6±8a
35	87.0±1.00b	284.6±7b
40	11.7±0.58d	67.3±4d
45	0	0

ค่าพีเอช

ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน มีผลทำให้การเจริญของเชื้อแตกต่างกัน (ภาพ 139) จากการทดลองพบว่า เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CYA ที่มีค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 6 หรือ 7 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 88)



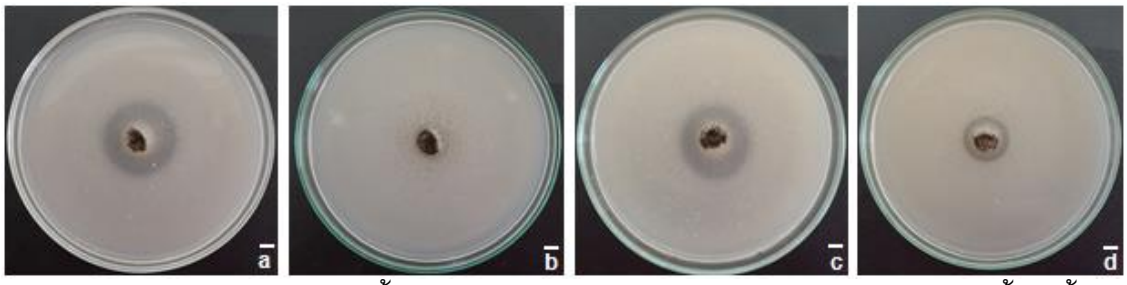
ภาพ 139 การเจริญของเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CYA ที่มีค่าพีเอชของอาหารที่แตกต่างกัน: (a) พีเอชเท่ากับ 3; (b) พีเอชเท่ากับ 4; (c) พีเอชเท่ากับ 5; (d) พีเอชเท่ากับ 6; (e) พีเอชเท่ากับ 7; บาร์เท่ากับ 5 มิลลิเมตร

ตาราง 88 การเจริญของเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชต่างกัน

ค่าพีเอช	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)
3	66.3±0.32c	154.3±2b
4	66.0±0.17c	156.7±3b
5	75.0±0.20b	140.3±8c
6	81.7±0.29a	167.1±6a
7	82.0±0.17a	171.6±11a

แหล่งคาร์บอน

จากการทดลองการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อความสามารถในการละลายและปลดปล่อยโพแทสเซียม เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *A. brasiliensis* SC301-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (ภาพ 140) จากการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Aleksandrov medium ที่มีการเติมกลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีผลทำให้เชื้อสามารถสร้างโซนใสบนอาหารและวัดปริมาณโพแทสเซียมที่ละลายออกมาได้มากที่สุด (ตาราง 89)



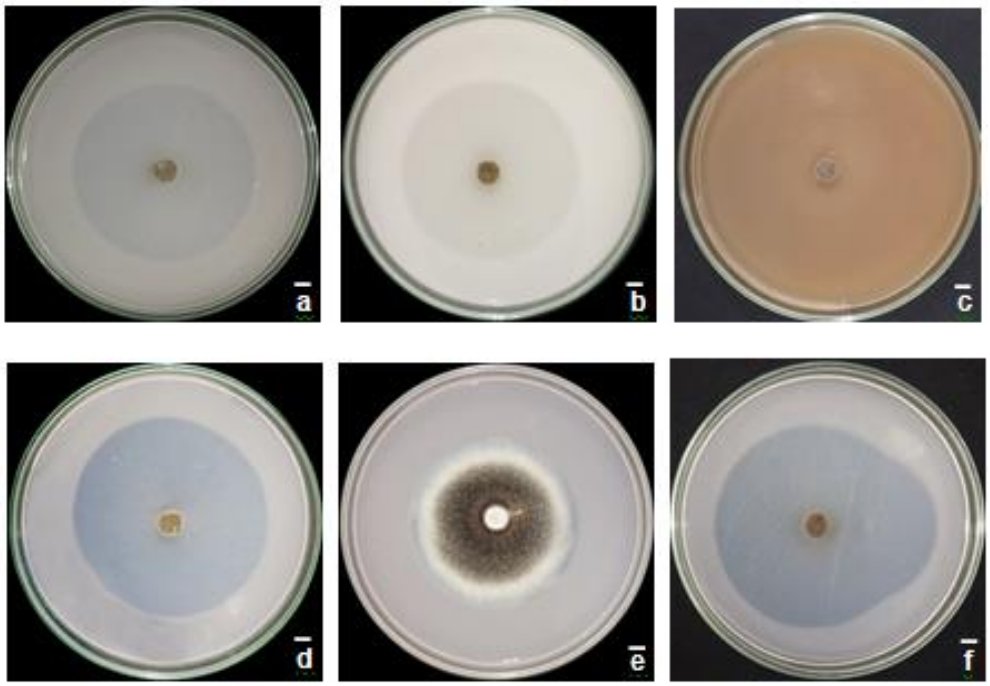
ภาพ 140 การสร้างโซนใสโดยเชื้อรา *A. brasiliensis* SC301-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Aleksandrov medium ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนต่างกัน: (a) กลูโคส; (b) กาแลคโตส; (c) ซูโครส; (d) ไซโลส; บาร์เท่ากับ 5 มิลลิเมตร

ตาราง 89 แสดงการวัดปริมาณโพแทสเซียมในรูปที่ละลายได้ในอาหาร Aleksandrov medium broth ที่เติมแหล่งคาร์บอนต่างกัน

แหล่งคาร์บอน	ค่าพีเอชสุดท้าย	ปริมาณโพแทสเซียมที่ละลายได้ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	ขนาดของโซนใส (มิลลิเมตร)
กลูโคส	4.07	1,069.9a	28.3±1.53a
กาแลคโตส	6.95	935.0b	12.7±0.58b
ซูโครส	4.06	1,031.3a	23.7±3.21a
ไซโลส	6.53	980.2b	15.3±6.67b

แหล่งโพแทสเซียม

จากการทดลองการหาแหล่งโพแทสเซียมที่เหมาะสมต่อความสามารถในการละลายและปลดปล่อยโพแทสเซียม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเติมแหล่งโพแทสเซียมที่มาจากธรรมชาติและสังเคราะห์ขึ้น (ภาพ 141) จากการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Aleksandrov medium ที่มีการเติม KCl เป็นแหล่งโพแทสเซียม มีผลทำให้เชื้อสามารถสร้างโซนใสบนอาหารและวัดปริมาณโพแทสเซียมที่ละลายออกมาได้มากที่สุด (ตาราง 90)



ภาพ 141 การสร้างโซนใสโดยเชื้อรา *A. brasiliensis* SC301-1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Aleksandrov medium ที่มีการเติมแหล่งโพแทสเซียมต่างกัน: (a) แร่เฟลด์สปาร์; (b) แร่ดินขาว; (c) K_2HPO_4; (d) K_2SO_4; (e) KNO_3; (f) KCl; บาร์เท่ากับ 5 มิลลิเมตร

ตาราง 90 แสดงการวัดปริมาณโพแทสเซียมในรูปที่ละลายได้ในอาหาร Aleksandrov medium broth ที่เติมแหล่งโพแทสเซียมต่างกัน

แหล่งโพแทสเซียม	ค่าพีเอชสุดท้าย	ปริมาณโพแทสเซียมที่ละลายได้ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	ขนาดของโซนใส (มิลลิเมตร)
เฟลด์สปาร์	4.10	8.75e	52.0±1.00d
ดินขาว	3.70	1.15e	54.0±1.00c
K_2HPO_4	7.12	2,216.23d	0
K_2SO_4	4.07	2,701.73c	56.7±1.15b
KNO_3	3.61	3,055.73b	48.7±1.15e
KCl	3.54	3,678.23a	62.0±1.00a

วิจารณ์ผลการทดลอง

โพแทสเซียมในดินส่วนใหญ่พบในรูปของแร่โพแทสเซียม จัดอยู่ในกลุ่มแร่ซิลิเกต ซึ่งเป็นแร่ที่มีองค์ประกอบของธาตุซิลิกอนและออกซิเจนเป็นหลัก กลุ่มแร่ซิลิเกตนี้จัดว่าเป็นแร่ที่พบอยู่บนเปลือกโลกมากที่สุด (ประมาณร้อยละ 96 โดยน้ำหนัก) ซึ่งแร่โพแทสเซียมจะเป็นพวกไซอะลิกซิลิเกต (sialic silicate) แร่พวกนี้จะมีปริมาณธาตุซิลิกอนและอะลูมิเนียมสูงถึงร้อยละ 85 ในเปลือกโลก โดยมากมักมีสีขาว เช่น ควอตซ์ เฟลด์สปาร์ ไมกาขาวหรือมัสโคไวท์ ดังนั้นเพื่อให้โพแทสเซียมในรูปนี้ใช้ประโยชน์ได้เร็วขึ้น จำเป็นต้องอาศัยกลไกที่ทำให้เกิดการสลายตัว ซึ่งการสลายทางอินทรีย์โดยเน้นการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ มีผลเร็วและประหยัดที่สุด จุลินทรีย์ที่มีความสามารถละลายโพแทสเซียมมีกลไกหลัก ๆคือการสร้างกรดอินทรีย์ออกมาทำให้แร่โพแทสเซียมในรูปที่ละลายไม่ได้อยู่ในรูปละลายแล้วพืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ จากการคัดแยกจุลินทรีย์ละลายโพแทสเซียมขั้นแรก จึงทำการหาจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแล้วเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ จากสีเขียวเป็นสีเหลือง พบว่ามีจุลินทรีย์ที่ที่สร้างกรดแล้วเปลี่ยนสีอาหารได้ทั้งหมด 79 ไอโซเลต แต่เมื่อนำมาทดสอบการละลายโพแทสเซียมมีเพียง 33 ไอโซเลตที่สร้างโซนใสบนอาหารที่เติมแร่เฟลด์สปาร์หรือแร่ดินขาวลงไป ซึ่งเชื้อราไอโซเลต SC301-1 สามารถละลายแร่โดยวัดโซนใสได้กว้างที่สุด จากนั้นทำการทดลองในอาหารเหลวแล้วนำไปวัดปริมาณโพแทสเซียมที่ละลายได้ด้วยเครื่อง flame photometer ก็ยังพบว่าเชื้อไอโซเลต SC301-1 วัดค่าโพแทสเซียมที่ละลายได้ได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ไอโซเลตอื่น นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแร่เฟลด์สปาร์กับแร่ดินขาวแล้ว พบว่าแร่เฟลด์สปาร์ให้ปริมาณโพแทสเซียมที่ละลายได้มากกว่าแร่ดินขาว จึงเลือกใช้เชื้อไอโซเลต SC301-1 และแร่เฟลด์สปาร์มาทดลองขั้นต่อไป เมื่อทำการบ่งชี้ชนิดของเชื้อที่คัดเลือกโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางโมเลกุล พบว่า เชื้อไอโซเลต SC301-1 คือ เชื้อรา *Aspergillus brasiliensis* ซึ่งกลไกที่สำคัญของเชื้อในการละลายแร่เฟลด์สปาร์ คือเชื้อมีการสร้างกรดโดยทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม สนับสนุนกลไกนี้ ในขณะที่โพแทสเซียมสามารถละลายออกมาได้มากขึ้น เชื้ออาจจะมีกลไกอื่นร่วมกับการสร้างกรดเพื่อการสลายโครงสร้างของแร่เช่น ionic strength และสารประกอบอินทรีย์ เช่น ซิเตรต, ไดไฮดรอกซีเบนโซเอท, โทรโปโลน ซึ่งสารประกอบอินทรีย์เหล่านี้ จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเพื่อสร้างคุณสมบัติ iron chelate (Al-Kananit et al., 1984) นอกจากความสามารถในการละลายโพแทสเซียมแล้ว เชื้อ *A. brasiliensis* SC301-1 ยังมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ ความสามารถละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ ซึ่งอาจจะใช้กลไกการสร้างกรดเช่นเดียวกันกับการละลายโพแทสเซียม จากการศึกษาการละลายฟอสเฟตของ Chen et al. (2006) พบว่า *Bacillus megaterium* สร้างกรดซิตริก, กรดแลกติก และกรดโพพิโอนิกในอาหาร เหลว NBRIP การสร้างไซเดอโรฟอร์ แต่เนื่องจากเชื้อมีการสร้างกรดออกมา อาจมีผลทำให้เหล็กในอาหารทดสอบละลายและเปลี่ยนสีอาหารได้ ดังนั้นความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอร์ของเชื้อจึงยังไม่แน่ชัด และสามารถยับยั้งการเจริญของ

เชื้อก่อโรคพืชที่อาศัยในดินบางชนิดได้ เมื่อทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและความสามารถในการละลายโพแทสเซียมของเชื้อ พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYA ที่มีค่าพีเอช 6 ถึง 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเชื้อจะมีประสิทธิภาพในการละลายโพแทสเซียมเมื่อเชื้อใช้กลูโคสหรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน การนำไปปรับใช้ควรจะใช้ซูโครสเพราะหาได้ง่ายและมีราคาถูกกว่ากลูโคส และเชื้อใช้โพแทสเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งโพแทสเซียม แต่อาจเป็นเพราะว่าโพแทสเซียมคลอไรด์ เป็นสารประกอบที่สามารถแตกตัวได้ดีในน้ำ จากผลการทดลองจึงสามารถวัดโพแทสเซียมที่ละลายออกมาได้มากที่สุด อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการที่สามารถควบคุมตัวแปรต่างๆได้ ดังนั้นการนำเชื้อไปใช้ในแปลงปลูกพืชที่มีสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติควรคำนึงถึงปัจจัยด้านอื่น เช่น ธาตุอาหารในดิน สารเคมีที่ปนเปื้อนในดิน ความชื้น ความเข้มแสง ปริมาณน้ำฝน เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน 9 ตัวอย่าง คือ ดินรอบรากต้นกาแฟ, ดินรอบรากต้นมันสำปะหลัง, ดินรอบรากต้นอ้อย, ดินรอบรากต้นข้าว, ดินรอบรากต้นข้าวโพด, ดินรอบรากต้นแตงร้าน, ดินรอบรากต้นยางพารา, ดินรอบต้นไม้บริเวณสำรวจแร่โปรแตชจังหวัดอุดรธานี 2 แห่ง และเชื้อที่ได้จากห้องปฏิบัติการสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการด้านการพัฒนาแบบยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้ตัวอย่างเชื้อที่เจริญและสร้างโซนใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Aleksandrov medium ทั้งหมด 79 ไอโซเลต นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการละลายโพแทสเซียมจากแร่เฟลด์สปาร์และแร่ดินขาว พบว่าเชื้อไอโซเลต SC301-1 สามารถละลายและปลดปล่อยโพแทสเซียมได้ดีที่สุด เมื่อนำเชื้อไอโซเลต SC301-1 มาจำแนกชนิด พบว่าเป็นเชื้อรา *Aspergillus brasiliensis* ซึ่งเชื้อสร้างกรดทาร์ทาริก กรดซิตริก และกรดซักซินิก เป็นกลไกที่สำคัญของเชื้อในการละลายแร่เฟลด์สปาร์ นอกจากนี้แล้ว เชื้อยังมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ ความสามารถละลายฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ การสร้างไซเดอโรฟอร์ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืชบางชนิดได้ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและความสามารถในการละลายโพแทสเซียมของเชื้อ โดยเชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYA ที่มีค่าพีเอช 6 หรือ 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อจะมีประสิทธิภาพในการละลายโพแทสเซียมเมื่อเชื้อใช้กลูโคสหรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้โพแทสเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งโพแทสเซียม

3.2 ผลของแอคติโนแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตต่อการเจริญและการเป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว

การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างดินจากรอบรากข้าวจังหวัดเชียงใหม่ ดินรอบรากมันสำปะหลังจังหวัดอุดรธานี และดินรอบรากอ้อยจังหวัดอุดรธานี ทั้งหมดจำนวน 15 ตัวอย่าง นำตัวอย่างดินผึ่งให้แห้ง แล้วนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50°C ด้วยเครื่อง water bath จากนั้นชั่งตัวอย่างดิน 10 g นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 ml ในระดับความเจือจางถึง 10^{-5} นำตัวอย่างที่เจือจางระดับ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} มาสเปรทบนอาหารแยกเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ Humic Acid Vitamin (HV) agar และ Starch Casein (SC) agar ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ 50 $\mu g/ml^{-1}$ nalidixic acid และ100 $\mu g/ml^{-1}$ cycloheximide และ nystatin อาหารละ 3 ซ้ำ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C นานประมาณ 4 สัปดาห์ แล้วแยกโคโลนีเดี่ยวของแอคติโนแบคทีเรียเพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วจึงเก็บรักษาในอาหาร ISP-2 agar slant และ 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -20 °C

การคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่มีการละลายฟอสเฟต (Chaiharn and Lumyong 2009)

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียบนอาหาร ISP-2 agar ประมาณ 3-5 วัน แล้วใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการจุดตัวอย่างเชื้อลงบนอาหาร Pikovskaya's agar ที่มีการเติม Tricalcium phosphate : $Ca_3(PO_4)_2$ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 7 วัน ทำการคัดเลือกตัวอย่างเชื้อที่มีการสร้างวงใสรอบโคโลนี แล้วนำมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ISP-2 บ่มเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 7 วัน แล้วนำตัวอย่างหยดลงในหลุม 20 µl บนอาหาร Pikovskaya's agar ที่มีการเจาะเอาวุ้นอาหารออกแล้ว บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 7 วัน

การวิเคราะห์การผลิตกรด

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากข้อ 2 ในอาหาร Pikovskaya's broth ที่มีการเติม Tricalcium phosphate : $Ca_3(PO_4)_2$ ปริมาตร 50 ml นำไปเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที นาน 7 วัน นำน้ำเลี้ยงมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บส่วนใสนำไปแช่ที่ -20 °C แล้วนำไประเหิดแห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer เมื่อตัวอย่างแห้งแล้วนำไปวิเคราะห์การผลิตกรดด้วย HPLC

การทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะ

การยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* BS265 โดยวิธี dual culture bioassay (Nakaew *et al*., 2009)

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียลงในอาหาร ISP-2 agar นาน 3-5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เจาะลงบนโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรีย แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อนำชิ้นวุ้นแอคติโนแบคทีเรียวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางชิ้นวุ้นทั้ง 2 ด้านของจานอาหารให้มีระยะห่างจากขอบจานประมาณ 2 cm บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 3-5 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อรา *Pyricularia oryzae* BS265 วางลงตรงกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างเชื้อแอคติโนแบคทีเรียทั้ง 2 ด้าน ส่วนชุดควบคุมจะวางเฉพาะเชื้อราบริเวณตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 14 วัน จากนั้นวัดความกว้างของบริเวณยับยั้งและหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (% inhibition)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{\text{(รัศมีของเชื้อราในจานควบคุม - รัศมีของเชื้อราที่มีสารทดสอบ)}}{\text{รัศมีของเชื้อราในจานควบคุม}} \times 100$$

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* XPK1 โดยวิธี agar cross streak method (Lemos *et al*., 1985)

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียลงในอาหาร ISP-2 agar นาน 3-5 วัน ขีดแอคติโนแบคทีเรียเป็นแนวยาวบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 3-5 วัน เมื่อแอคติโนแบคทีเรียมีการเจริญแล้วนำแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* XPK1 ที่เลี้ยงในอาหาร NB และปรับค่า McFarland เท่ากับ 0.5 ขีดในแนวขวางให้ตั้งฉากกับแอคติโนแบคทีเรีย บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2 วัน จากนั้นวัดความกว้างของบริเวณที่มีการยับยั้ง (Inhibition zone)

การจำแนกและบ่งบอกชนิดของแอคติโนแบคทีเรียเบื้องต้น

ศึกษาและจัดจำแนกแอคติโนแบคทีเรียเบื้องต้นจากลักษณะสัณฐานวิทยา การสร้างสปอร์ การสร้างเส้นใยใต้อาหาร เส้นใยเหนืออากาศ และการวิเคราะห์ 2-6 diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งเลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียในอาหารเหลว ISP-2 หลังจากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C เวลา 7 วัน เก็บเซลล์ใส่ในหลอด eppendorf แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ โดยการนำไปปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อ 15 นาที เพื่อให้ตกตะกอนทิ้งส่วนใสประมาณ 3 รอบ นำเซลล์ที่ได้ไปแช่ใน-20 °C เวลา 24 ชั่วโมง เติม 0.1 ml ของ 6 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอลิก เขย่าสารเพื่อให้กรดไฮโดรคลอลิกท่วมเซลล์ในหลอด eppendorf นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที แล้วนำสารมาตรฐานและตัวอย่างมา spot ลงบนแผ่น TLC แล้วนำแผ่น TLC ที่ spot แช่ในแท็งก์ประมาณ 3-4 ชั่วโมง โดยสารภายในแท็งก์ประกอบด้วย (Metnanol: Dist water: 6N HCL: Pyridine) อัตราส่วน (80:26:4:10) : (V/V) ตามลำดับ เมื่อมีการเคลื่อนที่ของสารถึงจุดกำหนดแล้วนำแผ่น TLC มาเป่าให้แห้ง จากนั้นพ่นด้วย ninhydrin reagent จากนั้นนำไปให้ความร้อนประมาณ 100 °C เวลาประมาณ

2 นาที แล้วเทียบการเคลื่อนที่ของสารเทียบกับสารมาตรฐานเพื่อดูว่าตัวอย่างเป็น *LL*-DAP หรือ *Meso*-DAP ซึ่งถ้าเป็น *LL*-DAP จัดว่าเป็น Streptomyces และถ้าเป็น *Meso*-DAP แสดงว่าเป็น Non-Streptomyces

การศึกษาความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอร์ (siderophore) (Fiss and Brooks, 1991)

โดยนำแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร ISP-2 agar เป็นเวลา 3 วัน เจาะรูชิ้นวุ้นที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm โดยฆ่าเชื้อโดยใช้เปลวไฟ เจาะลงบนโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรีย แล้วนำชิ้นวุ้นที่เจาะออกโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อนำชิ้นวุ้นของแอคติโนแบคทีเรียที่ได้วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chrome azurol S (CAS agar) และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลทที่สร้างไซเดอโรฟอร์จะพบว่ามีวงใสรอบโคโลนี แล้วทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

การคัดกรองการผลิตเอนไซม์

เอนไซม์ไคติเนส

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียลงในอาหาร ISP-2 agar นาน 3-5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เจาะลงบนโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียใช้เข็มเขี่ยเชื้อนำชิ้นวุ้นของเชื้อแอคติโนแบคทีเรียวางลงบนอาหาร Colloidal chitin agar 4 จุด บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 วัน ซึ่งแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสจะพบว่ามีวงใสรอบโคโลนี แล้วทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

เอนไซม์เซลลูเลส

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียลงในอาหาร ISP-2 medium นาน 3-5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เจาะลงบนโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียใช้เข็มเขี่ยเชื้อนำชิ้นวุ้นของแอคติโนแบคทีเรียวางลงบนอาหาร Carboxy methy cellulose agar 4 จุด บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 จากนั้นย้อมด้วย 0.1% Congo red แล้วล้างออกด้วย 1 M NaCl ซึ่งแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะพบว่ามีวงใสรอบโคโลนี แล้วทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

เอนไซม์อะไมเลส

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียลงในอาหาร ISP-2 agar นาน 3-5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เจาะลงบนโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียใช้เข็มเขี่ยเชื้อนำชิ้นวุ้นของแอคติโนแบคทีเรียวางลงบนอาหาร Starch agar 4 จุด บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 จากนั้นย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน ซึ่งแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะพบว่ามีวงใสรอบโคโลนี แล้วทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

เอนไซม์โปรติเอส

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียลงในอาหาร ISP-2 agar นาน 3-5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เจาะลงบนโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียใช้เข็มเขี่ยเชื้อนำชิ้นวุ้นของแอคติโนแบคทีเรียวางลงบนอาหาร Skimmed milk agar 4 จุด บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 ซึ่งแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะพบว่ามีวงใสรอบโคโลนี แล้วทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

เอนไซม์ไลเปส

เลี้ยงแอคติโนแบคทีเรียลงในอาหาร ISP-2 agar นาน 3-5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เจาะลงบนโคโลนีของแอคติโนแบคทีเรียใช้เข็มเขี่ยเชื้อนำชิ้นวุ้นของแอคติโนแบคทีเรียวางลงบนอาหารที่มีส่วนผสมของ Tween 80 จำนวน 4 จุด บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 ซึ่งแอคติโนแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจะพบว่ามีวงใสรอบโคโลนี แล้วทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

การทดสอบการย่อยสลาย (Hemolysis) เม็ดเลือดแดงของแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลทคัดเลือก

เลี้ยงแอคติโนแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลทคัดเลือก บนอาหาร ISP-2 agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 4 วัน แล้ว streak เชื้อลงบนจานอาหาร blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 7 วัน โดยแอคติโนแบคทีเรียที่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจะมีการสร้างวงใสรอบๆรอย streak และดูขนาดของวงใสเพื่อดูว่าเป็นชนิดเบตา แอลฟา หรือแกรมมา

ผลการทดลอง

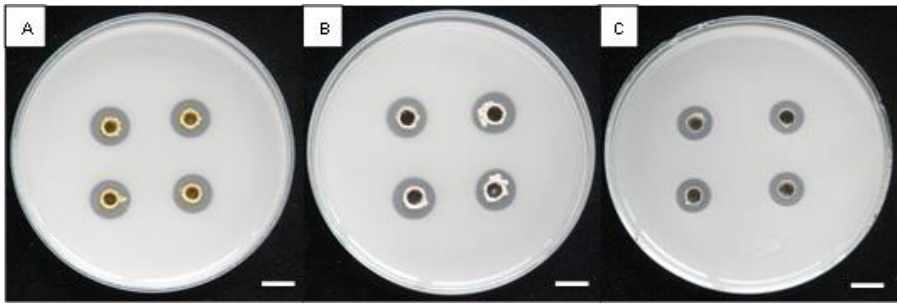
การคัดแยกแอคติโนแบคทีเรีย

จากดินตัวอย่างรอบรากข้าว จังหวัดเชียงใหม่ ดินรอบรากมันสำปะหลัง จังหวัดอุดรธานี และดินรอบรากอ้อย จังหวัดอุดรธานี จำนวน 15 ตัวอย่าง นำมาแยกแอคติโนแบคทีเรีย โดยใช้อาหารแยกเชื้อ 2 ชนิด คือ Humic Acid Vitamin (HV) agar และ Starch Casein (SC) agar แยกโคโลนีแอคติโนแบคทีเรียที่มีการเจริญแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถแยกแอคติโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ทั้งหมดจำนวน 110 ไอโซเลท

การคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียที่มีการละลายฟอสเฟต

จากการคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 110 ไอโซเลท ทำการทดสอบความสามารถในการการละลายฟอสเฟต พบว่ามีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 83 ไอโซเลท ให้ผลการละลายฟอสเฟตในการจุดลงบนอาหาร Pikovskaya's agar ที่มีการเติม Tricalcium phosphate: $Ca_3(PO_4)_2$ และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบบนอาหาร Pikovskaya's agar พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-S3 มีการสร้างวงใสในการละลายฟอสเฟตสูงสุด เท่ากับ 22.8

mm และไอโซเลทอื่นๆที่สามารถให้ผลการละลายได้ดีรองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท CMU-S31 และCMU-S48 ซึ่งมีการสร้างวงใสในการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 20.0 mm แสดงดังภาพ 142



ภาพ 142 การสร้างวงใสในการละลายฟอสเฟต 7 วัน. A. ไอโซเลท CMU-S3, B. CMU-S31 และC. CMU-S48. Bar = 10 mm.

การวัดปริมาณการผลิตกรดด้วย HPLC

จากการทดลองคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-S3 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากข้อ 2 มาวิเคราะห์การผลิตกรดพบว่าไอโซเลท CMU-S3 มีการผลิตกรดออกซาลิก 1.91 ± 0.14 mg./ 200 mg Crude เท่ากับ 9.5 µg/ml และผลิตกรดทาร์ทาริก 14.04 ± 0.61 mg./ 200 mg Crude เท่ากับ 70.2 µg/ml

การทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการสร้างสารปฏิชีวนะ

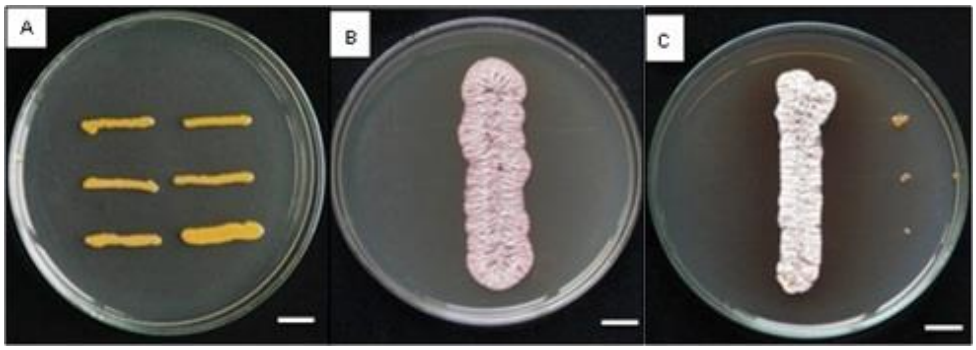
การยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* BS265 โดยวิธี dual culture bioassay

จากการทดลองคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 110 ไอโซเลท ทำการทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะเบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* BS265 พบว่าเชื้อแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* BS265 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตั้งแต่ 50.00 % ขึ้นไป ซึ่งพบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-PW4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 100 % และไอโซเลทอื่นๆที่สามารถให้ผลการยับยั้งได้ดีรองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท CMU-S1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 70.00 %, CMU-S40 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 57.77 %, CMU-S8 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 54.00 % และ CMU-S3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 52.00 % แสดงดังภาพ 143

ภาพ 143 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* BS265 ของแอคติโนแบคทีเรีย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 10 วัน (A), ชุดควบคุม (B), CMU-PW4 (C), CMU-S1 (D), CMU-S8 (E), CMU-S40 (F), CMU-S3. Bar = 10 mm.

4.2 การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* XPK1 โดยวิธี agar cross streak method

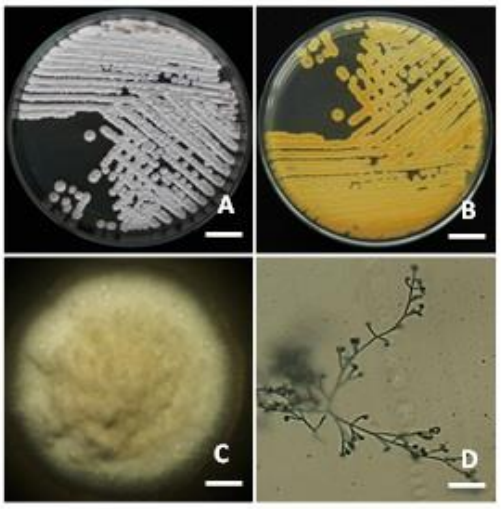
จากการทดลองคัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 110 ไอโซเลท ทำการทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะเบื้องต้นในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* XPK1 พบว่ามีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* XPK1 ตั้งแต่ 20-25 mm ซึ่งพบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-S1 มีการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 25 mm. เมื่อเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม = 25 mm. และไอโซเลทอื่นๆที่สามารถให้ผลการยับยั้งได้ดีรองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท CMU-S1, CMU-S3 และ CMU-PW4 แสดงดังภาพ 144



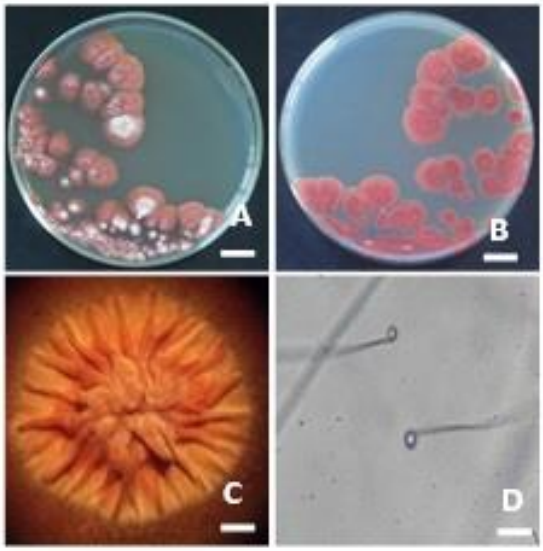
ภาพ 144 ผลการยับยั้งเชื้อรา *Xanthomonas oryzae* XPK1 ของแอคติโนแบคทีเรีย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 2 วัน (A), ชุดควบคุม (B), CMU-S1 และ(C), CMU-S3. Bar = 10 mm.

5. การจำแนกและบ่งบอกชนิดของแอคติโนแบคทีเรียเบื้องต้น

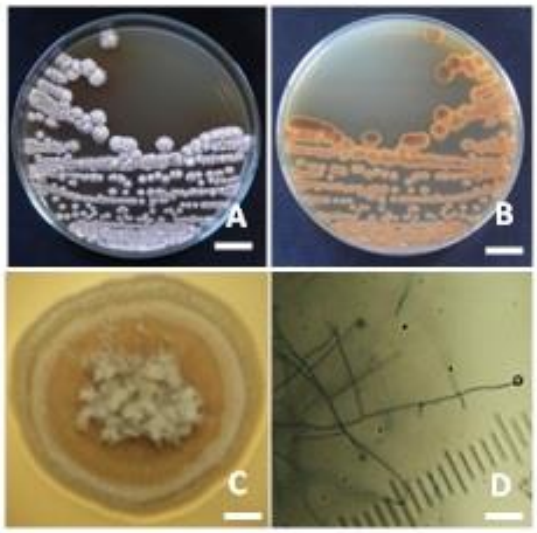
จากแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 110 ไอโซเลท ได้คัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิสูงจากการทดสอบการละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟต ($Ca_3(PO_4)_2$ และคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์จากการคัดกรองเบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* BS265 สาเหตุก่อโรคใบไหม้ และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* XPK1 สาเหตุก่อโรคขอบใบแห้งในข้าว คือ แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-PW4, CMU-S1 และ CMU-S3 พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* แสดงดังภาพ 145, 146 และ 147



ภาพ 145 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย CMU-PW4 เวลา 5 วัน. A.เส้นใยเหนืออากาศ Bar = 10 mm, B. เส้นใยใต้อาหาร Bar = 10 mm, C.โคโลนีเดี่ยว Bar = 1 mm. และ D. การจัดเรียงตัวของเส้นใยและสปอร์ Bar = 10 µm



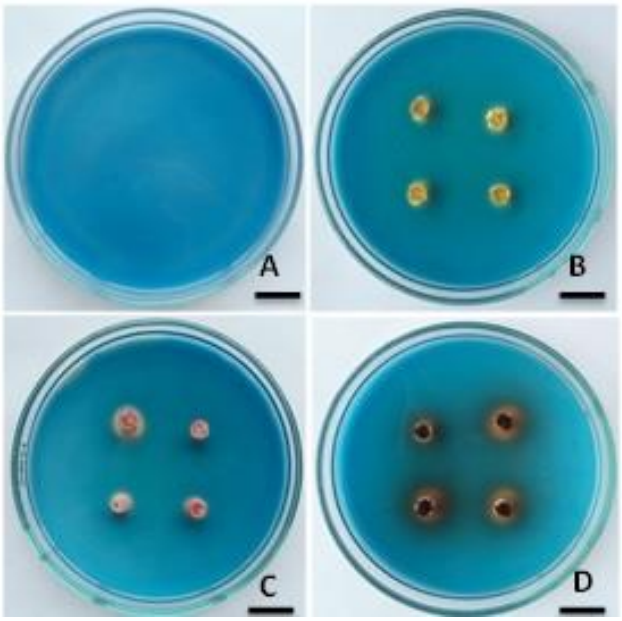
ภาพ 146 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย CMU-S1 เวลา 5 วัน. A.เส้นใยเหนืออากาศ Bar =10 mm, B. เส้นใยใต้อาหาร Bar = 10 mm, C.โคโลนีเดี่ยว Bar = 1 mm. และ D. การจัดเรียงตัวของ เส้นใยและสปอร์ Bar = 10 µm



ภาพ 147 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนแบคทีเรีย CMU-S3 เวลา 5 วัน. A.เส้นใยเหนืออากาศ Bar = 10 mm, B. เส้นใยใต้อาหาร Bar = 10 mm, C.โคโลนีเดี่ยว Bar = 1 mm. และ D. การจัดเรียงตัวของเส้นใยและสปอร์ Bar = 10 µm

6. การศึกษาความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอร์ (siderophore)

แอคติโนแบคทีเรียที่มีการสร้างไซเดอโรฟอร์พบว่า แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-PW4 สร้างไซเดอโรฟอร์ 0.2 mm CMU-S1 มีการสร้างไซเดอโรฟอร์ 0.2 mm และCMU-S3 สร้างไซเดอโรฟอร์ 0.4 mm แสดงดังภาพ 148

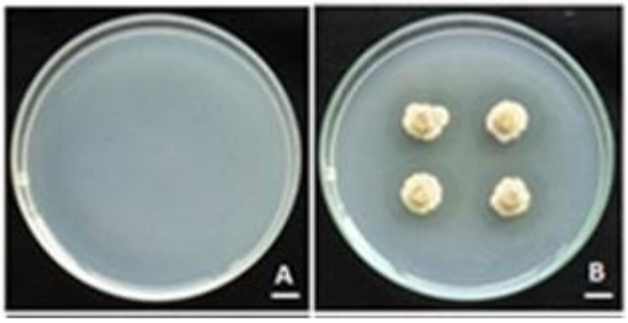


ภาพ 148 การสร้างไซเดอโรฟอร์ (siderophore) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เวลา 7 วัน. A. ชุดควบคุม, B.CMU-PW4, C. CMU-S1. และ D. CMU-S3 Bar = 10 mm.

การคัดกรองการสร้างเอนไซม์

เอนไซม์ไคติเนส

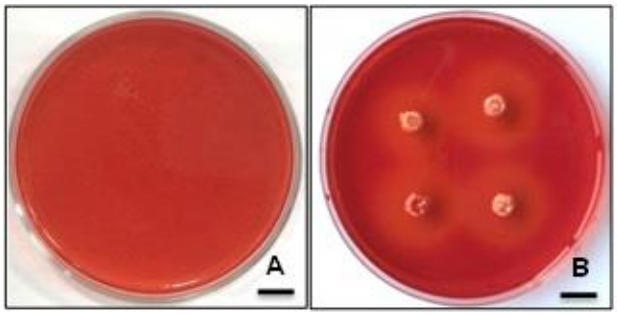
แอคติโนแบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสพบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-PW4 มีการผลิตเอนไซม์ไคติเนส 2.41 mm แสดงดังภาพ 149



ภาพ 149 การสร้างเอนไซม์ไคติเนส บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 7 วัน. A. ชุดควบคุม, B.CMU-PW4, Bar = 10 mm

เอนไซม์เซลลูเลส

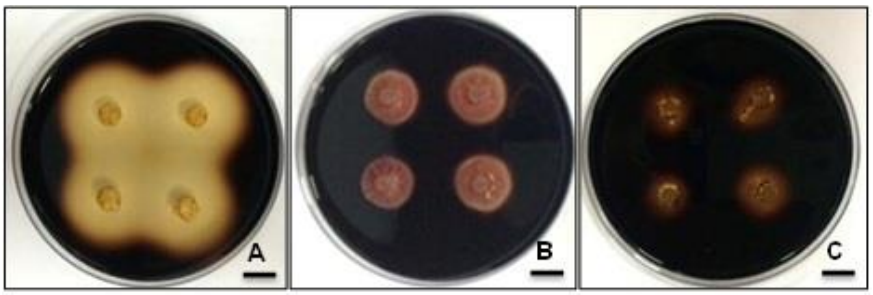
แอคติโนแบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสพบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-PW4 มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 2.64 mm แสดงดังภาพ 150



ภาพ 150 การสร้างเอนไซม์ไคติเนส บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 7 วัน. A. ชุดควบคุม, B.CMU-PW4, Bar = 10 mm

เอนไซม์อะไมเลส

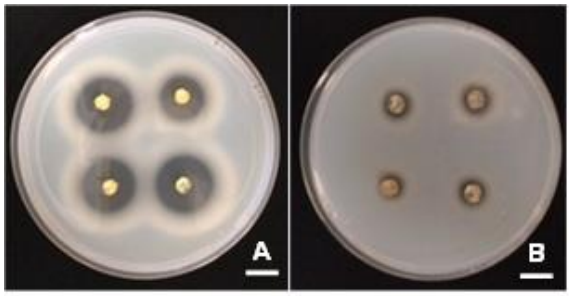
แอคติโนแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสพบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-PW4 มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส 3.81 mm CMU-S1 มีการผลิต 1.50 mm และ CMU-S3 มีการผลิต 2.62 mm แสดงดังภาพ 151



ภาพ 151 การสร้างเอนไซม์อะไมเลส บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 7 วัน. A. CMU- PW4, B.CMU-S1, C.CMU-S3, Bar = 10 mm

เอนไซม์โปรติเอส

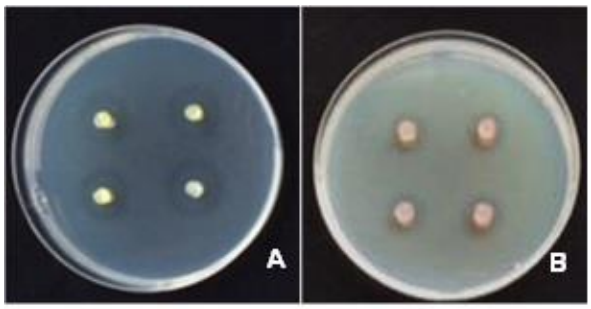
แอคติโนแบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสพบว่า แอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท CMU-PW4 มีการสร้าง 3.70 mm และ CMU-S1 มีการสร้าง 1.59 mm แสดงดังภาพ 152



ภาพ 152 การสร้างเอนไซม์โปรติเอส บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 7 วัน. A. CMU- PW4, B. CMU-S1, Bar = 10 mm

เอนไซม์ไลเปส

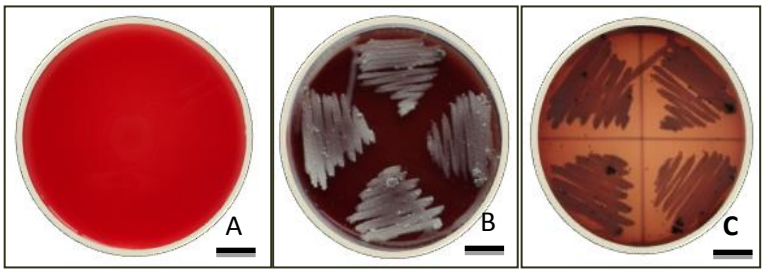
แอคติโนแบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสพบว่าแอคติโนแบคทีเรีย CMU-PW4 มีการสร้าง 2.41 mm และ CMU-S1 มีการสร้าง 2.05 mm แสดงดังภาพ 153



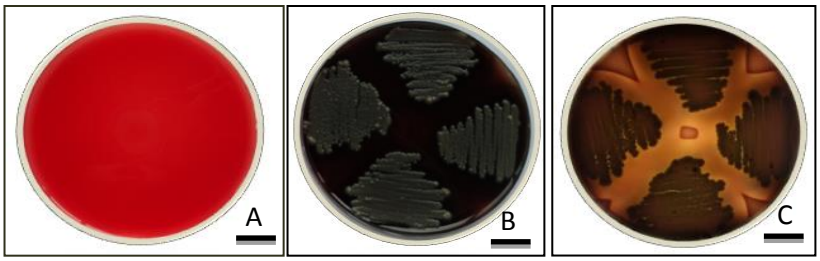
ภาพ 153 การสร้างเอนไซม์ไลเปส บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา 7 วัน. A. CMU- PW4, B. CMU-S1, Bar = 10 mm

การสลายเม็ดเลือดแดง Hemolysis

แอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกพบว่า ไอโซเลท CMU-PW4 ไม่มีการสลายเม็ดเลือดแดง เป็นชนิดแกรมมา และ ไอโซเลท CMU-S1 มีการสลายเม็ดเลือดแดงชนิดเบตา แสดงดังภาพ 154 และ155



ภาพ 154 การสลายเม็ดเลือดแดง Hemolysis แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-S1 ชนิดเบตา บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เวลา 7 วัน. A. ชุดควบคุม, B.ด้านหน้าจานเลี้ยงเชื้อ และC. ด้านหลังจานเลี้ยงเชื้อ Bar= 10 mm



ภาพ 155 การสลายเม็ดเลือดแดง Hemolysis แอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-S1 ชนิดเบตา บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เวลา 7 วัน. A. ชุดควบคุม, B.ด้านหน้าจานเลี้ยงเชื้อ และC. ด้านหลังจานเลี้ยงเชื้อ Bar= 10 mm

วิจารณ์ผลการการทดลอง

จากการแยกและคัดกรองแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินรอบรากข้าวจังหวัดเชียงใหม่ ดินรอบรากมันสำปะหลังจังหวัดอุดรธานี และดินรอบรากอ้อยจังหวัดอุดรธานี จำนวน 15 ตัวอย่าง ที่สามารถเจริญบนอาหารคัดแยก Humic Acid Vitamin (HV) agar และ Starch Casein (SC) agar พบว่าสามารถแยกแอคติโนแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 110 ไอโซเลท จะเห็นว่าแอคติโนแบคทีเรียที่คัดแยกจากดินรอบรากมีความหลากหลายทางชีวภาพและปริมาณของจุลินทรีย์ค่อนข้างสูง เนื่องจากดินรอบรากเป็นแหล่งแร่ธาตุของสารอาหาร รวมทั้งรากพืชมีการปล่อยสารออกมา (root exudates) (Merckx et al., 1987) เช่น กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ เอนไซม์ เมือก และสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่เป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ในการใช้เป็นแหล่งของสารอาหาร และแหล่งของพลังงาน (Bertin *et al.*, 2003) นอกจากนี้พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายอนินทรีย์บริเวณรอบรากพืชมีปริมาณมากกว่าในดินทั่วไป (Vasquez *et al.*, 2000) เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการการละลายฟอสเฟตบนอาหาร

Pikovskaya's agar ที่มีการเติม Tricalcium phosphate : $Ca_3(PO_4)_2$ พบว่ามีแอคติโนแบคทีเรียจำนวน 83 ไอโซเลท มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟต เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบบนอาหาร Pikovskaya's agar พบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-S3 มีการสร้างวงใสในการละลายฟอสเฟตได้ดีที่สุด และนำไปวิเคราะห์การผลิตกรดด้วย HPLC พบว่าไอโซเลท CMU-S3 มีการผลิตกรดออกซาลิก 1.91 ± 0.14 mg./ 200 mg Crude เท่ากับ 9.5 µg/ml และผลิตกรดทาร์ทาริก 14.04 ± 0.61 mg./ 200 mg Crude เท่ากับ 70.2 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าจุลินทรีย์จะผลิตกรด เช่น แลคติก, ซิตริก, 2-คีโตกลูโคนิก, มาลิก, ออกซาลิก, มาโลนิก, ทาร์ทาริก และซักซินิก (Kucey el. Al., 1989) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารคีเลตในการจับกับธาตุอื่นที่มีประจุบวก เช่น สังกะสี แมงกานีส เหล็ก ทองแดง แมกนีเซียม และแคลเซียม และจากงานวิจัยพบว่าการผลิตกรดออกซาลิกโดยใช้ในรูปของการละลาย Tricalcium phosphate ไอโซเลท CMU-S3 สามารถผลิตกรดออกซาลิกได้เท่ากับ 9.5 µg/ml ซึ่งพบว่ามีการผลิตได้สูงกว่า *Pseudomonas* sp. BIHB 751 ที่มีการผลิตกรดออกซาลิกเท่ากับ 7.7 µg/ml (Vyas and Gulati 2009) นอกจากนี้พบว่าเกือบ 20% ของ *Streptomyces* sp. และ *Micromonospora* sp. มีศักยภาพในการละลายฟอสเฟต (Barreto et al., 2008;El-Tarabily et al., 2008; Hamdali et al. 2008; Khan et al., 2014) เมื่อนำแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมด 110 ไอโซเลท ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia oryzae* BS265 สาเหตุโรคไหม้ในข้าวพบว่ามีจำนวน 5 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricular ia oryzae* BS265 ซึ่งพบว่าไอโซเลท CMU-PW4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่า *Streptomyces* SP. PM5 มีกิจกรรมในการต้านเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ภายในห้องปฏิบัติการ และสามารถยับยั้งการแสดงออกของโรคลดน้อยลงในสภาวะเรือนกระจก (Prabavathy et al., 2006) และนำมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* XPK1 สาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าวพบว่ามีจำนวน 3 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* XPK1 ซึ่งพบว่าไอโซเลท CMU-S1 มีการยับยั้งได้ดีที่สุด ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า *Streptomyces termitum* ATC-2 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Donghua et al., 2013) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกแอคติโนแบคทีเรียจากคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตและความสามารถการเป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว ไอโซเลท CMU-S3 CMU-PW4 และ CMU-S1 จัดจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยา การสร้างสปอร์ การสร้างเส้นใยใต้อาหาร เส้นใยเหนืออากาศ และการวิเคราะห์ 2-6 diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของแอคติโนแบคทีเรียโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท เป็น *LL*-DAP จัดเป็น *Streptomyces* sp. โดยความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียที่พบจะขึ้นอยู่กับปริมาณธาตุอาหารในดิน ซึ่งส่วนใหญ่กลุ่ม Streptomycetes จะพบมากในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ ที่มีแหล่งของคาร์บอน ไนโตรเจนในปริมาณที่เพียงพอ (Stackebrandt et al., 1981) เมื่อทดสอบการสร้างไซเดอโรฟอร์ และการผลิตเอนไซม์ พบว่าไอโซเลท CMU-PW4 มีการสร้างไซเดอโร

ฟอร์และผลิตเอนไซม์ต่างๆได้ทุกชนิด เช่น ไคติเนส เซลลูเลส อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ไอโซเลท CMU-S1 มีการสร้างไซเดอโรฟอร์และผลิตเอนไซม์ เช่น อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ส่วนไอโซเลท CMU-S3 พบว่ามีการสร้างไซเดอโรฟอร์ และผลิตเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งจากฐานข้อมูลพบว่าแอคติโนแบคทีเรียมีความหลากหลายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนอกจากจะมีความสำคัญในการผลิตยาปฏิชีวนะ เอนไซม์ และยังพบว่ามีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช (Hamdali et al., 2008). รวมทั้งทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดงพบว่าไอโซเลท CMU-PW4 ไม่มีการสลายเม็ดเลือดแดงเป็นชนิดแกมมา และ ไอโซเลท CMU-S1 มีการสลายเม็ดเลือดแดงชนิดเบตา จากการทดลองผลของแอคติโนแบคทีเรียที่ละลายฟอสเฟตต่อการเป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวพบว่าไอโซเลท CMU-S3 ที่มีคุณสมบัติการละลายฟอสเฟตให้ผลการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว แต่เป็นที่น่าสังเกตได้ว่าไอโซเลท CMU-PW4 และไอโซเลท CMU-S1 ให้ผลการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวได้ดีกว่า CMU-S3 ดังนั้นการเป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวอาจไม่ได้มีผลจากการละลายฟอสเฟตโดยตรง แต่อาจเกิดจากกลไกอื่น เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะ การเป็นปรสิต หรือ hydrolytic enzyme ซึ่งสามารถสร้างสารทำลายผนังของเชื้อราได้ (Gomes *et al*., 2000) นอกจากนี้จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าไอโซเลท CMU-S1 เป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าว แต่ไอโซเลท CMU-S1 มีการสลายเม็ดเลือดแดง ดังนั้นการนำไปพัฒนาในการควบคุมโรคทางชีวภาพควรมีการศึกษาผลจากความเป็นพิษและความเข้มข้นของปริมาณความเป็นพิษที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ประกอบการ

สรุปผลการการทดลอง

จากการทดลองสามารถคัดแยกแอคติโนแบคทีเรียจากตัวอย่างดินรอบรากข้าวจังหวัดเชียงใหม่ ดินรอบรากมันสำปะหลังจังหวัดอุดรธานี และดินรอบรากอ้อยจังหวัดอุดรธานีได้ทั้งหมด 110 ไอโซเลท พบว่า 83 ไอโซเลท มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟตบนอาหาร Pikovskaya's agar ที่มีการเติม Tricalcium phosphate : $Ca_3(PO_4)_2$ ซึ่งพบว่าไอโซเลท CMU-S3 มีการสร้างวงใสในการละลายฟอสเฟต เท่ากับ 22.8 มิลลิเมตร ไอโซเลท CMU-S31 และ CMU-S48 มีการสร้างวงใสในการละลายฟอสเฟตเท่ากับ 20.0 มิลลิเมตร เมื่อนำไอโซเลท CMU-S3 ไปวิเคราะห์การผลิตกรดพบว่าไอโซเลท CMU-S3 มีการผลิตกรดออกซาลิก 1.91±0.14 มิลลิกรัม/ 200 มิลลิกรรม Crude และผลิตกรดทาร์ทาริก 14.04±0.61 มิลลิกรัม/200 มิลลิกรัม Crude เมื่อนำแอคติโนแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 110 ไอโซเลท ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* BS265 สาเหตุโรคไหม้ในข้าวพบว่ามีจำนวน 5 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. oryzae* BS265 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตั้งแต่ 50.00% ขึ้นไป ซึ่งพบว่าแอคติโนแบคทีเรียไอโซเลท CMU-PW4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 100% และไอโซเลทอื่นๆที่สามารถให้ผลการยับยั้งได้ดีรองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท CMU-S1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 70.00%, CMU-S40 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 57.77% และ CMU-S8 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 54.00% และCMU-S3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 52.00% และทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย

X. oryzae XPK1 สาเหตุโรคขอบใบแห้งในข้าวพบว่ามีจำนวน 3 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *X. oryzae* XPK1 ตั้งแต่ 20-25 มิลลิเมตร ซึ่งพบว่าไอโซเลท CMU-S1 มีการยับยั้งสูงสุด 25 มิลลิเมตร เมื่อเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเท่ากับ 25 มิลลิเมตร และไอโซเลทอื่นๆที่สามารถให้ผลการยับยั้งได้ดีรองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท CMU-S1, CMU-S3 และ CMU-PW4 เมื่อนำแอคติโนแบคทีเรียที่คัดเลือกจากการละลายฟอสเฟตและการเป็นปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในข้าวไอโซเลท CMU-S3 CMU-PW4 และ CMU-S1 จัดจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยา การสร้างสปอร์ การสร้างเส้นใยใต้อาหาร เส้นใยเหนืออากาศ และการวิเคราะห์ 2-6 diaminopimelic acid (DAP) พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท เป็น *LL-DAP* จัดว่าเป็น *Streptomyces* sp. เมื่อทดสอบการสร้างไซเดอโรฟอร์และการผลิตเอนไซม์พบว่าไอโซเลท CMU-PW4 มีการสร้างไซเดอโรฟอร์และสามารถผลิตเอนไซม์ต่างๆได้ทุกชนิด เช่น ไคติเนส เซลลูเลส อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ไอโซเลท CMU-S1 มีการสร้างไซเดอโรฟอร์และสามารถผลิตเอนไซม์ เช่น อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส สำหรับไอโซเลท CMU-S3 พบว่ามีการสร้างไซเดอโรฟอร์และผลิตเอนไซม์อะไมเลส รวมทั้งทดสอบการสลายเม็ดเลือดแดงพบว่าไอโซเลท CMU-PW4 ไม่มีการสลายเม็ดเลือดแดงเป็นชนิดแกมมา และ ไอโซเลท CMU-S1 มีการสลายเม็ดเลือดแดงชนิดเบตา

3.3 การใช้แอคติโนมัยซีทจากดินในการควบคุมโรคหลาวของข้าว

การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีสต์

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณรอบรากข้าวที่สมบูรณ์ไม่เกิดโรค เก็บตัวอย่างดินใส่ในถุงพลาสติกที่รัดปากถุงให้สนิท บรรจุในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง เพื่อทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ ชั่งดิน 1 กรัมจากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีค่าความเจือจางเท่ากับ 10^{-1}ถึง 10^{-3} ดูดสารแขวนลอยในแต่ละความเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารคัดเลือก ได้แก่ Starch casein agar และ Humic acid vitamin agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 – 14 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Hickey Treasner's agar เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาระยะยาว (Wellington and Williams, 1978)

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลทที่แยกได้บนอาหาร ISP-2 และอาหาร ISP-3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเจริญ สีของสปอร์ สีเส้นใยอาหารและสีรงควัตถุที่ละลายในอาหารเพื่อจัดกลุ่มแอกติโนมัยซีสต์โดยเทียบกับสีมาตรฐาน The NBS/IBCC Color System (National Bureau of Standards/Inter Society Color Council) (Mundie, 1995)

การแยกเชื้อราก่อโรค

ทำการเก็บตัวอย่างใบข้าวที่เป็นโรคมาทำการแยกเชื้อโดยวิธีการ tissue transplanting ตัดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชบริเวณคาบต่อระหว่างชิ้นส่วนที่เป็นโรคกับชิ้นส่วนที่ไม่เป็นโรคให้มีขนาดประมาณ 0.5 ×0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 1% sodium hypochlorite (10% chlorox) นาน 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จานละ 3 ชิ้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตเชื้อราเจริญออกจากเนื้อเยื่อ จากนั้นทำการตัดบริเวณปลายเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้งเพื่อให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรค

สังเกตลักษณะของเชื้อราสาเหตุที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยบันทึกลักษณะต่างๆ ดังนี้ ลักษณะโคโลนี ลักษณะเส้นใย การสร้าง pigment การสร้าง spore mass ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

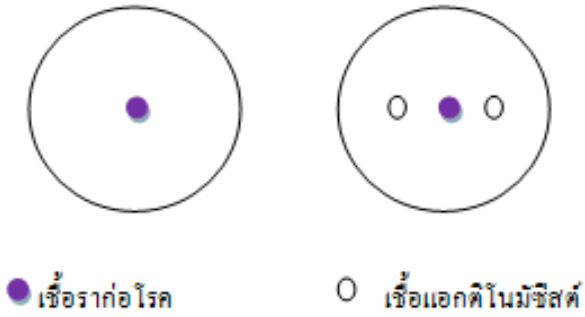
การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

ทำการปลูกเชื้อบนเมล็ด (seed inoculation) โดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *Fusarium* sp. โดยทำการเลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน เทน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไปในจานอาหาร ใช้แผ่นสไลด์ที่ลนไฟฆ่าเชื้อขูดสปอร์ที่เจริญบนอาหารมากรองด้วยผ้าขาวบางพับ 2 ชั้นที่รองรับด้วยบีกเกอร์ นำไปนับจำนวนเส้นใยด้วย haemacytometer โดยปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้อยู่ในช่วงประมาณ 10^6 – 10^7 spore/ml. หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวมาแช่ใน 10% sodium hypochlorite นาน 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 – 3 ครั้ง นำเมล็ดที่ได้ไปแช่ในสปอร์แขวนลอยที่เตรียมไว้โดยแช่เมล็ดไว้นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นผึ่งให้แห้งนาน 12 ชั่วโมง นำไปเพาะบนกระดาษชื้น โดยเพาะเมล็ดข้าว แบ่งเป็น 4 ซ้ำๆ 100 เมล็ด ตรวจผลเปอร์เซ็นต์การงอก การติดเชื้อของเมล็ดและต้นกล้าผิดปกติจากการเพาะบนกระดาษชื้น

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าวด้วยวิธี dual culture technique โดยเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium* sp. บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นใช้ปลาย Pasteur's pipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. เจาะชิ้นวุ้นบริเวณปลายโคโลนีของราก่อโรคและใช้เข็มเขี่ยชิ้นเชื้อราวางไว้ตรงกลางจานอาหารทดสอบ PDA เจาะชิ้นวุ้นที่มีการเจริญของโคโลนีแอกติโนไมซีสต์ 2 ชิ้น วางขนาบข้างโคโลนีของราก่อโรค (Naik et al., 2009) (ภาพ 156)บันทึกผลโดยวัดรัศมีโคโลนีของราก่อโรคในจาน

ทดสอบและจานควบคุม ทำการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยทำการวัดรัศมีของเชื้อราสาเหตุ



ภาพ 156 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยวิธี dual culture

การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

คัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้สูงมาทดสอบได้แก่ ไอโซเลท RH1-5-22, RH15-14, S4-3,S4-3.2, S6-2 และ *S. hygroscopicus* โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้นที่เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไปวางบนอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) โดยวิธี spot inoculation บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเทสารละลาย 1% Congo red เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที ล้างออกด้วยสารละลาย 1% NaCl ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาทีจนเห็นวงใสแล้วจึงเทสารละลายทิ้ง วัดความกว้างของบริเวณที่เกิดวงใสและบันทึกผล

การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

นำเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ที่คัดเลือกเลี้ยงในอาหาร CMC broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดชมพู่ขนาด (flask) ขนาด 250 มิลลิเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใส (supernatant) มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสโดยวิธีการ Miller (1959)

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

ทำการเจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อแอกติโนมัยซีสต์เจริญดีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ chitin broth ทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (supernatant) มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินโดยวิธีการ Agar well บนอาหาร chitin agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดทำการวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้นแล้วบันทึกผล

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ทำการเจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อแอกติโนมัยซีสต์เจริญดีไปวางบนอาหาร ISP-2 ที่ผสม 1% เจลาติน โดยวิธี spot inoculation ทดสอบ 4 ซ้ำ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็น 7 วัน เมื่อครบกำหนดวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณการเกิดวงใสของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์และบันทึกผล

การศึกษาประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืช

การทดสอบการผลิตไซเดอร์โรฟอร์

เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์บริสุทธิ์จำนวน 6 ไอโซเลทบนอาหารแข็ง ISP- 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ ปลาย Pasteur's pipette เจาะโคโลนีแอกติโนไมซีสต์ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) นำไปวางบนผิวหน้าอาหาร chrome azurole S agar (CAS) (Schwyn and Neilands, 1987) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วันในที่มืด ทำ 3 ซ้ำ บันทึกผลโดยวัดรัศมีโคโลนีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนที่เกิดขึ้น

การสร้าง IAA

เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์บริสุทธิ์บนอาหาร ISP-2 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการเจาะชิ้นวุ้นแอกติโนไมซีสต์ขนาด 5 มม.จำนวน 1 ชิ้นลงในอาหาร ISP-2 ที่เติม 2% L-trytophan นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณ IAA โดยทดสอบกับ Salkowski reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปไว้ในที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตรและบันทึกผล (Khamna et al. 2010)

การทดสอบการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ $Ca_3 (PO_4)_2$

เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์บริสุทธิ์บนอาหารสูตร ISP-2 เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้ปลาย Pasteur's pipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. เจาะชิ้นวุ้นบริเวณที่มีโคโลนีของเชื้อเจริญอยู่ นำไปวางบนอาหารแข็งสูตร Pikovskaya's medium (PVK) ทำ 3 ซ้ำเพื่อทดสอบการ

ละลายฟอสเฟต บ่มเชื้อไว้ 7 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีแอกติโนไมซีสต์และบันทึกผล

ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์และสารที่ผลิตขึ้นโดยแอกติโนมัยซีสต์ควบคุมเชื้อราด้วยวิธี blotter method

เพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ลงในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) ซึ่งมีเปลือกกุ้งเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน

นำเมล็ดข้าวสายพันธุ์ดอกมะลิ 105 ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่ใน10% Sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำเมล็ดข้าวแช่ใน spore suspension ที่ทำการปรับความเข้มข้น 10^6สปอร์/ มิลลิลิตร ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ โดยแต่ละกรรมวิธีแช่เมล็ดข้าวจำนวน 100 เมล็ด ซึ่งทดสอบทั้งหมด 7 วิธีได้แก่

วิธีที่ 1 เมล็ดข้าวที่ไม่ฆ่าเชื้อที่ผิว +แช่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 มิลลิลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

วิธีที่ 2 เมล็ดข้าวที่ฆ่าเชื้อที่ผิว + แช่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 มิลลิลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

วิธีที่ 3 เมล็ดข้าวที่ฆ่าเชื้อที่ผิว + แช่ใน spore suspensionของเชื้อรา *Fusarium* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีที่ 4 เมล็ดข้าวที่ฆ่าเชื้อที่ผิว + แช่ใน spore suspensionของเชื้อรา *Fusarium* sp.+ สารเคมี (mencozab) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีที่ 5 เมล็ดข้าวที่ฆ่าเชื้อที่ผิว + แช่ใน spore suspensionของเชื้อรา *Fusarium* sp.+ แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ชนิด A เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีที่ 6 เมล็ดข้าวที่ฆ่าเชื้อที่ผิว + แช่ใน spore suspensionของเชื้อรา *Fusarium* sp. + แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ชนิด Bเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีที่ 7 เมล็ดข้าวที่ฆ่าเชื้อที่ผิว + แช่ใน spore suspensionของเชื้อรา *Fusarium* sp. + แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ชนิด A+B เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการแช่ตามวิธีต่างๆ ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปเพาะบนกระดาษชื้นด้วยวิธี blotter method โดยวางบนกล่องเก็บความชื้น จำนวน 100 เมล็ดต่อกล่อง จากนั้นบ่มทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10 วัน ทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าวและการติดเชื้อที่เมล็ด ทำการวัดความสูง ความยาวของราก และลักษณะสีของราก

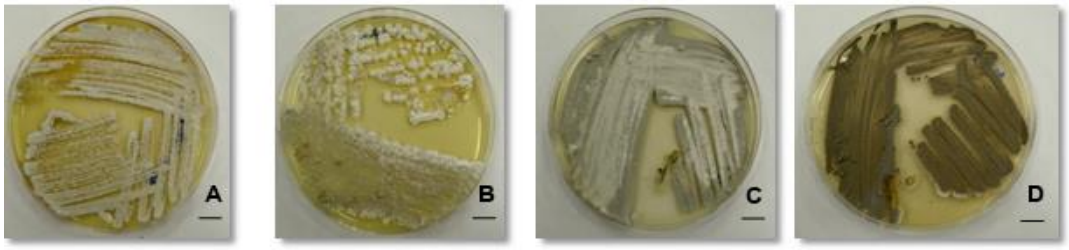
ผลการทดลอง

การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีสต์

ทำการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณนาข้าว ในจังหวัดเชียงใหม่ ดินมีลักษณะเป็นดินเหนียวแฉะและมีสีดำ เมื่อทำการคัดแยกเชื้อบนอาหาร Starch casein agar และ humic acid vitamin agar พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์

ในการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพ 157) พบว่าส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นสาย โคโลนีมีการเจริญแบบยกตัวขึ้น และลักษณะคล้ายหนัง สีของโคโลนีได้แก่ สีขาว เหลือง เทา เป็นต้น เมื่อทำการย้อมติดสีแกรมพบว่ามีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายเชื้อรา สร้างสปอร์หลายรูปแบบ เมื่อทำการทดสอบการบนอาหาร ISP-6 พบว่ามี 7 ไอโซเลทที่สามารถสร้างเมลานินได



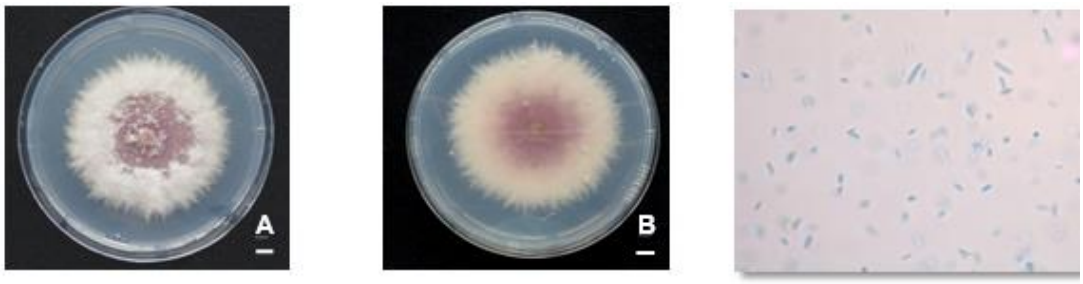
ภาพ 157 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์บนอาหาร ISP2

การแยกเชื้อราก่อโรคข้าว

จากการทดสอบสามารถแยกเชื้อราก่อโรคข้าวจากตัวอย่างใบข้าวที่แสดงอาการของโรค โดยวิธี surface sterilization และ tissue transplanting method บนอาหาร PDA พบว่าเมื่อนำมาแยกเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร PDA สามารถแยกเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้ 1 ไอโซเลท จากนั้นทำการทดสอบขั้นต่อไป

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรคข้าว

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Fusarium* sp. เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ระยะเวลา 7 วัน (ภาพ 158) พบว่าเส้นใยมีลักษณะสีขาวฟู สร้างรงควัตถุสีม่วงโคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.0 เซนติเมตร มีสร้างสปอร์ 2 แบบคือ macroconidia มีขนาดรูปร่างยาวเรียว ปลายเรียว มี 3 - 4 septum พบได้น้อยและ microconidia มีขนาดเล็ก รูปไข่ มี 1-2 septum พบจำนวนมาก



ภาพ 158 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Fusarium* sp. บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน (C) ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

จากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อรา *Fusarium* sp. และเชื้อรามาตรฐาน *Fusarium moniliforme* บนเมล็ดข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105 ด้วยวิธี blotter method พบว่า บนกระดาษชื้นเมล็ดที่ปลูกเชื้อด้วย *F. moniliforme* และ *Fusarium* sp. มีเชื้อราเกาะบนเมล็ดและต้นกล้าผิดปกติแตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ โดยชุดที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Fusarium* sp. ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 82.7% พบการติดเชื้อของเมล็ดเท่ากับ 17.25% และชุดที่ปลูกด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 84% พบการติดเชื้อของเมล็ดเท่ากับ 16% ซึ่งแตกต่างจากเมล็ดในชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อคือเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 97% พบการติดเชื้อของเมล็ดเท่ากับ 10% จากข้อมูลข้างบนเมื่อทำการวิเคราะห์สถิติพบว่าชุดที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* และ *Fusarium* sp. ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหมายถึงเชื้อราทั้งสองก่อให้เกิดโรคถอดฝักดาบได้ และพบว่าเมล็ดข้าวพบางส่วนไม่งอกเนื่องจากมีเส้นใยเชื้อราปกคลุม ลักษณะของเมล็ดข้าว ส่วนที่เมล็ดที่สามารถงอกได้พบว่าต้นกล้ามีอาการผิดปกติ มีลักษณะแคระแกรน

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค

จากการทดลองนำเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ทั้งหมด 24 ไอโซเลทมาทดสอบกับเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Fusarium moniliforme* โดยวิธี dual culture technique บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วันพบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีสต์จำนวน 13 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 47.22±1.96 ถึง 85.45 ± 1.48 และมีเพียง 6 ไอโซเลทเท่านั้นที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์และจากการประเมินค่าการยับยั้งพบว่า ไอโซเลท RH1-5-22, RH1-5-14, S4-3 และ S4-3.2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (เกษม 2532) ดังแสดงในตาราง 91

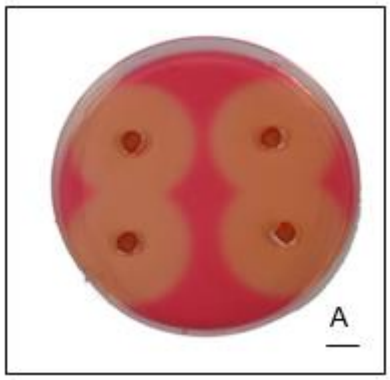
ตาราง 91 ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคข้าว

ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย (%)	
	Fusarium moniliforme	*Fusarium* sp.
RH1-5-22	85.45 ± 1.48	82.42 ± 1.71
RH1-5-14	84.24 ± 0.86	81.02 ± 2.85
S.hygroscopicus	65.07 ± 0	78.18 ± 0
S4-3	84.24 ± 0.86	74.16 ± 1.78
S4-3.2	84.24 ± 0.86	80 ± 2.57
S6-2	64.7 ± 1.61	70.37 ± 3.27

การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์

ผลทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

คัดเลือกแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลทที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 70 % ขึ้นไป จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท RH1-5-22 RH1-5-14 S4-3 S4-3.2 S6-2 และ *S. hygroscopicus* มาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธี spot inoculation บนอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) (ภาพ 159) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท S4-3 และ S4-3.2 ให้ความกว้างวงใสสูงสุดเท่ากับ 4.725 ± 0.13 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่เชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท RH1-5-14 ให้ความกว้างวงใสเท่ากับ 3.65±0.1เซนติเมตร



ภาพ 159 ความสามารถในการสร้างวงใสบนอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC agar) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

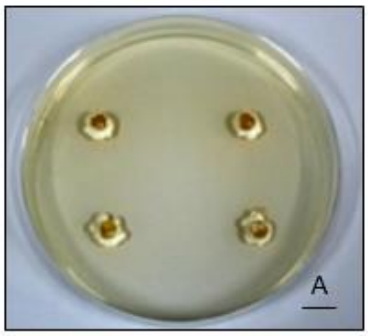
เมื่อนำแอกติโนมัยซีสต์ที่มีความสามารถสร้างวงใสบนอาหาร CMC agar ได้ มาทดสอบวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธีการของ Miller (1959) พบว่าแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท S6-2 ให้ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1310.25 ug/ml และให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเท่ากับ 485.28 U/ml และเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ S4-3 ให้ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 910.25 ug/ml และให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 337.13U/ml ตามลำดับ

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

คัดเลือกแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลทที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 70 % ขึ้นไป จำนวน 6 ไอโซเลทมาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสโดยวิธี Agar well บนอาหาร chitin agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลทไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

คัดเลือกแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลทที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 70 % ขึ้นไป จำนวน 6 ไอโซเลทมาทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี spot inoculation บนอาหาร ISP-2 ที่ผสม 1% เจลาติน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลทไม่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ (ภาพ 160)



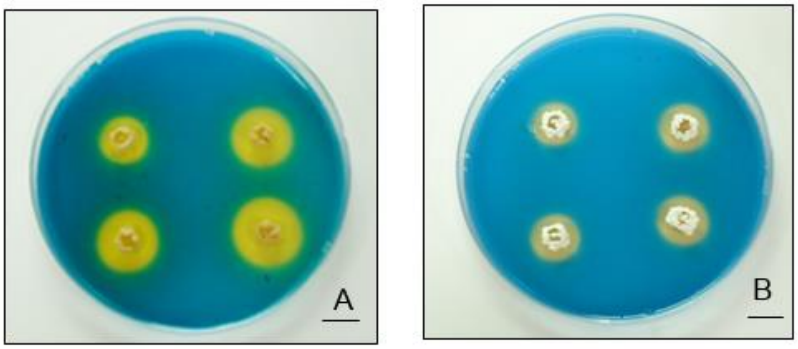
ภาพ 160 การทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส ให้ผลลบไม่เกิดวงใส บนอาหาร ISP2 + 1% gelatin (A) S4-3.2

การศึกษาประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืช

การทดสอบการผลิตไซเดอร์โรฟอร์

เมื่อนำแอกติโนไมซีสต์ทั้งหมด 6 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้มาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตไซเดอโรฟอร์ลงบนอาหาร Chrome

Azurol S (CAS) agar ที่มีอาหาร King B เป็นอาหารพื้นฐานพบว่า แอกติโนไมซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถผลิตไซเดอร์โรฟอร์โดยเปลี่ยนสีอาหารจากสีฟ้าเป็นสีเหลืองได้ (ภาพ 161) โดยแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท Rh1-5-22 มีขนาดสูงสุดเท่ากับ 2.22 ± 0.34 เซนติเมตร



ภาพ 161 ลักษณะการสร้างไซเดอโรฟอร์ของแอกติโนไมซีสต์ (A)ไอโซเลท Rh1-5-22 (B) ไอโซเลท S4-3.2 บนอาหาร Chrome Azurol S (CAS) agar

การสร้างกรด Indole acetic acid (IAA)

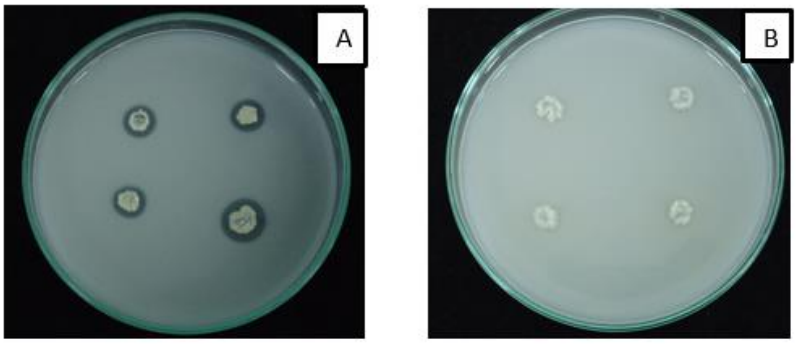
จากการทดสอบคุณสมบัติในการสร้าง Indole acetic acid (IAA) ของแอกติโนไมซีสต์จำนวน 6 ไอโซเลทพบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีสต์ จำนวน 5 ไอโซเลทสามารถผลิตกรด IAA ได้ โดยปริมาณ IAA ที่สร้างขึ้นอยู่ในช่วง 2.11 ± 0.03 ถึง7.71 ± 0.03 µg/mL โดยแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท RH1-5-22 ที่คัดสามารถผลิต IAA ได้สูงสุด ดังตาราง 92

ตาราง 92 ปริมาณ IAA ที่เชื้อแอกติโนไมซีสต์ผลิตเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน

จีนัส	ไอโซเลท	ปริมาณ IAA (µg/mL)
Streptomyces	RH1-5-22	7.71 ± 0.03
Streptomyces	RH1-5-14	3.8 ± 0
Streptomyces	S6-2	-
Streptomyces	S4-3	2.11 ± 0.03
Streptomyces	S4-3.2	5.38 ± 0.02
Streptomyces	*S.hygroscopicus*	3.12 ± 0.02

การทดสอบการละลายฟอสเฟตอินทรีย์ในรูป $Ca_3(PO_4)_2$

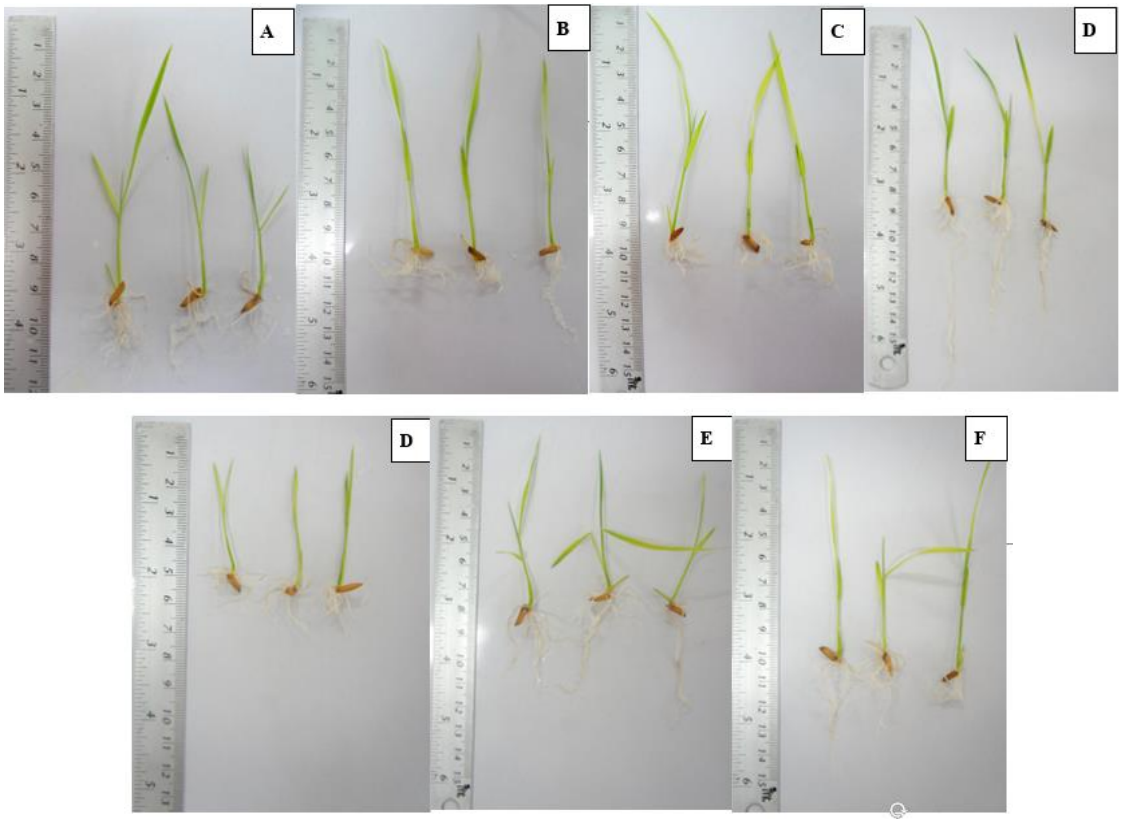
จากการทดสอบความสามารถในการละลายฟอสเฟตในรูป $Ca_3(PO_4)_2$ บนอาหารแข็งสูตร Pikovskaya's medium (PVK) พบว่ามีเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลทที่แสดงลักษณะวงใสล้อมรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง PVK (ภาพ 162) ได้แก่ เชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท S6-2 มีขนาดวงใสสูงสุดเท่ากับ 0.25 ± 0.05 เซนติเมตรและเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท S4-3.2 มีขนาดวงใสเท่ากับ 0.11 ± 0.02 เซนติเมตร



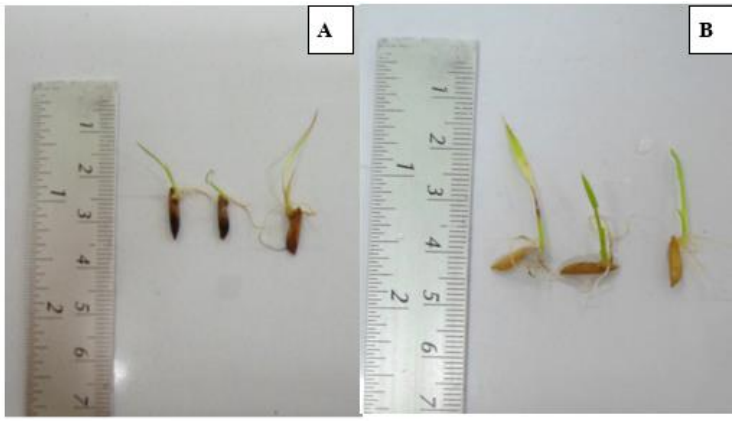
ภาพ 162 ลักษณะของโคโลนีแอกติโนไมซีสต์และการเกิดวงใสในการละลายฟอสเฟตบนอาหารแข็งสูตร PVK (A)ไอโซเลท S6-2 (B) ไอโซเลท S4-3.2

ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์และสารที่ผลิตขึ้นโดยแอกติโนมัยซีสต์ควบคุมเชื้อราด้วยวิธี blotter method

จากการควบคุมโรคถอดฝักดาบที่เกิดจากเชื้อรา fusarium sp. ด้วยวิธี blotter method โดยแช่เมล็ดข้าวพันธุ์หอมดอกมะลิ 105 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ 2 ไอโซเลทได้แก่ ไอโซเลท RH1-5-22 ,S6-2 และ เชื้อผสม (RH1-5-22 + S6-2) พบว่าหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 10 วัน พบว่าเมล็ดที่ปลูกเชื้อราแล้วแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท Rh1-5-22, S6-2 และ เชื้อผสม (RH1-5-22 + S6-2) มีเปอร์เซ็นต์การงอกเฉลี่ยเท่ากับ 94, 90 และ 94 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่แช่เมล็ดในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อและแช่เมล็ดและ mencozab ให้เปอร์เซ็นต์การงอกเฉลี่ยเท่ากับ 92 และ 91 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 163) กลุ่มที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Fusarium* sp. ให้เปอร์เซ็นต์การงอกเฉลี่ยเท่ากับ 77 เปอร์เซ็นต์และอัตราการติดเชื้อที่เมล็ดเท่ากับ 23 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการวัดความสูงและความยาวรากของต้นกล้าระยะ 10 วันพบว่าเมล็ดข้าวที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท Rh1-5-22 มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 3.01 และความยาวรากเฉลี่ย 1.94 เซนติเมตร เมล็ดข้าวที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท S6-2 มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 5.54 และ ความยาวรากเฉลี่ย 3.01 เซนติเมตร และเมล็ดข้าวที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ผสมระหว่างเชื้อ RH1-5-22 และ S6-2 มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 3.57 และ ความยาวรากเฉลี่ย 3.05 เซนติเมตร (ภาพ 164)



ภาพ 163 ลักษณะการงอกของเมล็ดข้าวหอมดอกมะลิ 105 ภายหลังเพาะเมล็ดโดยวิธี blotter method เป็นเวลา 10 วัน โดยการแช่เมล็ดข้าวในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ (A) – (D) กลุ่มควบคุม (D) ไอโซเลท RH1-5-22 (E) ไอโซเลท S6-2 (F) ไอโซเลท RH1-5-22 ผสมกับ S6-2



ภาพ 164 ลักษณะของเมล็ดที่ติดเชื้อรา *Fusarium* sp. ภายหลังการปลูกเชื้อลงเมล็ดข้าวเป็นระยะ 10 วัน (A) ชุดควบคุมวิธีที่ 1 (B) ชุดควบคุมวิธีที่ 2

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท RH1-5-22 และS6-2 เป็นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium* sp. ซึ่งก่อให้เกิดโรคถอดฝักดาบ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลล์จำพวก cellulose และสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชได้แก่ IAA, siderophor และการละลายฟอสเฟตให้แก่พืชได้ และพบว่าช่วยลดอัตราการเกิดโรคเมื่อทำการแช่เมล็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ และส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าว ช่วยให้ต้นกล้าเจริญเติบโตโดยเพิ่มความยาวรากและความสูงของลำต้น

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2549. ข้อมูลการเกษตร, ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร. http://production.doae.go.th/. ค้นเมื่อ 24 มีนาคม 2550.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2550. ข้อมูลการเกษตร, ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร. http://production.doae.go.th/. ค้นเมื่อ 8 เมษายน 2550.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2556. ข้อมูลการเกษตร, ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร. http://production.doae.go.th/. ค้นเมื่อ 30 เมษายน 2557.

เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถานบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 326 หน้า.

จิตรา เกาะแก้ว และเลขา มาโนช. 2549. ราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรและการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชในระดับห้องปฏิบัติการ.โครงการวิจัยและเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัย และพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 8 หน้า.

จำเป็น อ่อนทอง. 2553. การใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมเพื่อพัฒนาผลและคุณภาพผลผลิตของลองกอง. ภาควิชาธรณีศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 4: 1003–1016.

ดาราก ร อัคฮาดศรี. 2552. แหล่งของโพแทสเซียมสำหรับพืชจากดินดอนที่มีพัฒนาการสูงภายใต้สภาพภูมิอากาศแบบมรสุมเขตร้อนของประเทศไทย. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา) สาขาปฐพีวิทยา ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 160 หน้า

ธงชัย เนมขุนทด. 2531. แคนตาลูป. โครงการหนังสือชุมชน. กรุงเทพฯ.

ธงชัย มาลา. 2546. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์.ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ปัทมา วิตยากร. 2543. ความอุดมสมบูรณ์ของดินขั้นสูง. ภาควิชาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อมคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 423 หน้า.

ปิยะมาศ โสมภีร์. 2546. ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดต่อการย่อยสลายแร่เฟลด์สปาร์เพื่อให้โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของอ้อย. ภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 16: 40-55.

ปรีดา จาติกวณิช และ ปรีชา สุริยพันธุ์. 2523. ประวัติการปลูกอ้อยและการทำน้ำตาลของโลก. ในอ้อย เอกสารวิชาการ เล่ม 1 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

มัลลิกา หมูแก้ว. 2250. การประเมินความสามารถของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 121 หน้า.

ยงยุทธ โอสถสภา. 2546. ธาตุอาหารพืช. สำนักพิมพ์หาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วลัยพร แสนวงษ์, ศิราพร เชื้ออ้วน และนิตยา รื่นสุข.2554. ระบบการปลูกข้าวที่เหมาะสมในแหล่งที่มีการระบาดของข้าววัชพืชในจังหวัดอุตรดิตถ์. สัมนาวิชาการกลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง.

สมจิตร อยู่เป็นสุข. 2549. ไมคอร์ไรซา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2538. สรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมพร คนยงค์. 2554. ปุ๋ยเคมี (หน่วยที่14). เอกสารประกอบการสอนวิชา 09-501-410 ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

สมพล นิลเวศน์. 2553. รายงานการฝึกอบรมชาน้ำมัน (International Training Workshop On High-yield Cultivation Techniques of Oil-tea Camellia (*Camellia oleifera*)) เมืองฉางชา มลฑลหูหนาน ประเทศจีน ระหว่างวันที่ 9 – 28 สิงหาคม 2553.

สายทอง แก้วฉาย. 2556. โรครากขาวของยางพาราและการป้องกัน (White root disease of rubber tree and control). วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ 5:118–131.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. รายงานผลการสำรวจมะนาวปี 2551. ศูนย์สารสนเทศการเกษตรสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.กรุงเทพฯ.

อรพรรณ วิเศษสังข์. 2552. คู่มือการเลือกใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

อารักษ์ ธีรอำพน และอุษา ขุมทอง. 2543. การเปรียบเทียบพันธุ์แตงแคนตาลูปที่เหมาะสำหรับการปลูกในโรงเรือน. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. 549.

อารีย์ วิบูลย์พงศ์, ทรงศักดิ์ ศรีบุญจิตต์, พฤกษ์ ยิบมันตะสิริ และประทานทิพย์ กระมล. 2544. ผลกระทบของโรคไหม้คอรวงและประสิทธิภาพการผลิตข้าวดอกมะลิ 105. ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. Turk J Biol 29: 29–34

Ali S, Charles TC, Glick BR. 2014. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. Plant Physiol. Biochem 80: 160–167.

AL-Kanani T, Meckenzie AF, Ross GJ. 1984. Potassium status of some Quebec soils: K released by nitric acid and sodium tetraphenylboron as related to particle size and mineralogy. Can J Soil Sci 64: 99–106.

Apine OA, Jadhav JP. 2011. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. J Appl Microbiol 110:1235–1244.

Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD, and Kursar TA. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? Ecol Lett 3: 267–274.

Baharlouei A, Sharifi-Sirchi GR, Shahidi Bonjar GH. 2011. Biological control of Sclerotinia *sclerotiorum* (oilseed rape isolate) by an effective antagonist *Streptomyce*s. Afr J Biotechnol 10: 5785–5794.

Balakrishna G, Shanker AS, Pindi PK. 2012. Isolation of phosphate solibulizing from forest soils of Mahabubnagar district. Inter Organiz Sci Res J Pharm 2: 271-275.

Barnett HL, Hunter BB. 1971. Illustrated Genera of Imperfect Fungi 4th ed, Prentice-Hall, New York.

Baz M, Lahbabi D, Samri S, Val F, Hamelin G, Madore I, Bouarab K, Beaulieu C, Ennaji M, Barakate M. 2012. Control of potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepti*cum by Moroccan actinobacteria isolates. World J Microbiol Biotechnol 28: 303–311.

Bécard G, Fortin JA. 1988. Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol 108: 211–218.

Belanger FC. 1996. A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability. Crop Sci 36: 460–462.

Bidochka M. 2004. *Metarhizium*, In the Encyclopedia of Entomology. Entomological Society of America, Landham, MD.

Binder M, Hibbett DS. 2006. Molecular systematics and biological diversification of Boletales. Mycologia 98: 971–981.

Bivi MR, Farhana MSN, Khairulmazmi A, Idris A. 2010. Control of *Ganoderma boninense:* a causal agent of basal stem rot disease in oil palm with endophyte bacteria In Vitro Int J Agric Biol 12: 833-839.

Boonphong S, Kittakoop P, Isaka M, Pittayakhajonwut D, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. 2001. Multiplolides A and B, new antifungal 10-membered lactones from *Xylaria multiplex*. J Nat Prod 64: 965–967.

Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE. 1991. Rapid *in situ* assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. Appl Environ Microbiol 57: 535–538.

Brown KB, Johnson GI, Guest DI. 2003. Interactions between the endophytic fungi of durian (*Durio zibethinus*) and *Phytophthora palmivora*. Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology, p. 41. Christchurch, New Zealand.

Brundrett M, Abbott LK, Jasper DA. 1999. Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia: Comparison of the effectiveness and specificity of different isolation procedures. Mycorrhiza 8: 305–314.

Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph. Canberra.

Brunings AM, Gabriel DW. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. Molecr Plant Patho 4: 141–157.

Bussaban B, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2001a. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. Can J Microbiol 47: 943–948.

Bussaban B, Lumyong S, Lumyong P, Hyde KD, McKenzie EHC. 2001b. Two new species of endophytes (ascomycetes) from *Zingiberaceae* sporulating in culture. Nova Hedwig 73: 487–493.

Bussaban B, Lumyong S, Lumyong P, Seelanan T, Park DC, McKenzie EHC, Hyde KD. 2005. Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. Mycologia 97: 1002–1011.

Cai YZ, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci 74: 2157–2184.

Carmichael JW, Kendrick WB, Conners IL, Sigler L. 1980. Genera of Hyphomycetes. The University of Alberta Press, Alberta.

Carroll G. 1998. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbionts. Ecol Res 69: 2–9.

Chabot S, Bécard G, Piché Y. 1992. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. Mycologia 84: 315–321.

Chaiharn M, Lumyong S. 2009. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. World J Microbiol Biotechnol 25: 305–314.

Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl Soil Ecol 34: 33–41.

Choma MI, Grzelak EM. 2011. Bioautography detection in thin-layerchromatography. J Chromatogr A 1218(19): 2684–2691.

Chung KR, Shilts T, Ertürk U, Timmer LW, Ueng PP. 2003. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. FEMS Microbiol 266: 23–30.

Chutima R, Lumyong S. 2012. Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi. Symbiosis 56: 35–44.

Civerolo EL.1984. Bacterial canker disease of citrus. J. Rio Grande Valley Hort. Assoc. 37: 127–146.

Collins MD, Pirouz T, Goodfellow M, Minnikin DE. 1977. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. J Gen Microbiol 100: 221–230.

Coombs JT, Franco CMM. 2002. Isolation and identification of actinobacteia from surface sterilize wheat roots. Appl Environ Microbiol 69: 5603–5608.

Cross T, Goodfellow M. 1973. *Actinomycetales*: Characteristic and Practical Importance. Academic Press, London.

Declerck S, Stullu DG, Plenchette C. 1998. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. Mycologia 90: 579–585.

Desale MG, Bodhankar MG. 2013. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Vitex negundo* Linn. Int J Curr Microbiol App Sci 2: 389–395.

Dhiman A, Nanda A, Ahmad S, Narasimhan B. 2011. *In vitro* antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava* L. J Pharm Bioallied Sci 3: 226–229.

Dodd J. 2000. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in agro-and natural ecosystem. Outlook Agri 29: 63–70.

Doner LW, Bécard G. 1991. Solubilization of gellan gels by chelation of cations. Biotechnol Tech 5: 25–28.

Ehmann A. 1977. The van URK-Salkowski reagent-a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. J Chromatogr 132: 267–276.

Ellis MB. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, London.

Ellis MB. 1976. More *Dematiaceous Hyphomycetes*. CAB

Ezra D, Hess WM, Strobel GA. 2004. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. Microbiol 150: 4023–4031.

Felsenstein J. 1985. Confidence intervals on phylogenetics: an approach using bootstrap. Evolution 39: 783–791.

Fialho MB, Duarte de Moraes MH, Tremocoldi AR, Pascholati SF. 2011. Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. Pesqui Agropecu Bras 46: 137–142.

Fiske C, Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem 66: 375–400.

Fiss E, Brooks GF. 1991. Use of a siderophore detection medium, ethylene glycol degradation, and beta-galactosidase activity in the early presumptive differentiation of *Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces*, and rapidly growing *Mycobacterium* species. J Clinic Microbiol 29: 1533–1535.

Fomina MA, Alexander IJ, Colpaert JV, Gadd GM. 2005. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. Soil Biol Biochem 37: 851–866.

Fredriksson NJ, Hermansson M, Wilén B-M. 2013. The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant. PLOS ONE 8: e76431.

Fröhlich J, Hyde KD, Petrini O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. Mycol Res 104: 1202-1212.

Gadd GM. 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma 122: 109–119.

Gambrog OL, Wetter LR. 1975. Plant tissue culture method. National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon, Saskatchewan, 109 p.

Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. 2005. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Volume 2, The Proteobacteria. Sprinker, Michigan.

Gathogo EWN, Waugh ACW, Peric-Concha N, Redpath MB, Long PE. 2004. Rapid detection of 'rare' actinomycetes in environmental sample. Biotechnol Lett 26: 897–900.

Gaur A, Adholeya A, Mukerji KG. 2000. On-farm production of VAM inoculum and vegetable crops in marginal soil amended with organic matter. Trop Agri 77: 21–26.

Gazis RO. 2012. Evaluating the endophytic fungi community in planted and wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*). Dissertation, University of Maryland.

Gazis R, Chaverri P. 2010. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. Fungal Ecol 3: 240–254.

Gazey C, Abbott KK, Robson AD. 1993. VA mycorrhizal spores from 3 species of *Acaulospora*—germination, longevity and hyphal growth. Mycol Res 97: 785–790.

Girgis MGZ, Khalil HMA, Sharaf MS. 2008. *In vitro* evaluation of rock phosphate and potassium solubilizing potential of some *Bacillus* strains. Aus J Basic Appl Sci 2(1): 68–81.

Gomes RC, Semedo LTAS, Soares RMA, Alviano CS, Linhares LF, Coelho RRR. 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. Appl Microbiol 30: 146–150.

Gopalakrishnana S, Humayuna P, Vadlamudia S, Vijayabharathia R, Bhiminenia RK, Rupelaa O. 2012. Plant growth-promoting traits of *Streptomyces* with biocontrol potential isolated from herbal vermicompost. Inter Crops Res Inst Semi-Arid Tropics 22: 1199–1210.

Goto M, Takahashi T, Massina MA. 1980. Comparative study to the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from citrus canker in Japan and cancresis B in Argentina. Ann Phytopathol Soc Jap 46: 329–338.

Guo B, Wang Y, Sun X, Tang K. 2008. Bioactive natural products from endophytes: a review. Appl Biochem Micro 44:136–142.

Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. 1998. A method to promote sporulation in palm endophytic fungi. Fung Divers 1: 109-113.

Gupta R, Sharma C. 2010. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Camellia sinensis* in Uttarakhand State, India J Biotec 9: 5313–5319.

Hallmann J, Berg G. 2006. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. Springer-Verlag, Berlin.

Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol 43: 895–914.

Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, Lebrihi A, Marie Virolle J, Ouhdouch Y. 2008. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. Contents lists available at SciVerse ScienceDirect. Appl Soil Ecol J 38: 1 2–19.

Hamayun M, Khan SA, Ahmad N, Tang AS, Kang SM, Na CI, Sohn EY, Hwang YH, Shin DH, Lee BH, Kim JG, Lee IJ. 2009. *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. World J Microbiol Biotechnol 25: 627–632.

Hart SC, Gehring CA, Selmants PC, Deckert RJ. 2006. Carbon and nitrogen elemental and isotopic pattern in macrofungal sporocarps and trees in semiarid forests of the south-western USA. Funct Ecol 20: 42–51.

Hasan H, 2002. Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. Acta Microbiol Immunol Hung 49: 105–118.

Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. J Gen Appl Microbiol 29: 319–322.

Hasselquist NJ, Douhan GW, Allen MF. 2011. First report of ectomycorrhizal status of boletes on Northern Yucatan Peninsula, Mexico determined using isotopic method. Mycorrhiza 21: 456–471.

Hayakawa M, Nonomura H. 1987. Humic acid vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. J Ferm Technol 65: 501–509.

Hebei Acadamy of Sciences. 1996. International training course on biological fertilizer. The International Science and Technology Coperation Department of SSTCC The Instituite of Microviology.

Helgason T, Fitter AH, Young JPW. 1999. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides nonscripta* (bluebell) in a seminatural woodland. Molec Ecol8: 659–666.

Hobbie EA. 2005. Using isotopic tracers to follow carbon and nitrogen cycling of fungi. In: Dighton J, Oudemans P, White J (eds) The fungal community: its organization and role in the ecosystem. Marcel Dekker, pp 361–381.

Hobbie EA, Weber NS, Trappe JM. 2001. Mycorrhizal vs. saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. New Phytol 150: 601–610.

Horn WS, Simmonds MSJ, Schwartz RE, Blaney WM. 1995. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. Tetrahedron 51: 3969–3978.

Hou W, Lian B, Dong H, Jiang H, Wu X. 2012. Distinguishing ectomycorrhizal and saprophytic fungi using carbon and nitrogen isotopic compositions. Geosci Front 3: 351–356,

Huang Y, Wang J, Li G, Zheng Z, Su W. 2001. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei, Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. FEMS Immunol Med Microbiol 31: 163–167.

Humphris SN, Bruce A, Buultjens E, Wheatley RE. 2002. The effects of volatile microbial secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. FEMS Microbiol Lett 210: 215–219.

Hung PQ, Annapurna K 2004. Isolation and chatacterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.). Omonrice 12: 92–101.

Hung R, Lee S, Bennett JW. 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. Fungal Ecol 6: 19–26.

Hyde KD, Taylor JE, Fröhlich J. 2000. Genera of Ascomycetes from Palm, Fungal Diversity Research Series 2. Fungal Diversity Press, Hong Kong.

International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. 2014. Online available, http://invam.wvu.edu/the-fungi.

International Mycological Institute, Kew, UK. 507 pp.Fisher PJ, Anson, AE and Petrini O. 1984. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. Botanica Helvetica. 94: 249–253.

INVAM Newsletter 3. 1993. Properties of infective propagules at the suborder level (*Glomineae* versus *Gigasporineae*). http//invam.caf.wvu.edu/articles/propagules.htm. Accessed 9 July 2012.

Jalgaonwala RE, Mohite VB, Mahajan RT. 2011. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. J Microbiol Biotechnol Res 1: 21–32.

James EK. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Res 65: 197–209.

James EK, Olivares FL. 1998. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Crit Rev Plant Sci 17: 77–119.

Jasim B, Jimtha CJ, Jyothis M, Radhakrishman EK. 2013. Plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Piper nigrum*. Pl Growth Reg 71:1–11.

Ji SY, Gururani MA, Chun SC. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbiol Res 169: 83–98.

Kabir Z, O'Halloran I, Fyles J, Hamel C. 1998. Dynamics of the mycorrhizal symbiosis of corn: effect of host physiology, tillage practice and fertilization on spatial distribution of extraradical hyphae in the field. Agric Ecos Environ 68: 151–163.

Kaewchai S, Soytong K. 2010. Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees. IJAT 6: 349–363.

Kämpfer P, Kroppenstedt RM. 1996. Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. Can J Microbiol 42: 989–1005.

Kanakadurga VV, Manoharachary D, Rama Rao P. 1990. Occurrence of endomycorrhizal fungi in teak. In: Bagyaraj DJ, Manjunath A. (eds) Mycorrhizal symbiosis and plant growth. University of Agricultural Sciences, Bangalore, pp 17.

Karabaghli C, Frey-Klett P, Sotta B, Bonnet M, Tacon FL. 1998. *In vitro* effects of *Laccaria bicolor* S238N and *Pseudomonas fluorescens* strain BBc6 on rooting of de-rooted shoot hypocotyls of Norway spruce. Tree Physiol. 18: 103–111.

Karov IK, Mitrev SK and Kostadinovska ED. 2009. *Gibberella Fujikuroi* (sawada) wollenweber, the new parasitical fungus on rice in the republic of Macedonia. Proc Nat Sci Matica Srpska Novi Sad 116: 175–182.

Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using grams iodine. Current Microbiol 57: 503–507.

Khamna S, Yokota A, Peberdy JF, Lumyong S. 2010. Indole -3- acetic acid production by *Streptomyces* sp. Isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. Eur Asia J Bio Sci 4: 23–32.

Khamna S, Yokota A, Peberdy JF, Lumyong S. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. Eur Asia J Bio Sci 4: 23–32.

Klaubauf S, Tharreau D, Fournier E, Groenewald1 JZ, Crous PW, de Vries RP, Lebrun M-H. 2014. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (*Pyriculariaceae*). Stud Mycol 79: 85–120.

Klute A. 1982. Method of Soil Analysis Part 2 (Chemical and Microbiological Properties), 2nd edn. American Society of Agronomy, Wisconsin.

Kobayashi DY, Palumbo JD. 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture, In C. W. Bacon and J. F. White (ed.), Microbial endophytes. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 199–233.

Kohzu A, Yoshioka T, Ando T, Takahashi M, Koba K, Wada E. 1999. Natural ^{13}C and ^{15}N abundance of field-collected fungi and their ecological implications. New Phytol 144: 323–330.

Kudalkar P, Strobel G, Riyaz-Ul-Hassan S, Geary B, Sears J. 2011. *Muscodor sutura*, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities. Mycoscience 53: 319–325.

Kumla J, Suwannarach N, Bussaban B, Lumyong S, Danell E. 2012. Basidiome formation of an edible wild, putatively ectomycorrhizal fungus, *Phlebopus portentosus* without host plant. Mycologia 104: 597–603.

Kumla J, Suwannarach N, Bussaban B, Matsui K, Lumyong S. 2014. Indole-3-acetic acid production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance of some sclerodermatoid fungi collected from northern Thailand. Ann Microbiol 64: 707–720.

Laatikainen T, Heinonen H. 2002. Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides. Microbiol Res 157: 127–137.

Larsen J, Thingstrup I, Jokabsen I, Rosendahl S. 1996. Benomyl inhibitions phosphorus transport but not fungal alkaline phosphatase activity in a *Glomus* cucumber symbiosis. New Phytol 132: 127–133.

Leaungvutiviroj C, Ruangphisarn P, Hansanimitkul P, Shinkawa H, Sasaki K. 2010. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N_2 fixation, phosphateand potassium solubilization and auxin production. Biosci Biotechnol Biochem 74: 1098–1101.

Lee J, Lee S, Young JPW. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Micro Eco 65: 339–349.

Lemos ML, Toranzo AE, Barja JL. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. Microbial Ecology 11: 149–163.

Leuchtmann A, Petrini O, Petrini LE, Carroll GC. 1992. Isozyme polymorphism in six *Phyllosticta* species. Mycol Res 96: 287–294.

Lian B, Fu PQ, Mo DM, Liu CQ. 2002. A comprehensive review of the mechanism of potassium release by silicate bacteria. Acta Mineral Sinica 22: 179–183.

Li FC, Li S, Yang YZ, Cheng LJ. 2006. Advances in the study of weathering products of primary silicate minerals, exemplified by mica and feldspar. Acta Petrol Mineral 25: 440–448.

Li HQ, Li XJ, Wang YL, Zhang Q, Zhang AL, Gao JM, Zhang XC. 2011. Antifungal metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*. Biochem Sys Ecol 39: 876–879.

Li JY, Strobel G, Harper J, Lobkovsky E, Clardy J. 2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. Org Let 2: 767–770.

Liu D., Lian B. and Dong H. 2012. Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. Geomicrobiol J 29: 413–421.

Luo J, Qiu H, Cai G, Wagner NE, Bhattacharya D, Zhang N. 2015. Phylogenomic analysis uncovers the evolutionary history of nutrition and infection mode in rice blast fungus and other Magnaporthales. Sci Rep 5: 9448.

Luo J, Walsh E, Zhang N. 2015. Toward monophyletic generic concepts in Magnaporthales: species with *Harpophora* asexual states. Mycologia 107: 641–646.

Machuca A, Pereira G, Aguiar A, Milagres AMF. 2007. Metal-chelating compounds produced by ectomycorrhizal fungi collected from pine plantations. Lett Appl Microbiol 44: 7–12.

Macías-Rubalcava ML, Hernández-Bautista BE, Oropeza F, Duarte G, González MC, Glenn AE, Hanlin RT, Anaya AL. 2010. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. J Chem Ecol 36: 1122–1131.

Magda MA, Hameda ES, Samyah DJ. 2012. Synergistic Effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces* sp. Isolated From Saline Soil on Seed Germination and Growth of Wheat Plant. J Amer Sci 8: 1–10.

Marschner H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, New York.

Mayor JR, Schuur EAG, Henkel TW. 2009. Elucidating the nutritional dynamics of fungi using stable isotopes. Ecol Lett 12: 171–183.

McInroy JA, Kloepper JW. 1995. Population dynamics of endophytic bacteria in field grown sweet corn and cotton. Can J Microbiol 41: 895–901.

Mikami H, Ishida Y. 1983. Post-column fluorometric detection of reducing sugar in high-performance liquid chromatography using arginine. Bunseki Kagaku 32: E207–E210.

Miller GC. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 31: 426–428.

Miller CM, Miller RV, Garton-Kenny D, Redgrave B, Sears J, Condron MM, Teplow DB, Strobel GA. 1998. Ecomycins unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. J Appl Microbiol84: 937–944.

Millner PD, Kitt DG. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 2: 9–15.

Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow M, Alderson G, Athalye M, Schaal A, Parlett JH. 1984. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. J Microbiol Methods 2: 233–241.

Mitchell AM, Strobel GA, Moore E, Robison R, Sears J. 2010. Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. Microbiol 156: 270–277.

Mummey DL, Rillig MC. 2007. Evaluation of LSU rRNA-gene PCR primers for analysis of arbuscular mycorrizal fungal communities via terminal restriction fragment length polymorphism analysis. J Microbiol Meth 70: 200–204.

Murphy J, Riley JP. 1985. A single solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. J Mar Biol Assoc UK 37: 9–14.

Naher L, Tan SG, Yusuf UK, Ho CL, Abdullah F. 2012. Biocontrol agent *Trichoderma harzianum* strain FA 1132 as an enhancer of oil palm growth. Pertanika J Trop Agri Sci 35: 173–182.

Naik BS, Shashikala J, Krishnamurthy YL. 2009. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*. Microbiol Res 164: 290–296.

Nakaew N, Pathom-aree W, Lumyong S. 2009. Generic diversity of rare actinomycetes from Thai cave soils and their possible use as new bioactive compounds. Actinomycetologica 23: 21–26.

Nakajima Y, Kitpreechavanich V, Suzuki K, Kudo T. 1999. *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. Int J Syst Bacteriol 49: 1761–1767.

Nur Ain Izzati MZ, Abdullah F. 2008. Disease suppression in *Ganoderma*-infected oil palm seedlings treated with *Trichoderma harzianum*. Plant Protec Sci 44: 101–107.

Ogura T, Sunairi M, Nakajima M. 2000. 2-Methylisoborneol and geosmin, the main sources of soil odor, inhibit the germination of *Brassicaceae* seeds. Soil Sci 46: 217–227.

Ou SH. 1985. Rice disease. 2nd, commonwealth mycological institute, Kew. 380 p.

Parmar P, Sindhu SS. 2013. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: Influence of nutritional and environmental conditions. J Microbiol Res 3: 25–31.

Patil NN, Waghmode MS, Gaikwad PS, Gajbhai MH, Bankar AV. 2013. Bioautography guided screening of antimicrobial compounds produced by *Microbispora* V2. Int Res J Biological Sci 2: 65–68.

Peres JCF, Retz de Carvalho L, Goncalez E, Berian LOS, D′arc Felicio J. 2012. Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. Cienc Agrotec 36: 294–299.

Petrini O. 1986. Taxonamy of endophytic fungi of curial plant tissues. *In*: N.J. Fokkema, and van den Heuvel. (eds.), Microbiology of the Phylosphere. Cambridge, University Press, UK. p. 175–187.

Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans Brit Mycol Soc 55: 157–160.

Phillips LA, Germida JJ, Farrell RE, Greer CW. 2008. Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. Soil Biol Biochem 40: 3054–3064.

Phitakkit S, Petcharat V, Chunchit S. 2014. Screening of *Streptomyce*s spp. from soil rhizosphere of oil palm in southern Thailand for biological control of oil palm fungal pathogens. Songkla J Plant Sci 1: 77–81.

Pietikäinen A, Kytöviita MM, Husband R, Young JPW. 2007. Diversity and persistence of arbuscular mycorrhizas in a low-Arctic meadow habitat. New Phytol 176: 691–698.

Pimentel MR, Molina G, Dionísio AP, Junior MRM, Pastore GM. 2011. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. Biotechnol Res Int 20: 1–11.

Pinruan U, Rungjindamai N, Choeyklin R, Lumyong S, Hyde KD, Jones EBG. 2010. Occurrence and diversity of basidiomycetous endophytes from the oil palm, *Elaeis guineensis* in Thailand. Fungal Divers 41: 71–88.

Plodpai P, Petcharat V, Chuenchitt S, Chakthongc S, Joycharat N. 2013. *Desmos chinensis*: a new candidate as natural antifungicide to control rice diseases. Indust Crops Prod 42: 324–331.

Ponhcharoen W, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S, Kühn T, Pelzing M, Sakayaroj J, Taylor WC. 2008. Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. Phytochem 69: 1900–1902.

Prabavathy VR, Mathivanan N, Murugesan K. 2006. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. Biol Cont 39: 313–319.

Prakash S, Ramasubburayan R, Iyapparaj P, Kumar C, Mary CJ, Palavessam A, Immanuel G. 2013. Screening and partial purification of antifungal metabolite from *Streptomyces rochei* MSA14: an isolate from marine mining soil of Southwest coast of India. Indian J Geo-Mar Sci 42: 888–897.

Prihastuti H, Cai L, Chen H, McKenzie EHC, Hyde KD. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. Fungal Divers 39: 89–109.

Ramanwong K. 1998. Species diversity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi of teak (*Tectona grandis* Linn.f.) and their effects on growth of teak seedlings. Dissertation, Kasetsart University.

Ramin AA, Braun PG, Prange RK, DeLong JM. 2005. *In vitro* effects of *Muscodor albus* and three volatile components on growth of selected postharvest microorganisms. Hort Sci 40: 2109–2114.

Rees RW, Flood J, Hasan Y, Cooper RM. 2007. Effect of inoculum potential, shading and soil temperature on root infection of oil palm seedlings by the basal stem rot pathogen *Ganoderma boninense.* Plant Pathol 56: 862–70.

Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New phytol 182: 314–330.

Rosenblueth M, Martínez-Romero E. 2006. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. Mol Plant Microbe Interact 19: 827–837.

Rudawska M, Kieliszewska-Rokicka B. 1997. Mycorrhizal formation by *Paxillus involutus* in relation to their IAA-synthesizing activity. New Phytol 137: 509–517

Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiol Lett 278: 1–9.

Santamaría J, Bayman P. 2004. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). Microb Ecol 50:1–8.

Sardi P, Saracchi M, Quaroni B, Borgonovi GE, Merli S. 1992. Isolation of endophytic Streptomyces strains from surface-sterilized roots. Appl Environ Microbiol 58: 2691–2693.

Sasser M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.

Schaad, NW, Postnikova E, Lacy G, Sechler A, Agakova I, Stromberg PE, Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem 160: 47–56.

Seong CN, Choi JH, Baik KS. 2001. An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil. J Microbiol 39(1): 17–23.

Sessitsch A, Hardoim P, Doring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, van Overbeek L, Brar D, van Elsas JD, Reinhold-Hurek B. 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. Mol Plant Microbe Interact. 25: 28–36.

Sheng XF. 2005. Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. Soil Biol Biochem 37: 1918–1922.

Shirling EB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of Streptomyces species. Int J Syst Bacteriol 16: 313–340.

Siddiquee S, Yusuf UK, Hossain K, Jahan S. 2009. *In vitro* studies on the potential *Trichoderma harzianum* for antagonistic properties against *Ganoderma boninense*. J Food Agri Environ 7: 970–976.

Sindhu SS, Gupta SK, Dadarwal KR. 1999. Antagonistic effect of *Pseudomonas* spp. on pathogenic fungi and enhancement of plant growth in green gram (*Vigna radiata*). Biol Fert Soil 29: 62–68.

Singh SS, Tiwari SC, Dkhar MS. 2003. Species diversity of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi in Jhum fallow and natural forest soils of Arunachal Pradesh, north eastern India. Trop Ecol 44: 207–215.

Sirithunya P, Sreewongchai T, Sriprakhon S, Toojinda T, Pimpisithavorn S, Kosawang C, Smitamana P. 2008. Assessment of genetic diversity in Thai isolates of *Pyricularia grisea* by random amplification of polymorphic DNA. J Phytopath 156: 196–204.

Siri-Udom S, Suwannarach N, Lumyong S. 2015. Existence of *Muscodor vitigenus*, *M. equiseti* and *M. heveae* sp. nov. in leaves of the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.), and their biocontrol potential. Ann Microbiol :DOI 10.1007/s13213-015-1126-x.

Smith SE, Read DJ. 1997. Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn. Academic Press. London.

Soepena H, Purba RY, Pawirosukarto S. 2000. A control strategy for basal stem rot (*Ganoderma*) on oil palm. In: Flood J et al. (ed), *Ganoderma* Disease of Perennial Crops, CAB International, pp 83–88.

St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. Mycol Res 100: 328–332.

Stone JK, Bscon CW, White Jr JF. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined [J]. In: Becon CW, White, Jr JF (ed) Microbial Endophytes. Marcel Dekker, New York, pp 3–29.

Stone JK, Polishook JD, White Jr JF. 2004. Endophytic fungi. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods (ed.). Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp 241–270.

Schubert T.S., and Miller J.W. 2000. Bacterial Citrus Canker. Florida Department of Agriculture and Consumer Services.

Strobel GA. 2002. Rain forest endophytes and bioactive products. Crit Rev Biotechnol 22: 325–333.

Strobel G, Daisy B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol Mol Biol Rev 4: 491–502.

Strobel GA, Dirkse E, Sears J, Markworth C. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. Microbiology 147: 2943–2950.

Stromberg V.K. and Vidaver A.K.. 2006. Emended classification of *Xanthomonas* pathogens on citrus. Syst Appl Microbiol 29: 690–695.

Strullu D G and Romand C. 1986. Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. C R Acad Sci 303: 245–250.

Sturz AV, Christie BR, Nowak J. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. Crit Rev Plant Sci 19: 1–30.

Sturz AV, Nowak J. 2000. An endophytic community of rhizobacteria and the strategies requires to create yield enhancing associations with crops. Appl Soil Ecol 15: 183–90.

Sukarno N, Smith SE, Smith FA, Scott ES. 1996. The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis II. The effects on area of interface and efficiency of P uptake and transfer to the plant. New Phytol 132: 583–593.

Susanto A, Sudharto PS, Purba RY. 2005. Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninese*) in oil palm plantations. Mycopathologia 159: 153–157.

Sutton BC. 1980 The *Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, London.

Suwannarach N, Bussaban B, Hyde KD, Lumyong S. 2010. *Muscodor cinnamomi,* a new endophytic species from *Cinnamomum bejolghota*. Mycotaxon 114:15–23.

Suwannarach N, Bussaban B , Nuangmek W, McKenzie EHC, Hyde KD, Lumyong s. 2012. Diversity of Endophytic fungi Associated with *Cinnamomum bejolghota* (Lauraceae) in northern Thailand. Chiang Mai J Sci 39:1–16.

Suwannarach N, Bussaban B, Nuangmek W, Pithakpol W, Lumyong S. 2011. Inhibition of green mold by volatile compounds from an endophytic fungus, *Muscodor albus* CMU-Cib 462. Agricultural Sci J 42: 125–128.

Suwannarach N, Kumla J, Bussaban B, Hyde KD, Matsui K, Lumyong S. 2013. Molecular and morphological evidence support four new species in the genus *Muscodor* from northern Thailand. Ann Microbiol 63: 1341–1351.

Suwannarach N, Kumla J, Bussaban B, Lumyong S. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* AG-2, the causal agent of damping-off by *Muscodor cinnamomi* CMU-Cib 461. World J Microbiol Biotechnol 28: 3171–3177.

Suwannarach N, Sujarit K, Kumla J, Boonsom B, Lumyong S. 2013. First report of leaf spot disease on oil palm (*Elaeis guineensis*), caused by *Pestalotiopsis theae* in Thailand. J Gen Plant Pathol 79: 277–279.

Swofford DL. 2002. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). version4b10. Sunderland. MA: Sinauer Associates.

Taechowisan T, Chuaychot N, Chanaphat S, Wanbanjob A, Tantiwachwutikul P. 2009. Antagonistic effects of *Streptomyces* sp. SRM1 on *Collectotrichum musae*. Biotechnol 8: 86–92.

Taechowisan T, Lu C, Shen Y, Lumyong S. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. Microbiol 151: 1691–1695.

Talukdar NC, Germida JJ. 1993. Propagation and storage of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi isolated from Saskatchewan agricultural soils. Can J Bot 71: 1328–1335.

Tangonan NG, Pecho JA, Butardo EGG. 2008. Technoguide on diseases of rubber and their management. University of Southern Mindanao, Philippines.

Tamuli P, Boruah P. 2002. Vesicular-abuscular mycorrhizal (VAM) association of agarwood tree in Jorhat District of the Brahmatputra Valley. Indian Forest 128: 991–994.

Taylor AFS, Fransson PM, Högberg P, Högberg MN, Plamboeck AH. 2003. Species level patterns in 13C and 15N abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. New Phytol 159: 757–774.

Taylor JE, Hyde KD and Jones EBG. 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. New Phytol 142: 335–346.

Tennant D. 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. J Ecol 63: 995–1001.

Thapar HS, Khan SN. 1988. Seasonal frequency of *Endogone* spores in new-forest soils. In: Khosla PK, Sehgal RN (eds.) Trends in Tree Sciences. Indian Society of Tree Scientists, Solan, pp 161–162.

Thongkantha S, Jeewon R, Vijaykrishna D, Lumyong S, McKenzie EHC, Hyde KD. 2008. Molecular phylogeny of *Magnaporthaceae* (Sordariomycetes) with a new species *Ophioceras chiangdaoense* from *Dracaena loureiroi* in Thailand. Fung Divers 34: 155–171.

Tian XL, Cao LX, Tan HM, Zeng QG, Jia YY, Han WQ, Zhou SN. 2004. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. World J Microbiol Biotechnol 20: 303–309.

Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AI. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiol Res 162: 69–76.

Vitorino LC, Silva FG, Soares MA, Souchie EL, Costa AC, Lima WC. 2012. Solubilization of calcium and iron phosphate and *in vitro* production of

indoleacetic acid by endophytic isolates of *Hyptis marrubioides* Epling (*Lamiaceae*). IRJOB 3: 47–54.

von Arx JA. 1981. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. Cramer, Vaduz.

Walker J. 1981. Taxonomy of take-all fungi and related genera and species. In: Shipton PJ, Asher MJC (eds), The Biology and Control of Take-all. Academic Press, London, pp.15–74.

Wan M, Li G, Zhang J, Jiang D, Huang HC. 2008. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. Bio Control 46: 552–559.

Watling R (2006) The sclerodermatoid fungi. Mycoscience 47:18–24

Wilkins K, Schöller C. 2009. Volatile organic metabolites from selected *Streptomyces* strains. Actinomycetol 23: 27–33.

Williams, S.T., Goodfellow, M. and Alderson, G. 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. The Williams and Wilkins. USA.

Worapong J, Strobel GA. 2009. Biocontrol of a root rot of kale by *Muscodor albus* strain MFC2. Biol Control 54: 301–306.

Xu J, Ebada SS, Proksch P. 2010. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. Fungal Divers 44: 15–31.

Xue L, Xue Q, Chen Q, Lin C, Shen G, Zhao J. 2013. Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of Verticillium wilt of cotton. Crop Protect 43: 231–240.

Yang X, Strobel G, Stierle A, Hess WM, Lee J, Chardy J. 1996. A fungal endophyte-tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. Plant Sci 102: 1–9.

Youpensuk S, Lordkaew S and Rerkasem B. 2006. Comparing the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on upland rice and *Macaranga denticulata* in soil with different levels of acidity. Science Asia 32: 121–126.

Youpensuk S, Piwpueak W, Rerkasem B. 2012. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on resistance to *Phytophthora parasitica* of citrus seedlings and on growth of Thai honey tangerine scions on citrus root stocks. Afri J Biotech 11: 11400–1140.

Yuan Z-L, Su Z-Z, Mao L-J, Peng Y-Q, Yang G-M, Lin FC, Zhang C-L. 2011. Distictive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of *Muscodor* (*Xylariaceae*). J Microbiol 49: 15–23.

Zakaria AAB. 2009. Growth optimization of potassium solubilizing bacteria isolated from biofertilizer. Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering 3: 8–10.

Zarandi ME, Shahidi Bonjor GH, Dehkaei FP, Ayatollahi Moosavi SA, Rashid Farokhi P and Aghighi S. 2009. Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sisdeneusis* isolate 263 in greenhouse. Am J Appl Sci 6: 194–199.

Zeller B, Brechet C, Maurice J-P, Le Tacon F. 2007. ^{13}C and ^{15}N isotopic ractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway pruce plantation. Ann For Sci 64: 419–429.

Zhang CL, Wang GP, Mao LJ, Komon-Zelazowska M, Yuan ZL, Lin FC, Druzhinina IS, Kubicek CP. 2010. *Muscodor fengyangensis* sp. nov. from southeast China: morphology, physiology and production of volatile compounds. Fungal Biol 114: 797–808.

Zhao J, Xue QH, Shen GH, Xue L, Duan JL, Wang DS. 2012. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biocontrol of gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) and growth promotion of *Cucumis melo* L. Biocontrol Sci Technol 22: 23–37.

Zhao J, Zhou L, Wang J, Shan T, Zhong L, Liu X, Gao X. 2010. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. In Mendez-Vilas A (ed) Applied microbiology and Microbial Biotechnology. Formatex, Spain.

Zhenhua X, Dongmei G., Xiuli S, Ying X. 2012. A review of endophyte and its use and function. Adv Biomed Eng 8: 124–130.

Zinniel DK, Lambrecht P, Beth Harris N, Feng Z, Kuczmarski D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Anne KV. 2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. Appl Environ Microbiol 68: 2198–2208.

Output ที่ได้จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 15 เรื่อง

1.1 Suwannarach N., Kumla J., Bussaban B., Nuangmek W., Matsui K., Lumyong S. 2013. Mycofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit. *Crop Prot* 45: 63-70.

1.2 Suwannarach N., Kumla J., Bussaban B., Hyde K.D., Matsui K., Lumyong S. 2013. Molecular and morphological evidence support four new species in the genus *Muscodor* from northern Thailand. *Ann Microbiol* 63: 1341-1351.

1.3 Suwannarach N., Sujarit K., Kumla J., Bussaban B., Lumyong S. 2013. First report of leaf spot disease on oil palm caused by *Pestalotiopsis theae* in Thailand. *J Gen Plant Pathol* 79: 277-279.

1.4 Kumla J., Suwannarach N., Bussaban B., Lumyong S. 2014. New report of *Morganella purpurascens* in Thailand. *Mycoscience* 55: 49–52.

1.5 Kumla J., Suwannarach N., Bussaban B., Lumyong S. 2013. *Scleroderma suthepense*, a new ectomycorrhizal fungus from Thailand. *Mycotaxon* 123: 1-7.

1.6 Kumla J., Suwannarach N., Bussaban B., Matsui K., Lumyong S. 2014. Indole-3-acetic acid production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance of some sclerodermatoid fungi collected from northern Thailand. *Ann Microbiol* 64: 707-720.

1.7 Rangjaroen C., Rerkasem B., Teaumroong N., Sungthong S., Lumyong S. 2014. Comparative study of endophytic and endophytic diazotophic bacterial communication across rice landraces grown in the highlands of northern Thailand. *Arch Microbiol* 196: 35–49.

1.8 Sujada N., Sungthong R., Lumyong S. 2014. Termite nests as an abundant source of cultivable actinobacteria for biotechnological purposes. *Microbes Environ* 29: 211-219.

1.9 Rangjaroen C., Rerkasem B., Teaumroong N., Noisangiam R., Lumyong S. 2014. Promoting plant growth in a commercial rice cultivar by endophytic diazotrophic bacteria isolated from rice landraces. *Ann Microbiol* 65: 253-266.

1.10 Kumla J., Danell E., Lumyong S. 2014. Improvement of yield for a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, cultivation in northern Thailand. *Mycoscience* 56: 114-117.

1.11 Suwannarach N., Kumla J., Lumyong S. 2015. First report of Alternaria leaf blight disease on oil palm caused by *Alternaria longipes* in Thailand.

Phytoparasitica 43: 57-59.

1.12 Chaiyasen A., Young JPW., Teaumroog N., Gavinlertvatana P., Lumyong S. 2014. Characterization of arbuscular mycorrhizal fungus communities of *Aquilaria crassna* and *Tectona grandis* roots and soils in Thailand plantation. *PLoS One,* e112591.

1.13 Suwannarach S., Kumla J., Matsui K., Lumyong S. 2015. Characterization and efficacy of *Muscodor cinnamomi* in promoting plant growth and controlling Rhizoctonia root rot in tomatoes Biological control 90: 25–33.

1.14 Suwannarach N., Bussaban, B. Nuangmek, W., Pithakpol, W., Jirawattanakul, B., Matsui, K. and Lumyong, S. 2015. Evaluation of *Muscodor suthepensis* strain CMU-Cib462 as a postharvest biofumigant for tangerine fruit rot caused by *Penicillium digitatum*. J Sci Food Agric 96: 339-345.

1.15 Siri-udom S., Suwannarach N., Lumyong S. 2015. Existence of *Muscodor vitigenus, M. equiseti* and *M. heveae* sp.nov. in leaves of the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.), and their biocontrol potential. Ann Microbiol doi: 10.1007/s13213-015-1126-x.

1.16 Kumla J., Hobbie EA., Suwannarach N. and Lumyong S. 2015. The ectomycorrhizal status of a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, assessed using mycorrhizal synthesis and isotopic analysis. Mycorrhiza. doi:10.1007/s00572-015-0672-1

2. ต้นฉบับเพื่อเตรียมตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 4 เรื่อง

2.1 Chaiyasen A., Gavinlertvatana P. and Lumyong. 2015. Effect of edaphic factors on arbuscular mycorrhizal fungi in plantation of *Aquilaria crassna* and *Tectona grandis* from Thailand (submitted).

2.2 Chaiyasen A., Douds DD. and Lumyong. 2015. Influence of host plants soil diluents on AM fungus for on-farm production using leaf litter compost (submitted).

2.3 Sopin N., Suwannarach N., Kumla J. and Lumyong S. 2016. Solubilization of potassium-bearing minerals and promote plants growth by *Aspergillus brasiliensis* strain SC310-1 (submitted).

2.4 Sujarit K., Suwannarac N., Matsui K. and Lumyong S. 2016. Promoting the plant growth by volatile organic compounds from *Streptomyces* sp. strain CMU-AB21. (submitted).

3. การนำเสนอผลงานของกลุ่มวิจัยในงานประชุมวิชาการ 11 ครั้ง

3.1 Lumyong S, Suwannarach N. 2013. Endophytic fungi some medicinal plants in northern Thailand: Biodiversity, secondary metabolites and application. XI International Fungal Biology Conference. 29 October- 3 November 2013. Karisruhe, Germany.

3.2 Phongsida C, Rangjaroen C, Lumyong S. 2013. Colonization of endophytic diazotrophic strain of *Kleabsiella* sp. SS2 on non-host plants. Proc. of the 39th Congress on Science and Technology of Thailand. October 21-23, 2013. Bangkok, Thailand. 847-849.

3.3 Lumyong S, Kumla J. 2014. Indole-3-acetic acid and metal chelating compounds production by some scleromatoid fungi. The 10th International Mycological Congress (IMC10). 4-8 August 2014. Queen Sirikit national Convention Center (QSNCC), Bangkok, Thailand.

3.4 Lumyong S, Suwannarach N. 2014. Biofumigation from Thai Endophytic fungi. The 5th International Symposium of Biofumigation. 9-12 September 2014. Harper Adams University, UK.

3.5 Lumyong S. 2014. Potential of endophytic fungi to promote plant growth. 26th Meeting of Thai Society for Biotechnology and International Conference. 26-29 November 2014, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.

3.6 Lumyong S, Suwannarach N, Kumla J, Kakumyan P, Mugo NC and Matsui K. 2014. Microbe in northern Thailand: biodiversity, volatile, non-volatile compounds production, and application. 1th Joint Seminar; New Core to Core Program. “Establishment of an International Research Core for New Bio-Research Fields with Microbe from Tropical Areas” August 10 – 11, 2014, Centara Grand and Bangkok Conversation Center, Central World, Bangkok, Thailand.

3.7 Numponsuk T, Lumyong S. 2014. Screening of Indole-3-acetic acid production activity of endophytic fungi isolated from coffee plants in northern Thailand. The 10th Young Scientist Seminar “Establishment of International Research Network for Tripical Bioresources and Their Utilization”. 16-17 November 2014. Yamaguchi, Japan.

3.8 Kumla J, Matsui K. and Lumyong S. 2014. Indole-3-acetic acid and solubilization of insoluber metal minerals of some ectomycoohizal fungi collected from northern Thailand. The 10th Young Scientist Seminar “Establishment of

International Research Network for Tripical Bioresources and Their Utilization". 16-17 November 2014. Yamaguchi, Japan

3.9 Chaiyasen A, Young J P W, Teaumroong N, Gavinlertvatana P, Lumyong S. 2015. Arbuscular mycorrhizal communities analysis and their effect on growth of *Aquilaria crassna* and *Tectona grandis*. The 8th Congress of the International Symbiosis Society. 12-18 July 2015. Lisbon, Portugal.

3.10 Lumyong S, Kumla J. 2015. Cultural characterization of *Pisolithus* species colleted from northern Thailand and their *in vitro* mycorrhization with *Eucalyptus camaldulensis* seedling. The 8th Congress of the International Symbiosis Society. 12-18 July 2015. Lisbon, Portugal.

3.11 Kumla J, Hobbie EA, Suwannarach N, Lumyong S. 2015. The ectomycorrhizal status of *Phlebopus portentosus* determined using isotopic analysis. The 8th Congress of the International Symbiosis Society. 12-18 July 2015. Lisbon, Portugal.

4. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการต่างประเทศ จำนวน 3 ท่าน

4.1 Prof. Dr. Kenji MATSUI

Department of Applied Molecular Bioscience, Graduate School of Medicine and Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan. โดยมีความร่วมมือด้านการวิจัยในเรื่องการวิเคราะห์องค์ประกอบของไอระเหยจากเชื้อรา

4.2 Dr. David D. Douds

USDA, Agriculture Research Service, Eastern Regional Reseach Center. 600 E. Mermaid Lane Wyndmoor, Pennsylvania 19038, USA. โดยมีความร่วมมือด้านการใช้ประโยชน์ไมคอร์ไรซาในการเพิ่มจำนวน และการประยุกต์ใช้

4.3 Assoc. Prof. Dr. Eric Hobbie

Earth Systems Research Center, University of New Hampsshire, Durham NH 03824, USA โดยมีความร่วมมือด้านการใช้เครื่องมือ และเทคนิคไอโซโทปเพื่อบ่งบอกการเป็นเอกโตไมคอร์ไรซาของเห็ดกลุ่มที่ทำการศึกษา

5. ผลิตนักวิจัยหลังปริญญาเอก จำนวน 2 คน

5.1 ดร. จวงจันทร์ จำปาทอง

5.2 ดร. นครินทร์ สุวรรณราช

6. ผลิตนักศึกษาระดับปริญาโท จำนวน 4 คน

6.1 นางสาวณัฐณิฏฐี โสภิณ

6.2 นางสาวจุรีพร ป้องศรีดา

6.3 นางสาวอรวรรณ ด้วงฟู

6.4 นายทศพล นำปนสัก

7. ผลิตนักศึกษาระดับปริญาเอก จำนวน 1 คน

7.1 นางสาวศกุลตลา ศิริอุดม

8. ต่อยอดงานวิจัยของอาจารย์เพื่อขอเลื่อนตำแหน่งทางวิชาการ

8.1 อาจารย์ ดร. วสุ ปฐมอารีย์

8.2 อาจารย์ ดร. บุญสม บุษบรรณ์

8.3 อาจารย์ ดร. วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก

8.4 อาจารย์ ดร. บุญสม บุษบรรณ์

8.5 อาจารย์ ดร. มธุรส ชัยหาญ

8.6 อาจารย์ ดร. เรืองวุฒิ ชุติมา

9. ประชุมวิชาการของกลุ่มวิจัยเพื่อเผยแพร่องค์ความรู้และข้อมูลงานวิจัย จำนวน 3 ครั้ง

9.1 การประชุมวิชาการครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 13 มีนาคม 2557 ณ ห้องประชุม SCB2814 ชั้น 8 อาคาร 40 ปี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

9.2 การประชุมวิชาการครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 19 กันยายน 2557 ณ ห้องประชุม AGR1101 คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา

9.3 การประชุมวิชาการครั้งที่ 3 เมื่อวันที่ 1 กันยายน 2558 ณ ห้องประชุม 203 ชั้น 2 สำนักบริการเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

10. ตำราเพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัย จำนวน 2 เรื่อง

10.1 ไมคอร์ไรซาเพื่อการใช้ประโยชน์ (อยู่ระหว่างการจัดทำ)

10.2 จุลินทรีย์เอนโดไฟท์กับการเจริญของพืช (อยู่ระหว่างการจัดทำ)

ภาคผนวก

Crop Protection 45 (2013) 63–70

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Crop Protection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cropro

Biofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit

Nakarin Suwannarach [a], Jaturong Kumla [a], Boonsom Bussaban [a], Wipornpan Nuangmek [b], Kenji Matsui [c,d], Saisamorn Lumyong [a,*]

[a] Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
[b] School of Agriculture and Natural Resources, The University of Phayao, Phayao 56000, Thailand
[c] Department of Applied Molecular Bioscience, Graduate School of Medicine, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan
[d] Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 July 2012
Received in revised form
9 November 2012
Accepted 19 November 2012

Keywords:
Biocontrol
Fungal endophyte
Mycofumigant
Postharvest disease

ABSTRACT

Forty-six fungal endophytes were isolated from *Lagerstroemia loudoni*. Only one fungus, identified as *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34, produced antifungal volatile compounds. It produced 31 volatile compounds, primarily composed of alcohols, acids, esters and monoterpene. The most abundant volatile compound was eucalyptol. *In vitro* tests showed that volatile compounds produced by *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 inhibited or killed 12 different plant pathogens. *In vivo* mycofumigation with jasmine rice grain cultures of *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 controlled green mold decay on *Citrus limon* caused by *Penicillium digitatum*, blue mold decay of *Citrus aurantifolia* and *Citrus reticulata* caused by *Penicillium expansum*. *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 has potential as a biofumigant for controlling postharvest disease.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Endophytic fungi are characterized by their ability to asymptomatically colonize living plant tissues (Bacon and White, 2000). The prospect that endophytes produce novel bioactive products stems from the idea that some endophytes may have coevolved with their respective higher plant, and as a result may produce certain phytochemicals characteristic of their hosts (Tan and Zou, 2001; Strobel and Daisy, 2003). Thus, the search for novel endophytic microbes is ongoing, accompanied by an examination of the bioactivities of their natural products encompassing such uses as antibiotics, antiviral compounds, anticancer agents, antioxidants, insecticides, antidiabetic agents and immunosuppressive compounds (Stinson et al., 2003; Strobel and Daisy, 2003; Dai et al., 2006; Mercier et al., 2007; Wu et al., 2010). Several endophytic fungi producing volatile antifungal substances have been previously reported (Dennis and Webster, 1971; Strobel et al., 2001; Ezra et al., 2004). Mycofumigation is the use of antimicrobial volatiles produced by fungi for the control of other organisms (Stinson et al., 2003). For this reason, most of the research on the development of *Muscodor albus* as a biocontrol agent has focused on strain CZ-620 (Mercier et al., 2007) and strain MFC2 (Worapong and Strobel, 2009). These strains have been shown to be an effective biofumigant against fungal fruit decay (Mercier and Jiménez, 2004; Mercier and Smilanick, 2005) and grain smut fungi (Strobel et al., 2001; Goates and Mercier, 2009). The volatile mixture produced by strain CZ-620 was also shown to have some nematicidal and insecticidal activities (Lacey and Neven, 2006; Riga et al., 2008). In addition, *Phomopsis* spp., *Nodulisporium* spp., *Hypoxylon* spp. and *Oxyporus latemarginatus* have been rather than were reported to produce volatile compounds that control fruit decay (Lee et al., 2009; Park et al., 2010; Tomsheck et al., 2010; Singh et al., 2011).

In this study, we aimed to evaluate the ability of *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 was isolated from stem of *Lagerstroemia loudoni* as a potential biological agent to control both *in vitro* and *in vivo* *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*, which causes devastating citrus fruit decay. The volatile compounds of *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 were identified by gas chromatograph and mass spectrometer (GC/MS). In addition, a suitable solid medium for inoculum production was examined. Knowledge gained is expected to be used to develop *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 as a biocontrol agent for mycofumigation, which may replace the toxic fungicides that are currently used.

* Corresponding author. Tel.: +66 53 941947x144; fax: +66 53 892259.
E-mail address: saisamorn.l@cmu.ac.th (S. Lumyong).

0261-2194/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.11.015

2. Materials and methods

2.1. Isolation of endophytic fungi

Samples of leaf and stem tissues of *L. loudoni* Teijsm. & Binn. were collected from natural forest in The University of Phayao, Phayao Province, Thailand (19°1′39.21″N, 99°53′43.43″E, temperature 26–31 °C, humidity 80–100%), in June 2011. Five branches (2 cm diam) and 10 leaves from a plant were collected. The samples were then taken to the laboratory and processed within 24 h. Samples were washed in running tap water for 15 min. The samples were cut into pieces (leaf, 5 mm × 5 mm and stem, 5 mm long). All pieces were surface sterilized in 75% ethanol for 30 s, 2% sodium hypochlorite for 3 min and 95% ethanol for 30 s under a laminar flow hood (Nuangmek et al., 2008). The sterilized samples were placed in Petri dishes containing 2% malt extract agar, 0.05% streptomycin sulfate and 0.03% rose bengal (Bussaban et al., 2001). Petri dishes were sealed with Parafilm M® and incubated at room temperature (25 ± 2 °C) for one week. The fungi growing out from the samples were aseptically transferred to potato dextrose agar (PDA). Each pure isolate was kept on PDA slants.

2.2. Identification of endophytic fungi and screening in vitro for fumigation activity of endophytic fungi

The endophytic fungi were identified according to their macro- and microscopic structures (Ellis, 1971; Carmichael et al., 1980; Sutton, 1980; von Arx, 1981; Ellis and Ellis, 1985; Barnett and Hunter, 1998; Hyde et al., 2000). All identified endophytic fungi were maintained in cryovials containing 20% glycerol at −20 °C and deposited in the Sustainable Development of Biological Resources Laboratory, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. All of the endophytic fungi isolated from *L. loudoni* were initially screened by dual culture volatile assay for volatile antimicrobial activity against *Rhizoctonia solani*. Fungal endophytes were inoculated on one site of a two-compartment plastic plate (92 × 16 mm) and incubated for three days at 25 ± 2 °C. An agar plug of *R. solani* was then placed on the other compartment before sealing with Parafilm M® and incubated for one week at 25 ± 2 °C. Colony diameter of *R. solani* was measured after seven days and the percentage of inhibition was calculated. To assess viability of the pathogen, the mycelia plugs of *R. solani* were then transferred to fresh PDA and incubated for seven days. The experiment was repeated twice with five replicates.

2.3. Phylogenetic study of volatile-producing fungi

A volatile-producing fungus (*Nodulisporium* spp. UPE-CMU34) was subcultured onto PDA and incubated for 10 days. Mycelium was harvested, freeze dried and ground into a fine powder with a pestle and mortar. Genomic DNA was extracted by a modified SDS-CTAB method (Bussaban et al., 2005). The internal transcribed spacer (ITS) regions 1 and 2, including 5.8S rDNA were separately amplified in a 25 μL reaction on a GeneAmp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) under these reaction conditions: 1 μL of template DNA extraction, 0.2 mM each of dNTP, 0.2 μL of FastTaq (Applied Biosystems), 0.2 mM each of primers, 2.5 μL of the supplied 10X PCR buffer with $MgCl_2$ and sterile water to bring the volume to 25 μL. The ITS regions were amplified by using ITS4 and ITS5 primers (White et al., 1990). Amplification of ITS regions was for 30 cycles (initial denaturation at 95 °C for 2 min, denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 30 s and extension at 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 10 min). PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels in TAE buffer (20 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) and viewed by staining with ethidium bromide. PCR products were purified using PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin® Extract II purification Kit (Macherey-Nagel, Germany) following the manufacturer's protocol. The purified PCR products were directly sequenced. Sequencing reactions were performed and sequences determined automatically in a genetic analyzer (1ST Base, Malaysia) using the PCR primers mentioned above. Sequences obtained in this study were compared to those from GenBank database using the BLAST software on the NCBI website: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). A multiple sequence alignment was carried out using the alignment subroutines in Clustal X (Thompson et al., 1997). The data was analyzed to determine the phylogenetic relationship based on distance and parsimony criteria phylogenetic tree was inferred with PAUP beta 10 software program, versions 4.0 (Swofford, 2002).

2.4. In vitro assay for fumigation activity of Nodulisporium spp. CMU-UPE34

Nodulisporium spp. CMU-UPE34 was studied by dual culture volatile assays against 12 plant pathogenic fungi, *Alternaria porri*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium solani*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *R. solani* and *Sclerotium rolfsii*. All of the pathogens were isolated from host plants and pathogenicity was confirmed by Koch's postulates technique. Before testing, all pathogens were separately grown on PDA for two weeks. The pathogen cultures not exposed to the volatiles of *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 were used as control treatments. Colony diameters of pathogens were measured after seven days and the percentage of inhibition was calculated. To assess viability of the pathogen, mycelial plugs of the exposed pathogen were then transferred to fresh PDA and incubated for seven days. The experiment was repeated twice with five replicates.

2.5. Qualitative analysis of Nodulisporium spp. CMU-UPE34 by GC/MS

Analyses of volatiles produced by *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 grown for one week at 25 ± 2 °C on PDA were carried out according to the protocols described earlier by Strobel et al. (2001). A baked solid phase microextraction (SPME) fiber (Supelco) consisting of 50/30 divinylbenzene/carboxen on polydimethylsiloxane on a stable flex fiber was exposed for 45 min to the vapour phase of head space of the grown culture. The fiber was inserted into the splitless injection port of a gas chromatograph GC 2010 (Shimadzu, Japan) equipped with a 30 m × 0.25 mm I.D. DB-Wax capillary column with a film thickness of 0.25 μm. The column was subjected to a thermal program as follows: 40 °C for 2 min increased to 200 at 5 °C min^{-1}. Ultra high purity helium was used as a carrier gas with an initial column head pressure of 60 kPa. The fiber was conditioned at 250 °C for 57 min under a flow of helium gas prior to trapping the volatiles. A 30 s injection time was used to introduce the adsorbed volatiles into the GC. The gas chromatograph was interfaced to a mass spectrometer MS-QP 2010 Plus (Shimadzu, Japan) mass selective detector mass spectrometer operating at unit resolution. Data acquisition and processing were performed on the software system. The compounds produced by CMU-UPE34 were tentatively identified through library comparison with the NIST database, hence all chemical compounds described in this report use the NIST database chemical terminology.

2.6. Determination of a suitable solid medium for inoculum production

Six solid media; barley grain (*Hordeum vulgare*), GABA rice grain (*Oryza sativa*), jasmine rice grain (Thai Hom Mali 105, *O. sativa*), job's tear grain (*Coix lacryma-job*), rye grain (*Secale cereale*) and sorghum grain (*Sorghum bicolor*) were used in this experiment. Each medium was prepared by boiling grains for 10–15 min. The medium was placed in 18 × 180 mm test tubes to approximately 10 cm depth and autoclaved at 121 °C for 30 min. After cooling, each tube was inoculated with a mycelial plug (5 mm diam) cut from the periphery of the growing colony and incubated at room temperature for one week in darkness. Linear growth of the mycelium was measured every third day, and growth rate was estimated from the linear part of the plot of the length against incubation time (Ohta and Fujiwara, 2003).

2.7. In vivo assay for fumigation activity of Nodulisporium spp. CMU-UPE34

The volatile compounds produced by *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 were tested against both *Penicillium* spp. (*P. expansum* decay of *Citrus aurantifolia* and *Citrus reticulata*, and *P. digitatum* decay of *Citrus limon* which inoculated into separate of each fruits). Citrus fruit were surface sterilized by 0.2% (v/v) sodium hypochlorite for 3 min and then washed three times with sterile distilled water. After air-dying, a uniform wound (6 pores, 1 mm width and 2 mm depth) was made at the equator of each fruit using needles, and 30 μL spore suspension of pathogenic fungi (10^6 spore ml^{-1}) was injected into each wound. The inoculated fruits were arranged (3 fruits per box) in 4 L plastic boxes.

Two-week-old jasmine rice grain *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 was used for inocula since the fungal mycelial completely covered the surface of jasmine rice medium within two weeks. Eight dosages of CMU-UPE34 inocula (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 g) were tested; each dosage being applied to a separate box. The boxes were sealed by Parafilm M® and stored at 25 ± 2 °C for 48 h. The fungal inocula were then removed and the boxes were restored. After one week of storage, diameters of decay lesions were recorded and control percentages were calculated (Park et al., 2010). The experiment was repeated twice with three replicates.

2.8. Statistical analyses

All experiment data was analyzed using SPSS program version 16.0 for windows and Fisher's LSD multiple comparison test was used for significant differences ($P < 0.05$) between treatments.

3. Results

3.1. Endophytic fungi isolated from L. loudoni and antifungal volatile compound producing strain

Forty-six fungal isolates were recovered from *L. loudoni* as shown in Table 1. Thirty-seven taxa were identified based on morphological characteristics, comprising 10 ascomycetes and 27 anamorphic taxa (16 coelomycetes and 11 hyphomycetes). Dominant genera were *Xylaria*, *Colletotrichum* and *Phomopsis*. Only one fungal isolate CMU-UPE34, which was isolated from the stem, showed antifungal activity against *R. solani* by dual culture volatile assay (Table 1). The identification of CMU-UPE34 was based on morphological characteristic and molecular data via partial sequencing of its ITS1-5.8S-ITS2 rDNA. Fungal colonies were white to brownish green on PDA (Fig. 1A). Hyphae were 0.7–3.6 μm thick and branching. Conidiogenous cells were attached in irregular to verticillate patterns, arising singly or more often in groups, laterally or more frequently at each branch terminus (Fig. 1B and C). Conidia were pale brown and smooth, 1.8–2.7 × 4.2–5.4 μm, single celled and ellipsoidal, with a flattened base indicating the former point of attachment to the conidiogenous cell (Fig. 1D–F). In morphological respects, the fungus appeared to be a hyphomycetes, *Nodulisporium* spp.

Table 1
In vitro fumigation activity screening of endophytic fungi isolated from *Lagerstroemia loudoni* against *Rhizoctonia solani*.

Fungal taxa	Fungal isolate	Part of plant	Fumigation activity [a]
Chaetomium globosum	CMU-UPE44	Leaf	–
Cladosporium spp.	CMU-UPE5	Stem	–
Cladosporium cucumerinum	CMU-UPE6	Leaf	–
Cladosporium tenuissimum	CMU-UPE30	Leaf	–
Colletotrichum acutatum	CMU-UPE21	Stem	–
Colletotrichum acutatum	CMU-UPE23	Leaf	–
Colletotrichum acutatum	CMU-UPE26	Leaf	–
Colletotrichum acutatum	CMU-UPE42	Stem	–
Colletotrichum acutatum	CMU-UPE43	Stem	–
Colletotrichum coccodes	CMU-UPE27	Leaf	–
Colletotrichum gloeosporioides	CMU-UPE3	Stem	–
Colletotrichum gloeosporioides	CMU-UPE7	Stem	–
Eupenicillium ochrosalmoneum	CMU-UPE20	Stem	–
Eupenicillium javanicum	CMU-UPE12	Stem	–
Fusarium oxysporum	CMU-UPE4	Stem	–
Fusarium spp.	CMU-UPE18	Leaf	–
Fusarium solani	CMU-UPE29	Stem	–
Fusarium solani	CMU-UPE35	Stem	–
Glomerella spp.	CMU-UPE25	Stem	–
Guignardia mangiferae	CMU-UPE38	Leaf	–
Humicola fuscoatra	CMU-UPE15	Leaf	–
Nodulisporium spp.	CMU-UPE34	Stem	+
Periconia spp.	CMU-UPE22	Leaf	–
Pestalotiopsis spp. 1	CMU-UPE33	Stem	–
Pestalotiopsis spp. 2	CMU-UPE37	Leaf	–
Phoma sp.	CMU-UPE28	Leaf	–
Phomopsis spp. 1	CMU-UPE1	Leaf	–
Phomopsis spp. 2	CMU-UPE2	Leaf	–
Phomopsis spp. 2	CMU-UPE11	Stem	–
Phomopsis spp. 2	CMU-UPE16	Leaf	–
Phyllosticta musarum	CMU-UPE9	Leaf	–
Phyllosticta musarum	CMU-UPE17	Leaf	–
Phyllosticta spp.	CMU-UPE19	Leaf	–
Phyllosticta spp.	CMU-UPE24	Leaf	–
Phyllosticta spp.	CMU-UPE36	Stem	–
Talaromyces flavus	CMU-UPE40	Leaf	–
Verticillium spp.	CMU-UPE41	Stem	–
Xylariaceous taxa	CMU-UPE8	Stem	–
Xylariaceous taxa	CMU-UPE10	Leaf	–
Xylariaceous taxa	CMU-UPE13	Stem	–
Xylariaceous taxa	CMU-UPE14	Leaf	–
Xylariaceous taxa	CMU-UPE31	Leaf	–
Xylariaceous taxa	CMU-UPE32	Leaf	–
Xylariaceous taxa	CMU-UPE46	Stem	–
Mycelia sterilia	CMU-UPE39	Stem	–
Mycelia sterilia	CMU-UPE45	Stem	–

[a] + = inhibition activity and – = no inhibition activity.

Partial of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 was obtained and compared with GenBank database. The sequence is deposited in GenBank as JN558831. Parsimony analyses of the alignment yielded 30 most parsimonious trees with total length of 1032 steps (CI = 0.587, RI = 0.721, RC = 0.426 and HI = 0.413), one of which is shown in Fig. 2. Phylogenetic analysis indicated that *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 was closely related to *Nodulisporium* spp. JP3821 and NTLF04, which in turn are related to genus *Daldinia*.

3.2. In vitro assay for fumigation activity of Nodulisporium spp. CMU-UPE34

After one week of incubation, volatile compounds produced by *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 inhibited the mycelial growth of all

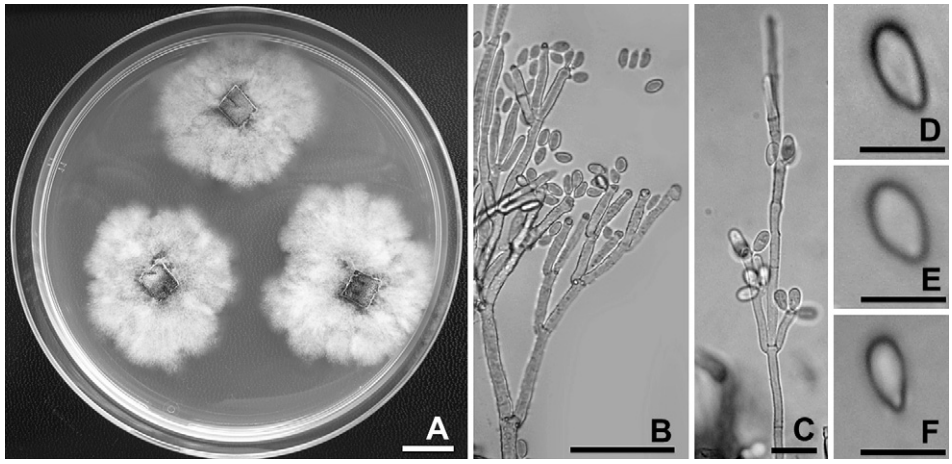


Fig. 1. *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34. A. Colonies grown 4 days at 25 °C on PDA. B and C. Conidiophores. D–F. Conidia. Bar: A = 10 mm, B = 15 μm, C–F = 5 μm.

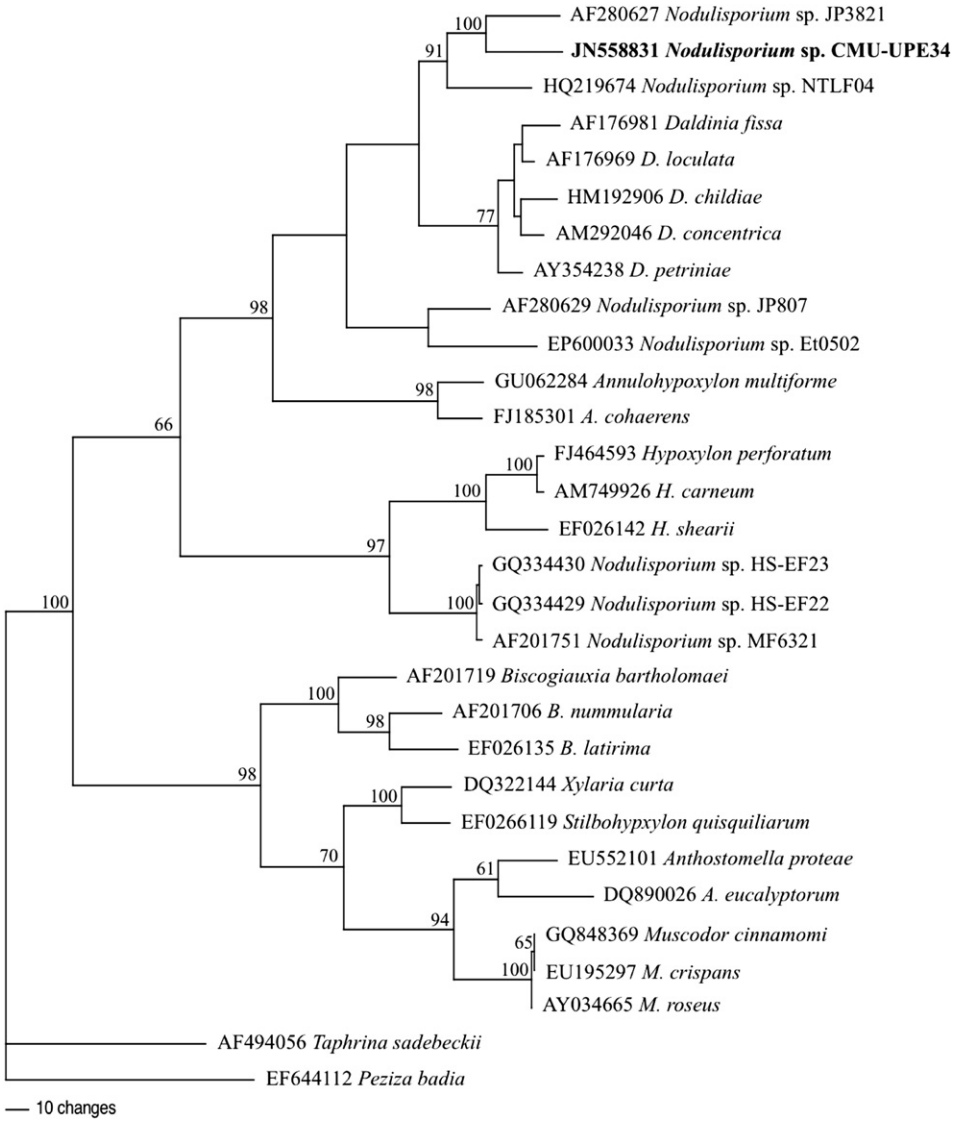


Fig. 2. One of 30 most parsimonious trees inferred from a heuristic search of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence alignment of 30 isolates of *Nodulisporium* and related genera. *Peziza badia* and *Taphrina sadebeckii* were used to root the tree. The size of the branches is indicated with a scale bar. Branches with bootstrap values ≥50% are shown at each branch.

tested plant pathogenic fungi by at least 50% except for *F. solani* (Table 2). Mycelial growth of *R. solani*, *S. rolfsii* and *P. expansum* were most inhibited (88–97%) but only *R. solani* was dead when transferred to fresh PDA after one week of exposure to *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 volatile compounds.

3.3. Qualitative analysis of Nodulisporium spp. CMU-UPE34 by SPME-GC/MS

Nodulisporium spp. CMU-UPE34 produced at least 31 volatile compounds (Table 3). These could be positively identified on the basis of a GC/MS comparison with authentic standards obtained from commercial sources as well as organic synthesis. The compounds were identified primarily on the basis of their mass spectral properties when compared to the NIST database. Of the compounds produced by this organism the most abundant was eucalyptol. Other major fungal compounds appearing in the analysis were cyclohexane,1,2,4-tris(methylene); 1-butanol,3-methyl; 2-cyclohexen-1-one, 2-(2-methyl-2-propenyl) and benzeneethanol. Interestingly, 11 monoterpene compounds (camphor; 2-carene, (+)-4-carene; limonene; eucalyptol; β-myrcene; cis-β-ocimene; pinane, α-terpineol; γ-terpinen and 3-thujene) were detected in this fungal culture together with azulene and naphthalene.

3.4. Determination of a suitable solid medium for inoculum production

The mycelial growth rates (+SD) of *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 in test tube culture on various media are shown in Table 4. The fungus was able to grow on all six solid media but after one week of incubation it grew fastest on jasmine rice grain, rye grain and Job's tear grain with no significant difference ($P < 0.05$).

3.5. In vivo assay for fumigation activity of Nodulisporium spp. CMU-UPE34

Citrus aurantifolia and *C. reticulata* fruit inoculated with *P. expansum* and *C. limon* inoculated with *P. digitatum* were fumigated with jasmine rice grain cultures of *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34. Volatile compounds produced by CMU-UPE34 suppressed the development of blue mold and green mold lesions on citrus fruits, with the effect depended on fumigation dose (Fig. 3). In untreated citrus fruits, the inoculation with *P. digitatum* and *P. expansum* exhibited decay lesions around the infection site. Treatment with 60 g of CMU-UPE34 inoculum was the minimum dose for control of blue mold decay on *C. aurantifolia* and *C. reticulata* (Fig. 3A and B). Furthermore, mycofumigation with CMU-UPE34 controlled green mold decay on *C. limon* caused by *P. digitatum*. Treatment with CMU-UPE34 at 50 g inoculum was the minimum dose causing complete control of green mold decay (Fig. 3C).

Table 2
Inhibition of mycelial growth of phytopathogenic fungi by volatile compound from *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34.

Test organism	Inhibition (%) [a]	Viability [b]
Alternaria porri	61.32 ± 0.32	A
Alternaria solani	76.99 ± 0.77	A
Colletotrichum capsici	74.36 ± 0.14	A
Colletotrichum musae	72.53 ± 0.21	A
Colletotrichum gloeosporioides	78.49 ± 0.17	A
Fusarium oxysporum	53.47 ± 0.64	A
Fusarium solani	47.26 ± 0.29	A
Nigrospora oryzae	65.41 ± 0.51	A
Penicillium digitatum	83.25 ± 0.31	A
Penicillium expansum	87.67 ± 0.11	A
Rhizoctonia solani	97.32 ± 0.24	D
Sclerotium rolfsii	93.56 ± 0.39	A

[a] Average ± SD from four replicates.
[b] Viability of the test organism was determined seven days after exposure to volatile compounds of *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 and transferred to a fresh PDA plate, A = alive and D = dead.

Table 3
GC/MS air-space analysis of the volatile compounds produced by *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 after one week at 25 ± 2 °C on PDA using an SPME fiber.

Retention time (min)	Total area (%)	Possible compounds	MW	Quality
4.66	0.48	3-thujene	136	96
5.04	0.57	Butanoic acid, ethyl ester	166	97
7.13	1.28	1-propanol, 2-methyl	74	96
7.77	0.39	1-butanol, 3-methyl acetate	130	96
9.13	1.40	β-myrcene	136	97
9.47	0.96	(+)-4-carene	136	94
10.12	1.27	Limonene	136	95
10.63	50.24	Eucalyptol	136	97
10.94	7.09	1-butanol, 3-methyl	88	98
11.56	0.11	1,3,6-octatriene, 3,7-dimethyl	136	95
11.76	0.32	γ-terpinen	136	96
12.07	0.15	Cis-β-ocimene	136	93
12.95	0.12	2-carene	136	94
13.01	0.16	2-propanol, 1-bromo	138	88
13.74	0.56	Hexane,3,3,4-trimethyl	128	87
14.28	0.87	1-pentanol, 4-methyl	102	88
15.88	11.49	Cyclohexane,1,2,4-tris(methylene)	120	94
16.85	0.14	Pentanoic acid, 3-methylbutyl ester	175	85
17.69	0.36	Benzene,1,4-dichloro	146	89
18.30	0.09	2-hexene,3,5,5-trimethyl	126	85
19.62	0.33	Camphor	125	97
21.07	0.04	1-octanol	130	94
24.45	1.32	α-terpineol	154	97
24.78	0.11	Azulene,1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1α,7α,8a β)]	204	92
25.21	0.10	Naphthalene	128	94
25.76	0.31	Pinane	138	98
28.30	0.14	Propanoic acid, 2-methyl,3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	216	94
29.24	3.79	Benzeneethanol	122	97
31.77	4.35	2-cyclohexen-1-one, 2-(2-methyl-2-propenyl)	150	87
36.87	0.03	1,2-benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester	194	90
37.21	0.57	9,17-octadecadienal, (Z)	264	95

Compounds present in a control PDA have been subtracted from the data.

4. Discussion

This study constitutes the first report of isolation and investigation of the fumigation activity for controlling postharvest decay of citrus fruit by endophytic fungi from *L. loudoni* collected from northern Thailand. All endophytes found have been reported in

Table 4
Growth of *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 on solid media after one week incubated in test tube.

Solid medium	Growth rate (mm per day) [a]
Barley grain	11.13 ± 0.23 b
Gaba rice grain	10.00 ± 0.31 c
Jasmine rice grain	13.68 ± 0.50 a
Job's tear grain	13.37 ± 0.32 a
Rye grain	13.53 ± 0.31 a
Sorghum grain	11.31 ± 0.30 b

Values with the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) according to Fisher's LSD multiple comparison test.
[a] Average ± SD from four replicates.

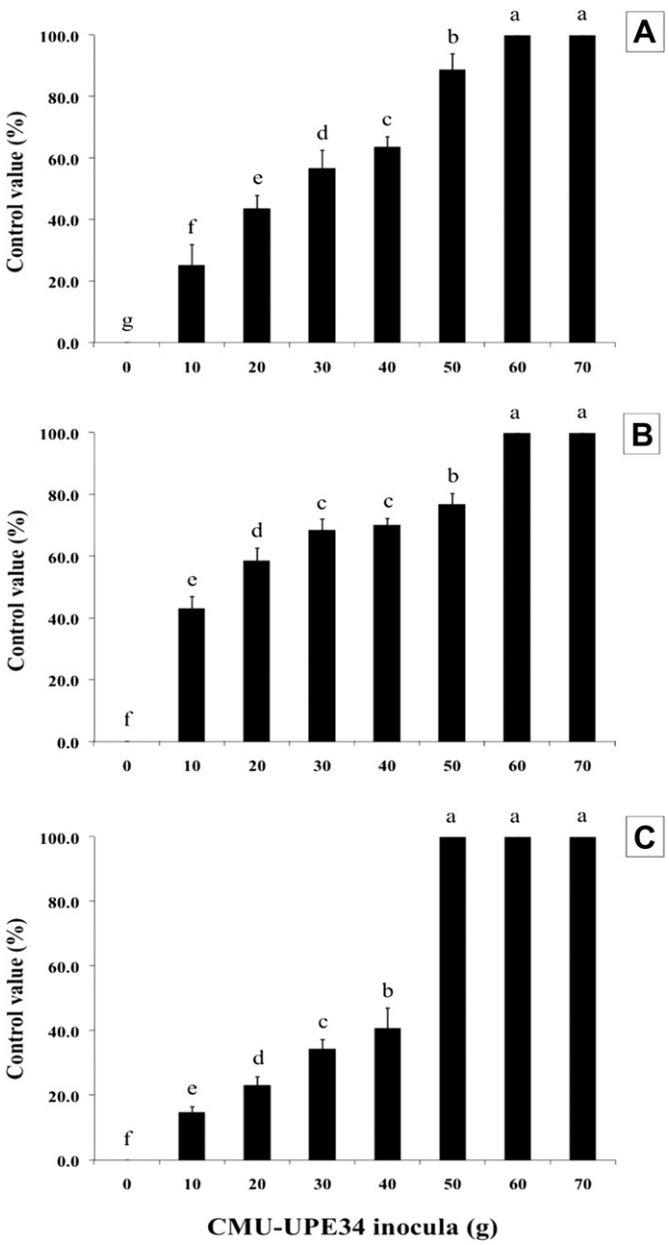


Fig. 3. *In vivo* antifungal activity of mycofumigation with *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 against blue mold decay of *Citrus aurantifolia* (A) and *C. reticulata* (B) and green mold decay of *C. limon* (C). Mycofumigation applied for 24 h at dosages of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 g of CMU-UPE34 inoculum, fruit incubation for one week at 25 ± 2 °C in dark. Control value (%) = 100 × [rotted symptom radius of untreated fruits − rotted symptom radius of treated fruits] ÷ rotted symptom radius of untreated fruits. The different letters above each graph indicated the significant difference ($P < 0.05$) according to Fisher's LSD multiple comparison test.

a wide range of host tree species in tropical regions such as *Amomum siamense* (Bussaban et al., 2001), *Calamus kerrianus* and *Wallichia caryotoides* (Lumyong et al., 2009), *Musa acuminata* (Nuangmek et al., 2008) and *Tripterygium wilfordii* (Kumar and Hyde, 2004).

Based on the sequence analysis of ITS regions of rDNA gene of *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 was 100% similar to *Nodulisporium* spp. JP3821 (AF280627). Thus, it is reasonable to identify the fungi isolate CMU-UPE34 as *Nodulisporium* spp. The genus *Nodulisporium* has been reported as an anamorphic stage of many fungal genera in the family Xylariaceae such as *Biscogniauxia*, *Daldinia*, *Camillea*, *Hypoxylon* and *Xylaria* (Ju and Rogers, 1996; Whalley, 1996). *Nodulisporium* spp. are distributed worldwide and known to be endophytic fungi, wood decay fungi or as a plant pathogen (White, 2004; Matheron et al., 2006; Nuangmek et al., 2008; Park et al., 2010; Rehman et al., 2011). Previous studies found that *Nodulisporium* spp. produced non-volatile compounds from a culture which showed antimicrobial activity (Dai et al., 2006; Wu et al., 2010; Rehman et al., 2011). Park et al. (2010) and Tomsheck et al. (2010) reported that *Nodulisporium* spp. was able to produce antimicrobial volatile compounds.

While endophytic fungi have been known to produce volatile compounds, the production of volatile antibiotics from endophytic fungi has been investigated minimally. The genus *Muscodor* is known to produce volatile compounds that inhibit and kill other fungi and bacteria (Strobel et al., 2001; Ezra et al., 2004; Mitchell et al., 2008; Goates and Mercier, 2009; González et al., 2009; Worapong and Strobel, 2009; Banerjee et al., 2010; Zhang et al., 2010). In addition, Atmosukarto et al. (2005) and Mercier et al. (2007) reported that *M. albus* produces aciphyllene, 2-butanone, 2-methylfuran, aciphyllene, isobutyric acid and tetrohydofuran which have antibiotic activity. Recently, Lee et al. (2009) found an antifungal volatile-producing basidiomycetous strain, *O. latemarginatus* EF069 that inhibits mycelial growth of plant pathogenic fungi by producing 5-pentyl-2-furaldehyde. However, *Phomopsis* spp. EC-4 (Singh et al., 2011), *Trichoderma* spp. (Ajith and Lakshmidevi, 2010; Amin et al., 2010) and some bacterial strains, such as *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia odorifera* and *Stenotrophomonas maltophilia*, (Kai et al., 2007; Sarangi et al., 2010) have also been shown to produce volatile organic compounds which inhibited mycelium growth of *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium* and *Verticillium*.

Nodulisporium spp. CMU-UPE34 was found to produce 31 volatile compounds which were primarily composed of various small molecular weight alcohols, acids, esters and monoterpene. Of these, 11 compounds produced by this fungus were classified as the monoterpene compounds. To our knowledge, this is the first report of production of 4 monoterpene compounds including camphor; 2-carene; (+)-4-carene and cis-β-ocimene by an endophytic fungus. Tomsheck et al. (2010) reported that *Hypoxylon* spp. CI-4 produced 29 volatile compounds, but only two compounds cyclohexane,1,2,4-tris(methylene) and eucalyptol, were similar to those found in the current work. Park et al. (2010) reported that *Nodulisporium* spp. FC016 produced five volatile compounds including, 5,5-dimethyl-1,3-cyclopentadiene, 1-methyl-1,4-cyclohexadiene, 2-methyl-5,6-dihydro-2H-pyreran, cyclohexane, beta-elemene, beta-selinene and alpha-selinene, which showed antifungal activity, but none of these compounds were detected in *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34. The strain CMU-UPE34 produced eucalyptol abundantly. Previous studies reported that eucalyptol is an essential oil, found as a major constituent of essential oil of plants including eucalyptus, and is known to possess antimicrobial properties (Karlovic et al., 2000; Akin et al., 2010; Sahoo et al., 2011). Furthermore, this strain produced azulene and naphthalene both of which are found in the fungal endophyte genus *Muscodor* such as *M. albus*, *Muscodor fengyangensis*, *Muscodor roseus*, *Muscodor vitigenus* (Worapong et al., 2001, 2002; Daisy et al., 2002; Zhang et al., 2010). Thus, each volatile compound and a class of similar compounds produced by *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 will be investigated further using biological tests.

This study showed that jasmine rice grain culture of *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 completely controlled citrus decay caused by blue mold (*P. expansum*) and green mold (*P. digitatum*), suggesting a biological fumigation effect. The fumigation with 60 g of CMU-UPE34 inoculum was the minimum dose for control blue

mold decay on *C. aurantifolia* and *C. reticulata* and 50 g inocula was the minimum dose causing complete control of green mold decay. In this study, the amount of inocula differed from other reports that studied biocontrol using volatile-producing endophytic fungi. For example fumigation with 30 g of rye cultured *M. albus* completely controlled lemon decay caused by *P. digitatum*, sour rot of lemon caused by *Geotrichum citri-aurantii*, apple decay caused by *P. expansum* and *Botrytis cinerea* and brown rot of peaches caused by *Monilinia fructicola* (Mercier and Jiménez, 2004; Mercier and Smilanick, 2005). Park et al. (2010) reported that fumigation with 50 g of wheat bran-rice hull culture of *Nodulisporium* spp. CF016 suppressed lesion development of gray mold and blue mold on apple fruits by 88% and 76%, respectively. Lee et al. (2009) reported that fumigation with 50 g of wheat bran-rice hull cultures of *O. latemarginatus* EF069 controlled disease development of *Botrytis* lesions on apple fruits by 98.4%. It is possible that *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 can be used as a biological control agent to eliminate postharvest diseases in various fruits and replace the use of chemical fungicides. Further study on the optimal solid media and techniques of inoculum production will be studied with the goal of finding low cost and easily maintained production methods for biofumigants in agriculture.

Acknowledgements

This work was supported by grants from TRF Research-Team promotion Grant RTA5580007 and Scholarship from JENSYS Program of Japan Society for the Promotion of Science (JSPS). We are grateful to Mr. Keegan Kennedy for improving the English text.

References

Ajith, P.S., Lakshmidevi, N., 2010. Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on bell peppers. Nat. Sci. 8, 265–269.

Akin, M., Aktumsek, A., Nostro, A., 2010. Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. Afr. J. Biotechnol. 9, 531–535.

Amin, F., Razdan, V.K., Mohiddin, F.A., Bhat, K.A., Sheikh, P.A., 2010. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in vitro*. J. Phytol. 2, 34–37.

von Arx, J.A., 1981. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. AR Gantner, Vaduz.

Atmosukarto, I., Castillo, U., Hess, W.M., Sears, J., Strobel, G., 2005. Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. Plant Sci. 169, 854–861.

Bacon, C., White, J., 2000. Microbial Endophytes. Marcus Dekker, New York.

Banerjee, D., Strobel, G., Geary, B., Seares, J., Ezra, D., Liarzi, O., Coombs, J., 2010. *Muscodor albus* strain GBA, an endophytic fungus of *Ginkgo biloba* from United States America, produces volatile antimicrobials. Mycology 1, 179–186.

Barnett, H.L., Hunter, B.B., 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, fourth ed. Prentice-Hall, New York.

Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., 2001. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. Can. J. Microbiol. 47, 943–948.

Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., Seelanan, T., Park, D.C., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., 2005. Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. Mycologia 97, 1002–1011.

Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Conners, I.L., Sigler, L., 1980. Genera of Hyphomycetes. The University of Alberta Press, Alberta.

Dai, J., Krohn, K., Frörke, U., Draeger, S., Schulz, B., Kiss-Szikazai, A., Antus, S., Kurtán, T., van Ree, T., 2006. Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. Eur. J. Org. Chem. 15, 3498–3506.

Daisy, B., Strobel, G., Ezra, D., Castillo, U., Bairn, G., Hess, W.M., 2002. *Muscodor vitigenus* anam. sp. nov., an endophyte from *Paullinia paullinioides*. Mycotaxon 81, 463–475.

Dennis, C., Webster, J., 1971. Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* II production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57, 41–48.

Ellis, M.B., Ellis, J.P., 1985. Microfungi on Land Plants, an Identification Handbook. Croom Helm, Sydney.

Ellis, M.B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, London.

Ezra, D., Hess, W.M., Strobel, G.A., 2004. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile antibiotic producing fungus. Microbiology 150, 4023–4031.

Goates, B.J., Mercier, J., 2009. Effect of biofumigation with volatiles from *Muscodor albus* on the viability of *Tilletia* spp. teliospores. Can. J. Microbiol. 55, 203–206.

González, M.C., Anaya, A.L., Glenn, A.E., Macías-Rubalcava, M.L., Hernández Bautista, B.E., Hanlin, R.T., 2009. *Muscodor yucatanensis*, a new endophytic ascomycetes from Mexican chakah, *Bursera simaruba*. Mycotaxon 110, 363–372.

Hyde, K.D., Taylor, J.E., Frohlich, J., 2000. Genera of Ascomycetes from Palms. In: Fungal Diversity Research Series, vol. 2. Fungal Diversity Press, Hong Kong.

Ju, Y.M., Rogers, J.D., 1996. A revision of the genus *Hypoxylon*. Mycologia Mem. 20, 1–365.

Kai, M., Effmert, U., Berg, G., Piechulla, B., 2007. Volatile of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Arch. Microbiol. 187, 351–360.

Karlović, Z., Anić, I., Miletić, I., Prpić-Mehičić, G., Pezelj-Ribarić, S., Maršan, T., 2000. Antibacterial activity of halothane, eucalyptol and orange oil. Acta Stomatol. Croat. 34, 307–309.

Kumar, D.S.S., Hyde, K.D., 2004. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. Fungal Divers. 17, 69–90.

Lacey, L.A., Neven, L.G., 2006. The potential of the fungus, *Muscodor albus*, as a microbial control agent of potato tuber moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in stored potatoes. J. Invertebr. Pathol. 91, 195–198.

Lee, S.O., Kim, H.Y., Choi, G.J., Lee, H.B., Jang, K.S., Choi, Y.H., Kim, J.C., 2009. Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and Rhizoctonia root rot on moth orchid. J. Appl. Microbiol. 106, 1213–1219.

Lumyong, S., Techa, W., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., 2009. Endophytic fungi from *Calamus kerrianus* and *Wallichia caryotoides* (Arecaceae) at Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. Chiang Mai J. Sci. 36, 158–167.

Matheron, M.E., Porchas, M., Bigelow, D.M., 2006. Factors affecting the development of wood rot on lemon trees infected with *Antrodia sinuosa*, *Coniophora eremophila*, and a *Nodulisporium* sp. Plant Dis. 90, 554–558.

Mercier, J., Jiménez, J.I., 2004. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. Postharv. Biol. Technol. 31, 1–8.

Mercier, J., Smilanick, J.L., 2005. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. BioControl 32, 401–407.

Mercier, J., Jiménez-Santamaría, I., Tamez-Guerra, P., 2007. Development of the volatile-producing fungus *Muscodor albus* Worapong, Strobel, and Hess as a novel antimicrobial biofumigant. Rev. Mex. Fitopatol. 25, 173–179.

Mitchell, A.M., Strobel, G.A., Hess, W.M., Vargas, P.N., Ezra, D., 2008. *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. Fungal Divers. 31, 37–44.

Nuangmek, W., McKenzie, E.H.C., Lumyong, S., 2008. Endophytic fungi from wild banana (*Musa acuminata* Colla) works against anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae*. Res. J. Microbiol. 3, 368–374.

Ohta, A., Fujiwara, N., 2003. Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture. Mycoscience 44, 295–300.

Park, M.S., Ahn, J., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S., Kim, J.C., 2010. Potential of the volatile-producing fungus *Nodulisporium* sp. CF016 for the control of postharvest diseases of apple. Plant Pathol. J. 26, 253–259.

Rehman, S., Mir, T., Kour, A., Qazi, P.H., Sultan, P., Shawl, A.S., 2011. *In vitro* antimicrobial studies of *Nodulisporium* specie: an endophytic fungus. J. Yeast Fungal Res. 2, 53–58.

Riga, E., Lacey, L., Guerra, N., 2008. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. BioControl 45, 380–385.

Sahoo, R.K., Kuanar, A., Joshi, R.K., Das, A.P., Nayak, S., Subudshi, E., 2011. Antidermatophytic activity of eucalyptol rich turmeric somaclone oil against human pathogenic isolates. J. Med. Plants Res. 5, 1594–1597.

Sarangi, N., Athukorala, P., Dilantha-Fernando, W.G., Rashid, K.Y., Kievit, T.D., 2010. The role of volatile and non-volatile antibiotics produced by *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 in its root colonization and control of *Sclerotinia sclerotiorum*. Biocontrol. Sci. Technol. 20, 875–890.

Singh, S.K., Stroble, G.A., Knighton, B., Geary, B., Sears, J., Ezra, D., 2011. An endophytic *Phomopsis* sp. bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds. Microb. Ecol. 61, 729–739.

Stinson, A.M., Zidack, N.K., Strobel, G.A., Jacobsen, B.J., 2003. Effect of mycofumigation with *Muscodor albus* and *Muscodor roseus* on seedling diseases of sugar beet and Verticillium wilt of eggplant. Plant Dis. 87, 1349–1354.

Strobel, G.A., Daisy, B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 491–502.

Strobel, G.A., Dirske, E., Sears, J., Markworth, C., 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. Microbiology 147, 2943–2950.

Sutton, B.C., 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, London.

Swofford, D.L., 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Beta Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tan, R.X., Zou, W.X., 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites, the Royal Society of Chemistry. Nat. Prod. Rep. 18, 448–459.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higguns, D.G., 1997. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24, 4876–4882.

Tomsheck, A.R., Stroble, G.A., Booth, E., Geary, B., Spakowicz, D., Knighton, B., Floerchinger, C., Sears, J., Liarzi, O., Ezra, D., 2010. *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. Microb. Ecol. 60, 903–914.

Whalley, A.J.S., 1996. The xylariaceous way of life. Mycol. Res. 100, 897–922.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H.,

Sninsky, J.S., White, T.J. (Eds.), PCR Protocols :a Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York.
White, N.A., 2004. The importance of wood-decay fungi in forest ecosystems. In: Arora, D.K. (Ed.), Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications. Marcel Dekker, New York.
Worapong, J., Strobel, G.A., 2009. Biocontrol of root rot of kale by *Muscodor albus* strain MFC2. BioControl 54, 301–306.
Worapong, J., Strobel, G.A., Ford, E.J., Li, J.Y., Brird, G., Hess, W.M., 2001. *Muscodor albus* anam. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. Mycotaxon 79, 67–79.
Worapong, J., Strobel, G.A., Daisy, B., Castillo, U.F., Baird, G., Hess, W.M., 2002. *Muscodor roseus* anam. sp. nov., an endophyte from *Grevillea pteridifolia*. Mycotaxon 81, 463–475.
Wu, Z.C., Li, D.L., Chen, Y.C., Zhang, W.M., 2010. A new isofuranonaphthalenone and benzopyrans from endophytic fungus *Nodulisporium* sp. A4 from *Aquilaria sinensis*. Helv. Chim. Acta 93, 920–924.
Zhang, C., Wang, G., Mao, L., Komon-Zelazowska, M., Yuan, Z., Lin, F., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., 2010. *Muscodor fengyangensis* sp. nov. from southeast China: morphology, physiology and production of volatile compounds. Fungal Biol. 114, 797–808.

Ann Microbiol (2013) 63:1341–1351
DOI 10.1007/s13213-012-0593-6

ORIGINAL ARTICLE

Molecular and morphological evidence support four new species in the genus *Muscodor* from northern Thailand

Nakarin Suwannarach · Jaturong Kumla · Boonsom Bussaban · Kevin D. Hyde · Kenji Matsui · Saisamorn Lumyong

Received: 1 August 2012 / Accepted: 13 December 2012 / Published online: 9 January 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and the University of Milan 2013

Abstract The genus *Muscodor* comprises fungal endophytes which produce mixtures of volatile compounds (VOCs) with antimicrobial activities. In the present study, four novel species, *Muscodor musae*, *M. oryzae*, *M. suthepensis* and *M. equiseti* were isolated from *Musa acuminata*, *Oryza rufipogon*, *Cinnamomum bejolghota* and *Equisetum debile*, respectively; these are medicinal plants of northern Thailand. The new *Muscodor* species are distinguished based on morphological and physiological characteristics and on molecular analysis of ITS-rDNA. Volatile compound analysis showed that 2-methylpropanoic acid was the main VOCs produced by *M. musae*, *M. suthepensis* and *M. equiseti*. The mixed volatiles from each fungus showed in vitro antimicrobial activity. *Muscodor suthepensis* had the highest antifungal activity.

Keywords Endophytes · Sterile ascomycete · Taxonomy · Volatile compounds

N. Suwannarach · J. Kumla · B. Bussaban · S. Lumyong (✉)
Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
e-mail: saisamorn.l@cmu.ac.th

N. Suwannarach
e-mail: suwan_461@hotmail.com

K. D. Hyde
Institute of Excellence in Fungal Research, and School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand

K. Matsui
Department of Applied Molecular Bioscience, Graduate School of Medicine, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan

K. Matsui
Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan

Introduction

Endophytes colonize healthy inter- and intracellular living tissue of host plants, typically without causing any visible symptoms of disease (Azevedo et al. 2000; Saikkonen et al. 2004; Hyde and Soytong 2008). Endophytes also protect their hosts from infectious agents and adverse conditions by secreting bioactive secondary metabolites (Azevedo et al. 2000; Gao et al. 2010). The highest plant biodiversity biomes are found in tropical and temperate rainforest regions, and plants in these areas also possess a high endophyte diversity (Strobel 2003). *Muscodor* species are volatile, producing endophytes known from certain tropical tree and vine species in Australia, Central and South America, and Central and Southeast Asia (Worapong et al. 2001, 2002; Daisy et al. 2002; Sopalun et al. 2003; Ezra et al. 2004; Atmosukarto et al. 2005; Strobel et al. 2007; Mitchell et al. 2008; González et al. 2009; Suwannarach et al. 2010; Zhang et al. 2010). The volatile organic compounds (VOCs) produced by *Muscodor* species are active against many plant pathogenic fungi and Gram-positive and Gram-negative bacteria, and the genus is thus potentially important for biocontrol (Strobel et al. 2001; Strobel and Daisy 2003; Macías-Rubalcava et al. 2010).

Eight species of *Muscodor* have been described on the basis of morphological, physiological, biological and genetic features (www.MycoBank.org; Kudalkar et al. 2012). These fungi are classified in the family *Xylariaceae* and have a unique molecular identity as compared to other genera in the family (Ezra et al. 2004; Zhang et al. 2010). Gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) can also be used to identify *Muscodor* species; this is based on the differences in the VOCs that they produce (Strobel et al. 2001).

We are investigating the endophytes of various plants, including medicinal plants in northern Thailand. The purpose of the present paper is to introduce four new species of *Muscodor* isolated from medicinal plants based on their

morphology, antimicrobial activities, volatile chemical composition and phylogeny.

Materials and methods

Study sites

Study sites were Chiang Mai University (18°47′74″N, 98° 57′41″E, altitude 328 m), Queen Sirikit Botanic Garden (18° 53′93″N, 98°51′11″E, altitude 640 m) and Medicinal Plant Garden, Doi Suthep-Pui National Park (18°48′22″N, 98°54′ 51″E, altitude 1,076 m), located in Chiang Mai Province, northern Thailand. Specimens were collected during November 2010 to May 2011.

Fungal isolation

The endophytic fungi were isolated from four plant species, *Cinnamomum bejolghota* and *Musa acuminata* (Medicinal Plant Garden site), *Equisetum debile* (Queen Sirikit Botanic Garden site) and *Oryza rufipogon* (Chiang Mai University site) by previously described methods (Mitchell et al. 2008). The plant samples (leaf and stem) were collected, placed in sterile plastic bags, stored in an icebox and transported to the laboratory within 48 h of sampling. A total of 40 samples were cut into segments (leaf, 5 mm × 5 mm; stem, 5 mm long). All segments were surface-sterilized in 75 % ethanol for 30 s, 2 % sodium hypochlorite for 3 min and 95 % ethanol for 30 s under a laminar flow hood. Potato dextrose agar (PDA) was poured into a half-plate of two-compartment plastic plates (90 mm × 15 mm). The other side of each plate contained ½ strength PDA, 0.05 % streptomycin sulfate and 0.03 % rose bengal. An agar plug (6 mm diam) of actively growing culture of *Muscodor cinnamomi* was placed into the PDA. The plant tissues then were placed onto ½PDA on the other side. The Petri dishes were sealed with Parafilm M and incubated at room temperature for 2 weeks. Fungi growing out from the samples were aseptically transferred to PDA. Pure culture isolates were maintained in PDA slants and tested three times by exposure to *M. cinnamomi* in order to exclude false positive growth in the initial isolation. The fungi were then grown on PDA for 12 days before small squares of colony were cut and placed into vials containing sterile 20 % glycerol, distilled water or mineral oil. The former vials were stored at −20 °C, while the latter two vials were stored at 4 °C, and pure fungi were deposited to the Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources (SDBR), Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand and Japan Collection of Microorganisms (JCM), Japan.

Fungal DNA extraction

Genomic DNA was extracted by a SDS-CTAB method (Suwannarach et al. 2010). *Muscodor* species were subcultured onto PDA and incubated for 10 days. Mycelium was harvested, freeze-dried, and ground into a fine powder with a pestle and mortar. About 15 mg of powdered mycelium was suspended in 1 mL of ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10 mM Tris–HCl, pH 7.4, 20 mg/mL proteinase K), transferred into a 1.5-mL Eppendorf tube and kept at 4 °C to prevent endonuclease activity during rehydration of the sample. SDS was added to a final concentration of 2 %, vortexed and incubated for 30 min at 65 °C. After centrifugation for 15 min at 14,000 rpm, the supernatant was transferred to a new sterile 1.5-mL Eppendorf tube. The volume of supernatant was measured and the NaCl concentration was adjusted to 1.4 M, and one-tenth volume of 10 % CTAB buffer (10 % CTAB, 500 mM Tris–HCl, 100 μM EDTA, pH 8.0) was added. The solution was thoroughly mixed and incubated for 10 min at 65 °C. After cooling for 2 min at 15 °C, an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1, v/v) was added, thoroughly mixed, and the tube was centrifuged for 15 min at 14,000 rpm. The extraction was repeated until the interface was clear. The supernatant was moved to a new Eppendorf tube, containing 2 volumes of cold 100 % ethanol. After DNA precipitation, the pellet was centrifuged for 15 min at 14,000 rpm and 4 °C. The pellet was washed with 70 % ethanol and dried at room temperature. It was resuspended in 100 mL of 0.002 % RNase (5 mg/mL) in TE buffer and incubated for 1 h at 37 °C. The suspension was stored at −20 °C pending use for PCR amplification.

ITS sequencing and phylogenetic analysis

The internal transcribed spacer (ITS) regions 1 and 2, including 5.8S rDNA, were separately amplified in a 25-μL reaction on a GeneAmp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) under these reaction conditions: 1 μL of template DNA extraction, 0.2 μM dNTP, 0.2 μL of FastTaq (Applied Biosystems), 0.2 μM each of primers, 2.5 μL of the supplied PCR buffer with $MgCl_2$, and sterile water to bring the volume to 25 μL. The ITS regions were amplified using ITS4 and ITS5 primers. Amplification of ITS regions was initialed by denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1 % agarose gels in TAE buffer (20 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) and viewed by staining with ethidium bromide. PCR products were purified using PCR clean up Gel Extraction NucleoSpin® Extract II Purification Kit (Macherey-Nagel, Germany) following the manufacturer's protocol. The purified PCR products were directly sequenced.

Sequencing reactions were performed and sequences determined automatically in a genetic analyzer (1st Base, Malaysia) using the PCR primers mentioned above. Sequences obtained in this study were compared to those from GenBank database using the BLAST software on the NCBI website: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). A multiple sequence alignment was carried out using the alignment subroutines in Clustal X (Thompson et al. 1997) and deposited at TreeBASE under study number 12911. The data was analyzed to determine the phylogenetic relationship based on distance and parsimony criteria phylogenetic tree was inferred with PAUP beta 10 software program, v.4.0 (Swofford 2002).

Bioassay tests

A dual culture volatile assay was used to investigate antimicrobial activity against 5 bacteria, 2 yeasts and 14 fungi test microorganisms. One side of a two-compartment plastic plate was loaded with PDA while the other side was loaded with nutrient agar (NA), PDA or yeast extract peptone dextrose agar (YPDA) for bacteria, fungi, and yeast tests, respectively. A 12-day-old *Muscodor* isolate was inoculated on the PDA side of the plate and grown for 3 days at room temperature (25 ±2 °C). Twenty-one strains including 14 plant pathogenic fungi, 2 yeasts, 3 Gram-positive bacteria, and 2 Gram-negative bacteria were used in this experiment (Table 3). An agar plug taken from the margin of 7-day-old fungal pathogen mycelium was placed into the other compartment containing PDA. Bacteria and yeasts were streaked (1.5-cm-long streak) onto either NA or YPDA. All incubated plates were sealed with Parafilm and incubated at room temperature for 6 days. Percentage inhibition of growth of each tested microorganism was then recorded and the viability of the tested microorganisms were investigated by subculture of each microorganism in the tested plate onto fresh medium. The experiment was repeated two times with three replicates.

Qualitative analysis of fungal volatiles

Analyses of volatiles produced by *Muscodor* spp. grown for 1 week at 25±2 °C on PDA were carried out according to the protocols described earlier (Strobel et al. 2001). A baked solid phase micro-extraction (SPME) fiber consisting of 50/30 divinylbenzene/carboxen on polydimethylsiloxane on a stable flex fiber was exposed for 45 min to the vapor phase of the headspace of the grown culture. The fiber was inserted into the splitless injection port of a gas chromatograph GC 2010 (Shimadzu, Japan) equipped with a 30 m×0.25 mm I.D. DB-Wax capillary column with a film thickness of 0.25 μm. The column was subjected to a thermal program as follows: 40 °C for 2 min increased to 200 °C at 5 °C/min. Ultra-high purity helium was used as a carrier gas with an initial column head pressure of 60 kPa. The fiber was conditioned at 250 °C for 57 min under a flow of helium gas prior to trapping the volatiles. A 30-s injection time was used to introduce the adsorbed volatiles into the GC. The gas chromatograph was interfaced to a mass spectrometer MS-QP2010 Plus (Shimadzu) mass selective detector mass spectrometer operating at unit resolution. Data acquisition and data processing were performed on the software system. The compounds produced by *Muscodor* spp. were tentatively identified through a library comparison with the NIST database, hence all chemical compounds described in this report use the NIST database chemical terminology and are compared to the type strains (Daisy et al. 2002; González et al. 2009; Kudalkar et al. 2012; Mitchell et al. 2008; Suwannarach et al. 2010; Worapong et al. 2001, 2002; Zhang et al. 2010).

Results

Fungal isolation

Four volatile-producing endophytic fungal isolates, *Muscodor equiseti*, *M. musae*, *M. oryzae* and *M. suthepensis* were isolated from medicinal plants, *Equisetum debile*, *Musa acuminata*, *Oryza rufipogon* and *Cinnamomum bejolghota*, respectively. Two isolates produced white mycelium on PDA, while isolate *M. suthepensis* developed a pale pink-colored mycelium in natural light, and isolate *M. oryzae* produced pale orange mycelium (Table 1). All isolates produced rope-like and coiled hyphae. Only swollen hyphae cells were found in isolate *M. equiseti*. The morphology characteristics of all isolates were different from other *Muscodor* species reported previously (Table 1) and therefore are introduced as new species. In addition, the morphological taxonomy was confirmed by molecular and physiological analysis. The characteristics of the *Muscodor* species are shown in Figs. 1, 2, 3 and 4.

Molecular phylogeny analysis

The ITS sequences data of the four isolates of *Muscodor* were obtained and compared with species downloaded from GenBank. The aligned dataset of 32 sequences consisted of 745 characters, of which 324 characters were constant, 184 variable characters were parsimony uninformative, and 237 characters were parsimony informative. Heuristic searches resulted in six equally parsimonious trees with a length of 904 steps, CI=0.683, RI=0.752, RC=0.531 and HI=0.318. One of the maximum parsimony trees is shown in Fig. 5. *Muscodor* species from GenBank formed a monophyletic clade with a high bootstrap support (83 %) and are closely related to other members within *Xylariaceae*. A phylogenetic dendrogram strongly supported the node separating *M. musae* and *M. suthepensis* from other *Muscodor* species with 96 and 100 % bootstrap support, respectively

Table 1 Biological and culture characteristic comparison of *Muscodor* species

Taxon	Host	Mycelium pigment production	Hyphal growth at colony front	Mycelial growth	Major compounds	Bioactivity
M. albus[a,b]	*Cinnamomum zeylanicum*	White	Straight	Rope-like	2-Methylpropanoic acid; naphthalene and azulene derivatives	Antifungal and antibacterial
M. cinnamomi[c]	*Cinnamomum bejolghota*	White in the dark and pale orange in the light	Straight	Rope-like with cauliflower- like bodies	Ethyl 2-methylpropanoate	Antifungal and antibacterial
M. crispans[d]	*Ananas ananassoides*	White in the dark and pink in the light	Wavy growing	Rope-like with cauliflower-like bodies	2-Methylpropanoic acid	Antifungal and antibacterial
M. equiseti[e]	*Equisetum debile*	White	Cottony-like pattern	Rope-like with coils structure and swollen cell	2-Methylpropanoic acid	Antifungal and antibacterial
M. fengyangensis[f]	*Actinidia chinensis*	White	Straight	Rope-like with coils structure	2-Methylpropanoic acid	Antifungal and antibacterial
M. musae[e]	*Musa acuminata*	White	Straight and hairy-like mycelium	Rope-like with coils structure	2-Methylpropanoic acid	Antifungal and antibacterial
M. oryzae[e]	*Oryza rufipogon*	Pale orange	Straight	Rope-like with coils structure	3-Methylbutan-1-ol	Antifungal and antibacterial
M. roseus[g]	*Grevillea pteridifolia*	Lightly rose	Felt-like mycelium	Forming rope-like stands and coils structure	Ethyl 2-butenoate and 1,2,4-trimethylbenzene	Antifungal
M. suthepensis[e]	*Cinnamomum bejolghota*	White in the dark and pale pink in the light	Straight	Rope-like with coils structure	2-Methylpropanoic acid	Antifungal and antibacterial
M. sutura[h]	*Prestonia trifidi*	White in the light and reddish in the dark	Suture-like pattern	Rope-like nondescript extracellular bodies	2-Methylpropanoic acid	Antifungal
M. vitigenus[i]	*Paullinia paullinioides*	White	Straight	Rope-like	Naphthalene	Anti-insect
M. yucatanensis[j]	*Bursera simaruba*	White	Flocculose pattern	Rope-like with coils structure and swollen cell	1R,4S,7S,11R-2,2,4,8-Tetramethyltricyclo [5.3.1.0(4,11)]undec-8-ene	Phytoinhibitory activity

[a] Worapong et al. (2001), [b] Ezra et al. (2004), [c] Suwannarach et al. (2010), [d] Mitchell et al. (2008), [e] present study, [f] Zhang et al. (2010), [g] Worapong et al. (2002), [h] Kudalkar et al. (2012), [i] Daisy et al. (2002), [j] González et al. (2009)

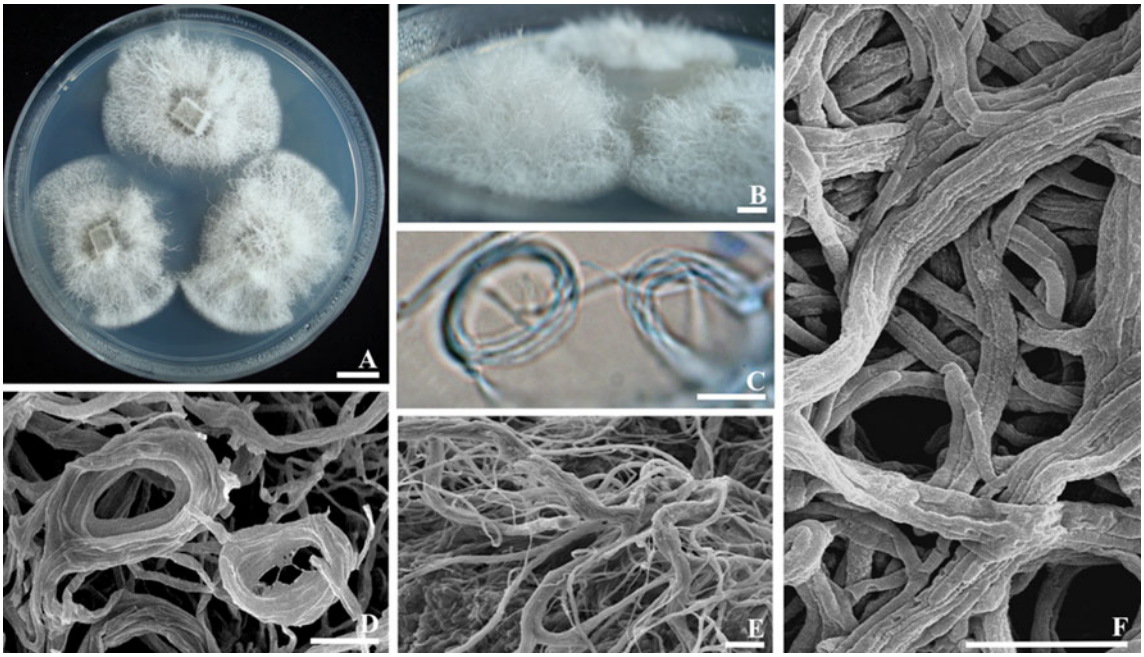


Fig. 1 *Muscodor musae* (CMU-MU3) **a**, **b** culture on PDA, *bars* 1 cm; **c** light microscope micrographs of coiling formation of fungal hyphae, *bar* 10 μm; **d**–**f** scanning electron micrographs, *bars* 10 μm: **d** coiling formation of fungal hyphae; **e**, **f** hyphal cells from the colony edge showing fused, rope-like hyphal cells

(Fig. 5). In addition, *M. equiseti* formed a sister group with 100 % bootstrap support to *M. vitigenus* and *M. sutura*. The remaining novel species, *M. oryzae*, was distant from the other novel species.

Antimicrobial activity

Twenty-one strains including 14 plant pathogenic fungi, 2 yeasts, 3 Gram-positive bacteria and 2 Gram-negative

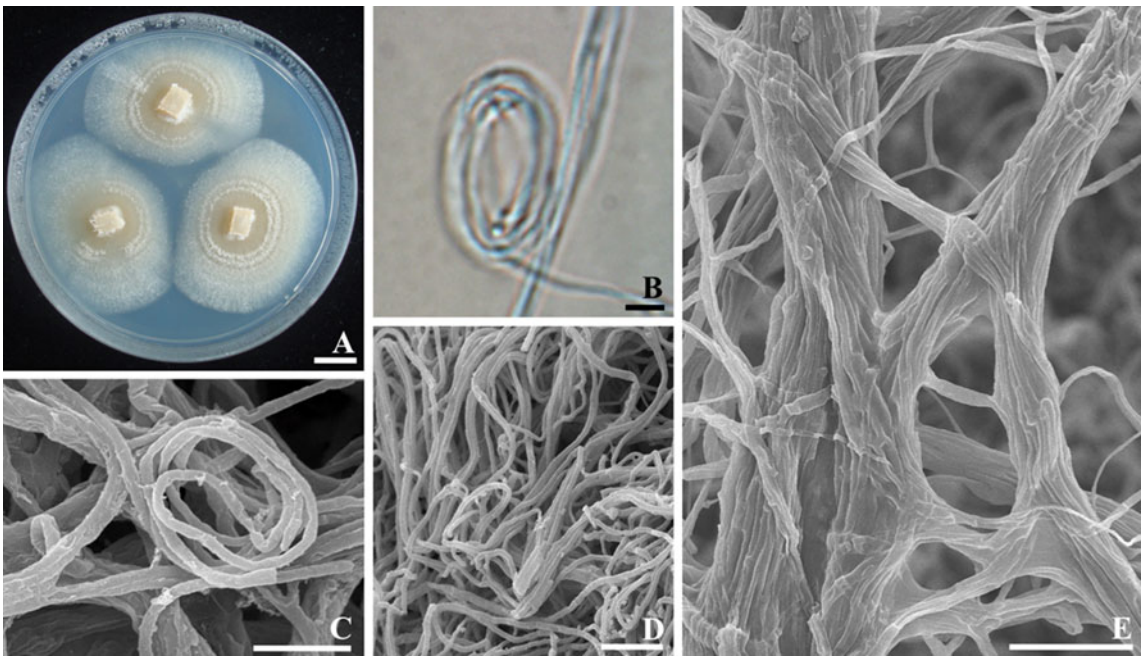


Fig. 2 *Muscodor oryzae* (CMU-WR2) **a** culture on PDA, *bar* 1 cm; **b** light microscope micrographs of coiling formation of fungal hyphae, *bar* 10 μm; **c**–**e** scanning electron micrographs, *bars* 10 μm: **c** coiling formation of fungal hyphae; **d**, **e** hyphal cells from the colony edge showing fused, rope-like hyphal cells

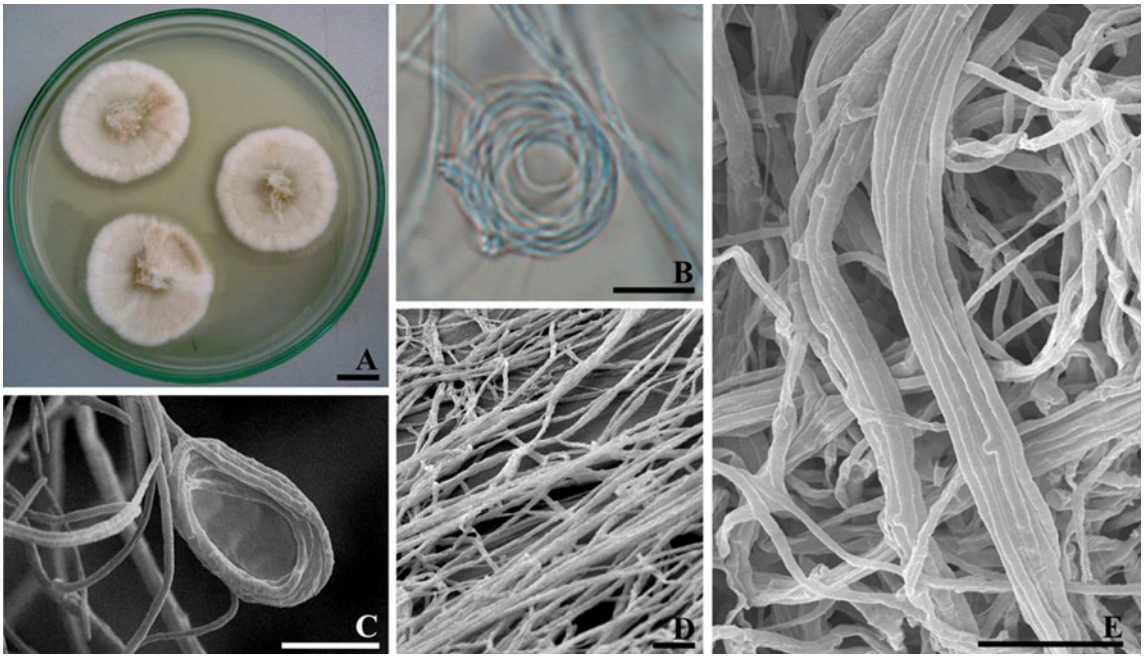


Fig. 3 *Muscodor suthepensis* (CMU-Cib462) **a** culture on PDA, *bar* 1 cm; **b** light microscope micrographs of coiling formation of fungal hyphae, *bar* 10 μm; **c**–**e** scanning electron micrographs, *bars* 10 μm: **c** coiling formation of fungal hyphae; **d**, **e** hyphal cells from the colony edge showing fused, rope-like hyphal cells

bacteria were tested. The growth and viability of the tested microorganisms were recorded after 7 days of exposure to volatile compounds from each novel *Muscodor* species. All new species have inhibitory activity on all tested microorganisms (Table 2). The volatile compounds produced by all *Muscodor* species inhibited the growth (100 %) and caused the death of the tested yeasts and bacteria. Percentage inhibition of tested plant pathogenic fungi ranged from 62.3 ± 2.1 to 100 % (Table 2).

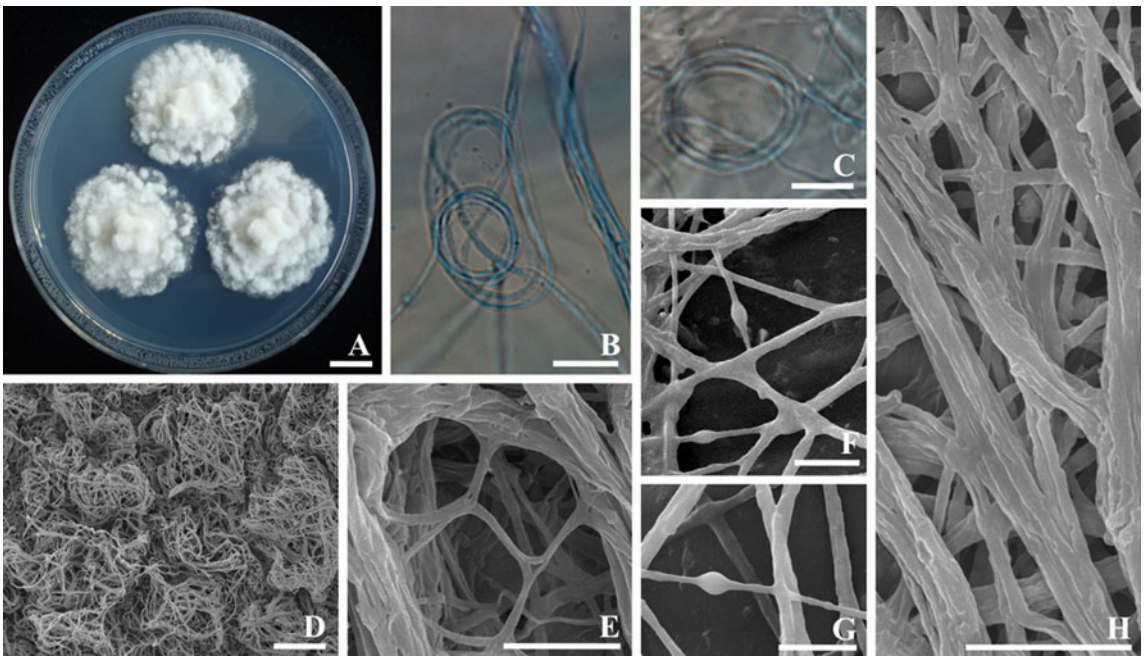


Fig. 4 *Muscodor equiseti* (CMU-M2) **a** culture on PDA, *bar* 1 cm; **b**, **c** light microscope micrographs of coiling formation of fungal hyphae, *bars* 10 μm; **d**–**h** scanning electron micrographs: **d** cottony-like mycelium, *bar* 50 μm; **e** triangular branching pattern; **f**, **g** swollen cells, *bars* 10 μm; **h** hyphal cells from the colony edge showing fused, rope-like hyphal cells, *bar* 10 μm

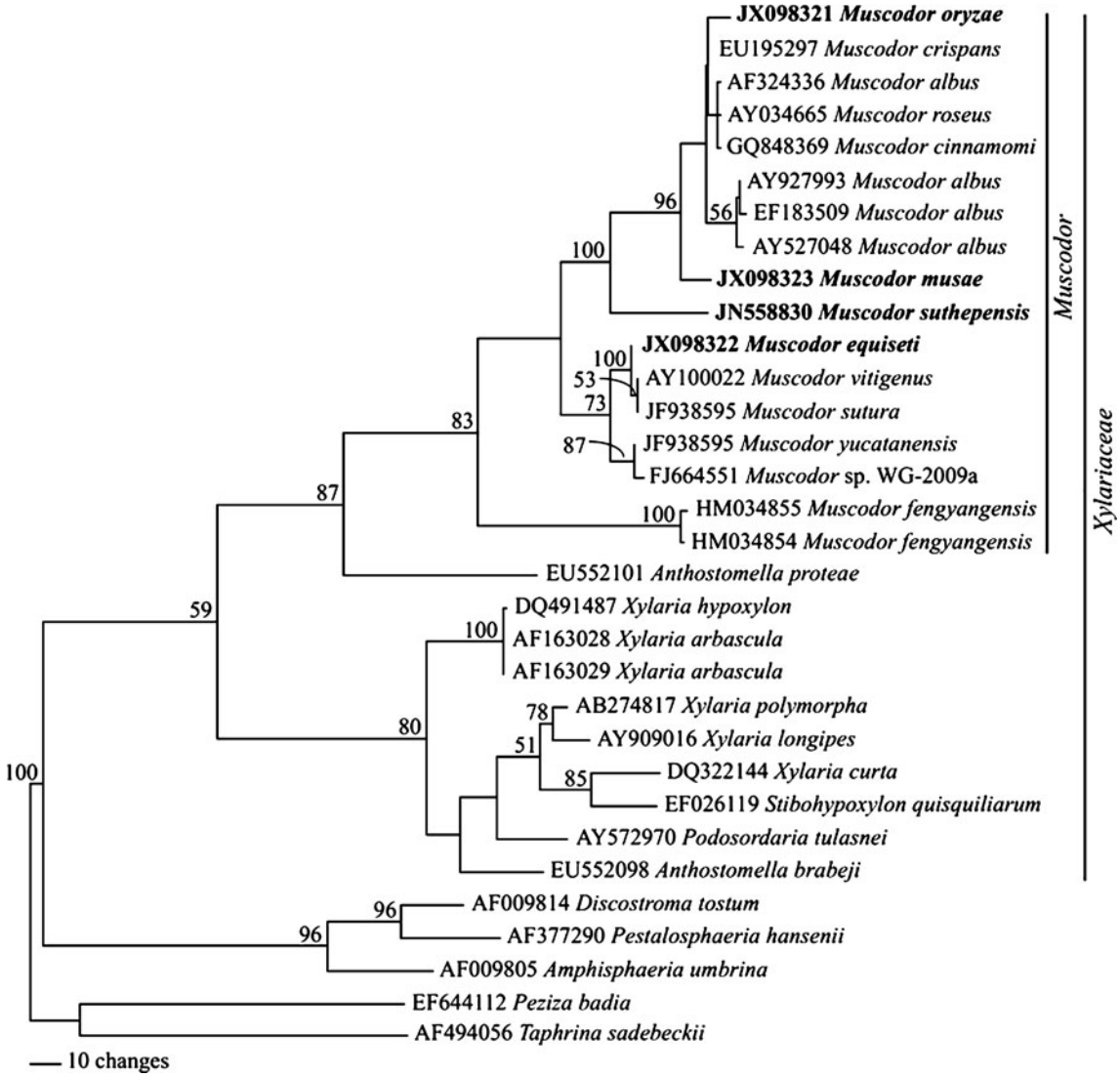


Fig. 5 Maximum parsimonious trees inferred from a heuristic search of the internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 sequence alignment of 32 sequences. *Peziza badia* and *Taphrina sadebeckii* were used to root the tree. Branches with bootstrap values ≥50 % are shown at each branch and the *bar* represents 10 substitutions per nucleotide position. New species are in *bold*

Most pathogens were killed by most *Muscodor* species. *Muscodor suthepensis* showed 100 % inhibition and killed all tested plant pathogenic fungi.

Volatile compound analysis

SPME-GC/MS analysis of 1-week-old cultures of the four *Muscodor* species grown on PDA revealed strikingly different patterns of volatile compounds production (Table 3). The four novel *Muscodor* species produced VOCs consisting mainly of esters, alcohols and small molecular weight acids. *Muscodor suthepensis* produced 27 VOCs which was the highest number, followed by *M. musae* (18 VOCs), *M. equiseti* (16 VOCs) and *M. oryzae* (15 VOCs). 2-methylpropanoic acid was the main VOC produced by *M. musae*, *M. suthepensis* and *M. equiseti*, whereas *M. oryzae* produced 3-methylbutan-1-ol as the major VOCs. Most taxa produced azulene derivatives, except for *M. equiseti*. Only naphthalene derivative compounds were detected in *M. suthepensis* cultures.

Taxonomy

Muscodor musae N. Suwannarach & S. Lumyong, sp. nov. Fig. 1

MycoBank No.: MB800811
GenBank No.: JX098323

Table 2 Comparison IUPAC name of the volatile compounds produced by novel *Muscodor* species through SPME-GC/MS analysis

RT (min)	Possible compound	*M/z*	Total area (%)			
			M. musae	*M. oryzae*	*M. suthepensis*	*M. equiseti*
3.42	Ethyl 2-methylpropanoate	116	2.96	0.57	2.03	0.82
4.30	Methyl 2-methylbutanoate	116	3.52	–	1.82	0.62
4.39	2-Methylpropyl acetate	116	4.91	9.75	1.3	0.95
4.54	Methyl 3-methylbutanoate	116	0.18	–	0.39	–
6.72	2-Methylpropyl propanoate	144	–	–	0.20	–
7.07	2-Methylpropan-1-ol	74	–	3.48	0.57	0.17
7.77	3-Methylbutanoyl acetate	130	20.41	4.70	3.31	5.60
10.32	2-Methylbutyl 2-methylpropanoate	158	0.21	–	0.97	0.32
10.88	3-Methylbutan-1-ol	88	13.34	32.69	11.00	7.36
12.10	3-Methyl-3-buten-1-ol	86	–	0.27	–	–
12.20	Ethyl 2-hydroxy-2-methylpropanoate	132	–	0.88	–	–
12.97	3-Hydroxy-2-butanone	88	0.59	2.00	0.58	–
13.78	3-Ethyl-2-methylpentane	114	–	–	0.07	–
14.73	6-Methyl-5-hepten-2-one	126	–	–	0.05	–
14.46	2-Methylpropanoyl chloride	106	–	–	–	0.35
16.18	3-Methylhexane	100	–	–	0.04	0.42
16.19	2,4-Dimethyl-1-heptene	126	–	0.13	–	–
16.26	1-(2-Propenyloxy)-heptane	156	–	–	0.12	–
16.31	1-Isobutoxy-2-ethylhexane	186	–	0.31	–	–
19.43	Isopropyl-4-piperidone	141	0.23	–	–	–
19.50	4,5-Dimethyl-1,3-cyclopentanedione	126	–	0.37	0.26	2.05
21.03	2-Methylpropanoic acid,	88	33.17	15.41	57.81	34.63
21.50	Ethyl 2-hydroxypropanoate	118	–	–	0.03	0.70
21.69	[1S-(1. α.,4. α.,7. α.)]-1,2,3,4,5,6,7,8-Octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-azulene	204	0.29	–	0.25	–
21.81	Caryophyllene	204	–	2.19	0.12	–
23.76	Butanoic acid, 2-methyl-	102	1.10	–	0.62	1.02
24.55	Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, [4aR-(4a. α.,7. α.,8a. β.)]-	204	–	–	0.32	–
24.75	Azulene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1. α.,7. α.,8a. β.)]-	204	1.01	0.44	1.99	–
24.99	Spiro[3.4]octan-5-one	124	–	–	0.36	0.72
26.91	2-Methyl-propanamide	87	0.07	–	0.05	–
25.72	3,7-Dimethyl-1,6-octadiene	138	0.05	–	–	–
27.05	2-Phenylethyl acetate	164	3.28	1.46	1.45	1.15
27.27	6-Nitro-2-picoline	138	0.12	–	–	–
31.37	Pentyl 2-methyl-2-propenoate	156		–	0.07	0.24
31.72	2-(2-Methyl-2-propenyl)-2-cyclohexen-1-one	150	0.25	–	0.86	–

Compounds present in a control PDA have been subtracted from the data. Unknown compounds represent those with a quality % value less than 80

RT retention time; *M/z* mass to charge ratio; – not detected

Diagnosis: Colonies cotton white, form a hairy mycelium pattern on PDA. Hyphae 0.9–3.4 μm thick, coils 24–28.9 × 26–27.4 μm diam and produced a musty odor.

Etymology: *musae*, refers to the name of the host plant, *Musa acuminata*.

Holotype: THAILAND, Chiang Mai Province, Doi Suthep-Pui, Medicinal Plant Garden, from a leaf of *Musa acuminata* (*Musaceae*), May 2011, Nakarin Suwannarach, dried culture (SDBR CMU-MU3), ex-type living culture JCM 18230.

Teleomorph: Unknown

Table 3 Effects of volatile compounds from the novel *Muscodor* species on the test microorganisms after 7 days exposure

Test microorganisms	Growth after exposure to *Muscodor* (% inhibition)				Viability after exposure to *Muscodor* culture			
	M. musae	*M. oryzae*	*M. suthepensis*	*M. equiseti*	*M. musae*	*M. oryzae*	*M. suthepensis*	*M. equiseti*
Alternaria porri	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Alternaria solani	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Aspergillus flavus	66.1±1.9	100	100	63.0±1.3	Alive	Dead	Dead	Alive
Botrytis cinerea	68.7±1.2	100	100	100	Alive	Dead	Dead	Dead
Colletotrichum capsici	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Colletotrichum gloeosporioides	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Colletotrichum musae	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Fusarium oxysporum	76.8±2.8	81.3±2.4	100	100	Alive	Alive	Dead	Dead
Fusarium solani	81.2±1.6	86.7±1.9	100	100	Alive	Alive	Dead	Dead
Nigrospora oryzae	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Penicillium digitatum	100	96.4±0.9	100	100	Dead	Alive	Dead	Dead
Penicillium expansum	62.3±2.1	87.3±2.1	100	73.2±1.5	Alive	Alive	Dead	Alive
Rhizoctonia solani	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Sclerotium rolfsii	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Candida albicans	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Cryptococcus neoformans	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Escherichia coli	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Enterococcus faecalis	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Proteus mirabilis	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Staphylococcus aureus	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead
Streptococcus pneumoniae	100	100	100	100	Dead	Dead	Dead	Dead

Tests were repeated two times with three replicates and means ± SD were calculated

Description: In nature, the fungus is associated with *Musa acuminata* and is an ascomycete with sterile mycelium. Fungal colonies are cotton white and form a hairy mycelium pattern on PDA when grown in darkness and natural light (Fig. 1a, b). Hyphae (0.9–3.4 μm thick) with coils (24–28.9 × 26–27.4 μm diam.; Fig. 1c, d), commonly appearing as fused rope-like hyphal strands and branching (5.3–16.1 μm thick; Fig. 1e, f). Mycelium on PDA has a growth rate of 3.50±0.35 mm day^{-1}, producing a musty odor. Spores and other fruiting bodies did not develop under any conditions tested.

Muscodor oryzae N. Suwannarach & S. Lumyong, sp. nov. Fig. 2

MycoBank No.: MB800812

GenBank No.: JX098321

Diagnosis: Colonies pale orange on PDA. Hyphae 1.1–3.9 μm thick, coils 19.6–39.4 × 18.1–36.7 μm diam and produced a fruity odor.

Etymology: *oryzae*, refers to the name of the host plant, *Oryza rufipogon*.

Holotype: THAILAND, Chiang Mai Province, Chiang Mai, Chiang Mai University, from a leaf of *Oryza rufipogon* (*Poaceae*), May 2011, Nakarin Suwannarach and Jaturong Kumla, dried culture (SDBR CMU-WR2), ex-type living culture JCM 18231.

Teleomorph: Unknown

Description: In nature, the fungus is associated with *Oryza rufipogon* and is an ascomycete with sterile mycelium. Fungal colonies pale orange on PDA when grown in darkness and natural light (Fig. 2a). Hyphae (1.1–3.9 μm thick) with coils (19.6–39.4 × 18.1–36.7 μm diam.; Fig. 2b, c); commonly appearing as fused rope-like hyphal strands and branching (6.3–20.9 μm thick; Fig. 2d, e). Mycelium on PDA has a growth rate of 3.65±0.30 mm day^{-1}, producing a fruity odor. Spores and other fruiting bodies did not develop under any conditions tested.

Muscodor suthepensis N. Suwannarach & S. Lumyong, sp. nov. Fig. 3

MycoBank No.: MB800813

GenBank No.: JN558830

Diagnosis: Colonies pale pink in natural light and white in dark on PDA. Hyphae 1–4.6 μm thick, coils 16.1–31.8 × 13.4–29.5 μm diam and produced a fruity odor.

Etymology: *suthepensis*, refers to the collection site, Doi Suthep-Pui National Park.

Holotype: THAILAND, Chiang Mai Province, Doi Suthep-Pui, Medicinal Plant Garden, from a stem of *Cinnamomum bejolghota* (*Lauraceae*), November 2010, Nakarin Suwannarach, dried culture (SDBR CMU-Cib462), ex-type living culture JCM 18232.

Teleomorph: Unknown

Description: In nature, the fungus is associated with *Cinnamomum bejolghota* and is an ascomycete with sterile mycelium. Fungal colonies pale pink on PDA when grown in natural light (Fig. 3a), and white mycelium when grown in dark condition. Hyphae (1–4.6 μm thick) have coils (16.1–31.8 × 13.4–29.5 μm diam.; Fig. 3b, c); commonly appearing as fused rope-like strands and branching (8.2–35.6 μm thick; Fig. 3d, e). Mycelium on PDA has a growth rate of 3.00±0.61 mm day^{-1}, producing a fruity odor. Spores and other fruiting bodies did not develop under any conditions tested.

Muscodor equiseti N. Suwannarach & S. Lumyong, sp. nov. Fig. 4

MycoBank No.: MB800814

GenBank No.: JX098322

Diagnosis: Colonies cottony pattern, white on PDA. Hyphae 0.9–2.9 μm thick, coils 16.5–29.4 × 19.1–26.9 μm diam, tri-angle branching, subglobose swollen cells (1–4.2 × 1.8–6.7 μm and produced a fruity odor.

Etymology: *equiseti*, refers to the name of the host plant, *Equisetum debile*.

Holotype: THAILAND, Chiang Mai Province, Queen Sirikit Botanic Garden, from a stem of *Equisetum debile* (*Equsetaceae*), May 2011, Nakarin Suwannarach, dried culture (SDBR CMU-M2), ex-type living culture JCM 18233.

Teleomorph: Unknown

Description: In nature, the fungus is associated with *Equisetum debile* and is an ascomycete with sterile mycelium. Fungal colonies are cotton white on PDA when grown in darkness (Fig. 4a). Hyphae (0.9–2.9 μm thick) with coils (16.5–29.4 × 19.1–26.9 μm diam.; Fig. 4b, c) and a cottony pattern (Fig. 4d); tri-angle branching (Fig. 4e); subglobose swollen cells (1–4.2 × 1.8–6.7 μm; Fig. 4f, g) commonly appearing as fused rope-like strands and branching (5.3–17.1 μm thick; Fig. 4h). Mycelium on PDA has a growth rate of 2.82±0.06 mm day^{-1}, producing a fruity odor. Spores and other fruiting bodies did not develop under any conditions tested.

Discussion

Muscodor is essentially a genus of endophytic volatile-producing tropical fungi. Its diversity, host range and habitats are being expanded (Atmosukarto et al. 2005; Strobel et al. 2007). The morphological identification of *Muscodor* species is difficult because the genus does not produce any reproductive structrues on any substrate or medium tested. Colony and mycelial characters are the only available morphological traits (Strobel et al. 2001; Zhang et al. 2010). Consequently, the physiological characteristics such as VOC production, biological activities and molecular analysis are necessary tools for characterization. We have described four novel *Muscodor* species, based on differences in colony and hyphal morphology, VOC production and ITS sequence data. In general, *Muscodor* species produce white mycelium (Worapong et al. 2001; Daisy et al. 2002; Ezra et al. 2004; Mitchell et al. 2008; González et al. 2009; Suwannarach et al. 2010; Zhang et al. 2010; Kudorka et al. 2012), However, *M. roseus* produces a light rose-colored mycelium (Worapong et al. 2002). *Muscodor oryzae* produced a pale orange mycelial pigment similar to *M. cinnamomi*, but *M. cinnamomi* produces pigment only under natural light conditions (Suwannarach et al. 2010). *Muscodor suthepensis* produced pale pink pigment in natural light similar to *M. crispans*, but *M. crispans* produced wavy growing hypha and cauliflower-like bodies (Mitchell et al. 2008). In addition, hyphal growth of *M. equiseti* on agar had a cottony-like pattern, while *M. musae* produced hairy-like mycelium in contrast to other species of *Muscodor* (Table 1). The ITS sequence analysis of the rDNA of the four novel species showed that they are clearly separated from the other *Muscodor* species (Fig. 5). A phylogenetic dendrogram of the *Muscodor* group is in concordance with previous studies that show *Muscodor* as a member of the *Xylariaceae*, but in a district phylogenetic clade (González et al. 2009; Suwannarach et al. 2010; Zhang et al. 2010).

GC/MS of *Muscodor* species consistently found alcohols, esters and small molecular weight acid in the gas phase, when grown on PDA. Both major and minor VOCs produced by different *Muscodor* species are distinguishable (Table 1). The most abundant VOC produced by *M. suthepensis*, *M. equiseti* and *M. musae* was 2-methylpropanoic acid which is similar to *M. albus*, *M. crispans*, *M. sutura* and *M. fengyangensis* (Worapong et al. 2001; Ezra et al. 2004; Mitchell et al. 2008; Zhang et al. 2010; Kudorka et al. 2012). However, in the present study *M. oryzae* produced 3-methylbutan-1-ol as a major volatile compound. *Muscodor suthepensis* produced both azulene and naphthalene derivatives similar to *M. albus*, *M. roseus*, *M. vitigenus* and *M. fengyangensis* (Worapong et al. 2001, 2002; Daisy et al. 2002; Ezra et al. 2004; Zhang et al. 2010). In addition, *M. musae* and *M. oryzae* produced only azulene derivatives similar to *M. cinnamomi* (Suwannarach et al. 2010). Neither

azulene nor naphthalene derivatives were found in *M. equiseti* culture which is similar to *M. crispans* and *M. yucatanensis* (Mitchell et al. 2008; González et al. 2009). The biological activity of mixed volatile compounds produced by the novel species showed antifungal and antibacterial activity (Tables 1 and 2). This result agrees with previous studies that mixed VOCs produced by *Muscodor* spp. were inhibitory to growth and killed tested bacteria and fungi (Worapong et al. 2001; Ezra et al. 2004; Mitchell et al. 2008; Suwannarach et al. 2010; Zhang et al. 2010). *Muscodor roseus* and *M. sutura* showed only antifungal activities (Kudalkar et al. 2012; Worapong et al. 2002). Only *M. yucatanensis* has been reported to have phytoinhibitory activity (González et al. 2009). Moreover, Worapong et al. (2002) reported that *M. vitigenus* has anti-insect activity. In addition, previous studies reported that 8 VOCs: aciphyllene, 3-methylbutanoyl acetate, 2-butanone, 2-methylbutan-1-ol, ethyl butyrate, 2-methyl furan, isobutyric acid, and tetrahydofuran from *M. albus* showed antibiotic activity (Atmosukarto et al. 2005; Ramin et al. 2005; Mercier et al. 2007). Each VOC produced by the four novel *Muscodor* species but not produced by *M. albus* will be further investigated using biological tests. Further studies are necessary to determine their potential for biological control, food storage, agricultural production, and industrial applications.

Acknowledgments This work was supported by The Higher Education Commission, Thailand, under the National Research University (A1) program, Chiang Mai University, and TRF Research-Team promotion Grant RTA5580007. We are grateful to Keegan Kennedy for improving the English text.

References

Atmosukarto I, Castillo U, Hess WM, Sears J, Strobel G (2005) Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3 s, a volatile antibiotic producing fungus. Plant Sci 169:854–861. doi:10.1016/j.plantsci.2005.06.002

Azevedo JL, Ereira JOP, Araujo WL (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electron J Biotechnol 3:40–65

Daisy B, Strobel G, Ezra D, Castillo U, Bairn G, Hess WM (2002) *Muscodor vitigenus* anam. sp. nov., an endophyte from *Paullinia paullinioides*. Mycotaxon 81:463–475

Ezra D, Hess WM, Strobel GA (2004) New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile antibiotic producing fungus. Microbiology 150:4023–4031. doi:10.1099/mic.0.27334-0

Gao F, Dai C, Liu X (2010) Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. Afr J Microbiol Res 4:1346–1351

González MC, Anaya AL, Glenn AE, Macías-Rubalcava ML, Hernández-Bautista BE, Hanlin RT (2009) *Muscodor yucatanensis*, a new endophytic ascomycete from Mexican chakah, *Bursera simaruba*. Mycotaxon 110:363–372

Hyde KD, Soytong K (2008) The fungal endophyte dilemma. Fungal Divers 33:163–173

Kudalkar P, Strobel G, Hassan S, Geary B, Sears J (2012) *Muscodor sutura*, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities. Mycoscience. doi:10.1007/s10267-011-0165-9

Macías-Rubalcava ML, Hernández-Bautista BE, Oropeza F, Duarte G, González MC, Glenn AE, Hanlin RT, Anaya AL (2010) Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. J Chem Ecol 36:1122–1131. doi:10.1007/s10886-010-9848-5

Mercier J, Jiménez-Santamaría I, Tamez-Guerra P (2007) Development of the volatile-producing fungus *Muscodor albus* Worapong, Strobel, and Hess as a novel antimicrobial biofumigant. Rev Mex Fitopatol 25:173–179

Mitchell AM, Strobel GA, Hess WM, Vargas PN, Ezra D (2008) *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. Fungal Divers 31:37–44

Ramin AA, Braun PG, Prange RK, DeLong JM (2005) *In vitro* effects of *Muscodor albus* and three volatile components on growth of selected postharvest microorganisms. Hortscience 40:2109–2114

Saikkonen K, Wali P, Helander M, Faeth SH (2004) Evolution of endophyte–plant symbioses. Trends Plant Sci 9:275–280. doi:10.1016/j.tplants.2004.04.005

Sopalun K, Strobel GA, Hess WM, Worapong J (2003) A record of *Muscodor albus*, an endophyte from *Myristica fragrans* in Thailand. Mycotaxon 88:239–247

Strobel GA (2003) Endophytes as source of bioactive products. Microbes Infect 5:535–544. doi:10.1016/S1286-4579(03)00073-X

Strobel GA, Daisy B (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol Mol Biol Rev 67:491–502. doi:10.1128/mmbr.67.4.491-502.2003

Strobel GA, Dirske E, Sears J, Markworth C (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. Microbiology 147:2943–2950. doi:10.1099/mic.0.27334-0

Strobel GA, Kluck K, Hess WM, Sears J, Ezra D, Vargas PN (2007) *Muscodor albus* E-6, an endophytic of *Guazuma ulmifolia* making volatile antibiotics: isolation, characterization and experimental establishment in the host plant. Microbiology 153:2613–2620. doi:10.1099/mic.0.2007/008912-0

Suwannarach N, Bussaban B, Hyde KD, Lumyong S (2010) *Muscodor cinnamomi*, a new endophytic species from *Cinnamomum bejolghota*. Mycotaxon 114:15–23

Swofford DL (2002) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), beta version 4.0b10. Sinauer, Sunderland

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higguns DG (1997) The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible stratgies for multiple sequene alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 24:4876–4882

Worapong J, Strobel GA, Ford EJ, Li JY, Brird G, Hess WM (2001) *Muscodor albus* anam. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. Mycotaxon 79:67–79

Worapong J, Strobel GA, Daisy B, Castillo UF, Baird G, Hess WM (2002) *Muscodor roseus* anam. sp. nov., an endophyte from *Grevillea pteridifolia*. Mycotaxon 81:463–475

Zhang C, Wang G, Mao L, Komon-Zelazowska M, Yuan Z, Lin F, Druzhinina IS, Kubicek CP (2010) *Muscodor fengyangensis* sp. nov. from southeast China: morphology, physiology and production of volatile compounds. Fungal Biol 114:797–808. doi:10.1016/j.funbio.2010.07.006

J Gen Plant Pathol (2013) 79:277–279
DOI 10.1007/s10327-013-0453-7

DISEASE NOTE

First report of leaf spot disease on oil palm caused by *Pestalotiopsis theae* in Thailand

Nakarin Suwannarach · Kanaporn Sujarit · Jaturong Kumla · Boonsom Bussaban · Saisamorn Lumyong

Received: 12 July 2012 / Accepted: 5 March 2013 / Published online: 10 May 2013
© The Phytopathological Society of Japan and Springer Japan 2013

Abstract A leaf spot on oil palm, caused by *Pestalotiopsis theae*, was found in a plantation of *Elaeis guineensis* for the first time in the world in Chiang Mai Province, Thailand. The fungus was isolated from lesions on leaves, and its pathogenicity was confirmed. Pathogenicity tests showed that *P. theae* could infect *E. guineensis*, which developed the same symptoms after inoculation as those observed naturally in the field. The fungus was identified based on morphological characteristics and confirmed using comparisons of DNA sequences of internal transcribed spacer (ITS)1, ITS2 and 5.8S rDNA. This report is the first on oil palm leaf spot disease caused by *P. theae*.

Keywords *Elaeis guineensis* · *Pestalotiopsis theae* · Leaf spot

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), a tropical tree crop, is important for the industrial production of vegetable oil with Indonesia and Malaysia and makes up the highest plantation area in Southeast Asia (Carter et al. 2007). Demand for oil palm is increasing as a precursor for biodiesel production. Therefore, oil palm has become an important economic plant. In Thailand, oil palms were first widely planted in 1920 and have been cultivated commercially since 1968 (Likhitekaraj and Tummakate 2000). In addition, as areas planted with oil palm have increased in Thailand, more plantations are established on less suitable sites, and disease problems have increased.

Oil palm leaves showing typical symptoms were collected from *E. guineensis* plantations in Chiang Mai Province, Thailand (18°45′35″N, 98°55′37″E) in May 2012. The disease began as dark spots that gradually increased from 1.5 to 20 mm in diameter, changing from circular to elliptical lesions. Leaf spots were dark brown to black, surrounded with a yellow to rust brown zone (Fig. 1a, b). In a humid environment, black, sessile and discoid conidiomata developed and exuded conidial masses that turned black. Acervuli were visible on the leaf surface lesions, 230–250 μm diameter, occasionally up to 280 μm. Conidiogenous cells were lageniform, ampuliform or subcylindrical, colorless, smooth-walled, 6.2–14.7 × 1.2–3.0 μm. The five-celled conidia were clavate fusiform, apical and basal cells were hyaline, while the three median cells were brown. Conidia ($n = 50$) were 18.5–27.0 × 6.3–8.0 μm; three median cells were 15.7–17.5 μm long; two to four apical appendages were 28.5–32.0 μm long; basal appendages were 3.0–5.0 μm long (Fig. 1c–e). The fungus was initially identified as *Pestalotiopsis theae* (Sawada) Steyaert (Chang et al. 1997) based on these morphological observation.

Ten symptomatic leaves were kept in a plastic box with wet filter paper to induce conidiation. Conidial masses were then suspended in 250 μL of sterilized distilled water on sterilized glass slides and dropped on 2 % (w/v) water agar containing 0.5 mg/L of chloramphenicol. After 24 h incubation at 25 °C, individual germinating conidia were selected and transferred directly to a potato dextrose agar (PDA) plate according to the procedures by Choi et al. (1999) and subcultured on PDA.

Fungal colonies on PDA grew to 75–80 mm diameter in 1 week at room temperature (25 ± 2 °C) with an even to

N. Suwannarach · K. Sujarit · J. Kumla · B. Bussaban · S. Lumyong (✉)
Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
e-mail: saisamorn.l@cmu.ac.th

N. Suwannarach
e-mail: suwan_461@hotmail.com

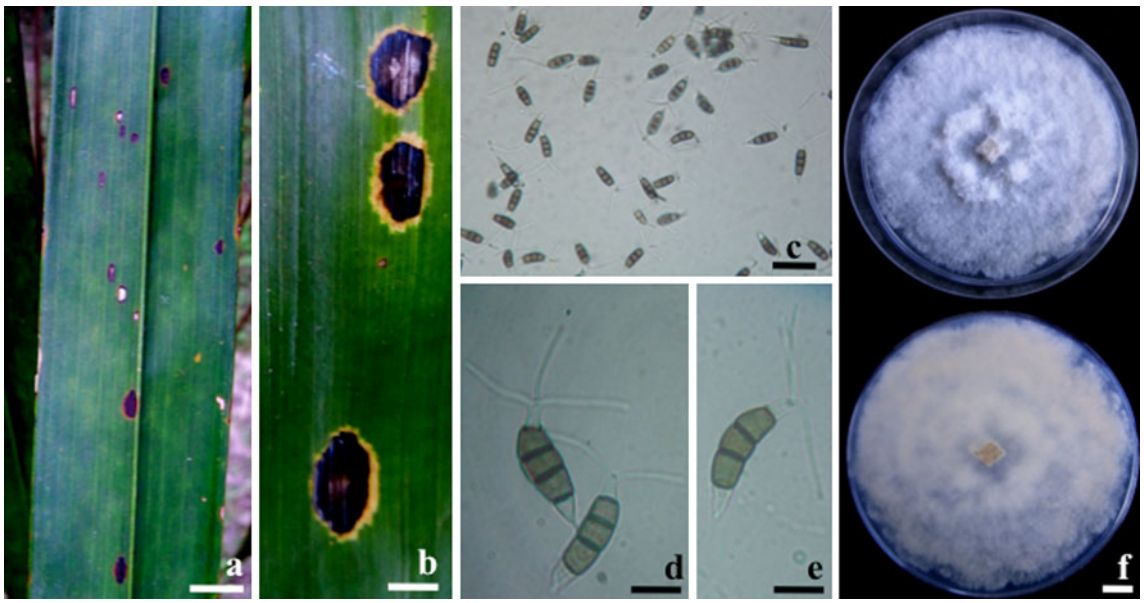


Fig. 1 **a**, **b** Natural symptoms of *Elaeis guineensis* leaf spot caused by *Pestalotiopsis theae*. **c**–**e** Fusiform five-celled conidia on *E. guineensis* leaf. **f** Colonies on PDA viewed from the top (*upper*) and bottom (*lower*) of the plate. *Scale bars* **a**, **b** 5 mm; **c** 20 μm; **d**, **e** 10 μm; **f** 1 cm

undulating, glabrous, colorless margin; immersed mycelium was pale orange, aerial mycelium pure white and woolly-cottony (Fig. 1f). Acervuli formed on the aerial mycelium and contained black, slimy conidial masses. The conidia were fusiform, five-celled, straight or slightly curved. The cells comprised three colored median cells and hyaline apical and basal cells with appendages.

To confirm pathogenicity, we disinfected the surface of five healthy *E. guineensis* leaves with 70 % ethanol (Sezer and Dolar 2012), then placed them in a plastic box. A conidial suspension of the fungus (30 μL of 12×10^6 conidia/mL) was dropped on the leaves. After 12 days, typical symptoms were observed on all inoculated *E. guineensis* leaves. The same fungus was reisolated from the lesions, confirming Koch's postulates.

For molecular analysis, genomic DNA of the fungus was extracted using the SDS-CTAB method (Suwannarach et al. 2010), and the ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA regions were amplified using primers ITS4 and ITS5 under the following thermal conditions: 95 °C for 2 min; 30 cycles of 95 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 1 min; and 72 °C for 10 min. The PCR products of about 600 bp were directly sequenced. The partial ITS sequence, containing 584 bp, was deposited in GenBank as JX205216. BLAST searches of the database showed that ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA sequences of the fungus had 99 % similarity with *P. theae* HQ832793 and JQ619652. For the phylogenetic analysis, a multiple sequence alignment was carried out using the alignment subroutines in Clustal X (Thompson et al. 1997) and a maximum-parsimony phylogenetic analysis using the program PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). Relative branch support was estimated with 1,000 bootstrap replications using a heuristic search (Felsenstein 1985). A total of 23 sequences of *Pestalotiopsis* species and the outgroup (*Bartalinia robillardoides*) were used to construct the phylogenetic trees. The aligned data set of these 23 sequences consisted of 611 total characters, of which 502 characters were constant, 14 variable characters were parsimony uninformative and 95 characters were parsimony informative. Parsimony analysis of the alignment yielded 35 most parsimonious trees with a total length of 142 steps (CI = 0.838, HI = 0.162, RI = 0.943, RC = 0.790), one of which is shown in Fig. 2. Phylogenetic analysis based on ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA sequences clearly confirmed that the isolated fungus was *P. theae*. Although, *P. theae* appeared to be closely related to *P. fici*, the later species had pale brown intermediate cells and a shorter apical appendage (5–19 μm) (Steyert 1949).

Leaf spot disease on oil palm caused by *P. palmarum*, reported around the world including the United States, has brownish to black irregular with dark borders (Elliot et al. 2004; Steyert 1949), but can be distinguished from the disease in the present report, on the basis of the symptoms and pathogen. Oil palm plantations in West Africa can be affected by a leaf spot caused by *Cercospora elaeidis* (Kovachich 1954). In addition, *Curvularia lunata*, *C. maculans* and *Helminthosporium halodes* have also been reported as oil palm leaf spot pathogens (National Research Council 1993). The disease symptom on oil palm caused by *P. theae* in the present study is similar to that caused by

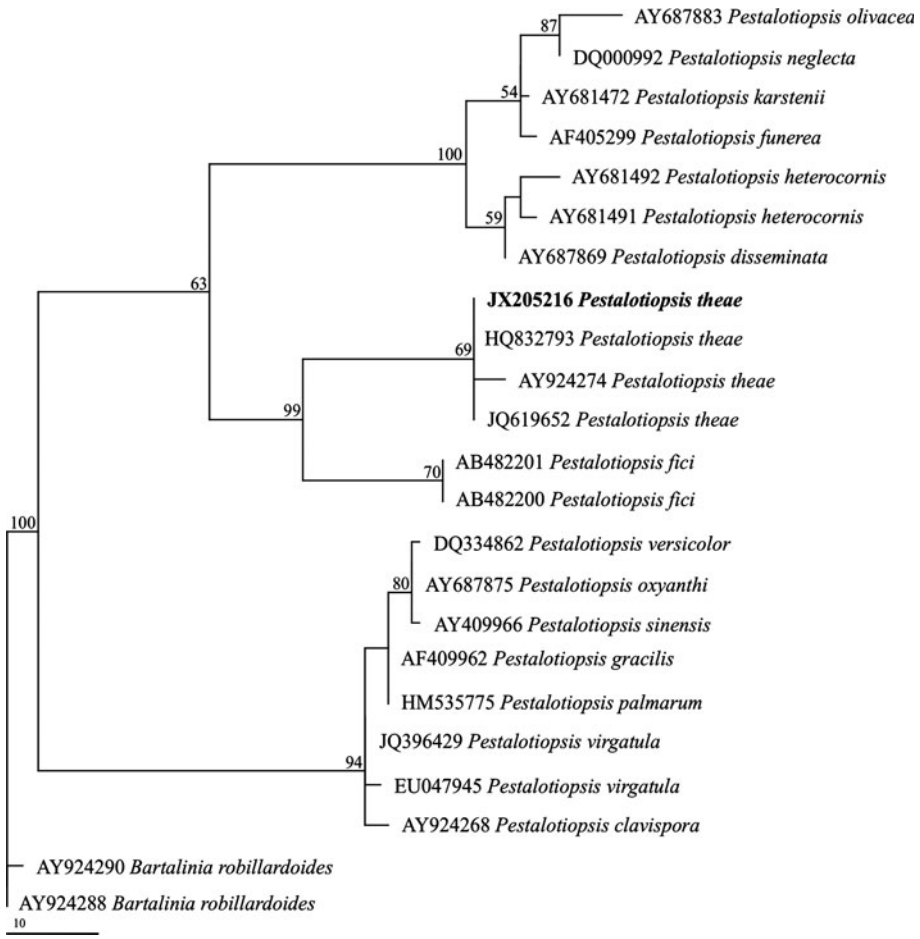


Fig. 2 One of 35 maximum parsimonious trees of the ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA regions for 23 sequences. *Bartalinia robillardoides* was used as the outgroup. The bootstrap value (≥50 %) at each branch calculated from 1,000 replications, and the bar represents 10 substitutions per nucleotide position

those pathogens. Therefore, we propose that *P. theae* be added as one of the causal agents of leaf spot disease on oil palm.

Acknowledgments This work was supported by grants from Thailand Research Fund on Research-Team Promotion Grant RTA5580007. We are grateful to Mr. Keegan Kennedy for improving the English text.

References

Carter C, Finley W, Fry J, Jackson D, Willis L (2007) Palm oil markets and future supply. Eur J Lipid Sci Technol 109:307–314

Chang T, Lim T, Chung B, Kim B (1997) Studies on cultural characteristics *Pestalotiopsis theae* causing leaf blight on oriental persimmon tree. Korean J Plant Pathol 13:232–238

Choi YW, Hyde KD, Ho WWH (1999) Single spore isolation of fungi. Fungal Divers 3:29–38

Elliot ML, Broshcat TK, Uchida JY, Simone GW (eds) (2004) Compendium of ornamental palm diseases and disorders. APS Press, St. Paul

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783–791

Kovachich WG (1954) *Cercospora elaeidis* leaf spot of the oil palm. Trans Brit Mycol Soc 37:209–212

Likhitekaraj S, Tummakate A (2000) Basal stem rot of oil palm in Thailand caused by *Ganoderma*. In: Flood J, Bridge PD, Holderness M (eds) *Ganoderma* diseases of perennial crops. CAB International, Wallingford, pp 69–70

National Research Council (1993) Vetiver grass: a thin green line against erosion. National Academy Press, Washington

Sezer A, Dolar FS (2012) *Colletotrichum acutatum*, a new pathogen of hazelnut. J Phytopathol 160:428–430

Steyert RL (1949) Contribution à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.) (in French with English summary). Bull Jard Box État Brux 19:285–354

Suwannarach N, Bussaban B, Hyde KD, Lumyong S (2010) *Muscodor cinnamomi*, a new endophytic species from *Cinnamomum bejolghota*. Mycotaxon 114:15–23

Swofford DL (2002) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland

Thompson JD, Ginson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higg DG (1997) The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25:4876–4882

MYCOSCIENCE 55 (2014) 49–52

Available online at www.sciencedirect.com

MYCOSCIENCE

ISSN 1340-3540 (print), 1618-2545 (online)

journal homepage: www.elsevier.com/locate/myc

Note

New report of *Morganella purpurascens* in Thailand

*Jaturong Kumla, Nakarin Suwannarach, Boonsom Bussaban, Saisamorn Lumyong**

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, 239 Huay Kaew Road, Chiang Mai, 50200, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 March 2013
Received in revised form
12 May 2013
Accepted 13 May 2013
Available online 5 July 2013

Keywords:
Gasteromycetes
Puffball fungus
Taxonomy

ABSTRACT

Morganella purpurascens previously known from Asia, Australia and Pacific Islands, is reported here for the first time from Chiang Mai Province, northern Thailand. This species has tuberculated exoperidium, pitted endoperidium, paracapillitium abundant and minutely spiny basidiospores. A molecular phylogenetic analysis confirmed that this species is most closely related to known *Morganella* species and is positioned within *Lycoperdon* sensu lato. A description and illustration are provided.

© 2013 The Mycological Society of Japan. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

The gasteroid genus, *Morganella* Zeller has worldwide distribution in temperate and tropical regions with saprotrophic habits, usually growing on dead wood (Ponce de Leon 1971; Suárez and Wright 1996; Kirk et al. 2008). During a taxonomic survey of *Morganella* collected from northern Thailand, we found *Morganella purpurascens* (Berk. & M.A. Curtis) Kreisel & Dring. It is reported here for the first time from Thailand. This species was previously known from Australia, India, Bonin islands (Japan), Philippines and Samoa Island (Ito and Imai 1937; Kreisel and Dring 1967; Ponce de Leon 1971). In this article, morphological characters of the Thai material are described and illustrated. Moreover, its taxonomic status was supported by molecular phylogenetic analysis.

The studied material is deposited in the Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources, Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand (SDBR-CMU). Macroscopic features are described from fresh and dried specimens. Microscopic features were observed on sections of gleba and peridium of the basidiomata mounted in 95% ethanol followed by distilled water, 5% KOH, and Melzer's reagent, and examined under the light microscope. Color names and codes follow Ridgway (1912). Scanning electron image of basidiospores were also captured with a JEOL JSM-5910LV electron microscope.

Morganella purpurascens (Berk. & M.A. Curtis) Kreisel & Dring, Feddes Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis, 74: 113 (1967). Figs. 1–3.

≡ *Lycoperdon purpurascens* Berk. & M.A. Curtis, Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences, 4: 124 (1858).

Basidiomata 12–16 mm diameter, 8–12 mm height, subglobose to depressed-globose (Fig. 1), with whitish rhizomorphs, cord-like strands, branched, 0.2–0.5 mm thickness and up to 20 mm in length attached at the base, consists of three layers,

* *Corresponding author*. Tel.: +66 53 941947x144; fax: +66 53 892259.
E-mail addresses: jaturong_yai@hotmail.com (J. Kumla), saisamorn.l@cmu.ac.th (S. Lumyong).
1340-3540/$ – see front matter © 2013 The Mycological Society of Japan. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2013.05.002

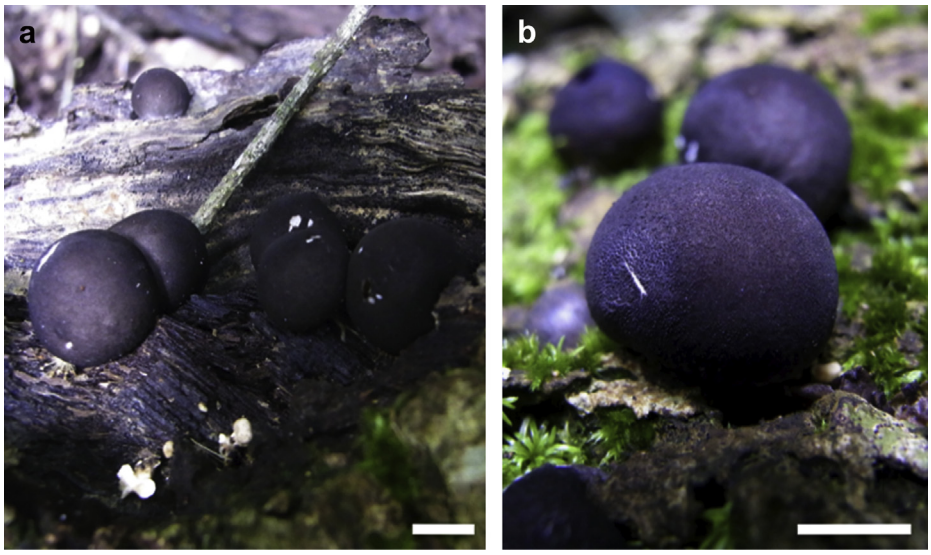


Fig. 1 – *Morganella purpurascens*. a, b: Basidiomes growing in the nature. *Bars*: 5 mm.

margin of rhizomorphs divided into thin-walled cortex hyphae up to 4 μm diameter and sclerified hyphae up to 4 μm diameter; the center of rhizomorphs comprise thick-walled vessel hyphae with septa, up to 15 μm diameter. Exoperidium dark grayish brown (XLV5‴k) to blackish violet gray (LII59‴m) and deep olive-buff to olive-buff (XL21‴b–d) to toward the base, covered by minute conical tubercles, composed by chains of globose cells, 7–22 × 6.8–18.5 μm diameter (Fig. 2a). Endoperidium pitted, soft, papery, mustard yellow (XVI19′b), slightly shining, thin. Gleba cottony, white (LIII) when young and powdery, dark olive-buff (XL21‴) when mature. Subgleba maize yellow (III19f), composed of compacted cells. Pseudocolumella inconspicuous. Basidiospores globose, 3.5–4 μm diameter without the ornamentation, minutely spiny, spines up to 0.5 μm length, with an oil drop inside, shortly pedicellate (Figs. 2b and 3), primuline yellow (XVI19′) in water, KOH and not changing in Melzer's reagent. Eucapillitium absent. Paracapillitium abundant, thin-walled, 2.5–4.5 μm diameter, septate and branched, hyaline, presenting amorphous and hyaline incrustation (Fig. 2c).

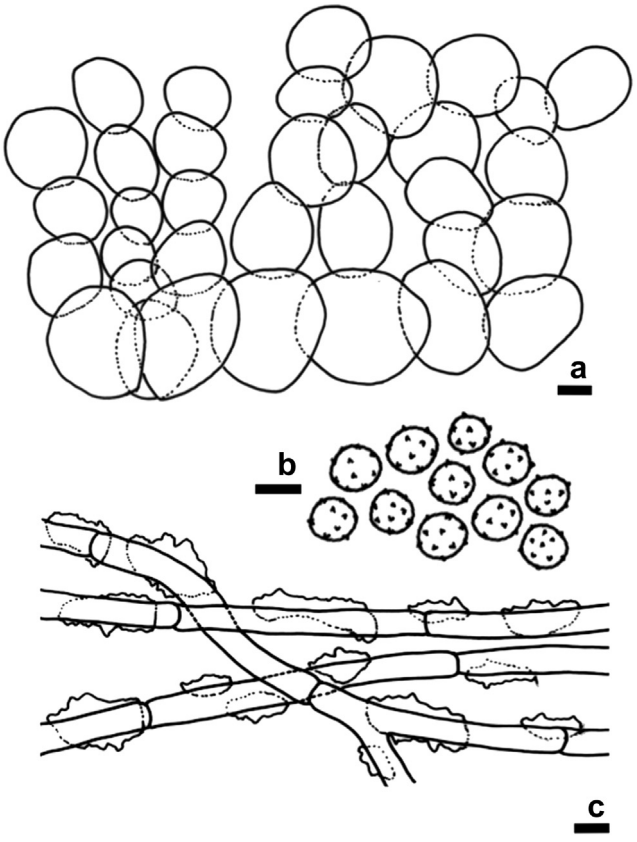


Fig. 2 – *Morganella purpurascens*. a: Exoperidial elements. b: Basidiospores. c: Paracapillitial hyphae. *Bars*: 5 μm.

Material studied: THAILAND, Chiang Mai Province, Muang District, Doi Suthep-Pui National Park, Huai Kok Ma village, 18°48′24″N 98°54′34″E, elevation 1150 m, on rotting wood in a tropical deciduous forest, dominated by *Castanopsis* spp., June 18, 2012, Kumla J. & Suwannarach N., SDBR-CMU55-LY1, GenBank sequence KC414581.

Notes: Thai material has much smaller (12–16 mm diameter) basidiomata size than in a type material from Bonin Island (20–30 mm diameter; Ponce de Leon 1971), but other macroscopic and microscopic features agree well with descriptions of Kreisel and Dring (1967) and Ponce de Leon (1971).

For molecular analysis, genomic DNA of dried specimen was extracted using the CTAB method (Kumla et al. 2012) and the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA regions were amplified using ITS4 and ITS5 primers under the following thermal conditions: 95 °C for 2 min, 30 cycles of 95 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and 72 °C for 10 min. The PCR products were directly sequenced. The partial ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA sequence, containing 694 bp, was deposited in GenBank as KC414581. For the phylogenetic analysis, a total of 27 sequences of lycoperdaceous fungi and the outgroup were obtained from previous studies (Krüger et al. 2001; Larsson and Jeppson 2008; Gube 2009) and GenBank database. A multiple

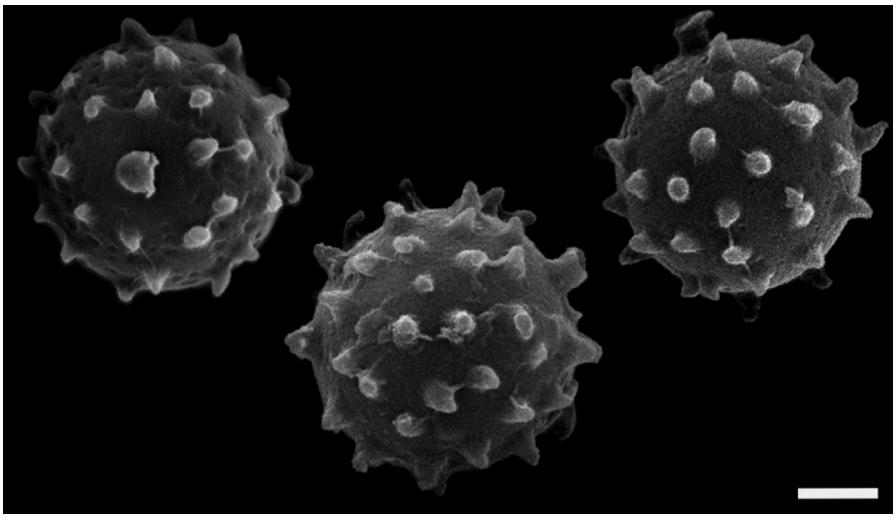


Fig. 3 – Scanning electron microscope image of the basidiospores of *Morganella purpurascens*. Bar: 1 μm.

sequence alignment was carried out using the alignment subroutines in Clustal X (Thompson et al. 1997) and phylogenetic trees were performed using PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). In maximum parsimony analysis, all characters were equally weighted and gaps were treated as missing data. Heuristic searches with 100 random-addition sequence replicates and tree-bisection-reconnection branch swapping were performed. Bootstrap analysis (Felsenstein 1985) was conducted with 1000

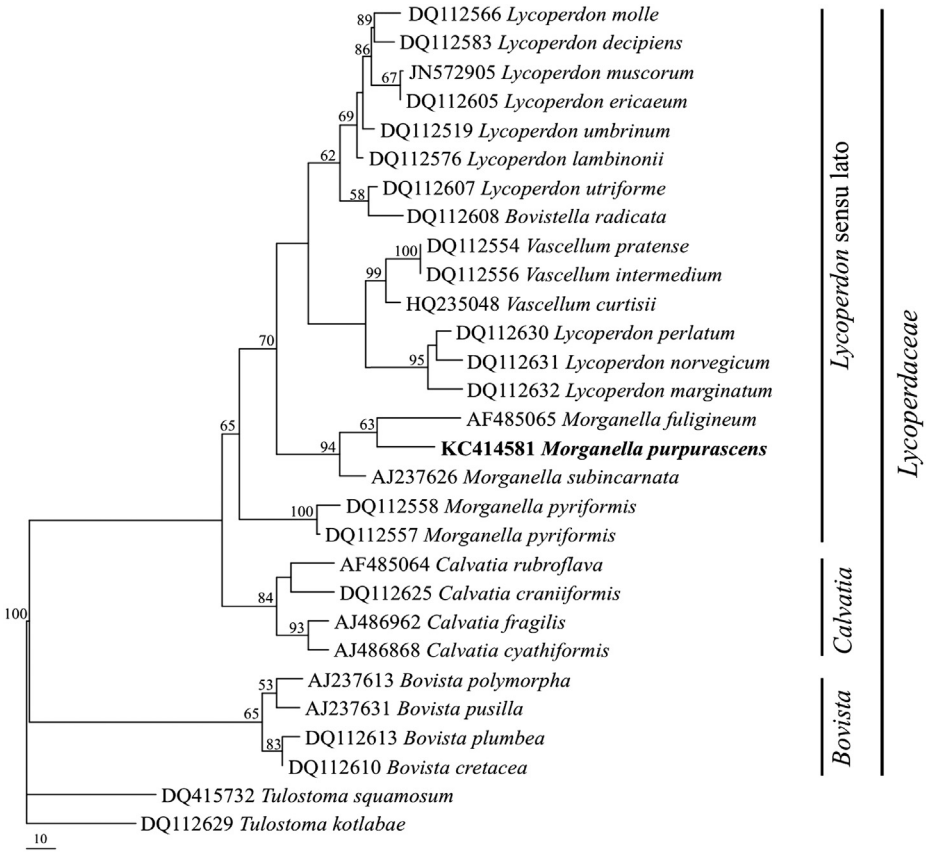


Fig. 4 – One of 56 maximum parsimonious trees of the ITS1, ITS2 and 5.8S ribosomal DNA regions of 29 sequences. *Tulostoma katlabae* and *T. squamosum* were used as the outgroup. The aligned dataset consisted of 755 total characters, of which 484 characters were constant, 95 variable characters were parsimony uninformative and 176 characters were parsimony informative. Parsimony analysis of the alignment yielded 56 most parsimonious trees with total length of 596 steps (CI = 0.628, HI = 0.373, RI = 0.659, RC = 0.414). The bootstrap value (≥50%) at each branch calculated from 1000 replications and bar represents 10 showed substitutions per nucleotide position.

replicates using the same settings as above. One of 56 maximum parsimonious trees is shown in Fig. 4. Phylogenetic analysis indicated that *M. purpurascens* was assigned to *Lycoperdon* subgenus *Morganella* together with *M. fuliginea* (Berk. & M.A. Curtis) Kreisel & Dring and *M. subincarnata* (Peck) Kreisel & Dring, this subgenus being well-supported by their morphological characteristics (small size, usually dark-colored basidiome and only paracapillitium present). Recent molecular phylogenetic studies of Larsson and Jeppson (2008) and Gube (2009) have proposed a widening of the genus *Lycoperdon* to incorporate traditional genera such as *Bovistella*, *Morganella*, *Utraria* and *Vascellum* which proposed a subdivision of the genus and recognized *Apioperdon*, *Bovistella*, *Morganella*, *Utraria* and *Vascellum* as subgenera within this genus.

According to descriptions by Kreisel and Dring (1967) and Ponce de Leon (1971), *Morganella purpurascens* is easily recognized by its tuberculated exoperidium, pitted endoperidium and smooth to minutely spiny basidiospores. *Morganella purpurascens* resembles *M. fuliginea* which is frequently found in the pantropical region, but is clearly distinguished from *M. fuliginea* by pitted endoperidium and shorter basidiospore spine length (Ponce de Leon 1971; Suárez and Wright 1996; Kasuya et al. 2006; Trierveiler-Pereira et al. 2010). *Morganella subincarnata* and *M. samoensis* (Bres. & Pat.) P. Ponce de Leon are closely related to *M. purpurascens*. However, *M. subincarnata*, distributed in Europe (Austria, Germany and Italy), Japan and North America (Ito and Imai 1937; Ponce de Leon 1971; Runge 1974; Besl et al. 1982; Kreisel and Karasch 2005; Sarasini 2005) has a wider size of the paracapillitium (3.5–6.5 μm diameter) and bigger echinulate basidiospore size (4–5 μm diameter) than *M. purpurascens*. Moreover, *M. samoensis* (Bres. & Pat.) P. Ponce de Leon is clearly distinguished from *M. purpurascens* by its reticulated endoperidium (Ponce de Leon 1971). Previously, only three species of *Morganella*, *M. compacta* (G. Cunn.) Kreisel & Dring, *M. fuliginea* and *M. pyriformis* (Schaeff.) Kreisel & D. Krüger, have been recorded from Thailand (Phanichapol 1968; Ellingsen 1982; Kasuya et al. 2006). *Morganella pyriformis* is clearly distinguished from both *M. compacta* and *M. purpurascens* by presented eucapillitium. Nevertheless, *M. compacta* was distinguished from a present species by its elongated and acicular spines exoperidium, and reticulated endoperidium (Ponce de Leon 1971). Therefore, *M. purpurascens* is a new record for Thailand.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Thailand Research Fund on Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0309/2550) and Research-Team Promotion Grant RTA5580007, and Graduate School of Chiang Mai University. We are grateful to Keegan H. Kennedy for improving the English text.

REFERENCES

Besl H, Bresinsky A, Einhellinger A, 1982. *Morganella subincarnata* and other rare fungi from submontane grasslands between Garmisch and Mittenwald (Bavaria). *Zeitschrift fur Mykologie* 48: 99–110.

Ellingsen HJ, 1982. Some gasteromycetes from northern Thailand. *Nordic Journal of Botany* 2: 283–285.

Felsenstein J, 1985. Confidence intervals on phylogenetics: an approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.

Gube M, 2009. *Ontogeny and phylogeny of gasteroid members of Agaricaceae (Basidiomycetes)*. PhD thesis. Friedrich-Schiller-Universität, Jena.

Ito S, Imai S, 1937. Fungi of the Bonin Islands I. *Transactions of the Sapporo Natural History Society* 15: 1–12.

Kasuya T, Phongpaichit S, Dissara Y, 2006. Two pantropical fungi, *Lycogalopsis solmsii* and *Morganella fuliginea* (Basidiomycota, Agaricales, Lycoperdaceae), new to Thai mycobiota. *Natural History Bulletin of the Siam Society* 54: 209–213.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (eds), 2008. *Dictionary of the Fungi*, 10th edn. CABI Publishing, Wallingford.

Kreisel H, Dring DM, 1967. An emendation of the genus *Morganella* Zeller (*Lycoperdaceae*). *Feddes Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 74: 109–122.

Kreisel H, Karasch P, 2005. Über *Bovista acuminata* und *Morganella subincarnata* – zwei bemerkenswerte Gasteromycetenfunde aus dem Alpenraum. *Mycologia Bavarica* 8: 9–15.

Krüger D, Binder M, Fischer M, Kreisel H, 2001. The *Lycoperdales*. A molecular approach to the systematics of some gasteroid mushrooms. *Mycologia* 93: 947–957.

Kumla J, Bussaban B, Suwannarach N, Lumyong S, Danell E, 2012. Basidiome formation of an edible wild, putatively ectomycorrhizal fungus, *Phlebopus portentosus* without host plant. *Mycologia* 104: 597–603.

Larsson E, Jeppson M, 2008. Phylogenetic relationships among species and genera of *Lycoperdaceae* based on ITS and LSU sequence data from north European taxa. *Mycological Research* 112: 4–22.

Phanichapol D, 1968. Check-list of fungi in the Forest Herbarium. *Natural History Bulletin of the Siam Society* 22: 263–269.

Ponce de Leon P, 1971. Revision of the genus *Morganella* (*Lycoperdaceae*). *Fieldiana Botany* 34: 27–44.

Ridgway R, 1912. *Color standards and color nomenclature*. Robert Ridgway, Washington.

Runge A, 1974. *Morganella subincarnata* (Peck) Kreisel & Dring in Österreich gefunden. *Zeitschrift für Pilzkunde* 40: 159–162.

Sarasini M, 2005. *Gasteromiceti epigei*. Associazione Micologica Bresadola, Trento.

Suárez VL, Wright JE, 1996. South American Gasteromycetes V: the genus *Morganella*. *Mycologia* 88: 655–661.

Swofford DL, 2002. *PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) version 4.0 beta 10*. Sinauer Associates, Sunderland.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 24: 4876–4882.

Trierveiler-Pereira IG, Kreisel H, Baseia IG, 2010. New data on puffballs from the northeast region of Brazil. *Mycotaxon* 111: 411–421.

ISSN (print) 0093-4666 © 2013. Mycotaxon, Ltd. ISSN (online) 2154-8889

MYCOTAXON

http://dx.doi.org/10.5248/123.1

Volume 123, pp. 1–7 *January–March 2013*

Scleroderma suthepense, a new ectomycorrhizal fungus from Thailand

Jaturong Kumla, Nakarin Suwannarach, Boonsom Bussaban & Saisamorn Lumyong*

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

* Correspondence to: *saisamorn.l@cmu.ac.th*

Abstract — A new species of earthball, described herein as *Scleroderma suthepense,* was found under *Prunus cerasoides* in Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. Morphological characteristics indicate it belongs to section *Scleroderma*. Molecular analysis showed differences from previously described *Scleroderma* species. A description, illustration, and comparisons with related taxa are provided.

Key words — gasteromycete, phylogenetic analysis, taxonomy

Introduction

Ectomycorrhizal fungi have symbiotic associations with many tree species in forests around the world and over 7000 species have been described (Taylor & Alexander 2005). *Scleroderma* (*Boletales*; Binder & Hibbett 2006) has worldwide distribution in temperate and tropical regions and forms ectomycorrhizas with a broad range of woody plants including members of families *Caesalpiniaceae*, *Dipterocarpaceae*, *Fagaceae*, *Myrtaceae*, *Phyllanthaceae*, and *Pinaceae* (Munyanziza & Kuyper 1995; Sims et al. 1997; Sanon et al. 2009). There are 131 *Scleroderma* names in Index Fungorum (http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp). In Thailand, only ten species of *Scleroderma* have been reported, *S. areolatum*, *S. bovista*, *S. cepa*, *S. citrinum*, *S. dictyosporum*, *S. flavidum*, *S. lycoperdoides*, *S. polyrhizum*, *S. sinnamariense*, and *S. verrucosum* (Chandrasrikul et al. 2011). *Scleroderma* species have been used to increase the growth of tree seedling, both in nurseries and in the field (Chen et al. 2006). Several species of *Scleroderma* have been proposed based on morphological characteristics of their basidiomes and basidiospores (Guzmán 1970; Sims et al. 1995; Guzmán et al. 2004). Recent studies have also used molecular analysis to analyze inter- and intraspecific variation in *Scleroderma* species (Phosri et al. 2009; Nouhra et al. 2012).

During an investigation of ectomycorrhizal fungi associated with tree species in northern Thailand, we found an interesting species of *Scleroderma* under *Prunus cerasoides* Buch.-Ham. ex D. Don (*Rosaceae*), which we describe as a new species in the present paper. To confirm their taxonomic status the phylogenetic relationship among 25 isolates of *Scleroderma* were also determined by analysis of complete sequences of the internal transcribed spacer (ITS) regions of the RNA gene.

Materials & methods

Morphology studies

Basidiomes of *Scleroderma* were collected from Medicinal Plant Garden (18°48′20″N 98°54′52″E, elevation 1072 m), Doi Suthep-Pui National Park, Chiang Mai Province, Thailand in May 2012. Basidiomes were wrapped in aluminum foil or kept in plastic specimen boxes until transport back to the laboratory where notes on macromorphological features and photographs were taken within 24 h. Macromorphological data were derived from fresh specimens, whereas micromorphological data were derived from dried specimens mounted in 95% ethanol followed by distilled water, 3% KOH or Melzer's reagent. Size data of anatomical features are based on at least 50 measurements of each structure. The specimens were dried at 40–45 °C and deposited at the Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources, Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand (SDBR-CMU).

Molecular studies

Genomic DNA of a dried specimen was extracted according to a CTAB method (Kumla et al. 2012). The ITS regions of the RNA gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with primers ITS4 and ITS5 under the following thermal conditions: 94 °C for 2 min; 35 cycles of 95 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and 72 °C for 10 min. The PCR products were then checked on 1% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under UV light. PCR products were purified by using PCR clean up Gel extraction NucleoSpin® Extract II Purification Kit (Macherey-Nagel, Germany, Catalog no. 740 609.50) following the manufacturer's protocol. The purified PCR products were directly sequenced. Sequencing reactions were preformed and the sequences were automatically determined in the genetic analyzer (1ST Base, Malaysia) using the PCR primers mentioned above. Sequences were used to query GenBank via BLAST (http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html). For the phylogenetic analysis, a multiple alignment subroutine in Clustal X (Thompson et al. 1997) and a maximum-parsimony analysis using the PAUP beta 10 software version 4.0 (Swofford 2002) were carried out.

Results

Taxonomic description

Scleroderma suthepense Kumla, Suwannarach & Lumyong, **sp. nov.** Plate 1

MycoBank MB800878

Differs from *Scleroderma meridionale* by its longer basidiospore spine length.

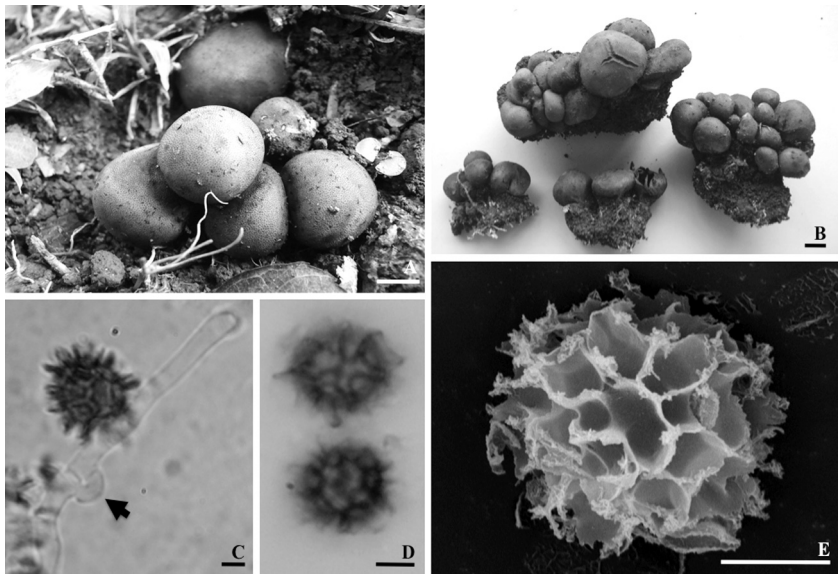


Plate 1. *Scleroderma suthepense.* A, B: Basidiomes. C: Hypha with a clamp connection (arrowed). D: Basidiospores as observed under a compound microscope. E: Basidiospore as observed with a scanning electron microscope. Scale bars: A, B = 1 cm; C–E = 5 μm.

Type—Thailand, Chiang Mai Province, Muang District, Doi Suthep-Pui National Park, Medicinal Plant Garden, 18°48′20″N 98°54′52″E, elevation 1072 m, rainforest dominated by *Prunus cerasoides*, *Cinchona pubescens*, and other trees, on sandy loam, 15 May 2012, Jaturong Kumla & Nakarin Suwannarach (**Holotype**, SDBR-CMU55-SC2; GenBank sequence, JX205215).

Etymology—*suthepense*, referring to Doi Suthep-Pui National Park, where the new species was found.

Basidiomes globose or subglobose 1.1–3.5 cm diameter, 1.0–3.9 cm height, rhizomorphs well developed, white to yellow, 0.5–1.2 cm height. Peridium 0.5–1.0 mm thick when fresh, leathery, surface partially smooth with scattered, small and thin scales, greyish yellow to greyish brown, consisting of two layers. The outer layer consists of cylindrical, thick-walled, yellowish brown hypha up to 8.0 μm diameter, with scattered clamp connections, turning to reddish brown with KOH. The inner layer consists of cylindrical, thick-walled, hyaline hyphae up to 6.0 μm diameter, with clamp connections. Gleba when mature dark greyish brown to back and pulverulent. Basidia not observed. Basidiospores globose to subglobose, strongly reticulate with spines, 8.0–13.0 μm diameter (n = 50) including ornamentation (Plate 1D,E), spine 1.0–2.5 μm in length, dark yellowish brown in water or KOH and not changing in Melzer's reagent.

Ecology & distribution — Terrestrial on sandy loam, under *Prunus cerasoides* in dipterocarp forest; known only from Thailand.

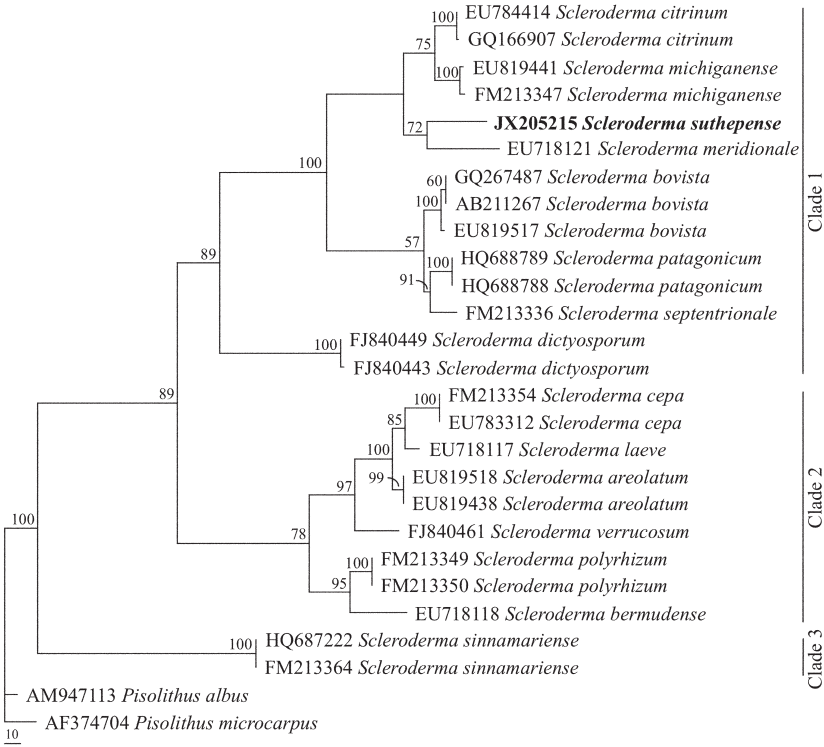


Plate 2. A maximum parsimonious tree inferred from a heuristic search of ITS 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ITS 2 alignments of 27 sequences. *Pisolithus albus* and *P. microcarpus* were used to root the tree. Branches with bootstrap values ≥50% are shown above each branch and the bar represents 10 substitutions per nucleotide position.

Molecular analysis

The 679-bp ITS sequence of *S. suthepense* (JX205215) was deposited in GenBank and analyzed phylogenetically with 24 other *Scleroderma* sequences and the outgroup (*Pisolithus albus* and *P. microcarpus*) obtained from the GenBank database. Heuristic searches produced a tree length of 803 steps, CI = 0.685, RI = 0.823, RC = 0.563 and HI = 0.315. One maximum-parsimony tree is shown in Plate 2. A phylogenetic dendrogram separates *Scleroderma* fungi into three clades. Clade 1 contains species with reticulate spores (sect. *Scleroderma*), while clades 2 and 3 include species with spiny or subreticulate spores. *Scleroderma suthepense* stands within clade 1 together with *S. bovista*,

S. citrinum, *S. dictyosporum*, *S. meridionale*, *S. michiganense*, *S. patagonicum*, and *S. septentrionale* and forms a sister taxon with *S. meridionale* (72% bootstrap support). Clade 2 includes six species (*S. areolatum*, *S. bermudense, S. cepa*, *S. laeve*, *S. polyrhizum, S. verrucosum*). Clade 3 comprises a single species, *S. sinnamariense*.

Discussion

Based on basidiospore morphology, *Scleroderma* species are separated into three sections; sect. *Aculeatispora* (spiny spore), sect. *Sclerangium* (subreticulate spore), and sect. *Scleroderma* (reticulate spore) (Guzmán 1970; Sims et al. 1995, 1997). However, it is difficult to distinguish *Scleroderma* species based only on morphology because basidiome size and shape change depending on the soil and environment (Sanon et al. 2009). *Scleroderma suthepense*, described as a new species in the present study, was found beneath *Prunus cerasoides* and is placed in sect. *Scleroderma* based on its reticulate basidiospores and hyphal clamp connections. Its basidiospores are similar in size to those of *S. dictyosporum*, *S. meridionale,* and *S. septentrionale* (Table 1). Our ITS sequence analysis clearly separates *S. suthepense* from the other reticulate spored *Scleroderma* species in sect. *Scleroderma,* although *S. suthepense* appears closely related to *S. meridionale*, which has a shorter basidiospore spine length (0.5–1.5 μm) and is reported only in North America (Sims et al. 1995; Guzmán & Ovrebo 2000). Our analysis separates the reticulate spored clade (clade 1) and the spiny or subreticulate spored clades (clades 2 and 3) with 89% bootstrap support (Plate 2). This result was similar to previous molecular phylogenetic studies, which separated *Scleroderma* species into two moderately to strongly supported clades (Phosri et al. 2009; Nouhra et al. 2012). Further studies are required to confirm an ectomycorrhizal synthesis between *S. suthepense* and various host plants.

Table 1. Basidiospore sizes of *Scleroderma suthepense* and other species in *Scleroderma* sect. *Scleroderma*.

Species	Spore diameter (μm)	References
S. bovista	11–16	Sims et al. (1995), Cortez et al. (2011)
S. citrinum	11–16	Sims et al. (1995), Cortez et al. (2011)
S. dictyosporum	9–14	Guzmán (1970), Cortez et al. (2011)
S. hypogaeum	17–20	Sims et al. (1995)
S. meridionale	8–17	Sims et al. (1995), Guzmán & Ovrebo (2000)
S. michiganense	14–20	Sims et al. (1995)
S. minutisporum	4–7	Alfredo et al. (2012)
S. patagonicum	19–28	Nouhra et al. (2012)
S. septentrionale	8–15	Jeppson & Piatek (2005)
S. suthepense	8–13	Present study

Such knowledge is important for selection and management of ectomycorrhizal fungi for greenhouse and in field inoculation programs in Thailand.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Thailand Research Fund for The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0309/2550) and Research-Team Promotion Grant RTA5580007 and Graduate School of Chiang Mai University. We are grateful to Dr. Eric H.C McKenzie and Dr. Steven L. Stephenson for presubmission reviews.

Literature cited

Alfredo DS, Leite AG, Braga-Neto R, Cortez VC, Baseia IG. 2012. *Scleroderma minutisporum*, a new earthball from the Amazon rainforest. Mycosphere 3: 294–299. http://dx.doi.org/10.5943/mycosphere/3/3/4

Binder M, Hibbett DS. 2006. Molecular systematics and biological diversification of Boletales. Mycologia 98: 971–981. http://dx.doi.org/10.3852/mycologia.98.6.971

Chandrasrikul A, Suwanarit P, Sangwanit U, Lumyong S, Payapanon A, Sanoamuang N, Pukahuta C, Petcharat V, Sardsud U, Duengkae K, Klinhom U, Thongkantha S, Thongklam S. 2011. Mushroom (basidiomycetes) in Thailand. Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning, Bangkok.

Chen YL, Dell B, Malajczuk N. 2006. Effect of *Scleroderma* spore density and age on mycorrhiza formation and growth of containerized *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla* seedlings. New Forest 31: 453–467. http://dx.doi.org/10.1007/s11056-005-0880-1

Cortez VG, Baseia IG, Silveira RMB. 2011. Gasteroid mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: Boletales. JYFR 2: 44–52.

Guzmán G. 1970. Monografia del género *Scleroderma*. Darwiniana 16: 233–407.

Guzmán G, Ovrebo CL. 2000. New observation on sclerodermataceous fungi. Mycologia 92: 174–179.

Guzmán G, Ramirez-Guillém F, Miller OK, Lodge DJ. 2004. *Scleroderma stellatum* versus *Scleroderma bermudense*: the status of *Scleroderma echinatum* and the first record of *Veligaster nitidum* from the Virgin Islands. Mycologia 96: 1370–1379.

Jeppson M, Piatek M. 2005. S*cleroderma septentrionale* (*Fungi, Basidiomycetes*) first records from central Europe. Pol Bot J 50: 15–17.

Kumla J, Bussaban B, Suwannarach N, Lumyong S, Danell E. 2012. Basidiome formation of an edible wild, putatively ectomycorrhizal fungus, *Phlebopus portentosus* without host plant. Mycologia 104: 597–603. http://dx.doi.org/10.3852/11-074

Munyanziza E, Kuyper TW. 1995. Ectomycorrhizal synthesis on seedlings of *Afzelia quanzensis* Welw. using various types of inoculum. Mycorrhiza 5: 283–287.

Nouhra ER, Caffot MLH, Pastor N, Crespo EM. 2012. The species of *Scleroderma* from Argentina, including a new species from the *Nothofagus* forest. Mycologia 104: 488–495. http://dx.doi.org/10.3852/11-082

Phosri C, Martín MP, Watling R, Jeppson M, Sihanonth P. 2009. Molecular phylogeny and re-assessment of some *Scleroderma* spp. (gasteromycetes). An Jard Bot Madrid 166: 83–91. http://dx.doi.org/10.3989/ajbm.2199

Sanon KB, Bâ AM, Delaruelle C, Duponnois R, Matin F. 2009. Morphological and molecular analyses in *Scleroderma* species associated with some caesalpinioid legumes, *Dipterocarpaceae* and *Phyllanthaceae* trees in southern Burkina Faso. Mycorrhiza 19: 571–584. http://dx.doi.org/10.1007/s00572-009-0272-z

Sims KP, Watling R, Jeffries P. 1995. A revised key to the genus *Scleroderma*. Mycotaxon 56: 403–420.

Sims K, Watling R, De LA, Cruz R, Jeffries P. 1997. Ectomycorrhizal fungi of the Philippines: a preliminary survey and notes on the geographic biodiversity of the *Sclerodermatales.* Biodivers Conserv 6: 45–58.

Swofford DL. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0 beta 10. Sunderland, Massachusetts.

Taylor AFS, Alexander I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. Mycologist 19: 102–111. http://dx.doi.org/10.1017/S0269915X05003034

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucl Acid Res 24: 4876–4882.

Ann Microbiol (2014) 64:707–720
DOI 10.1007/s13213-013-0706-x

ORIGINAL ARTICLE

Indole-3-acetic acid production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance of some sclerodermatoid fungi collected from northern Thailand

Jaturong Kumla · Nakarin Suwannarach · Boonsom Bussaban · Kenji Matsui · Saisamorn Lumyong

Received: 31 January 2013 / Accepted: 1 August 2013 / Published online: 18 August 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and the University of Milan 2013

Abstract Sclerodermatoid fungi basidiomes were collected from northern Thailand and pure cultures were isolated. The morphology and molecular characteristics identified them as *Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense*. This study investigated the in vitro ability of selected fungi to produce indole-3-acetic acid (IAA), to solubilize different toxic metal (Co, Cd, Cu, Pb, Zn)-containing minerals, and metal tolerance. The results indicated that all fungi are able to produce IAA in liquid medium. The optimum temperature for IAA production of all fungi was 30 °C, and the optimum concentration of L-tryptophan of *Astraeus odoratus, Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense* was 2 mg ml^{-1}. The highest IAA yield (65.29 ±1.17 μg ml^{-1}) was obtained from *Phlebopus portentosus* after 40 days of cultivation in culture medium supplemented with 4 mg ml^{-1} of L-tryptophan. The biological activity tests of fungal IAA showed that it can simulate coleoptile elongation, and increase seed germination and root length of tested plants. In addition, the metal tolerance and solubilizing activities varied for different minerals and fungal species. The presence of metal minerals affected fungal growth, and cobalt carbonate showed the highest toxicity. The solubilization index decreased when the concentration of metal minerals increased. *Astraeus odoratus* showed the lowest tolerance to metals. This is the first report of in vitro IAA production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance abilities of the tested fungi.

J. Kumla · N. Suwannarach · B. Bussaban · S. Lumyong (✉)
Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
e-mail: saisamorn.l@cmu.ac.th

K. Matsui
Department of Applied Molecular Bioscience, Graduate School of Medicine, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan

K. Matsui
Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan

Keywords Ectomycorrhizal fungi · Phytohormone · Toxic metal · Pure culture

Introduction

Ectomycorrhizal fungi form a mutualistic relationship with plants, in which the fungi can enhance a plant's nutrient and water uptake, increase tolerance to environmental stresses, increase the photosynthetic rate of the plant and protect against pathogens (Brundrett et al. 1996; Chung et al. 2002; Makita et al. 2012). Ectomycorrhizal fungi include more than 7,000 reported species (Taylor and Alexander 2005). The sclerodermatoid fungal group is one of ectomycorrhizal fungi aggregated based on phylogenetic analysis, and the group belongs to the suborder *Sclerodermatineae*, order *Boletales* (Binder and Hibbett 2006; Wilson et al. 2011). The fungi in the genera *Astraeus*, *Boletinellus*, *Calostoma*, *Phlebopus*, *Pisolithus* and *Scleroderma* have been classified as members of the sclerodermatoid fungi (Watling 2006). However, the mechanisms of root morphological changes caused by ectomycorrhizal fungi are not yet understood. One possible mechanism is that plant growth regulating phytohormores such as auxin, cytokinins, ethylene and gibberellin-like substances are produced (Strelczyck and Pokojska-Burdziej 1984; Barker and Tagu 2000).

Auxins are phytohormones widely present in most plants, and indole-3-acetic acid (IAA) is the most active auxin. IAA is responsible for the regulation of cell elongation, cell division, cell differentiation and root initiation (Teale et al. 2006; Zhao 2010). IAA, which is a product of L-tryptophan metabolism, is produced not only in plants, but also by microorganisms, including bacteria and fungi (Hasan 2002; Chung and Tzeng 2004; Ahmad et al. 2005; Tsavkelova et al. 2007; Apine and Jadhav 2011). Several studies reported that IAA produced from microorganisms, including those in rhizospheric soil, endophytic microorganisms and mycorrhizal fungi, has the

ability to improve and promote plant growth (Niemi et al. 2002; Tsavkelova et al. 2007; Khamna et al. 2010; Chaiharn and Lumyong 2011; Chutima and Lumyong 2012; Zaghian et al. 2012). Many ectomycorrhizas, such as *Amanita muscaria*, *Cenococcum graniforme*, *Laccaria bicolor*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius, Rhizopogon luteolus*, *Suillus luteus*, *Suillus bovinus*, *Tuber borchii* and *T. melanosporum*, were reported to produce IAA in pure culture (Frankenberger and Poth 1987; Rudawska and Kieliszewska-Rokicka 1997; Karabaghli et al. 1998; Splivallo et al. 2009). However, there is still a need to do further research on IAA produced by ectomycorrhizal fungi.

Toxicity of metals in soil is a major constraint affecting plant growth in a number of natural or managed ecosystems. However, plants that can prevent the metal toxicity in soil by phytoremediation processes have great potential for helping other plants withstand the metal stress (Mapelli et al. 2012; Rajkumar et al. 2012). Moreover, rhizosphere microbes deserve special attention because they can directly improve both phytoremediation processes and plant growth (Gadd 2004, 2010; Rajkumar et al. 2012). Similarly, ectomycorrhizal plants can grow better in metal contaminated soil than non-ectomycorrhizal plants. Several studies have concluded that ectomycorrhizal fungi are able to protect the roots against metal toxicity and increase the tolerance of their hosts in metal-contaminated soil (Jentschke and Godbold 2000; Van Tichelen et al. 2001). The mechanisms by which fungi are able to deal with these metals are numerous and varied in their action, e.g. solubilization, extracellular metal sequestration and precipitation, metal binding to the fungal cell walls or sequestration (Gadd 1993, 2004). The efficiency of protection differs between distinct isolates of ectomycorrhizal fungi and different toxic metals (Meharg and Cairney 2000). Moreover, many ectomycorrhizal fungi have the ability to solubilize insoluble toxic metal minerals, e.g. Al, Cd, Cu, Pb and Zn, and tolerate metals in pure culture (Tam 1995; Blaudez et al. 2000; Ray et al. 2005; Fomina et al. 2005). The purpose of this study was to investigate the ability of the sclerodermatoid fungi, *Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense*, collected from northern Thailand, to produce IAA in vitro. The optimal conditions for IAA production and the biological effects of fungal IAA were examined. Moreover, the ability of these fungi to solubilize insoluble toxic metal minerals and to tolerate metal in solid culture was investigated.

Materials and methods

Isolation and identification of sclerodermatoid fungi

The basidiomes of four sclerodermatoid fungi, *Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense*, were surveyed and collected from mid-April to the end of July, 2008−2010, in Chaing Mai and Chiang Rai Provinces, Thailand (Table 1). After return to the Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources, Faculty of Science, Chiang Mai University, the mycelia were isolated from each basidiome by aseptically removing a small piece of mycelium from the inside, and transferring it to modified Melin-Norkans (MMN) medium (0.05 g $CaCl_2$, 0.025 g NaCl, 0.15 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.012 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.001 g thiamine HCl, 10.0 g malt extract, 0.25 g $NH_4H_2PO_4$, 0.5 g KH_2PO_4, 2.5 g glucose and 15.0 g agar per liter of distilled water, pH 6.0) and incubating the isolated plates at 30 °C in the dark. The mycelia emerging from these tissue samples were transferred to a new fresh MMN medium. Each parallel culture was kept in either sterile distilled water at 4 °C or 20 % glycerol at −20 °C for long-term preservation.

Macroscopic and microscopic characteristics were used to identify the basidiomes. In addition, molecular methods were used to confirm the pure culture isolated from basidiome. Genomic DNA was extracted according to a CTAB method (Kumla et al. 2012) and the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA (rDNA) was amplified using ITS4 and ITS5 primers (White et al. 1990) under the following thermal conditions: 95 °C for 2 min, 30 cycles of 95 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and 72 °C for 10 min. The purified PCR products were directly sequenced. Sequencing reactions were performed, and the sequences were automatically determined in the genetic analyzer (1^{ST} Base, Malaysia) using the PCR primers mentioned above. Sequences of each sclerodermatoid fungus and previously published sequences from GenBank were aligned using Clustal X (Thomson et al. 1997). Phylogenetic analysis was performed using PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) with the maximum-parsimony analysis. In analysis, all characters were equally weighted and gaps were treated as missing data. Heuristic search with tree-bisection–reconnection branch swapping was implemented with 1,000 replicates of random-addition sequence. Maxtrees was set to auto-increase. Collapse of branch occurred if maximum length was zero. Bootstrap analysis was conducted with 1,000 replicates under the heuristic search (Felsenstein 1985). Tree length, consistency index (CI), retention index (RI), rescaled consistency index (RC), and homoplasy index (HI) were calculated for all the trees generated under different optimality criteria.

Determination of fungal IAA production

All fungi were grown in 25 ml of MMN liquid medium, pH 6.0, supplemented with 2 mg ml^{-1} of L-tryptophan in 100 ml Erlenmeyer flask. Five mycelial plugs (5 mm diameter) from the periphery of the growing colony on MMN medium at 30 °C for 15 days were transferred to each flask.

Table 1 Origin, date of collection, host plant and GenBank accession number of sclerodermatoid fungi used in this study

Taxa	Fungal isolate	GenBank number	Location	Collection date	Associated plant
Astraeus odoratus	CMU53-110-7	HQ687219	Wiang Pa Pao, Chiang Rai	23 June 2010	*Dipterocarpus* sp.
Phlebopus portentosus	CMU51-210-2	HQ687224	Phrao, Chiang Mai	7 May 2008	*Mangifera indica*
Pisolithus albus	CMU53-220-2	HQ687220	Muang, Chiang Mai	15 June 2010	*Eucalyptus camaldulensis*
Scleroderma sinnamariense	CMU53-210-2	HQ687222	Muang, Chiang Mai	23 May 2010	*Cinnamomum bejolghota*

Cultivation was performed in the dark at 30 °C with shaking at 150 rpm on a reciprocal shaker. After 20 days of incubation, the cultures were centrifuged at 11,000 rpm for 15 min to harvest the supernatant.

Optimal conditions of fungal IAA production

All scerodermatoid fungi were studied to identify the optimum conditions for IAA production, including temperature, L-tryptophan concentration and incubation period. The effects of temperature on IAA produced by the fungus were determined by inoculating each fungal isolate into medium with 2 mg ml^{-1} of L-tryptophan and incubating in the dark at 20, 25, 30, 35, 40 and 45 °C on the shaker for 20 days. After incubation, the biomass and IAA production were estimated.

Different concentrations of L-tryptophan (0, 2, 4, 6, 8 and 10 mg ml^{-1}) were added to the medium to determine the maximum amount of IAA produced by each of the tested fungi. The amount of fungal IAA was determined after each isolated fungus was cultured at 30 °C with shaking for 20 days. The concentrations of L-tryptophan that presented the highest levels of IAA were selected for further experiments.

The effects of incubation period on IAA production were determined. Cultivation was performed in the dark at 30 °C with shaking at 150 rpm for 60 days. The fungal supernatant was harvested and evaluated for IAA concentration every five days during incubation periods.

Extraction of fungal IAA

The supernatants were extracted using two volumes of ethyl acetate, according to the method described by Ahmad et al. (2005). The ethyl acetate fraction was evaporated until dry using a rotary evaporator. The crude extracts were dissolved in 1.0 ml of 75 % methanol and 1 % acetic acid (pH 4.5), and kept at −20 °C.

Detection and quantification of fungal indole

Colorimetric assay

The production of IAA of all fungi was determined according to the colorimetric assay (Tsavkelova et al. 2007). For IAA production screening, one milliliter of the supernatant was mixed with 2 ml of Salkowski's reagent (1 ml of 0.5 M $FeCl_3$ in 50 ml of 35 % $HClO_4$) and incubated in the dark for 30 min. A pink to red color was considered positive for IAA production.

Thin layer chromatography

The crude fungal IAA was applied to thin layer chromatography (TLC) plates (Silica gel G F254, thickness 0.25 mm, Merk, Germany) and developed in chloroform:methanol:water (84:14:1). Spots with R_f values identical to authentic IAA were identified under UV light (254 nm) and sprayed with Ehmann's reagent and Salkowski's reagent (Ehmann 1977).

High performance liquid chromatography

High performance liquid chromatography (HPLC) analysis also was used to determine IAA production by fungi, according to the method described by Chung et al. (2003). The samples were analyzed using Shimadzu Prominence UFLC system equipped with LC-20 AD pump, SIL-20ACHT autosampler, CTO-20 AC column oven, CBM-20A system controller and SPD-20A UV/VIS detector (Shimadzu, Japan), as well as a Mightysil RP-18 (250× 4.6 mm, 5 μm) column, used at 40°C. The mobile phase was 45 % solvent A (1 % acetic acid) and 55 % solvent B (100 % methanol). The flow rate was set to 0.5 ml min^{-1}, and the injection volume was 10 μl. The detection wavelength was 280 nm. The presence of IAA was confirmed by retention time and co-injection (spiking with an authentic IAA standard). A standard curve was constructed with different levels of authentic IAA standard. Fungal IAA was quantified by correlating peak area of sample extract and calibration curve.

Biological assay of fungal IAA

Coleoptile elongation and seed germination assays were used to investigate the biological activity of crude fungal IAA compared with standard IAA (Zhao et al. 1992; Ahmad et al. 2005; Khamna et al. 2010; Chutima and Lumyong 2012). Crude fungal IAA was dissolved in 0.5 ml of 0.1 N

NaOH, then diluted with sterile distilled water as 40 μg ml^{-1} before use. IAA stock solution 40 μg ml^{-1} was used as the positive control, and sterile distilled water was used as the negative control. Three replications were made for each experiment.

Coleoptile elongation

Oat (*Avena* sp.) and rice (*Oryza sativa*) coleoptiles were used in disc bioassay of coleoptile elongation. Seeds were surface sterilized by 0.05 % sodium hypochlorite in sterile water for 3 min, followed by sterile distilled water for 30 s and 70 % ethanol for 30 s. The sterile seeds were placed on a sponge saturated with sterile distilled water, and grown in the dark at 25 °C. After 3 days, the apical 1.5−2.0 mm of each coleoptile was removed, and coleoptile segments of rice and oat were adjusted to 5.0 and 10.0 mm lengths, respectively. Sections of coleoptiles were floated in distilled water for 2 h before use. One milliliter of each solution to be tested was pipetted onto a 4-cm diameter filter paper disc. For each treatment, ten coleoptile segments were placed on filter paper discs in a 9-cm Petri dish and then incubated in the dark at 25 °C. After 24 h, the length of the coleoptile segments was measured.

Seed germination

Seeds of black kidney bean (*Bruguiera parviflora*) and corn (*Zea mays*) were used in this experiment. Seeds were surface-sterilized by soaking in 0.2 % Tween 80 and 5 % NaClO solution for 5 min, followed by a thorough rinsing in sterile-distilled water. The surface-sterilized seeds were soaked in 250 ml water with 40 μg ml^{-1} of each IAA solution for 24 h, with three replicates of 100 seeds per treatment, and then sown in plastic pots (11 cm height and 15 cm width) with sterile sand:soil (1:1, v/v), pH 6.8. All pots were maintained in a greenhouse during March−April, 2012 with a daytime temperature range of 28−37°C and a relative humidity range of 57−70%. After one week, the percentage of seed germination was calculated and the lengths of roots were measured.

Determination of solubilization ability and metal tolerance

This experiment was carried out using MMN medium, pH 6.0, with the addition of insoluble metal minerals including $CdCO_3$, $CoCO_3$, $CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$, $2Pb(CO_3) \cdot Pb(OH)_2$ and $ZnCO_3$ at various final concentrations, ranging from 0 to 15 mM, according to the method described by Fomina et al. (2005). The components of MMN medium were dissolved in deionized water and autoclaved at 121 °C for 15 min. After autoclaving, metal minerals dissolved in sterilized deionized water were added by filtration on a 0.45 μm membrane under sterile conditions, to avoid formation of precipitates. For each experiment, 25 ml of test media was poured into Petri dish and a sterilized cellophane disc was placed on the surface of the test media. Mycelial inocula were prepared by growing on MMN medium at 30 °C in darkness for 3 weeks. Mycelial plugs (5 mm diameter) from the periphery of the growing colony were then used to inoculate the center of the media. All plates were sealed with Parafilm and incubated at 30 °C in darkness for 1 month. Colony diameter and solubilization zone (halo zone) were measured. Solubilization index (SI) was calculated as a halo zone diameter divided by a fungal colony diameter (Vitorino et al. 2012). SI values of less than 1.0, between 1.0 and 2.0, and more than 2.0 were low, medium and high solubilization activities, respectively. In addition, the covered cellophane discs of each experiment were removed, dried at 60 °C for 48 h and maintained in desiccators for 20 min before weighing. Dried mycelia were weighed, and tolerance results were expressed in terms of a tolerance index (Fomina et al. 2005). Tolerance index (TI) was calculated as dry weights of fungal biomass of treated mycelium divided by dry weights of fungal biomass of control mycelium, and was expressed as percentages. TI values less than 50 % indicated a growth inhibition effect.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) by SPSS program version 16.0 for Windows, and Duncan's multiple range test was used for significant differences ($P<0.05$) between treatments.

Results

Identification of sclerodermatoid fungi

The ITS regions from rDNA sequence analyses of pure culture of tested fungi were obtained and compared with GenBank database. The aligned data set of these 38 sequences consisted of 562 characters, of which 171 characters were constant, 29 variable characters were parsimony uninformative, and 362 characters were parsimony informative. Heuristic searches resulted in a tree length of 1,691 steps, CI=0.506, RI=0.772, RC=0.391 and HI=0.494. One of the maximum-parsimony trees is shown in Fig. 1. Phylogenetic analyses indicated that *Boletineae*, *Suillineae* and *Sclerodermatineae* are subordinate levels of the order *Boletales*, with 100 % bootstrap support. All of the sclerodermatoid fungi isolates were confirmed as members of the suborder *Sclerodermatineae*, which formed a sister group to suborder *Suillineae* (60 % bootstrap support). The four sclerodermatoid fungi in this study belonged to the families *Astraeaceae* (clade 1), *Boletinellaceae* (clade 4), *Pisolithaceae* (clade 2) and *Sclerodermataceae* (clade 3). Two sclerodermatoid fungi, CMU53-110-7 and CMU53-210-2 were closely related

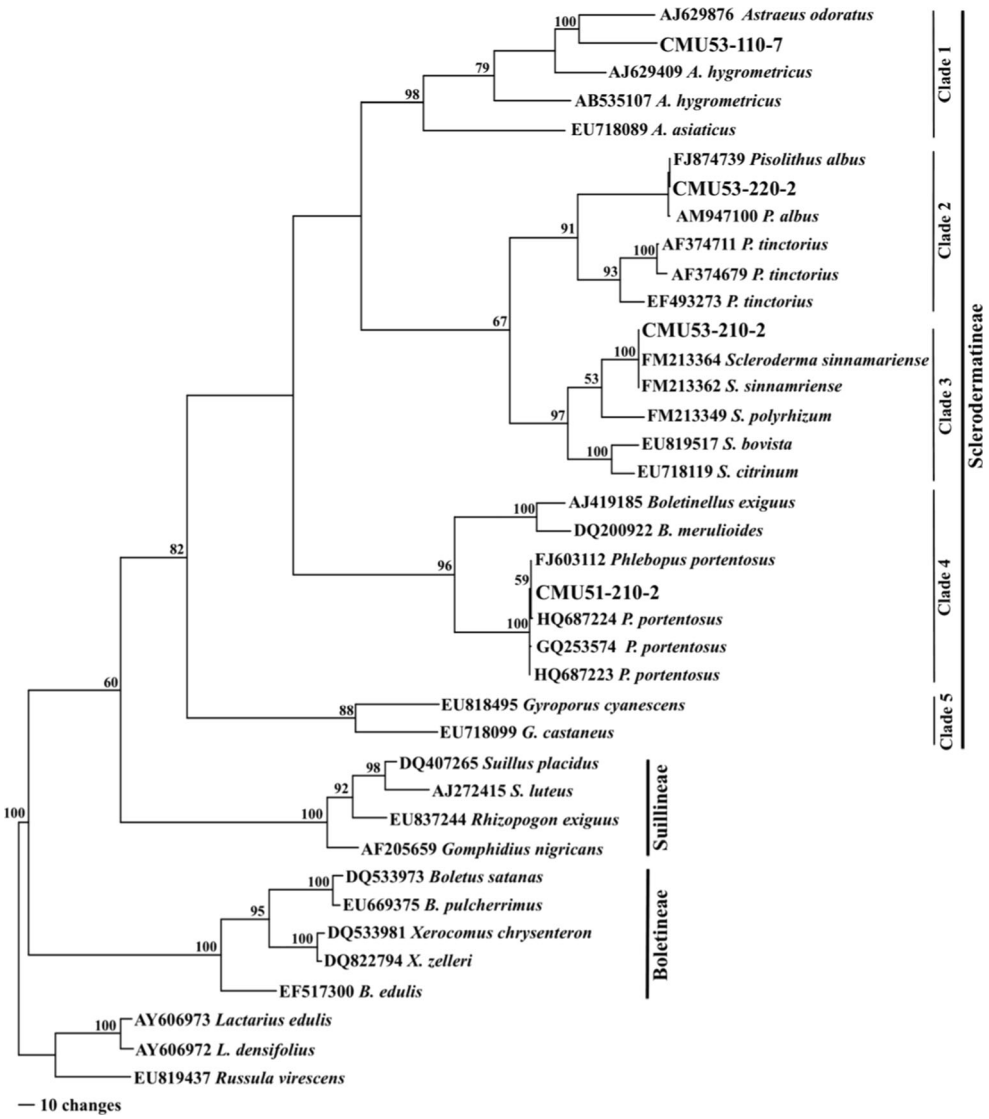


Fig. 1 Maximum-parsimonious trees inferred from a heuristic search of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA sequence alignments of 38 taxa. *Lactarius densifolius*, *L. edulis* and *Russula virescens* were used to root the tree. Branches with bootstrap values ≥ 50 % are shown at each branch and the bar represents ten shown substitutions per nucleotide position

(100 % bootstrap support) to *Astraeus odoratus* and *Scleroderma sinnamariense*, respectively. The fungus isolate CMU51-210-2 was closely related to *Phlebopus portentosus*, and the remaining fungus isolate CMU53-220-2 was closely related to *Pisolithus albus*. The phylogenetic tree that was constructed was also concordantly supported by each morphological characteristic of each tested sclerodermatiod fungi.

Detection and quantification of fungal IAA

Under culture conditions, all isolates of sclerodermatoid fungi were able to grow and were IAA positive when tested by Salkowski's reagent, as indicated by the formation of red color, while a culture filtration of *Scleroderma sinnamariense* showed a red-pink color. In addition, uninoculated medium showed a negative reaction. Thin layer chromatography (TLC) technique was used to detect fungal IAA. The TLC chromatogram of ethyl acetate extract from scerodermatoid fungi and standard IAA showed the same R_f value (0.48) under UV light, and presented a clear bluish-violet spot and red spot with Ehmann's reagent and Salkowski's reagent, respectively. The uninoculated medium extract did not have an IAA spot.

High performance liquid chromatography analysis was conducted to more precisely identify the fungal IAA. The analysis of ethyl acetate extract from all scerodermatoid fungi indicated the presence of fungal IAA that corresponded to the authentic IAA standard, with a retention time of 10.1 min and a maximum absorption at 279 nm. Moreover, the identity of fungal IAA was confirmed by a co-injection with the reference standard. No corresponding peak of IAA was identified in the culture extract without fungus (data not shown). The fungal IAA levels were also quantified by HPLC. *Pisolithus albus* showed the highest IAA production (33.68±0.98 μg ml^{-1}), followed by *Phlebopus portentosus* (20.45±1.13 μg ml^{-1}) and *Astraeus odoratus* (15.93±1.03 μg ml^{-1}). *Scleroderma sinnamariense* showed the lowest IAA production (12.84±1.32 μg ml^{-1}).

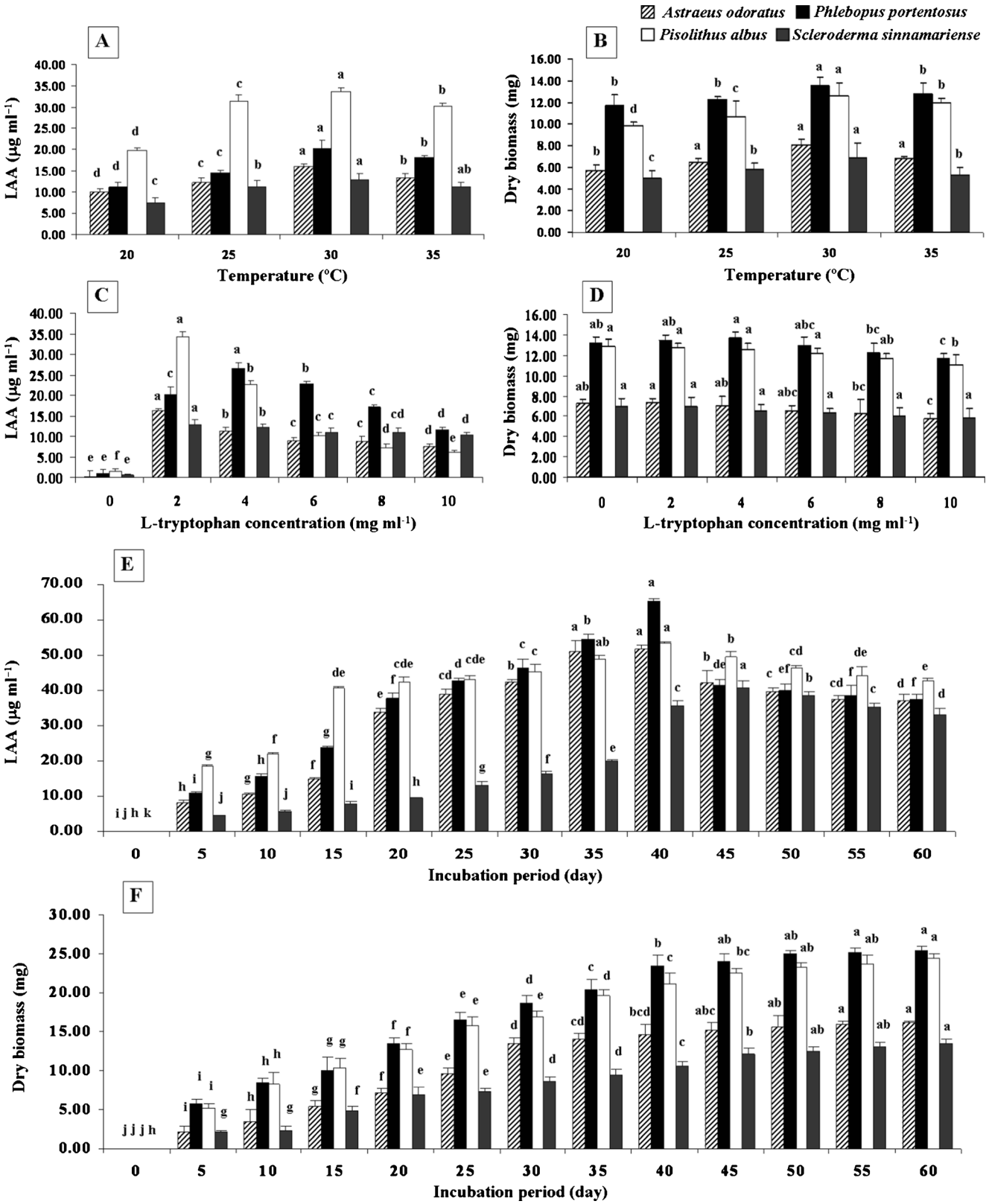


Fig. 2 Effect of temperature on fungal IAA production (**a**) and biomass (**b**). Effect of L-tryptophan concentration on fungal IAA production (**b**) and biomass (**c**). Effect of incubation period on fungal IAA production (**e**) and biomass (**f**). Data are means of three replicates. Error bar at each point indicates ± SD. Different letters above each graph indicate the significant difference ($P<0.05$)

Optimal conditions of fungal IAA production

Temperature affected IAA production and fungal growth (Fig. 2a, b). All fungal isolates produced IAA, with a temperature range of 25−35°C. The maximum dry biomass and IAA yield of all fungi were determined at 30 °C, which was the optimum temperature. All fungi did not grow at 40 and 45 °C. *Pisolithus albus* showed the highest IAA yield (33.75± 0.78 μg ml^{-1}), whereas *Scleroderma sinnamariense* showed the lowest IAA yield (12.92±1.45 μg ml^{-1}).

The IAA yield and dry biomass yield of all sclerodermatoid fungi in different L-tryptophan concentrations is presented in Fig. 2c and d, respectively. The maximum IAA yields of *Astraeus odoratus* (16.24±0.59 μg ml^{-1}), *Pisolithus albus* (34.32±1.12 μg ml^{-1}) and *Scleroderma sinnamariense* (12.87 ±1.24 μg ml^{-1}) were detected when 2 mg ml^{-1} of L-tryptophan was added in MMN medium. However, *Phlebopus portentosus* produced its maximum IAA yield (26.45±1.45 μg ml^{-1}) in MMN medium supplemented with 4 mg ml^{-1} of L-tryptophan.

The effect of incubation period on IAA production was investigated for each sclerodermatoid fungus. The results indicate that the greatest amount of fungal IAA was produced when fungi were grown in stationary phase, and then slowly decreased (Fig. 2e, f). The maximum IAA production yields by *Astraeus odoratus* (51.70±0.90 μg ml^{-1}) and *Pisolithus albus* (53.45±0.35 μg ml^{-1}) were found on day 40 of culturing in MMN medium supplemented with 2 mg ml^{-1} of L-tryptophan and incubating in the dark at 30 °C on a shaker, while a maximum IAA production of *Scleroderma sinnamariense* (40.76±2.10 μg ml^{-1}) was found on day 45. Furthermore, the maximum IAA yield produced by *Phlebopus portentosus* (65.29±1.17 μg ml^{-1}) was detected after 40 days cultivation in MMN medium with 4 mg ml^{-1} of L-tryptophan, which was the highest when compared to yields of other fungi in this study.

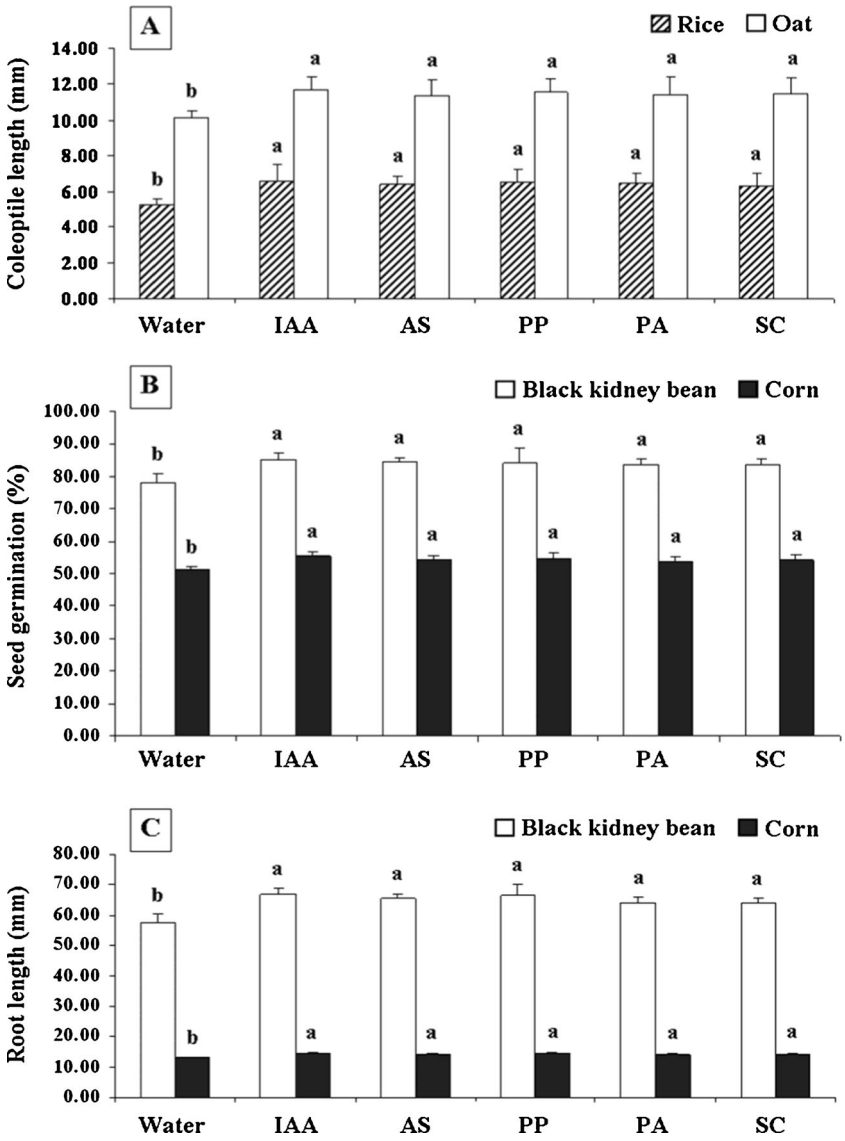


Fig. 3 Biological assay of crude fungal IAA. **a** Coleoptile elongation of oat and rice. **b**, **c** Seed germination of black kidney bean and corn. **b** Percentage of seed germination. **c** Root length. Data are means of three replicates. Error bar at each point indicates ± SD. Different letters above each graph indicate the significant difference ($P < 0.05$). *Water* water treatment; *IAA* IAA standard treatment; *AS* crude IAA of *Astraeus odoratus* treatment; *PP* crude IAA of *Phlebopus portentosus* treatment; *PA* crude IAA of *Pisolithus albus* treatment; *SC* crude IAA of *Scleroderma sinnamariense* treatment

Biological assay of fungal IAA

Coleoptile elongation

Elongation growth of oat and rice coleoptile segments induced by crude fungal IAA is presented in Fig. 3a. The length of oat coleoptile treated with crude IAA extract of *Astraeus odoratus* (11.38±0.88 mm), *Phlebopus portentosus* (11.57±0.75 mm), *Pisolithus albus* (11.41±1.02 mm), *Scleroderma sinnamariense* (11.47±0.87 mm) and IAA standard (11.66 mm±0.78 mm) were not statistically different, but they were significantly higher than for the water treatment (10.13±0.41 mm). Moreover, the rice coleoptile segment length treated with crude IAA extract of each sclerodermatoid fungi and IAA standard were similar, but longer than for the water treatments (Fig. 3a).

Seed germination

The highest percentages of seed germination and root length of both black kidney bean and corn seeds were obtained in IAA standard (40 μg ml^{-1}) treatment. However, the percentages of seed germination and root length of both plants after treated with crude fungal IAA solution were not significantly different compared with the IAA standard, but were higher than for the water treatment (Fig. 3b, c).

Determination of solubilization ability and metal tolerance

The ability to solubilize insoluble metal minerals depended on both fungal strain and insoluble minerals. Some fungi produced a solubilization zone in the agar that was larger than the fungal colony (Fig. 4a–c), while the solubilization zones were also found beneath the fungal colonies (Fig. 4d–f). However, not all fungi that were tested were able to produce the solubilization zone for $CoCO_3$. The solubilization activity of the tested fungi were reported in terms of a solubilization index (SI), and are shown in Fig. 5. The results show that the SI value of all tested fungi decreased when increasing the concentration of the insoluble minerals. In the presence of $CdCO_3$, the solubilization activity of *Phlebopus portentosus* was characterized as medium (1<SI<2) in concentration 1.0 −5.0 mM, while *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense* showed a low (SI<1) solubilization activity (Fig. 5a). *Phlebopus portentosus* showed a higher SI value than the other tested fungi at the same $CdCO_3$ concentration. All fungi showed a low solubilization activity for $CuCO_3$ and $2Pb(CO_3)\cdot Pb(OH)_2$ solubilizations (Fig. 5b, c). In the $ZnCO_3$ treatment, *Phlebopus portentosus* and *Scleroderma sinnamariense* showed high solubilization activity at concentrations 1.0−4.0 mM and 1 mM, respectively (Fig. 5d).

The toleration index (TI) of each fungus is shown in Fig. 6. It was found that the TI varied in different types and concentrations of metal minerals, and between fungal species. Toleration index of all tested fungi decreased when the concentration of the insoluble minerals increased. In $CoCO_3$ treatment, the toleration index of *Scleroderma sinnamariense* was higher than for the other tested fungi at the same concentration, and the maximum concentration for all fungal growth was observed at 2.0 mM, except for *Pisolithus albus* (Fig. 6a). The analysis showed that the growth of all tested fungi was inhibited (TI<50 %) by $CdCO_3$ and *Phlebopus portentosus* showed the highest growth tolerance on Cd-containing medium at 6.0 mM, followed by *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense* at 4.0 mM (Fig. 6b). In treated $CuCO_3\cdot Cu(OH)_2$, *Pisolithus albus* showed

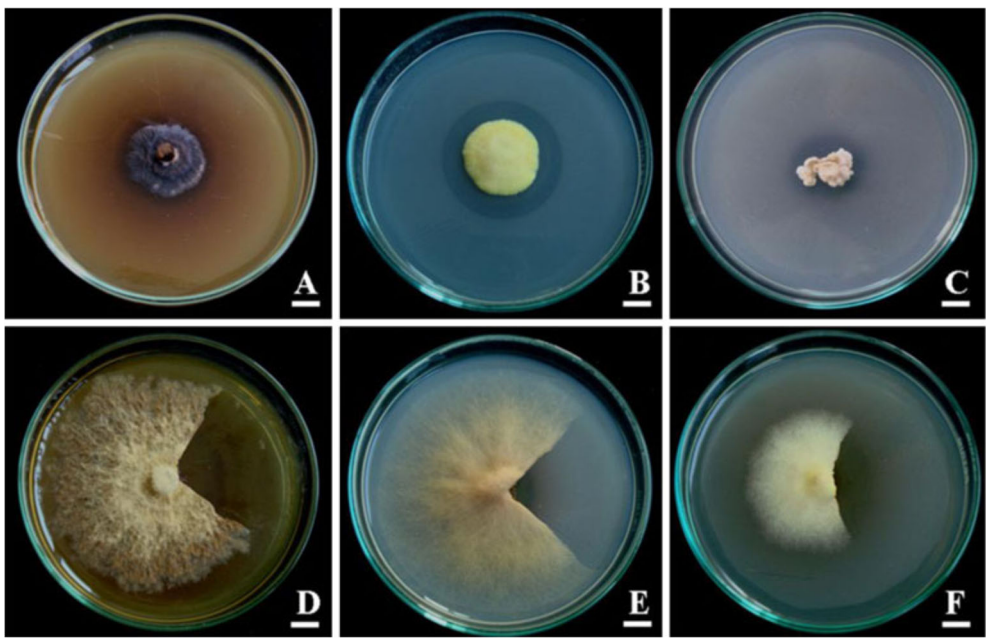


Fig. 4 Solubilization of toxic metal minerals in agar media. **a** $CdCO_3$ solubilization by *Phlebopus portentosus*. **b**, **c** $ZnCO_3$ and $2Pb(CO_3)\cdot Pb(OH)_2$ solubilization by *Scleroderma sinnamariense*, respectively. **d** $CuCO_3$ solubilization by *Phlebopus portentosus*. **e**, **f** $ZnCO_3$ and $CdCO_3$ solubilization by *Pisolithus albus*, respectively. Bar=10 mm

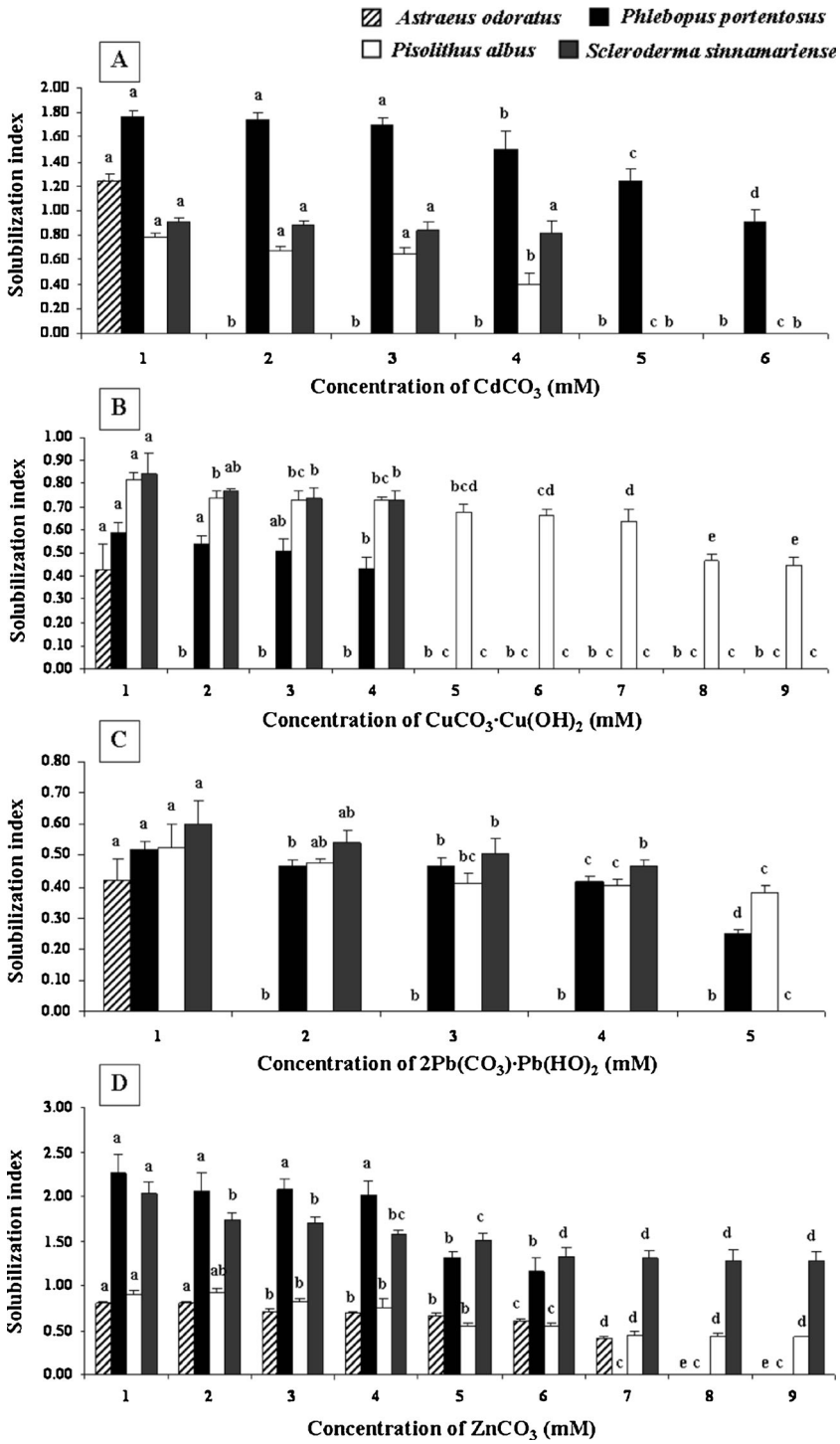
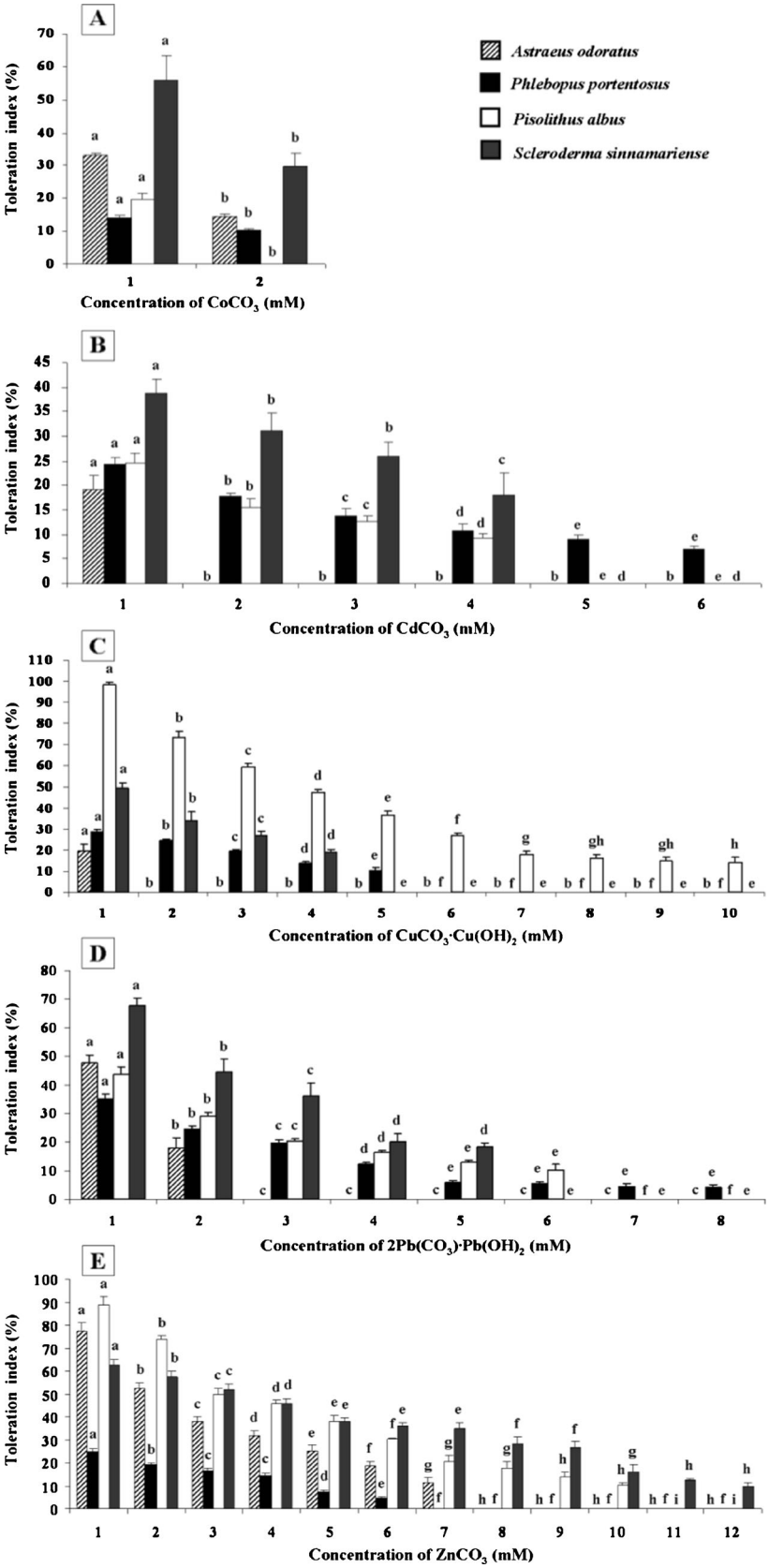


Fig. 5 Solubilization index of four sclerodermatoid fungi. a $CdCO_3$. b $CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$. c $CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$. d $2Pb(CO_3) \cdot Pb(OH)_2$. e $ZnCO_3$. Data are means of three replicates. Error bar at each point indicates ± SD. Different letters above each graph indicate the significant difference ($P<0.05$)

a higher TI value than the other tested fungi at the same concentration, and the maximum concentration for growth on Cu-containing medium was found at 10.0 mM (Fig 6c). The presence of $2Pb(CO_3) \cdot Pb(OH)_2$ in the medium affected the growth of all fungi, which was seen with a TI value less than 50 %, except for *Scleroderma sinnamariense* at 1.0 mM, which showed a TI index of 67.62±2.91 % (Fig. 6d). *Phlebopus portentosus* showed the highest growth tolerance on Pb-containing medium at 8.0 mM, followed by *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense* at 6.0 mM and *Astraeus odoratus* at 2.0 mM. The presence of $Zn(CO_3)$ affected the growth of *Phlebopus portentosus* (TI<50 %) at all tested concentrations (Fig. 6e). The highest growth tolerance on Zn-containing medium was found in *Scleroderma sinnamariense* at 12.0 mM, followed by *Pisolithus albus* at 10.0 mM and *Astraeus odoratus* at


A
Astraeus odoratus
Phlebopus portentosus
Pisolithus albus
Scleroderma sinnamariense
Toleration index (%)
Concentration of $CoCO_3$ (mM)
B
Toleration index (%)
Concentration of $CdCO_3$ (mM)
C
Toleration index (%)
Concentration of $CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$ (mM)
D
Toleration index (%)
Concentration of $2Pb(CO_3) \cdot Pb(OH)_2$ (mM)
E
Toleration index (%)
Concentration of $ZnCO_3$ (mM)

◀ **Fig. 6** Tolerance index of four sclerodermatoid fungi. **a** $CoCO_3$. **b** $CdCO_3$. **c** $CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$. **d** $2Pb(CO_3) \cdot Pb(OH)_2$. **e** $ZnCO_3$. Data are means of three replicates. Error bar at each point indicates ± SD. Different letters above each graph indicate the significant difference ($P<0.05$)

7.0 mM. *Astraeus odoratus* showed the lowest growth tolerance for all the toxic metals that were tested.

Discussion

The present study demonstrated that pure cultures of *Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense* showed IAA production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance abilities in vitro. Based on fungal identification by the ITS regions of rDNA sequences, the tested fungi were similar to several taxonomic studies, and were sclerodermatiod fungi within the suborder *Sclerodermatinae*, order *Boletales*, one of the major groups of ectomycorrhizal fungi represented in most forest ecosystems worldwide (Binder and Hibbett 2006; Watling 2006; Wilson et al. 2011).

All tested sclerodermatiod fungi produced IAA in liquid medium supplemented with L-tryptophan, with the level ranging from 12.84 to 33.68 μg ml^{-1}. This result is similar to previous studies that showed that pure cultures of ectomycorrhizal fungi could produced IAA in vitro after being cultured in medium supplemented with L-tryptophan, and that the efficiency of IAA production differs between distinct isolates of ectomycorrhizal fungi (Rudawska and Kieliszewska-Rokicka 1997; Karabaghli et al. 1998). However, this is the first report that describes the IAA produced by *Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense*. Moreover, all tested fungi produced the higher level of IAA when compared with previous reports of in vitro IAA production (0.012−1.58 μg ml^{-1}) from other ectomycorrhizal fungi (Strelczyck et al. 1977; Ek et al. 1983; Strelczyck and Pokojska-Burdziej 1984; Frankenberger and Poth 1987; Gay et al. 1989; Niemi et al. 2002).

The temperature, L-tryptophan concentration and incubation period affected fungal growth and IAA production. In this study, the optimal temperature for fungal growth and IAA production of all tested fungi was 30 °C, which showed both the highest biomass and IAA yields. This result is similar to previous reports that changes in temperature significantly affect microbial growth as well as the IAA biosynthesis (Yurekli et al. 2003; Khamna et al. 2010; Apine and Jadhav 2011). Previously studies reported that ectomycorrhizal fungi, such as *Amanita muscaria*, *Hebeloma hiemale*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius, Suillus luteus*, *Suillus bovinus* and *Rhizopogon luteolus*, produced IAA with temperature ranging from 22−25 °C (Strelczyck and Pokojska-Burdziej 1984; Ek et al. 1983; Gay et al. 1989; Niemi et al. 2002). Our results indicate that *Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense* can produce IAA at higher temperature than other ectomycorrhizal fungi previously reported on. Based on our results, the level of fungal IAA production varied for different L-tryptophan concentrations and fungal species, and decreased after the optimum concentration of L-tryptophan was reached. This result is similar to previous reports. For example, the levels of IAA produced by *H. hiemale* and *Colletotrichum acutatum* increased with increasing L-tryptophan concentration and decreased after the concentration of L-tryptophan reached 0.2 and 1.0 mg ml^{-1}, respectively (Gay et al. 1989; Chung et al. 2003). Ghosh and Basu (2006) showed that IAA production of the symbiont isolate *Rhizobium* sp. simultaneously increased with the concentration of L-tryptophan up to 2 mg ml^{-1}, and higher concentrations were inhibitory. Recently, the maximum level of IAA produced by orchid mycorrhizal fungi, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Tulasnella* spp. was reported in liquid medium supplemented with 4 mg ml^{-1} of L-tryptophan, and the IAA level decreased when using the higher concentration of L-tryptophan (Chutima and Lumyong 2012). This study found that IAA yield of the tested fungi varied for different fungal species and incubation periods, and the maximum IAA production was found when fungi were grown in a stationary phase. This result is supported by previous reports showing that the production of IAA varies greatly among different microbial species, and is also correlates with L-tryptophan availability in the culture medium and microbial growth stage; the level of IAA increased when the microbial growth rate increased (Hasan 2002; Ghosh and Basu 2006; Apine and Jadhav 2011; Chaiharn and Lumyong 2011). Moreover, Chutima and Lumyong (2012) reported that the maximum IAA production by orchid mycorrhizal fungi was found when fungi were grown in a stationary phase, and then slowly decreased as the fungi reached a death phase.

Our results indicate that both oat and rice coleoptile segments responded to crude IAA of sclerodermatoid fungi, which promoted elongation. Similarly, IAA production by the ectomycorrhizal fungus *Suillus variegatus* in culture filtrates simulated oat coleoptile segment elongation (Tomaszewski and Wojciechowska 1975). In addition, IAA produced by *C. gloeosporioides* and *Tulasnella* spp. could significantly increase the length of rice coleoptile segments (Chutima and Lumyong 2012). Moreover, the crude fungal IAA could promote plant-growth based on seed germination and root length. This result is in accordance with previous studies' findings that IAA produced by microorganisms (e.g. bacteria such as *Azotobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* sp., *Streptomyces* sp. and fungi such as *C. gloeosporioides*, *Tulasnella* sp. and *Fusarium oxysporum*) can improve the percentage of seed germination and root length of tested plants (Hasan 2002;

Ahmad et al. 2005; Khamna et al. 2010; Ahemad and Khan 2010, 2012; Chutima and Lumyong 2012).

Ectomycorrhizal formation is known to induce changes in root morphology through fungal phytohormones (Strelczyck and Pokojska-Burdziej 1984; Barker and Tagu 2000). Moreover, hypaphorine (an indole alkaloid) and IAA counteracted in controlling root hair elongation during ectomycorrhizal development between eucalyptus and *Pisolithus tinctorius*, which inhibited and stimulated root hair growth, respectively (Ditengou et al. 2000). Splivallo et al. (2009) reported that IAA and ethylene produced by truffles act additively on plant roots to induce changes, IAA signaling was inhibitory to primary root growth and induction of root hair growth, and ethylene signaling induced lateral root formation. On the other hand, IAA production by *Pisolithus tinctorius* and *Paxillus involutus* can improve root formation and growth of Scots pine (*Pinus silvestris)* and Oregon pine (*Pseudotsuga menziesii*) (Frankenberger and Poth 1987; Niemi et al. 2002), and Elumalai et al. (2011) reported that co-inoculated with *Pisolithus tinctorius*, *Glomus fasciculatum* and *Frankia* sp. enhanced the quality and quantity of IAA both in cladodes and roots of *Casuarina equisetifolia*.

In the terrestrial environment, fungi play important roles in the biogeochemical cycle of metals and associated elements (Gadd 1993, 2004). Metals and their compounds interact with fungi in various ways, depending on the type of metal and environment, in which the structure of metal components and fungal metabolic activity influence metal solubility, mobility and toxicity (Gadd 2010; Mapelli et al. 2012). Fungi can mobilize and solubilize metals into forms available for cellular uptake and leaching from the system, e.g. complexation with organic acid, other metabolites and siderophore. Additionally, immobilization may result from sorption onto cell components and exopolymers, transport and extracellular metal sequestration, or precipitation (Meharg and Cairney 2000; Gadd 2004, 2010). In this study, pure cultures of tested sclerodermatoid fungi were able to solubilize different metal (Cd, Cu, Pb, Zn)-containing minerals, and the solubilization demonstrated very different activities for the different fungal strains and minerals; this is similar to the previous reports. For example, ectomycorrhizal cultures of *Cenococcum geophilum*, *Laccaria laccata*, *Lactarius turpis*, *Paxillus involutus* and *Suillus bovinus* showed solubilization activity in Zn-containing media, whereas the ability of Cd-containing and Cu-containing mineral solubilization depended on strain, and Pb-containing mineral could not be solubilized (Fomina et al. 2005). The studies of Lapeyrie et al. (1991) and Gharieb and Gadd (1999) have shown the varied ability of some ectomycoorhizal fungi (e.g. *Cenococcum geophilum*, *Laccaria laccata*, *Paxillus involutus* and *Pisolithus tinctorius*) to solubilize Ca-containing minerals. Moreover, for the mechanism of solubilization of insoluble metal minerals by ectomycorrhizal fungi, it has been suggested that fungi produce and release metal chelating substances (Gadd 2004; Machuca et al. 2007). Many metals, e.g. Co, Cu and Zn, are essential micronutrients for fungal growth and development that fungi require at 10^{-6} M or less, but they can be toxic to fungi at higher concentrations (Griffin 1993; Gadd 2010). Several studies on the effect of toxic metal on ectomycorrhizal culture reported that generally, the fungal toxicity increased with increasing concentration of metal, which supports our results (Jones and Hutchinson 1988; Vodnik et al. 1998; Blaudez et al. 2000). Low concentration of Ni, Cd, Cr, Hg and Pb were strongly toxic, whereas Zn was the least toxic (Tam 1995; Fomina et al. 2005). In the present study, Zn also showed the least toxicity, but Co showed the strongest activity. Our results showed the considerable variation between toxic metal tolerances of the tested fungi, which is in accordance with previous reports that ectomycorrhizal culture metal tolerance depends on the species, the toxic metals and specific physiology (Tam 1995; Blaudez et al. 2000; Meharg and Cairney 2000; Fomina et al. 2005; Ray et al. 2005). Ectomycorrhizal fungi can act as a filtration barrier and reduce the translocation of toxic metals from plant roots to shoots, and increase the metal sorption by outer and inner components of the fungal mycelium (Gadd 1993, 2004, 2010; Rajkumar et al. 2012).

In conclusion, the sclerodermatoid fungi in this study, *Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus, Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense*, could produce IAA, which plays an important role in plant growth promotion, in vitro. All of the tested fungi could also solubilize toxic metal minerals, and this may help in selecting metal-tolerant ectomycorrhizal fungi for use in bioremediation and forest restoration in metal-contaminated areas. Further studies are needed to understand the effects of toxic metal minerals, physiology and chemical conditions on mycorrhizal association with host plants, the role of IAA in mycorrhizal association with host plants, and IAA biosynthesis by mycorrhizal association.

Acknowledgments This work was supported by grants from The Thailand Research Fund for The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0309/2550), Research Team Promotion Grant RTA5580007, Chiang Mai University and the Graduate School of Chiang Mai University. We are grateful for the help of Keegan H. Kennedy, Department of Biology, Chiang Mai University, for improving the English text.

References

Ahemad M, Khan MS (2010) Growth promotion and protection of lentil (*Lens esculenta*) againt herbicide stress by *Rhizobium* species. Ann Microbiol 60:735–745

Ahemad M, Khan MS (2012) Evaluation of plant-growth-promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide stress. Ann Microbiol 62:1531–1540

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2005) Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. Turk J Biol 29:29–34

Apine OA, Jadhav JP (2011) Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. J Appl Microbiol 110:1235–1244

Barker SJ, Tagu D (2000) The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. J Plant Growth Regul 19:144–154

Binder M, Hibbett DS (2006) Molecular systematics and biological diversification of Boletales. Mycologia 98:971–981

Blaudez D, Jacob C, Turnau K, Colpaert JV, Ahonen-jonnarth U, Finlay R, Botton B, Chalot M (2000) Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro. Mycol Res 104:1366–1371

Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph, Camberra

Chaiharn M, Lumyong L (2011) Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. Curr Microbiol 62:173–181

Chung HC, Kim DH, Lee SS (2002) Mycorrhizal formations and seedling growth of *Pinus densiflora* by in vitro synthesis with the inoculations of ectomycorrhizal fungi. Mycobiology 30:70–75

Chung KR, Shilts T, Ertürk, Timmer LW, Ueng PP (2003) Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. FEMS Microbiol Lett 266:23–30

Chung KR, Tzeng DD (2004) Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the gall-inducing fungus *Ustilago esculenta*. J Biol Sci 4:744–750

Chutima R, Lumyong S (2012) Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi. Symbiosis 56:35–44

Ditengou FA, Béguiristain T, Lapeyrie F (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. Planta 211:722–728

Ek M, Ljungquist PO, Stenstrom E (1983) Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. New Phytol 94:401–407

Ehmann A (1977) The van Urk-Salkowski reagent-a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. J Chromatogr 132:267–276

Elumalai S, Prabhakaran M, Raaman N (2011) Indole acetic acid (IAA) levels of cladodes and roots in effect of mycorrhizal and actinorhizal inoculation on *C. equisetifolia* under glasshouse condition. Recent Res Sci Tech 3:70–75

Felsenstein J (1985) Confidence intervals on phylogenetics: an approach using bootstrap. Evolution 39:783–791

Fomina MA, Alexander IJ, Colpaert JV, Gadd GM (2005) Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. Soil Biol Biochem 37:851–866

Frankenberger WTJ, Poth M (1987) Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Appl Environ Microbiol 53:2908–2913

Gadd GM (1993) Interactions of fungi with toxic metals. New Phytol 124:25–60

Gadd GM (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma 122:109–119

Gadd GM (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology 156:609–645

Gay G, Rouillon R, Bernillon J, Favre-Bonvin J (1989) IAA biosynthesis by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* as affected by different precursors. Can J Bot 67:2235–2239

Gharieb MM, Gadd GM (1999) Influence of nitrogen source on the solubilization of natural gypsum ($CaSO_4.2H_2O$) and the formation of calcium oxalate by different oxalic and citric acid producing fungi. Mycol Res 103:473–480

Ghosh S, Basu PS (2006) Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. Microbiol Res 161:362–366

Griffin D (1993) Fungal physiology, 2nd edn. Wiley-Liss, New York

Hasan H (2002) Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. Acta Microbiol Immunol Hung 49:105–118

Jentschke G, Godbold DL (2000) Metal toxicity and ectomycorrhizas. Physiol Plant 109:107–116

Jones MD, Hutchinson TC (1988) Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus* or *Scleroderma flavidum*. I. Effects on growth, photosynthesis, respiration and transpiration. New Phytol 108:451–459

Karabaghli C, Frey-Klett P, Sotta B, Bonnet M, Tacon FL (1998) In vitro effects of *Laccaria bicolor* S238N and *Pseudomonas fluorescens* strain BBc6 on rooting of de-rooted shoot hypocotyls of Norway spruce. Tree Physiol 18:103–111

Khamna S, Yokota A, Peberdy JF, Lumyong S (2010) Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. EurAsia J BioSci 4:23–32

Kumla J, Suwannarach N, Bussaban B, Lumyong S, Danell E (2012) Basidiome formation of an edible wild, putatively ectomycorrhizal fungus, *Phlebopus portentosus* without host plant. Mycologia 104:597–603

Lapeyrie F, Ranger J, Vairelles D (1991) Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. Can J Bot 69:342–346

Machuca A, Pereira G, Aguiar A, Milagres AMF (2007) Metal-chelating compounds produced by ectomycorrhizal fungi collected from pine plantations. Lett Appl Microbiol 44:7–12

Makita N, Hirano Y, Yamanaka T, Yoshimura K, Kosugi Y (2012) Ectomycorrhizal-fungal colonization induces physiomorphological change in *Quercus serrata* leaves and roots. J Plant Nutr Soil Sci 175:900–906

Mapelli F, Marasco R, Balloi A, Rolli E, Cappitelli F, Daffonchio D, Borin S (2012) Mineral-microbe interactions: biotechnological potential of bioweathering. J Biotechnol 157:473–481

Meharg AA, Cairney JWG (2000) Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. Adv Ecol Res 30:69–112

Niemi K, Vuorinen T, Ernstsen A, Häggman H (2002) Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings in vitro. Tree Physiol 22:1231–1239

Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MNV, Freitas H (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. Biotechnol Adv 30:1562–1574

Ray P, Tiwari R, Reddy UG, Adholeya A (2005) Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal in vitro. World J Microbiol Biotechnol 21:309–315

Rudawska M, Kieliszewska-Rokicka B (1997) Mycorrhizal formation by *Paxillus involutus* in relation to their IAA-synthesizing activity. New Phytol 137:509–517

Splivallo R, Fischer U, Göbel C, Feussner I, Karlovsky P (2009) Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene1. Plant Physiol 150:2018–2029

Strelczyck E, Pokojska-Burdziej A (1984) Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). Plant Soil 81:185–194

Strelczyck E, Sitek JM, Kowalski S (1977) Synthesis of auxins from tryptophan and tryptophan precursors by fungi isolated from mycorrhizae of pine (*Pinus silvestris* L.). Acta Microbiol Pol 26:255–264

Swofford DL (2002) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and 483 other methods), beta version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland

Tam PCF (1995) Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. Mycorrhiza 5:181–187

Taylor AFS, Alexander I (2005) The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. Mycologist 19:102–111

Teale WD, Paponov IA, Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. Nat Rev Mol Cell Biol 7:847–859

Thomson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25:4876–4882

Tomaszewski M, Wojciechowska B (1975) The role of growth regulators released by fungi in pine mycorrhizae. Hirokawa Publishing, Tokyo

Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AI (2007) Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiol Res 162:69–76

Van Tichelen KK, Colpaert JV, Vangronsveld J (2001) Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. New Phytol 150:203–213

Vitorino LC, Silva FG, Soares MA, Souchie EL, Costa AC, Lima WC (2012) Solubilization of calcium and iron phosphate and in vitro production of indoleacetic acid by endophytic isolates of *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae). IRJOB 3:47–54

Vodnik D, Byrne AR, Gogala N (1998) The uptake and transport of lead in some ectomycorrhizal fungi in culture. Mycol Res 102:953–958

Watling R (2006) The sclerodermatoid fungi. Mycoscience 47:18–24

White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylaor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego, pp 315–322

Wilson AW, Binder M, Hibbett DS (2011) Effect of gasteroid fruiting body morphology on diversification rate in three independent clades of fungi estimated using binary state speciation and extinction analysis. Evolution 65:1305–1322

Yurekli F, Geckil H, Topcuoglu F (2003) The synthesis of indole-3-acetic acid by the industrially important white-rot fungus *Lentinus sajor-caju* under different culture conditions. Mycol Res 107:305–309

Zaghian S, Shokri D, Emtiazi G (2012) Co-production of UV-stable bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) and indole-3-acetic acid hormone (IAA) and their optimization by Taguchi design in *Bacillus pumilus*. Ann Microbiol 62:1189–1197

Zhao ZR, Wu ZL, Huang GQ, Li GR (1992) An improved disk bioassay for determining activities of plant growth regulators. J Plant Growth Regul 11:209–213

Zhao Y (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annu Rev Plant Biol 61:49–64

Arch Microbiol (2014) 196:35–49
DOI 10.1007/s00203-013-0940-4

ORIGINAL PAPER

Comparative study of endophytic and endophytic diazotrophic bacterial communities across rice landraces grown in the highlands of northern Thailand

Chakrapong Rangjaroen · Benjavan Rerkasem · Neung Teaumroong · Rungroch Sungthong · Saisamorn Lumyong

Received: 17 February 2013 / Revised: 25 August 2013 / Accepted: 4 November 2013 / Published online: 22 November 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Communities of bacterial endophytes within the rice landraces cultivated in the highlands of northern Thailand were studied using fingerprinting data of 16S rRNA and *nifH* genes profiling by polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis. The bacterial communities' richness, diversity index, evenness, and stability were varied depending on the plant tissues, stages of growth, and rice cultivars. These indices for the endophytic diazotrophic bacteria within the landrace rice Bue Wah Bo were significantly the lowest. The endophytic bacteria revealed greater diversity by cluster analysis with seven clusters compared to the endophytic diazotrophic bacteria (three clusters). Principal component analysis suggested that the endophytic bacteria showed that the community structures across the rice landraces had a higher stability than those of the endophytic diazotrophic bacteria. Uncultured bacteria were found dominantly in both bacterial communities, while higher generic varieties were observed in the endophytic diazotrophic bacterial community. These differences in bacterial communities might be influenced either by genetic variation in the rice landraces or the rice cultivation system, where the nitrogen input affects the endophytic diazotrophic bacterial community.

Keywords Bacterial community · Bacterial endophytes · 16S rRNA gene · *nifH* gene · Cluster analysis · Principal component analysis

Communicated by Ursula Priefer.

C. Rangjaroen · S. Lumyong (✉)
Microbiology Division, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
e-mail: scboi009@gmail.com

C. Rangjaroen
e-mail: rangjaroen@gmail.com

B. Rerkasem
Faculty of Agriculture, Lanna Rice Research and Cultural Centre, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

N. Teaumroong
Institute of Agricultural Technology, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand

R. Sungthong
Departamento de Agroquímica y Conservación de Suelos, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC), Seville 41080, Spain

Introduction

Rice landraces or local rice cultivars are often named locally and distinguished individually on the basis of their morphologies, geographies, or ecologies (Bandara et al. 2006; Bonman et al. 1992; Pusadee et al. 2009). Among a total 120 rice varieties, 90 % are the local cultivars grown annually in deep water rice areas (Oupkaew et al. 2011; Sommut 2003). In supplementary farming conditions, the rice landraces usually produce lower yields compared to the modern high-yield varieties, but their products are still sufficient for household consumption. Although the majority of locally cultivated rice landraces are cultivated by traditional or natural rice farming without any chemical inputs and pest controls, they have been able to produce reasonable yields year by year (Oupkaew et al. 2011; Parzies et al. 2004; Purnomo et al. 2005). This traditional cultivation of the rice landraces requires both specific farming practices and unique local conditions (Chakhonkaen et al. 2012; Oupkaew et al. 2011; Saito et al. 2006). Investigations have revealed that genetic diversity of the rice landraces is one

of the reasons, which enable their evolutionary adaptation and selection to those traditional practices and farming systems (McCouch 2004). Pusadee et al. (2009) reported that the genetic diversity of a landrace rice cultivar Bue Chomee grown in the villages of the highland Karen people in northern Thailand is explained with the isolation by distance model. The significant differences of genetic structure either in a single field or across fields of different villages of this rice cultivar support its genetic variation. Moreover, the authors also found that the gene flow of this rice cultivar is due to the farmers' seed sharing network. The rice landraces are not only a valuable resource for farmers who, for economic or ecological reasons, do not have access to modern, improved varieties, but also for future improvement by plant breeding. However, in addition to the sustainability of traditional rice production systems, these genetically diverse rice landraces may also have benefited from microbes associated with them.

In traditional farming systems, where fertilizers and pesticides are rarely used, the plant-associated microorganisms can play important roles in nutrients cycling and preventing attacks by phytopathogens. In general, the plant–microbe interactions may take place at the rhizosphere and/or within the plant tissues. The microorganisms that have lived for one period of their life cycle within the plant tissues without causing apparent symptoms in the host plant may be considered as microbial endophytes (Azevedo et al. 2000; Bandara et al. 2006; Kaga et al. 2009; Mano and Morisaki 2008; Loaces et al. 2011). The different *in planta* roles of the microbial endophytes so far described such as nitrogen fixation (Wartiainen et al. 2008; Prakamhang et al. 2009), production of phytohormones (Arun et al. 2012; Feng et al. 2006), production of ACC-deaminase to reduce the level of ethylene (Tittabutr et al. 2008; Jha et al. 2012), and siderophore production (Loaces et al. 2011).

There are many reports demonstrated that several endophytic bacteria are living in plant tissues of rice such as *Bukholderia, Herbaspirillum, Rhizobium, Methylobacterium,* and *Bacillus* in root (Mano et al. 2007; Verma et al. 2004), *Azospirillum* and *Herbaspirillum* in stem (Koomnok et al. 2007; Mano and Morisaki 2008), and *Pantoea, Bacillus*, and *Sphingomonas* in seed (Kaga et al. 2009; Mano and Morisaki 2008; Mano et al. 2007). Some of these are diazotrophic bacteria, which are able to fix atmospheric nitrogen and to transform it to ammonium (NH_4+) that are further to amino acid that required for growth and reproduction of rice. Recently, an evidence suggested that rice's genotypes and stages of growth together with nitrogen level and soil processing influence the plant–microbe association of *Azospirillum* sp. strain B510 (Sasaki et al. 2010). A similar study of nitrogen-fixing bacterium *A. caulinodans* was conducted by Van Nieuwenhove et al. (2000). The authors found that this bacterium requires an inoculum carrier plant *Sesbania rostrata* for its long-term survival and greater persistence in the paddy rice rhizosphere. Moreover, the difference of rice varieties has no influence on both survival and nitrogenase activity of this bacterium. However, little is known about the complex community of endophytic and endophytic diazotrophic bacteria that live in association with high-genetic-variation rice landraces cultivated in highland areas.

Molecular techniques based on finger printing data have been applied worldwide for analysis of diverse microbial communities. Among these tools, polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis (PCR–DGGE) is an acceptable and consistent approach to evaluate the community structures of various microorganisms living in association with rice plants (García de Salamone et al. 2010; Hardoim et al. 2011; Jia et al. 2007). In this study, we aim to compare the community structures of endophytic bacteria and endophytic diazotrophic bacteria living in different plant tissues of five highland rice landraces at different stages of growth. The 16S rRNA gene was selected for the evaluation of the total bacterial endophytes, while the *nifH* gene was used for the endophytic diazotrophic bacteria. The finger printing data of both genes were profiled by PCR–DGGE. The influencing factors that affect the bacterial communities within the rice landraces are addressed and discussed in this article.

Materials and methods

Collection and preparation of rice samples

Highland rice landrace—Bue Polo (BP), Bue Pra Taw (BPT), Bue Pra Do (BPD), and Bue Saw Mi (BSM)—were collected from fields farmed without chemical input, except for a cultivar Bue Wah Bo (BWB) that was collected from nitrogen fertilizer-supplied fields (Table 1). All rice cultivars were cultivated in a farm at Chom Thong District, Chiang Mai, Thailand. This area was established since 2005, aiming to grow several crops including the rice landraces for household consumption of nearby villagers. The location of each collected site was recorded by GPS (GPS-12XL, Garmin, Kansas, USA). The rice samples were collected in 2010, when the mean of rainfall of Chiang Mai was 1,156 mm with 112 rainy days (data reported by the Thai Meteorology Department in 2010). Four growth stages including pre-planting in April (only mature rice seeds), nursery seedlings in June, vegetative plants in August, and reproductive cultivars in September were sampled. Mature rice seeds were obtained directly from the farmers, while 10 rice plants were randomly taken from the field of each rice cultivar and kept (not exceeding 12 h) in an icebox and transferred to the laboratory, where they were gently

Table 1 Sampling locations and conditions of the rice landraces grown in highland of northern Thailand

Rice cultivars	Collection site	Area above sea level (m)	Chemical fertilized
Bue Polo (BP)	N 18.38958 E 098.50671	1,191	No
Bue Pra Taw (BPT)	N 18.39079 E 098.51444	1,194	No
Bue Pra Do (BPD)	N 18.38804 E 098.51085	1,201	No
Bue Saw Mi (BSM)	N 18.39682 E 098.51631	1,137	No
Bue Wah Bo (BWB)	N 18.38798 E 098.51092	1,199	Applied with N–P–K (46–0–0) of 6.25 g/m^2 in nursery stage

washed with tap water and rinsed several times with sterilized water. The rice plant tissues including leaf, stem, and root were excised into 2–3 cm length. The rice grains of the reproductive stage were removed directly from the ear of rice. Each sample derived from 10 plants at the same stage of growth was pooled together and surface sterilized following the method described by Koomnok et al. (2007).

Extraction of total DNA from plant materials

Total DNA was extracted from the surface sterilized tissue of the rice using a modified potassium acetate method (Dellaporta et al. 1983). Briefly, the rice tissue was ground in liquid nitrogen and transferred into sterilized 1.5-mL microcentrifuge tube. Pre-heated extraction buffer (720 μL) containing 100 mM Tris–HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, and 1.25 % (w/v) SDS was added and mixed before incubation at 65 °C for 20 min. Proteins were precipitated by adding 225 μL of 5 M potassium acetate and cooling on ice for 20 min before the decanting supernatant into a new tube. Remaining protein residue was removed by adding an equal volume of buffer-equilibrated phenol–chloroform–isoamyl alcohol [25:24:1 (v/v/v)]. The DNA was precipitated by adding an equal volume of cold isopropanol and was washed twice with 70 % (v/v) ethanol. The DNA extraction protocol was repeated 3 times from the same pooled rice tissue. All extracted DNA from the same rice tissue was pooled together and resuspended with 30 μL of TE buffer prior to storage at −20 °C for further DNA manipulations.

PCR–DGGE analyses of 16S rRNA and *nifH* genes

Amplification of a variable region 3 of the 16S rRNA gene was performed using a pair of the universal primers [forward primer 341f (5′-CCTACGGGAGGCAGCAG-3′) with a GC-clamp, and reverse primer 534r (5′-ATTACCGCG GCTGCTGG-3′)] (Muyzer et al. 1993). The *nifH* gene was amplified using a nested PCR (Coelho et al. 2009). At the first step, the amplification was performed with the forward primer FGPH19 (5′-TACGGCAARGGTGG NATHG-3′) (Simonet et al. 1991) and the reverse primer PolR (5′-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3′) (Poly et al. 2001a), generating the PCR products of 429 bp. The second step was performed with the forward primer PolF (5′-TGCG AYCCSAARGCBGACTC-3′) (Poly et al. 2001a) with a GC-clamp and the reverse primer AQER (5′-GACGATGTA GATYTCCTG-3′) (Poly et al. 2001b). The PCR products from the same sample were pooled and purified by GeneJET™ PCR Purification Kit (Fermentas, Lithuania) following the manufacturer's instructions and stored at −20 °C before performing DGGE.

The DGGE was carried out following the manufacturer's protocol of Bio-Rad DCode® Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Briefly, 25 μL of an individual PCR product was loaded on 8 % (w/v) polyacrylamide gel with a linear gradient of 30–70 % denaturant for the 16S rRNA gene and 30–60 % denaturant for the *nifH* gene (100 % denaturant corresponds to 40 % (v/v) of formamide plus 7 M urea). Electrophoresis was performed at 130 V for 6 h at a constant temperature of 60 °C. Gels were then stained with 0.5 μg mL^{-1} ethidium bromide for 30 min. The DGGE bands profile was visualized and photographed by GeneFlash Syngene Bio Imaging (Syngene, Cambridge, UK).

Numerical analyses of PCR–DGGE bands profiling data

The DGGE bands profiling data were analyzed in different aspects for investigation of the living bacterial communities associated with the rice landraces. Mathematic parameters that describe the bacterial community in a defined habitat including richness, Shannon–Wiener diversity index, evenness, and stability were computed on the basis of number and relative intensity of the DGGE bands. The mathematical formulae of the indices were explained as following. First, a band was determined as a phylotype of any endophytic bacteria, while the richness

of a phylotype was calculated by Eq. (1) using the total difference of DGGE bands present in an individual (Fromin et al. 2002).

$$d = \frac{S-1}{\log N} \quad (1)$$

Where d is a richness of the bacterial community in a respective habitat; S is the number of different bands; N is the total number of individuals.

The Shannon–Wiener diversity index (H') was used to determine the diversity impacts of the bacterial community in any defined habitat. The H' index was calculated by Eq. (2), where P_i is the relative intensity of band i ($P_i = N_i/N$; N_i, an intensity of band i; N, a sum of all band intensities) (Shannon and Weaver 1963).

$$H' = -\sum P_i \ln P_i \quad (2)$$

The evenness (E) of the bacterial community is a proportion of the H' index divided by the natural logarithm of the richness (d) of that respective community (Asakawa and Kimura 2008), which was calculated by Eq. (3).

$$E = \frac{H'}{\ln d} \quad (3)$$

The stability (S) of the bacterial community was calculated with the formula (4), where $P_i^{\max}$is the maximum intensity of band i and n is the number of samples in the profile (Asakawa and Kimura 2008).

$$S = \frac{\sum \frac{P_i}{P_i^{\max}}}{n} \quad (4)$$

A percent proportion of the endophytic diazotrophic bacteria (N) per total number of the endophytic bacteria (T) in any respective habitat was calculated using a sum of all DGGE bands' intensities obtained from the endophytic diazotrophic bacteria (PN) divided by those obtained from the endophytic bacteria (PT), where n is the total number of all bands present in the profile (v).

$$N/T(\%) = \frac{\sum_{i=1}^{n} PN_i}{\sum_{i=1}^{n} PT_i} \times 100 \quad (5)$$

Cluster and principal component analyses

The numerical scores of the DGGE bands profiling the research data were also used to compare structural similarity between the bacterial communities that live with the rice landraces using cluster analysis. The percent similarities among the band profiles were calculated using Pearson's correlation coefficient generated by a similarity matrix. An agglomerative hierarchical clustering was performed using the unweight pair group method with an arithmetic average (UPGMA) and displayed as a dendrogram. The multiple parameters of each band profile comprised of rice plant tissue types, stages of growth and rice cultivars, were presented as a two-dimensional plot by principal component analysis (PCA), using the band intensity data. The two-dimensional plot represented the community pattern of either endophytic or endophytic diazotrophic bacteria within the rice landraces. The new generating axes of the two-dimensional plot were selected by comparing the correlation matrix based on eigenvalues and eigenvectors calculated. The percent variations in the new axes were indicated in the plot diagram. Both cluster and principal component analyses were carried out using an Excel-XLSTAT 2011 program.

DNA and protein sequencings and construction of phylogenetic trees

Representative DGGE bands were selected, marked, and excised from the DGGE gels and transferred to the sterilized 1.5-mL microcentrifuge tube. Thereafter, 20 μL of sterilized distilled water was added into each tube. The tubes were kept at 4 °C for overnight to allow the DNA to passively diffuse out of the gel strips (Prakamhang et al. 2009). Eluted DNA was used as a DNA template for the PCR amplification following the same conditions as previously mentioned, but the GC-clamp was removed from those respective primers. The amplicons were ligated into the pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA). The resultant ligated products were transformed into *Escherichia coli* JM109 competent cells. The purified plasmid DNAs of selected transformant colonies were sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). The *nifH* gene sequences were reverse translated to the protein sequences before alignment. The alignments of both 16S rRNA gene sequences and *nifH*-derived protein sequences were performed by BLASTN program (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). The phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining method using Mega 4 (Tamura et al. 2007), and confidence levels were estimated for 1,000 replicates.

Comparative study by statistical analysis

Comparisons of multiple means with standard deviations (SDs) obtained from individual mathematic parameters of both endophytic and endophytic diazotrophic bacteria living in association with different rice landraces were performed by nonparametric analysis using the SPSS 18.0 computer program (SPSS, Chicago IL, USA), with one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc tests at appropriate significant level of $P = 0.05$ or lower.

Results

Numerical analysis of bacterial communities living in rice landraces

The bacterial communities within the rice landraces were evaluated based on the PCR–DGGE profiling data. Existence and intensity of each DGGE band were recorded and used for numerical analysis of all community parameters (richness, Shannon–Wiener diversity index, evenness, and stability). These parameters varied depending on the rice cultivar, rice plant tissue, stages of growth, and husbandry conditions of the rice landraces (Table 2). The highest in both the richness and diversity index of both endophytic and endophytic diazotrophic bacterial communities was found in the root tissues of the BPT rice landrace. Higher richness and diversity indices of the endophytic bacteria were found mostly in the root tissues rather than the other rice plant tissues, while these two parameters of the endophytic diazotrophic bacteria were not constant across the rice plant tissues of every rice strain. For the nonparametric statistical comparison was carried out, the means of each mathematic parameter of the endophytic bacteria were not significantly different across the rice landraces ($P = 0.0001$). However, only the community's stability of the endophytic bacteria derived from any stages of growth of the BPD rice landrace was significantly different ($P = 0.05$) with the highest mean compared to those other rice cultivars. In case of the endophytic diazotrophic bacteria, all the community parameters obtained from the BWB rice landrace were significantly different ($P = 0.001$) to those other rice cultivars. The means of most parameters derived from this rice landrace were lower than those of the others except for the community's stability was uniformly high.

Ratios of the endophytic diazotrophic bacteria per total number of the endophytic bacteria in any conditions tested were quantified on the basis of the DGGE band's intensity (Table 2). The means of the percent proportion obtained during the cultivation periods across the rice landraces were relatively high (40.99 ± 16.20–91.68 ± 7.18 %) except for the BWB rice landrace, which showed the lowest percentage proportion of 14.33 ± 4.97–29.89 ± 23.38 %. These mean percentages found across the different stages of growth in the individual rice cultivar were not considered significantly different ($P = 0.0001$). However, these means percentages of the BWB rice landrace were significantly lower ($P = 0.01$) when compared to the other rice landraces in any stages of growth.

Community structures of bacterial endophytes in rice landraces

The DGGE bands profiling data of both bacterial communities which live in association with the rice landraces examined in this study were clustered using UPGMA (Fig. 1). There were 3 dominant DGGE bands of the endophytic bacteria found in all rice plant tissues obtained from every stages of growth (Fig. 1a). The % similarities of the endophytic bacterial communities were in the range of 34.88–95.55 %, which were categorized into seven clusters. The community structures derived from root tissues of the BPT rice landrace (cluster V) and BSM (cluster VII) grown in reproductive stage revealed unique molecular fingerprints, which separated them from the others. The endophytic bacteria within the BP rice landrace showed similar community structures, belonging to cluster II (Fig. 1a). Most of the band profiles across the different rice plant tissues or stages of growth within the same rice cultivar exhibited higher % similarities (similarity indices ≥80 %). Contrary to those observations, across the same rice plant tissues or stages of growth but looking at different rice cultivars, % similarities were much lower. For example, in cluster III (Fig. 1a), the community structures of the endophytic bacteria found in root and stem of the BPT rice landrace grown in nursery stage exhibited a relatively high similarity of 82.60 %. Similar observations were also found in cluster II (Fig. 1a) where the community structure found in stem of BPD rice landrace at nursery stage showed high similarity to those found in leaf at reproductive stage (95.55 %) and grain (88.24 %) of the same rice landrace.

In case of the endophytic diazotrophic bacteria, no dominant DGGE band was observed in all 3 clusters analyzed (Fig. 1b). Their % similarities were in the range of −1.77 to 100 %, while the high similarities (≥80 %) within the same rice cultivars could be found frequently in all clusters. However, it was clearly demonstrated that most of the community structures derived from the BWB rice landrace were separated from the others and clustered in clusters II and III (Fig. 1b). These 2 clusters were obviously different to cluster I, supported by low % similarity of 18.95 %.

The community structures of both bacteria were also viewed two-dimensionally by PCA (Fig. 2). The overall variances of data plots based on the DGGE band's intensity of these bacterial community structures influenced by the environmental factors were depicted in percent variances of axes F1 and F2. The percent variances were ranged varied depending on the rice cultivars, where F1 (49.24–59.39 %) and F2 (8.40–14.33 %) were found in the endophytic bacterial community, whereas F1 (32.29–65.26 %) and F2 (14.76–23.44 %) were found in the endophytic diazotrophic bacterial community. The community structures of the endophytic bacteria were similar across the rice landraces as the data plots were located more tightly in the graphs compared to those of the endophytic diazotrophic bacteria that exhibited a straggly distribution pattern (Fig. 2).

Table 2 Numerical comparison of the 16S rRNA and *nifH* genes obtained from endophytic bacteria of the rice landraces profiling by PCR–DGGE

Different growth stages and plant tissues of rice cultivars			16S rRNA gene				*nifH* gene				% proportion of endophytic diazotrophic bacteria
			d	*H′*	*E*	*S*	*d*	*H′*	*E*	*S*	
Pre-planting mature seed	BP		8.73	2.61	1.21	0.70	7.75	2.04	1.00	0.66	59.10 ± 19.22
	BPT		7.41	2.47	1.23	0.74	6.43	1.76	0.95	0.81	
	BPD		6.72	2.37	1.25	0.80	5.72	1.59	0.91	0.81	
	BSM		6.00	2.29	1.28	0.75	4.19	1.09	0.76	0.92	
	BWB		5.24	2.18	1.31	0.72	3.32	0.68	0.57	0.87	
Nursery	BP	Root	8.73	2.61	1.21	0.64	8.38	2.18	1.03	0.80	80.18 ± 3.84
		Stem	6.72	2.37	1.24	0.66	7.10	1.92	0.98	0.83	
		Leaf	8.08	2.54	1.21	0.63	7.10	1.93	0.98	0.80	
	BPT	Root	9.35	2.68	1.20	0.56	7.10	1.92	0.98	0.75	76.67 ± 4.56
		Stem	6.72	2.38	1.25	0.68	7.10	1.92	0.98	0.77	
		Leaf	7.41	2.45	1.22	0.61	7.10	1.91	0.97	0.76	
	BPD	Root	8.08	2.54	1.22	0.69	5.72	1.60	0.92	0.83	68.91 ± 7.47
		Stem	4.43	2.07	1.39	0.80	5.72	1.60	0.92	0.84	
		Leaf	6.72	2.38	1.25	0.80	5.72	1.59	0.91	0.81	
	BSM	Root	8.08	2.54	1.22	0.64	4.98	1.38	0.86	0.88	65.82 ± 10.75
		Stem	8.73	2.61	1.21	0.63	6.43	1.76	0.94	0.78	
		Leaf	8.08	2.54	1.22	0.66	7.10	1.93	0.98	0.81	
	BWB	Root	3.55	1.93	1.52	0.76	–	0.00	–	1.00	19.48 ± 17.37
		Stem	9.97	2.73	1.19	0.61	3.32	0.69	0.57	0.89	
		Leaf	4.43	2.06	1.39	0.71	3.32	0.69	0.57	0.91	
Vegetative	BP	Root	6.72	2.38	1.25	0.67	7.75	2.04	1.00	0.63	82.10 ± 6.32
		Stem	4.43	2.06	1.38	0.74	6.43	1.77	0.95	0.76	
		Leaf	6.72	2.36	1.24	0.64	6.43	1.77	0.95	0.76	
	BPT	Root	9.35	2.69	1.20	0.64	10.19	2.45	1.06	0.70	89.65 ± 9.40
		Stem	6.72	2.37	1.24	0.65	7.10	1.89	0.96	0.66	
		Leaf	3.55	1.92	1.52	0.69	7.10	1.89	0.96	0.75	
	BPD	Root	6.72	2.37	1.25	0.64	7.10	1.93	0.98	0.81	81.92 ± 17.22
		Stem	4.43	2.06	1.39	0.76	4.98	1.34	0.84	0.69	
		Leaf	2.57	1.78	1.89	0.85	6.43	1.77	0.95	0.81	
	BSM	Root	6.72	2.37	1.24	0.58	7.10	1.93	0.98	0.84	90.98 ± 8.95
		Stem	4.43	2.06	1.38	0.71	7.75	2.04	0.99	0.74	
		Leaf	3.55	1.92	1.51	0.70	6.43	1.77	0.95	0.79	
	BWB	Root	2.57	1.79	1.89	0.80	3.32	0.69	0.57	0.91	21.38 ± 19.62
		Stem	9.35	2.68	1.20	0.64	–	0.00	–	1.00	
		Leaf	9.35	2.67	1.19	0.65	3.32	0.68	0.57	0.87	
Reproductive	BP	Root	9.97	2.75	1.20	0.63	6.43	1.78	0.95	0.76	71.03 ± 8.13
		Stem	6.72	2.36	1.24	0.70	5.72	1.56	0.89	0.62	
		Leaf	5.24	2.16	1.30	0.62	5.72	1.53	0.88	0.56	
		Grain	3.55	1.90	1.50	0.66	5.72	1.57	0.90	0.64	
	BPT	Root	12.30	2.97	1.18	0.59	7.10	1.94	0.99	0.94	67.66 ± 10.01
		Stem	8.08	2.53	1.21	0.57	7.75	2.05	1.00	0.77	
		Leaf	6.72	2.35	1.23	0.54	5.72	1.58	0.90	0.74	
		Grain	6.72	2.38	1.25	0.66	4.98	1.35	0.84	0.79	

Table 2 continued

Different growth stages and plant tissues of rice cultivars			16S rRNA gene				*nifH* gene				% proportion of endophytic diazotrophic bacteria
			d	*H′*	*E*	*S*	*d*	*H′*	*E*	*S*	
	BPD	Root	9.35	2.68	1.20	0.69	6.43	1.78	0.96	0.79	66.99 ± 6.65
		Stem	3.55	1.94	1.53	0.89	4.98	1.37	0.85	0.85	
		Leaf	5.24	2.18	1.32	0.80	5.72	1.60	0.91	0.83	
		Grain	6.72	2.37	1.24	0.63	4.98	1.37	0.85	0.82	
	BSM	Root	10.57	2.81	1.19	0.66	6.43	1.79	0.96	0.86	82.34 ± 14.21
		Stem	9.97	2.73	1.19	0.61	8.38	2.19	1.03	0.85	
		Leaf	6.00	2.26	1.26	0.61	8.38	2.18	1.02	0.74	
		Grain	5.24	2.15	1.30	0.64	7.10	1.93	0.98	0.77	
	BWB	Root	9.97	2.76	1.20	0.72	3.32	0.69	0.57	0.92	22.34 ± 16.38
		Stem	10.57	2.78	1.18	0.58	3.32	0.69	0.58	0.98	
		Leaf	10.57	2.78	1.18	0.59	4.19	1.10	0.77	0.93	
		Grain	8.73	2.61	1.20	0.63	–	0.00	–	1.00	

The 16S rRNA and *nifH* genes were taken from any rice plant tissues of landrace rice cultivars Bue Polo (BP), Bue Pra Taw (BPT), Bue Pra Do (BPD), Bue Saw Mi (BSM), and Bue Wah Bo (BWB) grown in any stages, which were further profiled by PCR–DGGE where the DGGE bands profiling data were used to analyze numerical parameters comprised of richness (*d*), diversity index (Shannon–Wiener index: *H′*), evenness (*E*), and stability (*S*). The results indicated with (–) are incomputable mathematics

Phylogenetic evaluation of bacterial endophytes in rice landraces

The representative DGGE bands of both bacterial endophytes derived from the rice landraces (Fig. 1a, b) were sequenced to determine their phylogenetic relationships and identifications. Most selected band sequences of the 16S rRNA gene were matched to the uncultured bacteria, while some of them revealed phylogenetic relationship between *Pseudomonas* and *Klebsiella* (Table 3; Fig. 3). The band sequence A11-4 showed 100 % identity to the sequence of *Pantoea* sp. A1128, which is only a 16S rDNA sequence that has the origin from rice paddy soil (Table 3). The same endophytic bacterium was found in root (band sequences A10-8; HE860550) and leaf (band sequences A2-7; HE860547) of the BPD rice landrace grown in nursery stage (Fig. 1a). These two band sequences were closely related to the same uncultured bacterium supported by the sequence similarity of 95 and 100 % (Table 3). The band sequences A1-4, A11-3, P2, and P7 derived from different rice plant tissues of the rice landraces grown in various stages of growth (Fig. 1a) were clustered in the same phylogenetic cluster with the uncultured bacteria. These bacteria have their origins from pond water and the herbivorous freshwater fish, *Ctenopharyngodon idellus* (Table 3). The band sequences P1 (HE860534; from mature seed) and P6 (HE860538; from stem of vegetative stage) of the BP rice landrace (Fig. 1a) were clustered in the same phylogenetic clade (Fig. 3), which were closely related to the uncultured bacteria living in root and rhizosphere of grasses.

For the endophytic diazotrophic bacteria, most of the band sequences were also closely related to the uncultured bacteria. However, the other sequences revealed higher varieties of matched genera (*Novosphingobium, Pelomonas, Herbaspirillum, Enterobacter, Klebsiella*, and *Spirochaeta*) than those of the endophytic bacteria (Table 3; Fig. 4). The band sequences 3-1 and 3-2 derived from preplanting mature seed and reproductive roots of the BP rice landrace were clustered in the same phylogenetic clade with endophytic *Herbaspirillum* sp. B501 (Table 3; Fig. 4). This was evidence to ensure that the band sequences were derived from the bacterial endophytes. The same bacterium *Enterobacter* sp. was also found in root of rice at reproductive stage (band sequences 17-5) and grain (band sequences 17-3) of the BPT rice landrace (Fig. 1b; Table 3). This was in contrast to the same bacterium but found in different rice landraces such as the band sequences 24-1 (JX042298; from the BPD rice landrace) and 24-4 (JX042299; from the BSM rice landrace) that were matched to *Novosphingobium nitrogenifgens* (Fig. 1b; Table 3). This band sequence 37-1 (JX042307) was closely related to the sequence of an uncultured bacterium (98 % identity), which was the only a sequence found with its origin from roots of *O. officinalis* (Table 3). The other two band sequences 31-4 (JX042302) and 37-8 (JX042308) were closely related to the sequences of the uncultured bacteria from the rhizosphere samples (Table 3).

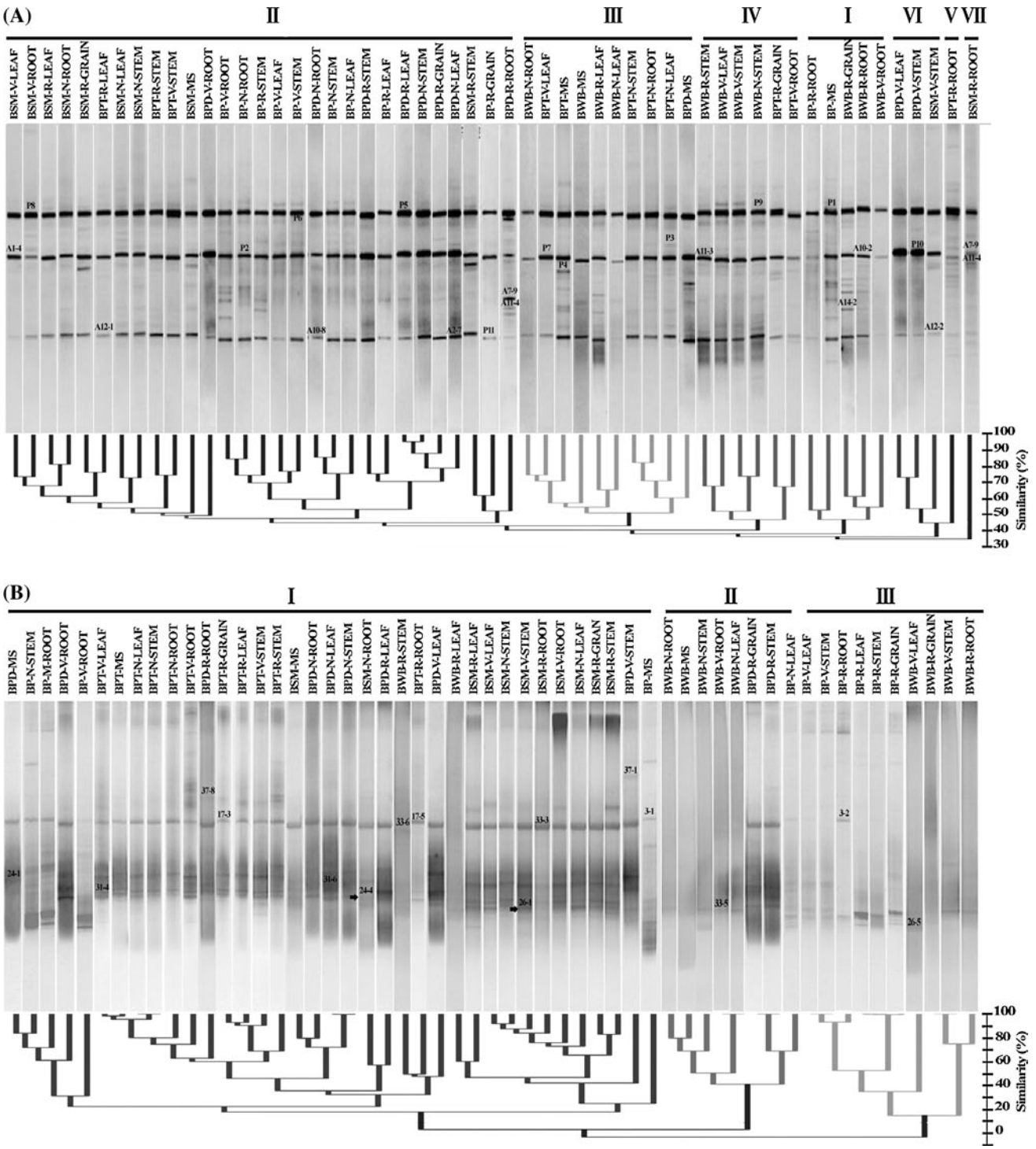
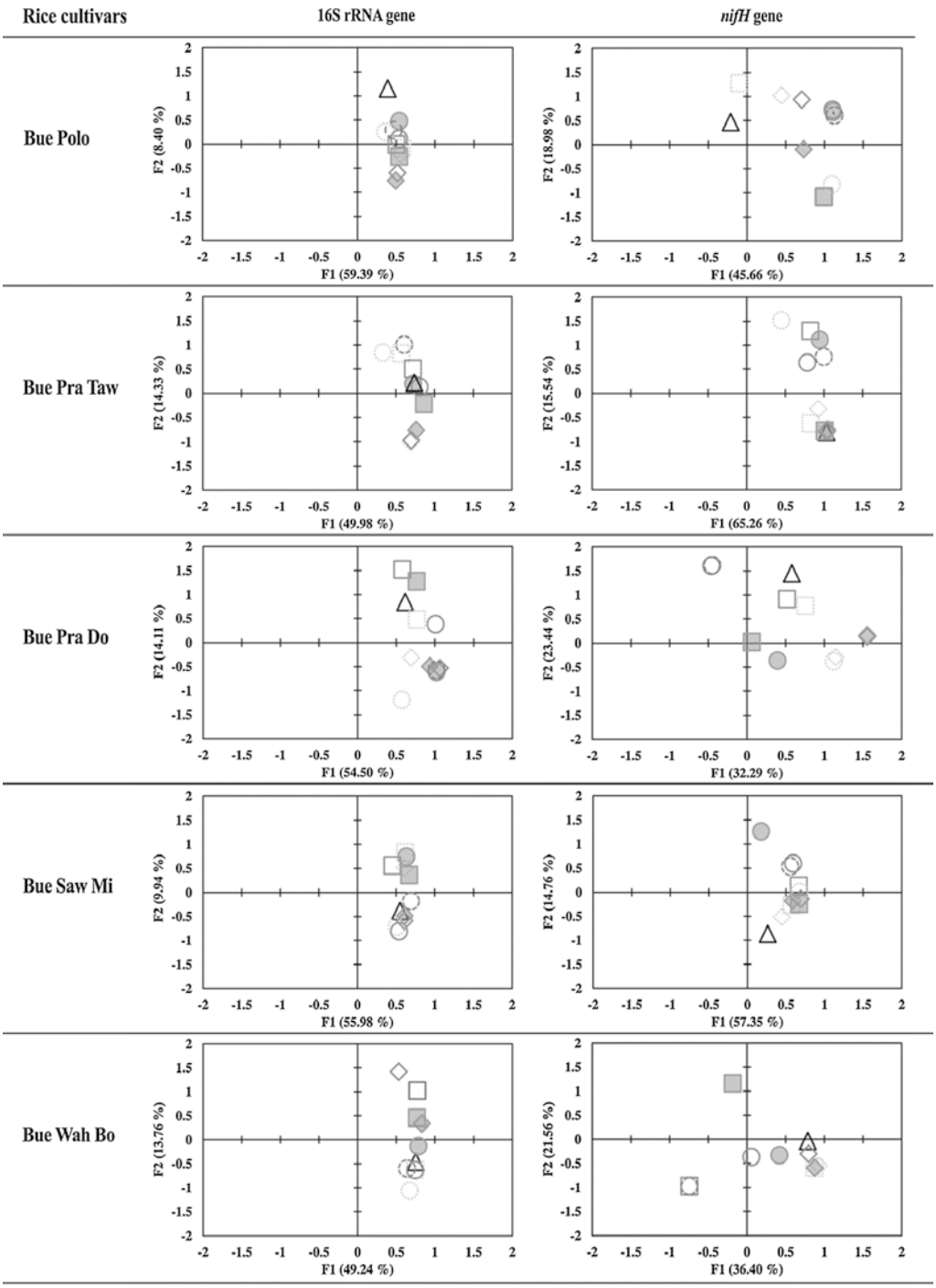


Fig. 1 Cluster analysis of the 16S rRNA (**a**) and *nifH* (**b**) genes obtained from endophytic bacteria of the rice landraces profiling by PCR–DGGE. Rice cultivars, including Bue Polo (BP), Bue Pra Taw (BPT), Bue Pra Do (BPD), Bue Saw Mi (BSM), and Bue Wah Bo (BWB), growing in different stages comprised of pre-planting mature seed (MS), nursery stage (*N*), vegetative stage (*V*) and reproductive stage (*R*), were used. The parts (root, stem, leaf, and grain) of rice tissues are indicated behind the codes of rice cultivars grown in different stages. The *marked codes* upper the respective bands in the band profile were determined as selected bands for further sequencing and phylogenetic analysis (see also Figs. 3, 4)



Plant tissues	Growth stages			
	Pre-planting	Nursery	Vegetative	Reproductive
Mature seed	△			
Root		◇	□	○
Stem		◇	□	○
Leaf		◆	■	●
Grain				○

Fig. 2 Principal component analysis of the 16S rRNA and *nifH* genes obtained from endophytic bacteria of the rice landraces profiling by PCR–DGGE

Table 3 Data summary of the 16S rRNA gene and *nifH*-derived protein sequences obtained from the respective bands present in DGGE profiles and their closest match sequences from GenBank database

	Band	Accession no.	Database match with accession no. in parentheses	Origin	% identity
16S rRNA gene sequence	P1	HE860534	Uncultured bacterium clone M3a (AJ851120.1)	Root of *Molinia caerulea*	98
	P2	HE860535	Uncultured bacterium DGGE band DS30-2 (EU585922.1)	*Ctenopharyngodon idellus*	96
	P3	HE860536	Uncultured bacterium DGGE band 7 (HQ876068)	*Danio rerio*	94
	P4	HE860537	Uncultured bacterium clone M3a (AJ851120.1)	Root of *Molinia caerulea*	99
	P5	HE860538	Uncultured bacterium clone M3a (AJ851120.1)	Root of *Molinia caerulea*	97
	P6	HE860539	Uncultured bacterium clone M6a (AJ851126.1)	Rhizosphere of grasses	95
	P7	HE860540	Uncultured bacterium DGGE band DS31-5 (EU585924.1)	*Ctenopharyngodon idellus*	97
	P8	HE860541	Uncultured bacterium DGGE band C-3 (EF669488)	*Ctenopharyngodon idellus*	96
	P9	HE860542	Uncultured bacterium clone M15a (AJ851144.1)	Rhizosphere of grasses	97
	P10	HE860543	Uncultured bacterium DGGE band DS31-5 (EU585924.1)	*Ctenopharyngodon idellus*	94
	P11	HE860544	Uncultured bacterium DGGE band DS34-3 (EU585925.1)	*Ctenopharyngodon idellus*	92
	A1-4	HE860545	Uncultured bacterium DGGE band DS31-5 (EU585924.1)	*Ctenopharyngodon idellus*	100
	A2-7	HE860547	Uncultured bacterium DGGE band 7 (HQ876068.1)	*Danio rerio*	100
	A7-9	HE860548	Uncultured *Pseudomonas* sp. clone 19318_ZC5M6_G12 (JQ897449)	Argillite geological	100
	A10-2	HE860549	Uncultured bacterium clone nby488c06c1 (HM831057.1)	Skin of *Mus musculus*	95
	A10-8	HE860550	Uncultured bacterium DGGE band 7 (HQ876068.1)	*Danio rerio*	95
	A11-3	HE860551	Uncultured bacterium DGGE band he-49 (FJ235679.1)	Pond water	100
	11-4	HE860552	*Pantoea* sp. A1128 (JX266309.1)	Taihu paddy soil	100
	12-1	HE860553	Uncultured bacterium DGGE band 7 (HQ876068.1)	*Danio rerio*	100
	12-2	HE860554	Uncultured bacterium DGGE band 7 (HQ876068.1)	*Danio rerio*	100
	14-2	HE860555	Uncultured bacterium clone ncd2380h03c1 (JF207567.1)	Volar of *Homo sapiens*	95
nifH-derived protein sequences	3-1	JX042294	*Herbaspirillum* sp. B501 *nifH* genes (AB196476.1)	Endophytic *Herbaspirillum* sp. B501	99
	3-2	JX042295	*Herbaspirillum* sp. B501 *nifH* genes (AB196476.1)	Endophytic *Herbaspirillum* sp. B501	89
	17-3	JX042296	*Enterobacter* sp. SP1 *nifH* genes (JQ001785.1)	*Saccharum officinarum* L.	98
	17-5	JX042297	*Enterobacter* sp. SP1 *nifH* genes (JQ001785.1)	*Saccharum officinarum* L.	97
	24-1	JX042298	*Novosphingobium nitrogenifigens* Y88 NifH (DQ660368.1)	A New Zealand pulp and paper wastewater	97

Table 3 continued

Band	Accession no.	Database match with accession no. in parentheses	Origin	% identity
24-4	JX042299	*Novosphingobium nitrogenifigens* Y88 NifH (DQ660368.1)	A New Zealand pulp and paper wastewater	99
26-1	JX042300	*Klebsiella* sp. AL060225_04 *nifH* genes (FJ593866.1)	*Trachymyrmex* sp.	99
26-5	JX042301	*Spirochaeta aurantia* clone 2 *nifH* genes (AF325792.1)	*Spirochaeta aurantia*	89
31-4	JX042302	Uncultured bacterium DGGE band 13r NifH (JN648871.1)	Horticultural soil	96
31-6	JX042303	Uncultured bacterium clone 16Z65C *nifH* genes (AY787543.1)	N-ViroTech pulp and paper wastewater	87
33-3	JX042304	*Pelomonas saccharophila nifH* gene (AB188120.1)	Genomic DNA of *Pelomonassaccharophila*	94
33-5	JX042305	*Klebsiella variicola* strain 6A2 *nifH* genes (AY367394.1)	Genomic DNA of *Klebsiella varicola*	99
33-6	JX042306	Uncultured bacterium clone P67 *nifH* genes (GU196859.1)	Genomic DNA *Ornithocercus quadratus*	96
37-1	JX042307	Uncultured bacterium clone g1(102) *nifH* genes (AF331982.1)	Roots of *Oryza officinalis*	98
37-8	JX042308	Uncultured bacterium clone 4-15 (FJ807383.1)	Mangrove rhizosphere soil	85

In addition, using this phylogenetic tree (Fig. 4), it was able to visualize 5 phylogenetic clades, including α-, β-, γ-, and δ-Proteobacteria and Spirochetes. Most of the band sequences were belonged to clade II of β-Proteobacteria followed by clade III of γ-Proteobacteria.

Discussion

Within this study, the community structures of bacterial endophytes within every plant tissue examined from the highland rice landraces grown in different stages of growth exhibited similarities but also dissimilarities depending on either environmental factors relating to the cultivating practices or the varieties of the rice landraces.

These factors can affect the interactions, colonization traits, survival, and distribution of the bacterial endophytes living in the rice plant tissues (Hardoim et al. 2008; Knief et al. 2012; Mano and Morisaki 2008). In general, high diversity of bacteria has been found in soil, especially in rhizosphere habitats, where plants release root exudates and mutually beneficial nutrient exchange between host plant and microorganisms takes place (Bais et al. 2006; Hardoim et al. 2011; Li et al. 2008; Roesch et al. 2008; Sessitsch et al. 2012). It was in accordance with our observations that the community's richness of endophytic bacteria examined was higher in root tissues than those other tissues of most rice cultivars. However, it was a different picture when endophytic diazotrophic bacteria were examined, as their richness values were relatively low and varied across the rice plant tissues.

The diversity indices of both bacterial groups found in the rice plant tissues also had a similar trend in terms of their richness values. Some authors assumed that lower diversity of the endophytic diazotrophic bacteria within wild rice cultivars might due to the genetic variation in the rice (Elbeltagy and Ando 2008; Engelhard et al. 2000). However, high density of the endophytic diazotrophic bacteria was found in nitrogen-poor environment where more than 50 % of the endophytes were diazotrophic bacteria (Sessitsch et al. 2012). In our study, the proportions of the endophytic diazotrophic bacteria per the total endophytic bacteria were relatively high (>40 %) with no significant different in most of the rice landraces, except for the BWB rice landrace that revealed significantly lower values. This might strongly relate to the difference of agricultural practices, where the BWB rice landrace was supplemented with nitrogen fertilizer at the nursery stage of growth (Table 1). There are some evidences suggested that the use of chemical input in rice paddy soil, particularly for the nitrogen fertilizer, can influence the population, diversity, function, and host-interaction of nitrogen-fixing bacteria with their mutual rice plants (Prakamhang et al. 2009; Wartiainen et al. 2008).

The results derived from cluster analysis and PCA also ensured that the community structures of the endophytic bacteria in any rice landraces tested revealed higher similarity and stability than those of the endophytic diazotrophic

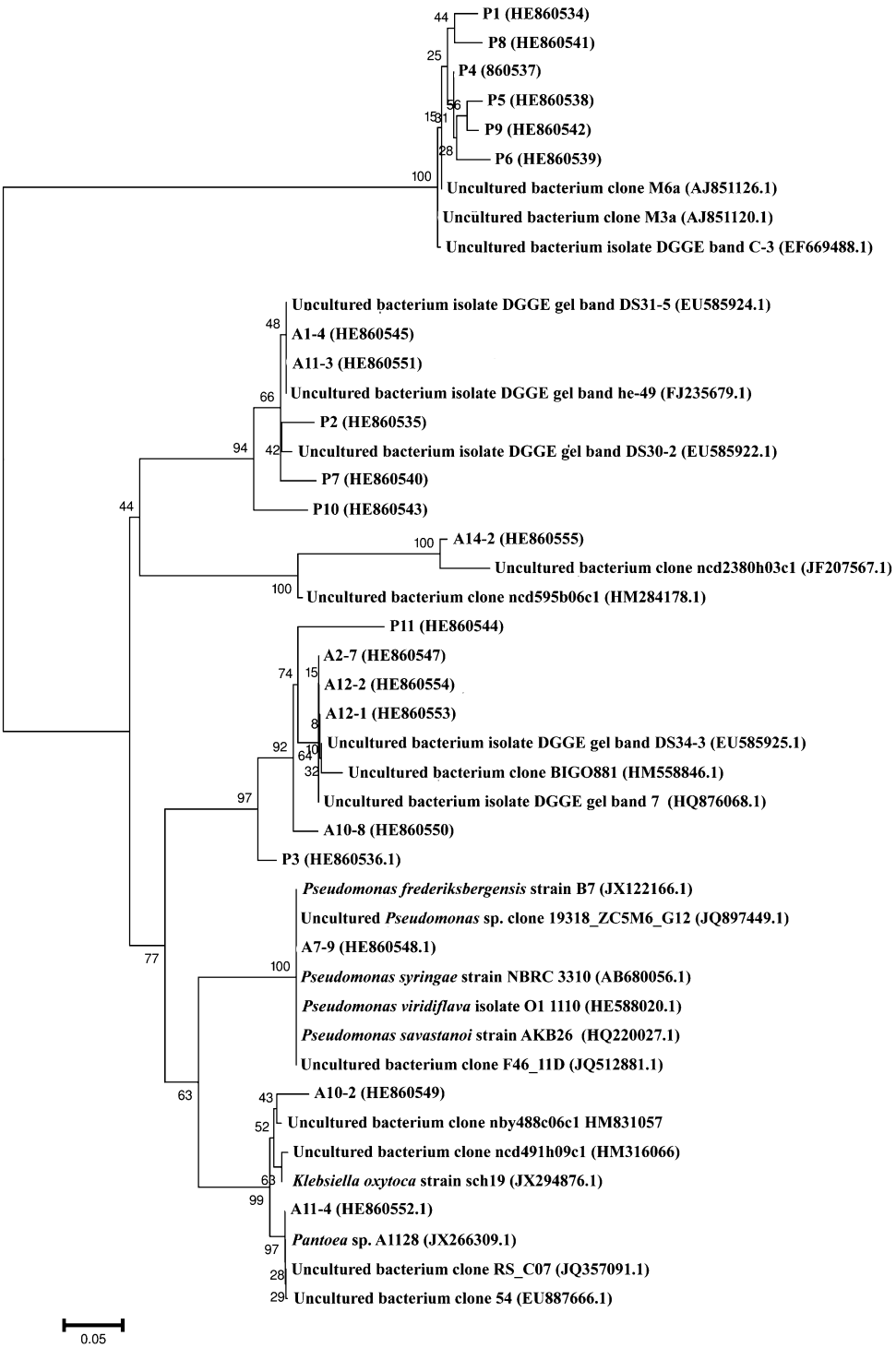


Fig. 3 Unrooted phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences respective to the marked bands present in the DGGE bands profile (Fig. 1a). Bootstrap analysis was based on 1,000 replicates. Neighbor-joining tree and the scale bar represent 5 % dissimilarity, where the accession numbers of the sequences are indicated in the *parentheses*

bacteria. According to the multiple parameters involved, these two cultivation techniques could have a significant impact upon the whole picture of the bacterial community structures. However, a better understanding of the bacterial community in generic and/or species levels was needed to provide greater resolution of this complex bacterial consortium and its agricultural significance. This has been partly addressed, by the molecular sequencing tools applied in this study. Here, we selected the representative DGGE bands for bacterial identification. The 16S rDNA fragments were closely related to uncultured bacteria, some of them were related to *Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp., and *Klebsiella* sp., which are members of the γ-Proteobacteria. This bacterial phylum has been found currently in association with

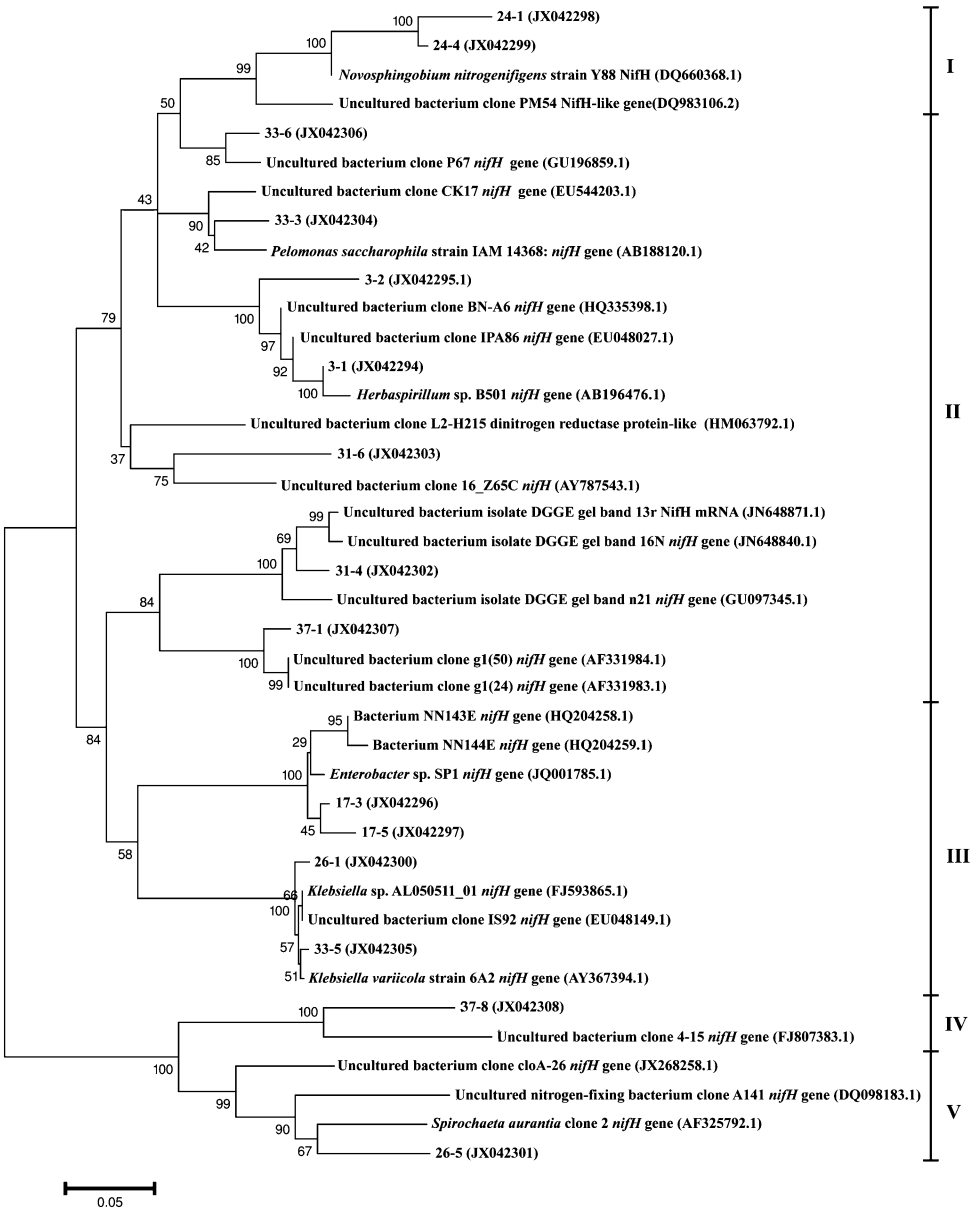


Fig. 4 Unrooted phylogenetic tree of *nifH*-derived protein sequences respective to the *marked bands* present in the DGGE bands profile (Fig. 1b). Bootstrap analysis was based on 1,000 replicates. Neighbor-joining tree and the scale bar represent 5 % dissimilarity, where the accession numbers of the sequences are indicated in the parentheses. The phylogenetic tree was divided into five different clades, including α-Proteobacteria (*I*), β-Proteobacteria (*II*), γ-Proteobacteria (*III*), δ-Proteobacteria (*IV*), and Spirochetes (*V*)

rice plant and paddy soil either in symbiotic (Reinhold-Hurek and Hurek 2011; Sun et al. 2008; Takahashi et al. 2011) or in free-living patterns (Sooksa-Nguan et al. 2010; Tago et al. 2011). Previous studies concerning the endophytic bacteria of rice reported that the Proteobacteria are the dominant bacteria found in association with rice plant (Hardoim et al. 2011; Knief et al. 2012; Reinhold-Hurek and Hurek 2011; Sessitsch et al. 2012). Some isolates of Actinobacteria, Firmicutes (Reinhold-Hurek and Hurek 2011), Bacteroidetes, and Deinococcus–Thermus phyla (Knief et al. 2012) have previously been found in relation to rice plants. In the case of the endophytic diazotrophic bacteria, most of our isolates belonged to the Proteobacteria, mainly in the β-Proteobacteria. Interestingly, some members of the phylum Spirochetae living in association with the rice landraces were firstly reported in this study. Nonetheless, some members of this bacterial phylum play an important role in nitrogen fixation, as evidence revealed that some Spirochetes, either living in termite hindguts or free-living in freshwater, can fix nitrogen through the *nifH* homolog genes (Lilburn et al. 2001).

It was clear from this study that the endophytic bacterial communities across the highland rice landraces revealed flexibility of phenotype and genotype depending on various factors, including different rice cultivars that possess high genetic variation, cultivation processes with natural farming, and/or supplied with chemical inputs. An apparent result of different treatments by supplying nitrogen fertilizer ensured the dissimilarity of the bacterial community structures, which decreased the community's richness and

diversity of nitrogen-fixing bacteria. However, the results in this study indicated that both endophytic and endophytic diazotrophic bacteria could exist in the rice various tissues examined and were distributed according to the growth practices of the rice plants. Moreover, some of them might exist in the mature seeds and persist even in the post-harvest stage. These endophytic bacteria of the rice landraces might be an important key to maintain yield and health of the rice plants in poor or deficient farming condition. Application of this plant–microbe interaction data, particularly in case of endophytic diazotrophic bacteria, might be an alternative way to reduce chemical usage and at the same time improve soil quality and sustain an organic farming system for future agricultural husbandry of rice.

Acknowledgments The authors would like to acknowledge the supports from Office of the Higher Education Commission, Thailand under the National Research University Project, the Graduated School of Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand and Thailand Research Fund RTA5580007. We also thank the Model Farm Project, the Royal Initiatives of Her Majesty the Queen, Khun Tae Village, Thailand for assistance in rice samples collection and Mr. Chainarong Kesamoon, a Ph.D. candidate at the Department of Mathematics, Autonomous University of Barcelona Spain, for his kindly suggest in numerical analysis of this work. We are grateful to Mr. Keegan H. Kennedy, Department of Biology, Chiang Mai University and Dr. Peter Green, Aberdeen, UK for helping improve English text.

References

Arun B, Gopinath B, Sharma S (2012) Plant growth promoting potential of bacteria isolated on N free media from rhizosphere of *Cassia occidentalis*. World J Microbiol Biotechnol 28:2849–2857

Asakawa S, Kimura M (2008) Comparison of bacterial community structures at main habitats in paddy field ecosystem based on DGGE analysis. Soil Biol Biochem 40:1322–1329

Azevedo JL, Maccheroni JW, Pereira JO, de Araújo WL (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electron J Biotechnol 3:40–65

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu Rev Plant Biol 57:233–266

Bandara W, Seneviratne G, Kulasooriya S (2006) Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. J Biosci 31:645–650

Bonman JM, Khush GS, Nelson RJ (1992) Breeding rice for resistance to pests. Annu Rev Phytopathol 30:507–528

Chakhonkaen S, Pitnjam K, Saisuk W, Ukoskit K, Muangprom A (2012) Genetic structure of Thai rice and rice accessions obtained from the International Rice Research Institute. Rice 5:1–13

Coelho MRR, Marriel IE, Jenkins SN, Lanyon CV, Seldin L, O'Donnell AG (2009) Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. Appl Soil Ecol 42:48–53

Dellaporta S, Wood J, Hicks J (1983) A plant DNA minipreparation: version II. Plant Mol Biol Rep 1:19–21

Elbeltagy A, Ando Y (2008) Expression of nitrogenase gene (*NIFH*) in roots and stems of rice, *Oryza sativa*, by endophytic nitrogen-fixing communities. Afr J Biotechnol 7:1950–1957

Engelhard M, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2000) Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. Environ Microbiol 2:131–141

Feng Y, Shen D, Song W (2006) Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. J Appl Microbiol 100:938–945

Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M, Rossi P (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. Environ Microbiol 4:634–643

García de Salamone I, Di Salvo L, Escobar Ortega J, Boa Sorte P, Urquiaga S, Teixeira K (2010) Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. Plant Soil 336:351–362

Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol 16:463–471

Hardoim PR, Andreote FD, Reinhold-Hurek B, Sessitsch A, van Overbeek LS, van Elsas JD (2011) Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. FEMS Microbiol Ecol 77:154–164

Jha B, Gontia I, Hartmann A (2012) The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. Plant Soil 356:265–277

Jia Z, Kikuchi H, Watanabe T, Asakawa S, Kimura M (2007) Molecular identification of methane oxidizing bacteria in a Japanese rice field soil. Biol Fert Soils 44:121–130

Kaga H, Mano H, Tanaka F, Watanabe A, Kaneko S, Morisaki H (2009) Rice seeds as sources of endophytic bacteria. Microbes Environ 24:154–162

Knief C, Delmotte N, Chaffron S, Stark M, Innerebner G, Wassmann R, von Mering C, Vorholt JA (2012) Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. ISME J 6:1378–1390

Koomnok C, Teaumroong N, Rerkasem B, Lumyong S (2007) Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. ScienceAsia 33:429–435

Li YL, Fan XR, Shen QR (2008) The relationship between rhizosphere nitrification and nitrogen-use efficiency in rice plants. Plant Cell Environ 31:73–85

Lilburn TG, Kim KS, Ostrom NE, Byzek KR, Leadbetter JR, Breznak JA (2001) Nitrogen fixation by symbiotic and free-living Spirochetes. Science 292:2495–2498

Loaces I, Ferrando L, Fernández Scavino A (2011) Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. Microb Ecol 61:606–618

Mano H, Morisaki H (2008) Endophytic bacteria in the rice plant. Microbes Environ 23:109–117

Mano H, Tanaka F, Nakamura C, Kaga H, Morisaki H (2007) Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. Microbes Environ 22:175–185

McCouch S (2004) Diversifying selection in plant breeding. PLoS Biol 2:1507–1512

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59:695–700

Oupkaew P, Pusadee T, Sirabanchongkran A, Rerkasem K, Jamjod S, Rerkasem B (2011) Complexity and adaptability of a traditional agricultural system: case study of a gall midge resistant rice landrace from northern Thailand. Genet Resour Crop Evol 58:361–372

Parzies HK, Spoor W, Ennos RA (2004) Inferring seed exchange between farmers from population genetic structure of barley landrace Arabi Aswad from northern Syria. Genet Resour Crop Evol 51:471–478

Poly F, Monrozier LJ, Bally R (2001a) Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. Res Microbiol 152:95–103

Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbiere F, Monrozier LJ (2001b) Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. Appl Environ Microbiol 67:2255–2262

Prakamhang J, Minamisawa K, Teamtaisong K, Boonkerd N, Teaumroong N (2009) The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Appl Soil Ecol 42:141–149

Purnomo E, Mursyid A, Syarwani M, Jumberi A, Hashidoko Y, Hasegawa T, Honma S, Osaki M (2005) Phosphorus solubilizing microorganisms in the rhizosphere of local rice varieties grown without fertilizer on acid sulfate soils. Soil Sci Plant Nutr 51:679–681

Pusadee T, Jamjod S, Chiang Y-C, Rerkasem B, Schaal BA (2009) Genetic structure and isolation by distance in a landrace of Thai rice. Proc Nat Acad Sci 106:13880–13885

Reinhold-Hurek B, Hurek T (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. Curr Opin Plant Biol 14:435–443

Roesch L, Camargo F, Bento F, Triplett E (2008) Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. Plant Soil 302:91–104

Saito K, Linquist B, Keobualapha B, Shiraiwa T, Horie T (2006) Farmers' knowledge of soils in relation to cropping practices: a case study of farmers in upland rice based slash-and-burn systems of northern Laos. Geoderma 136:64–74

Sasaki K, Ikeda S, Eda S, Mitsui H, Hanzawa E, Kisara C, Kazama Y, Kushida A, Shinano T, Minamisawa K, Sato T (2010) Impact of plant genotype and nitrogen level on rice growth response to inoculation with *Azospirillum* sp. strain B510 under paddy field conditions. Soil Sci Plant Nutr 56:636–644

Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, van Overbeek L, Brar D, van Elsas JD, Reinhold-Hurek B (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. Mol Plant Microbe Interact 25:28–36

Shannon CE, Weaver W (1963) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana

Simonet P, Grosjean MC, Misra AK, Nazaret S, Cournoyer B, Normand P (1991) *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 57:3278–3286

Sommut W (2003) Changes in flood-prone rice ecosystems in Thailand, Crop year 2000–2001. Department of Agriculture, Bangkok, Thailand

Sooksa-Nguan T, Gypmantasiri P, Boonkerd N, Thies JE, Teaumroong N (2010) Changes in bacterial community composition in the system of rice intensification (SRI) in Chiang Mai, Thailand. Microbes Environ 25:224–227

Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W (2008) Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. Microb Ecol 55:415–424

Tago K, Ishii S, Nishizawa T, Otsuka S, Senoo K (2011) Phylogenetic and functional diversity of denitrifying bacteria isolated from various rice paddy and rice-soybean rotation fields. Microbes Environ 26:30–35

Takahashi H, Sekiguchi H, Ito T, Sasahara M, Hatanaka N, Ohba A, Hase S, Ando S, Hasegawa H, Takenaka S (2011) Microbial community profiles in intercellular fluid of rice. J Gen Plant Pathol 77:121–131

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24:1596–1599

Tittabutr P, Awaya JD, Li QX, Borthakur D (2008) The cloned 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene from *Sinorhizobium* sp. strain BL3 in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 promotes nodulation and growth of *Leucaena leucocephala*. Syst Appl Microbiol 31:141–150

Van Nieuwenhove C, Van Holm L, Kulasooriya SA, Vlassak K (2000) Establishment of *Azorhizobium caulinodans* in the rhizosphere of wetland rice (*Oryza sativa* L.). Biol Fert Soils 31:143–149

Verma SC, Singh A, Chowdhury SP, Tripathi AK (2004) Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. Biotechnol Lett 26:425–429

Wartiainen I, Eriksson T, Zheng W, Rasmussen U (2008) Variation in the active diazotrophic community in rice paddy—*nifH* PCR–DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. Appl Soil Ecol 39:65–75

Microbes Environ. Vol. 29, No. 2, 211-219, 2014
https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jsme2 doi:10.1264/jsme2.ME13183

Termite Nests as an Abundant Source of Cultivable Actinobacteria for Biotechnological Purposes

Nikhom Sujada[1], Rungroch Sungthong[2], and Saisamorn Lumyong[1]*

[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand; and* [2]*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC), Seville 41080, Spain*

(Received December 27, 2013—Accepted March 30, 2014—Published online June 6, 2014)

A total of 118 actinobacterial isolates were collected from the three types of termite nests (mound, carton, and subterranean nests) to evaluate their potential as a source of bioactive actinobacteria with antimicrobial activity. The highest number (67 isolates) and generic abundance (7 known genera) of actinobacterial isolates were obtained from carton nests. *Streptomyces* was the dominant genus in each type of termite nest. In the non-*Streptomyces* group, *Nocardia* was the dominant genus detected in mound and carton nests, while *Pseudonocardia* was the dominant genus in subterranean nests. A discovery trend of novel species (<99% similarity in the 16S rRNA gene sequence) was also observed in the termite nests examined. Each type of termite nest housed >20% of bioactive actinobacteria that could inhibit the growth of at least one test organism, while 12 isolates, belonging to the genera *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Micromonospora* and *Nocardia*, exhibited distinct antimicrobial activities. *Streptomyces* sp. CMU-NKS-3 was the most distinct bioactive isolate. It was closely related to *S. padanus* MITKK-103^T, which was confirmed by 99% similarities in their 16S rRNA gene sequences. The highest level of extracellular antimicrobial substances was produced by the isolate CMU-NKS-3, which was grown in potato dextrose broth and exhibited a wide range (6.10×10^{-4}-1.25 mg mL^{-1}) of minimum inhibitory concentrations against diverse pathogens. We concluded that termite nests are an abundant source of bioactive strains of cultivable actinobacteria for future biotechnological needs.

Key words: termite nest, Actinobacteria, functional diversity, 16S rRNA gene, bioactive compounds

Actinobacteria are Gram positive bacteria that possess a high guanine plus cytosine (G+C) content in their genomic DNA. They have been detected in diverse ecological niches. Their member species are known to be a main source of various bioactive compounds, accounting for 70% of all currently discovered antibiotics (7, 23). Among the antibiotics derived from actinobacteria, 75% are produced by *Streptomyces* spp. and 25% are produced by the non-*Streptomyces* group (known also as rare actinomycetes) (4). These antibiotics are produced industrially and mainly supplied for medical, pharmaceutical, and agricultural needs. On the other hand, the release of bioactive compounds to the environment through anthropogenic activity and horizontal gene transfer has led to the evolution of natural pathogens and increased drug resistance. Therefore, novel and potent bioactive compounds from novel microbial resources may overcome this pathogenic evolution. The discovery of actinobacteria from diverse and unexplored sources has also been linked to increased opportunities to obtain novel bioactive compounds (15, 34). We here aimed to explore the diversity of actinobacteria in termite nests and their potential as a source of bioactive compounds.

Termites are a group of social insects that are classified as the order Isoptera, which is closely related to cockroaches (5). They live in large colonies that comprise a king, queen, and workers, each of which have different behaviors and functions (19, 30, 38). Soil termites play an important role in circulating nutrients from decaying dead plant materials in the soil ecosystem (20, 29). Termite colonies are often found in a protective structure called a "termite nest". These nests may be formed by diverse materials found close to their habitats. Mounds are a common type of termite nest, which are mainly constructed by the deposition of clay particles, organic carbon, and the saliva or secretions of the termites themselves. Other less common types, such as carton and subterranean nests, are also nest structures. Carton nests are mainly made from plant materials typically found on trees or in rich plant litter areas. The subterranean type is commonly found underground at an approximate depth of 50–100 cm. The various termite nests are shown in Fig. 1.

Recent studies reported no significant overlap in the gut microbial biota of soil-feeding termites and their nests or soil surrounding their nests (10, 11). Previous studies examined the microbial biota within the termite gut, and actinobacteria were identified as one of the dominant bacteria in this symbiotic lifestyle (3, 6, 20, 21, 26, 27). These symbiotic actinobacteria provide assisting functions for termites, such as nutrient cycling and exchange, and also protect termites from invading pathogens. Some of these termite-associated actinobacteria may also exhibit lignin-cellulolytic activity (3, 26, 27) and antagonistic activity against diverse pathogens (20, 21). Furthermore, some novel and prospective novel species of actinobacteria associated with termites have been reported previously (25, 32, 33). In the present study, we aimed to evaluate the generic and functional diversities of cultivable actinobacteria obtained from different types of termite nests. The biotechnological potential of the antimicrobial activity of actinobacteria was also evaluated against a set of representative pathogens found in medical

* Corresponding author. E-mail: scboi009@gmail.com;
Tel: +66 53 873535–36; Fax: +66 53 878225.

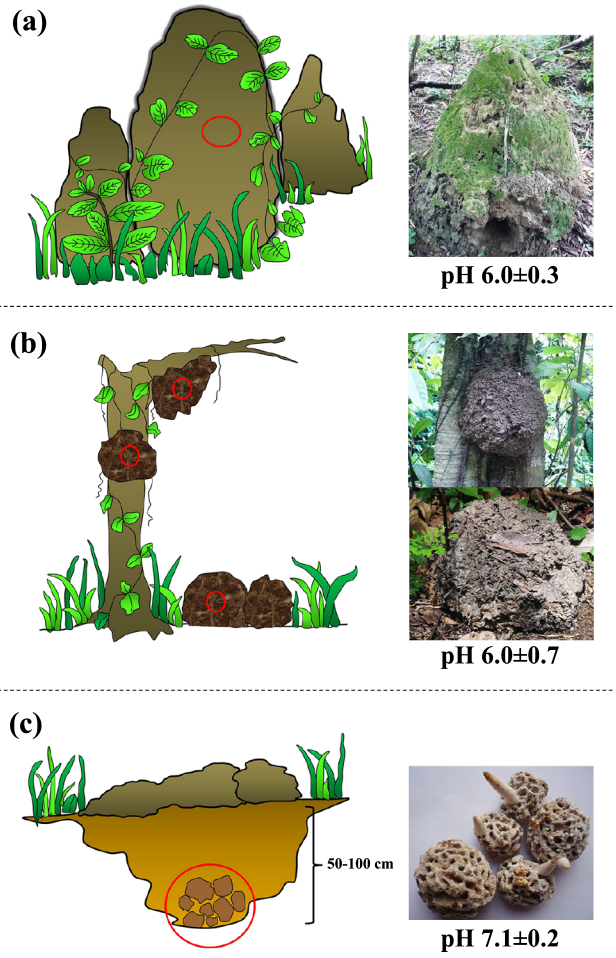


Fig. 1. Diagram showing different types of termite nests. Three types of termite nests: mound (a), carton (b), and subterranean (c) nests, are indicated together with their average pH ± SD.

and agricultural fields. The implication of different termite nests as an optimal source for potent antimicrobial actinobacteria was also discussed. The influences of some nutrition factors on the productivity of antimicrobial substances by a key actinobacterium and its further development for biotechnological applications were also assessed here.

Materials and Methods

Collection and preparation of termite nest samples

Three different termite nests, including mound, carton, and subterranean nests (Fig. 1), were collected from tropical forest and rubber tree farming areas in Phayao province, Thailand. Termite nest samples (200 g per sample from each type of termite nest) were placed in plastic bags and kept in an ice-box (for a maximum of 24 h) for transfer to the laboratory. All samples were ground into fine particles and air-dried at an ambient temperature for 7 d. Dried samples were suspended in sterilized distilled water and mixed well prior to the measurement of their pH by a pH meter (PB-10 Sartorius).

Isolation of actinobacteria from termite nests

Dried samples (10 g each) were pretreated either by moist heating in a water bath at 50°C for 1 h (35) or by suspending with 1.5% (w/v) phenol (15). These pretreatments were performed with the aim of reducing contamination by unwanted microorganisms (low G+C and/or Gram negative bacteria). Pretreated samples were serially diluted 10-fold, and the appropriate dilutions (10^{-3} to 10^{-6}) were individually spread on starch casein (SC) agar (2) or humic acid-vitamin (HV) agar (14) supplemented with nystatin, cycloheximide, and nalidixic acid at final concentrations of 100, 100, and 50 µg mL^{-1}, respectively. All plates were incubated at 30°C for 4 weeks. The individual colonies that appeared were re-grown and sub-cultured on International *Streptomyces* Project Medium 2 (ISP2) agar (2) at 30°C until they were pure isolates. Pure isolates were then kept either on Hickey-Tresner agar (2) as a working stock or in 20% (v/v) glycerol at –20°C for long term storage at the Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University.

Screening of antimicrobial actinobacteria isolated from termite nests

The antimicrobial activity of the actinobacterial isolates was evaluated by a dual culture technique against a list of test organisms indicated in Table 1. Antifungal activity against 5 phytopathogenic fungi was assessed on potato dextrose agar (PDA) (Kemma, Thailand). Briefly, an agar plug (5 mm Ø) of a test fungus grown previously on PDA at 30°C for 5 d was placed at the center of a new PDA plate, on which 2 lines (5 cm in length) of an actinobacterial isolate were individually streaked 3 cm from the fungal plug. The dual culture was incubated at 30°C for 7–14 d, and inhibition activity was observed intermittently. The plates inoculated with the fungi only served as controls. The antibacterial and anti-yeast activities of the actinobacterial isolates were assessed on nutrient agar (NA) (2) and Sabouraud agar (SBA) (2), respectively. Briefly, each actinobacterial isolate was streaked linearly at the center of each agar plate and allowed to grow at 30°C until mature colonies appeared (after approximately 3–5 d). The test organisms were streaked perpendicularly on their respective medium around a linear colony of the actinobacterial isolate. The dual culture was incubated at 37°C for the test bacteria used and at 30°C for the test yeasts used. The inhibition zone (a clear distance between the colonies of test organisms and actinobacterial isolate) that appeared was measured after 24 and 48 h of incubation. Control plates without the inoculation of actinobacteria were prepared to assess the normal growth of the test organisms on their respective agar. Distinctive antimicrobial isolates of the actinobacteria were selected based on their potential to inhibit a board range of the test organisms with relatively large inhibition zones. Of these isolates, the most distinctive antimicrobial isolate was chosen by its greater potential than that of the other isolates.

Diversity study of actinobacteria isolated from termite nests

Primary identification. The generic diversities of all actinobacteria isolated from termite nests were determined and classified using some key phenotypes from the database available in the Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (40). The arrangement of spores (chain or single) was examined microscopically using a cover slip-implanting technique. The cover slip was implanted on actinobacteria-growing ISP2 agar and incubated at 30°C for 7–10 d, which allowed aerial mycelia to grow on the cover slip. The cover slip was removed from the culture plate, on which the existing mycelia were then fixed by 15.5% (v/v) acetic acid for 1 min. The fixed mycelia were observed under a light microscope (Olympus SZ40, Japan) after simple staining with crystal violet. The colony morphology of the actinobacteria grown on ISP2 agar was also observed under a stereomicroscope (Olympus CH30, Japan). An analysis of 2,6-diaminopimelic acid (DAP) was carried out to determine the cell wall chemotype of the actinobacteria, following the protocol described by Ningthoujam *et al.* (24). The isomeric type of DAP together with the colony morphology were used to divide non-*Streptomyces* and unidentified genera from the *Streptomyces* group. The unidentified genera were determined according to the limited formation of aerial mycelia and spores on the agar media used. Their growth on the liquid medium used in the protocol to analyze the cell wall chemotype was also restricted.

Secondary identification. Only distinctive antimicrobial isolates

of actinobacteria were selected to determine their phylogenetic position. The genomic DNA of these isolates was extracted from their biomass, which was obtained after their massive growth in ISP2 broth at 30°C. The extraction was performed following the manufacturer's instructions for the FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Sample Kit (FAVORGEN®, Taiwan). The concentration and purity of DNA samples were evaluated by electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel and visualized by staining with 0.5 μg mL^{-1} ethidium bromide. An appropriate concentration of the DNA samples was adjusted for PCR amplification of the 16S rRNA gene. *Taq* DNA polymerase and a pair of universal primers (forward primer 27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and reverse primer 1,525 (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3' (R=A/G, W=A/T)) were used (18). PCR was performed according to the steps described by Adegboye and Babalola (1). PCR products were purified using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL, Germany) following the manufacturer's instructions. Purified PCR products were sequenced using the facilities of First Base Laboratories, Malaysia. Almost-complete 16S rRNA gene sequences (approximately 1,500 nt) were determined and compared with the corresponding sequences available in the GenBank database (http://www.ncbi-nlm-nih.gov/) using the BLAST program. A multiple sequence alignment was carried out before the construction of a phylogenetic tree by MEGA program version 5 (36) with the neighbour-joining method (31). In pairwise comparisons, sequence similarities were computed using PHYDIT program version 1.0 (http://plaza.snu.ac.kr/jchun/phydit/).

Effects of different fermentation media on the production of antimicrobial compounds

The most distinctive antimicrobial isolate was chosen and evaluated for its potential to form antimicrobial substances. Six different fermentation broths including potato dextrose broth (PDB) (Kemmar, Thailand), YpSs (2), AMHU-5 (22), Emerson's Broth (EM) (2), Bennett's Broth (BN) (2), and F-4 (8) were used to grow the isolates. Seventy milliliters of each broth was used at 30°C and shaking at 125 rpm, for 7 d. The biomass was then removed by centrifugation at 6,000 rev min^{-1} for 15 min. The supernatant of each culture broth was extracted by ethyl acetate at a ratio of 1:1 (v/v). The mixture was mixed vigorously for 5 min and left overnight, and the extraction was repeated 3 times. The ethyl acetate residual was removed by evaporation at 40°C using a rotary vacuum evaporator (Rotavapors® R-215 BUCHI). The residual of antimicrobial substances was re-suspended in methanol at a concentration of 50 mg mL^{-1} and used as a crude extract for the antimicrobial test using the agar well diffusion assay against the same set of test organisms listed in Table 1.

Test bacteria were grown in nutrient broth (Difco™, USA) at 37°C and shaking at 125 rpm for 1 d, while the test yeasts were grown in Sabouraud broth (24) at 30°C and shaking at 125 rpm for 16 h, before use. The cell densities of both test organisms were then adjusted relative to the 0.5 McFarland Standard, which corresponded to 10^8 CFU mL^{-1}. Spore suspensions of phytopathogenic fungi were prepared by adding 0.85% (w/v) NaCl solution and scraping the fungal mycelia previously grown on PDA for 3–5 d. The concentration of the fungal spores was adjusted by the NaCl solution to $1–3\times10^6$ spores mL^{-1} and quantified by a hemocytometer (BLAUBRAND®, Germany). All prepared suspensions of the test organisms were swabbed on their respective agar media including NA (for the test bacteria), SBA (for the test yeasts), and PDA (for the phytopathogenic fungi), on which wells were made. Fifty μL of the crude antimicrobial extract was added onto each agar well, while the same volumes of a negative control (methanol) and two positive controls (streptomycin [Wako Pure Chemical Industries, Japan] and benomyl [Banlee®, Thailand]) were added individually to the other wells. The positive controls were prepared by dissolving a powder of the antibiotics with methanol at the same concentration (50 mg mL^{-1}) of the crude extract before use. Inhibition activity was observed by the appearance of inhibition zones (mm Ø), the sizes of which were recorded after an incubation at 37°C for 1 d (for the test bacteria), at 30°C for 1 d (for the test yeasts), and at 30°C for 3–5 d (for the phytopathogenic fungi). All tests were performed in triplicate.

Determination of minimal inhibitory concentrations (MICs)

The most distinctive antimicrobial isolate was grown in 500 mL of PDB at 30°C and shaking at 125 rpm for 7 d. Its cell-free culture fluid was prepared by filtration through Whatman® No. 1 filter paper, and was then extracted by ethyl acetate following a previous extraction protocol. The crude extract (5 mg mL^{-1}) was serially diluted 2-fold, and appropriate dilutions (2.50 to 6.10×10^{-4} mg mL^{-1}) were tested for their antimicrobial activity using the paper disc diffusion assay against the same set of test organisms listed in Table 1. Fifty μL of each dilution was loaded onto a sterilized filter paper disc, while the same volumes of negative control (methanol) and positive controls (streptomycin and benomyl) were also individually loaded onto the other paper discs. The positive controls were prepared by dissolving the powder of the antibiotics with methanol at the same concentration (5 mg mL^{-1}) of the crude extract, while a set of 2-fold dilutions was performed as described above before use. MICs were determined as the lowest concentration showing inhibitory activity (appearance of an inhibition zone) against the test organisms. All tests were performed in triplicate.

Statistical analysis

Differences in means were evaluated by a one-way analysis of variance (one-way ANOVA) using Tukey's *post hoc* at a significant level of $P\leq0.05$ within SPSS version 17.0. The statistically analyzed data of *F*-distribution values were shown elsewhere in this study. The mean values with standard deviations (SDs) were computed on the basis of an at least triplicate data set.

Results

Termite nest actinobacteria and their generic abundance

A total of 118 actinobacterial strains were isolated from 8 termite nest samples (Table 2), while HV agar with a pretreatment of 1.5% (w/v) phenol was the optimal isolation process, giving the highest number of isolates (44.9%). A range of termite nest pH (5.3–7.2) was measured, and the average pH in each termite nest was shown in Fig. 1. Forty-five actinobacterial isolates were derived from termite nest pH 5.3–5.8, 54 isolates from pH 6.0–6.6, and 19 isolates from pH 6.6–7.2. Among all isolates, 56.8% were derived from carton nests, 31.4% were derived from mound nests, and 11.9% were derived from subterranean nests (Table 2 and Fig. 2a). All isolates within the non-*Streptomyces* group (Table 2 and Fig. 2b) were primarily identified using key phenotypic data into 7 different genera including *Amycolatopsis* (7.4%), *Kitasatospora* (14.8%), *Microbispora* (7.4%), *Micromonospora* (11.1%), *Nocardia* (33.3%), *Pseudonocardia* (11.1%) and *Streptosporangium* (14.8%). The 16S rRNA gene sequencing data of some bioactive isolates belonging to the non-*Streptomyces* group confirmed that the primary identification was accurate. For example, isolates CMU-NKS-2, CMU-NKS-51, CMU-NKS-70, and CMU-NKS-77 were primarily identified as the genera *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia*, and *Nocardia*, respectively. Consequently, the phylogenetic positions of these isolates were determined to be closely related to *Amycolatopsis mediterranei* NRRL B-3240^T, *Micromonospora echinofusca* HBUM 175187^T, *Pseudonocardia oroxyli* D10^T, and *Nocardia harenae* WS-26^T, respectively (Table 3). In addition, slight differences were observed in the % abundance of the actinobacterial groups (*Streptomyces*, non-*Streptomyces*, and unidentified genera) found in each type of termite nest (Table 2 and Fig. 3a). However, *Streptomyces* was the dominant genus found in every type of termite nest. The generic abundance of the non-*Streptomyces* group varied across the different types of termite nests examined, and the most diverse genera (6 genera) were

Table 1. MIC values of a crude antimicrobial extract derived from *Streptomyces* sp. CMU-NKS-3.

Test organism	MIC (mg mL^{-1})		
	Crude extract from *Streptomyces* sp. CMU-NKS-3	Positive control	
		Streptomycin	Benomyl
Gram positive bacteria[a]			
Bacillus cereus[1]	1.22×10^{-3}	0.02	ND
Enterococcus faecalis ATCC 29217[2]	0. 31	0.04	ND
Micrococcus luteus[3]	1.22×10^{-3}	2.44×10^{-3}	ND
Staphylococcus aureus ATCC 29213[4]	2.44×10^{-3}	4.88×10^{-3}	ND
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[5]	—	0.62	ND
Gram negative bacteria[b]			
Enterobacter aerogenes[6]	0.16	0.04	ND
Escherichia coli ATCC 35218[7]	—	0.08	ND
Escherichia coli O157:H7[8]	—	0.16	ND
Klebsiella pneumoniae (ESBL+)[9]	—	0.04	ND
Proteus mirabilis[10]	0.02	0.08	ND
Proteus vulgaris[11]	—	0.02	ND
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27859[12]	—	0.08	ND
Pseudomonas fluorescens[13]	0.04	2.50	ND
Salmonella sp. Group D[14]	—	9.76×10^{-3}	ND
Salmonella typhae[15]	—	0.62	ND
Serratia marcescens[16]	—	0.16	ND
Yeasts[c]			
Candida albicans[17]	6.10×10^{-4}	0.31	ND
Cryptococcus neoformans[18]	6.10×10^{-4}	0.08	ND
Filamentous fungi[d]			
Aspergillus flavus[19]	1.25	ND	0.31
Colletotrichum musae[20]	0.62	ND	0.08
Fusarium solani[21]	0.31	ND	0.08
Rhizoctonia solani AG-2[22]	0.16	ND	0.02
Sclerotium solani[23]	0.16	ND	0.04

[a,b,c] The initial stocks were kindly provided by the Central and Diagnostic Laboratory, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand. [d]The filamentous fungi (phytopathogens) were taken from a culture collection at the Sustainable Development of Biological Resources Lab (SDBR), Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University. [1–23]Index numbers refer to the test organisms shown in Fig. 6. Not determined (ND) and no inhibition activity (—) were also observed, while methanol was used as a negative control for all tests. Initial concentrations of the crude extract and positive controls together with their dilution factors can be found in the Materials and Methods section. Tests were performed in triplicate, and no significant difference was observed in the results derived from triplicate experiments.

Table 2. Actinobacteria isolated from termite nests

Termite nests	*Streptomyces*	Non-*Streptomyces**							Unidentified genera	Total	Number of bioactive isolates that antagonized at least one test organism†			
		a	b	c	d	e	f	g			h	i	j	k
Mound (3)	22	1	3	1	0	4	0	1	5	37	3 5 3	6 8 4	2 4 3	3 5 6
Carton (3)	43	1	0	1	3	5	1	3	10	67	9 3 5	11 7 4	8 3 4	7 3 6
Subterranean (2)	8	0	1	0	0	0	2	0	3	14	2 2	4 3	1 2	4 1
Total	73	2	4	2	3	9	3	4	18	118	32	47	27	35

The numbers in parentheses refer to the number of termite nest samples. *The non-*Streptomyces* group comprised (a) *Amycolatopsis*, (b) *Kitasatospora*, (c) *Microbispora*, (d) *Micromonospora*, (e) *Nocardia*, (f) *Pseudonocardia*, and (g) *Streptosporangium*. †Test organisms comprised (h) Gram positive bacteria, (i) Gram negative bacteria, (j) yeasts, and (k) filamentous fungi.

detected in carton nests and the fewest (2 genera) in subterranean nests (Table 2 and Fig. 3b). Among this non-*Streptomyces* group, *Nocardia* was the dominant genus found in mound and carton nests, while *Pseudonocardia* was the dominant genus found in subterranean nests.

Antimicrobial actinobacteria and their phylogenetic analysis

Among all the actinobacterial isolates examined, 47 isolates (39.8%) exhibited antibacterial activity, while 35 isolates (29.7%) exhibited antifungal activity. Most of these bioactive isolates were identified as *Streptomyces*, while a few isolates belonged to the non-*Streptomyces* group (Table 3). When we compared the abundance of the bioactive isolates derived from each type of termite nest, at least 20% of each could inhibit at least one test organism (Table 2 and Fig. 4), and most of the isolates could inhibit at least one Gram negative bacterium. However, no significant differences were observed in the % of bioactive isolates detected in the different types (mound, carton and subterranean) of termite nests or in the inhibition of different test organisms (Gram positive bacteria^{F1}, Gram negative bacteria^{F2}, yeasts^{F3}, and filamentous fungi^{F4}) (*F1-*

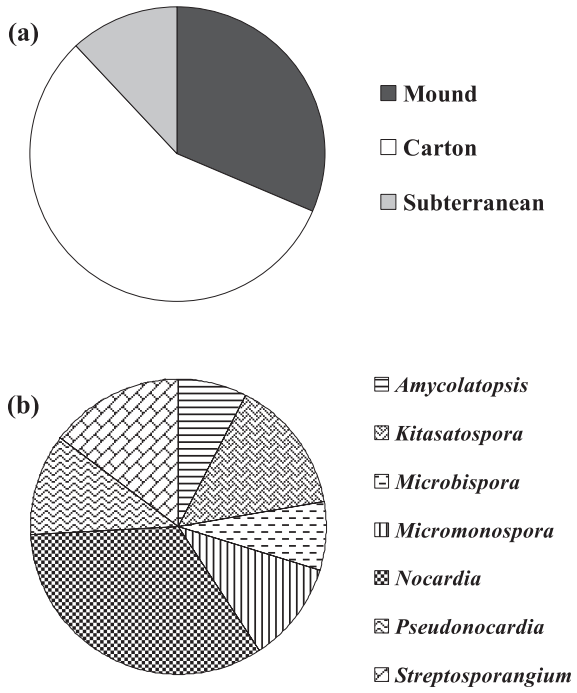


Fig. 2. Ratio of actinobacteria derived from each type of termite nest (**a**) and primary identification of actinobacteria that belong to the non-*Streptomyces* group (**b**). This identification was performed on the basis of some key phenotypic characterizations (see also the Materials and Methods section).

$4_{(2,5)}$ = 0.429, 1.301, 0.095, 1.261, P=0.001). Among all bioactive actinobacteria, the distinctive antimicrobial activities of 12 isolates were greater than those of the other isolates, as listed in Table 3. Based on the phylogenetic analysis of these distinctive isolates, the % similarities of the 16S rRNA gene sequences matched to the closest sequences available in GenBank database were 99.0% except for the isolate CMU-NKS-5, which was closely related to *Streptomyces bungoensis* NBRC 15711^T (98% sequence similarity, Table 3). Eight isolates belonged to the genus *Streptomyces*, while 4 isolates belonged to the non-*Streptomyces* genera, including *Amycolatopsis* (isolate CMU-NKS-2), *Micromonospora* (isolate CMU-NKS-51), *Pseudonocardia* (isolate CMU-NKS-70), and *Nocardia* (isolate CMU-NKS-77). The most distinctive antimicrobial isolate, *Streptomyces* sp. CMU-NKS-3 (which had the largest inhibition zone against most of the test organisms at the primary screening) was closely related to *Streptomyces padanus* MITKK-103^T, as supported by 99% similarity in the 16S rRNA gene sequence. All distinctive isolates were classified into 4 families (*Streptomycetaceae*, *Micromonosporaceae*, *Nocardiaceae* and *Pseudonocardiaceae*) of the order *Actinomycetales* by phylogenetic analysis (Fig. 5), while the accession numbers (KF746332–KF746343) of their 16S rRNA gene sequences obtained after their deposition to the GenBank database can be found in Table 3.

Influence of different nutrients on the production of antimicrobial substances by Streptomyces *sp. CMU-NKS-3*

Isolate CMU-NKS-3 showed the most distinctive antimicrobial activity against most of the test organisms examined, and was assessed for its potential to form antimicrobial substances using 6 different fermentation broths (Fig. 6). Among all the broths tested,

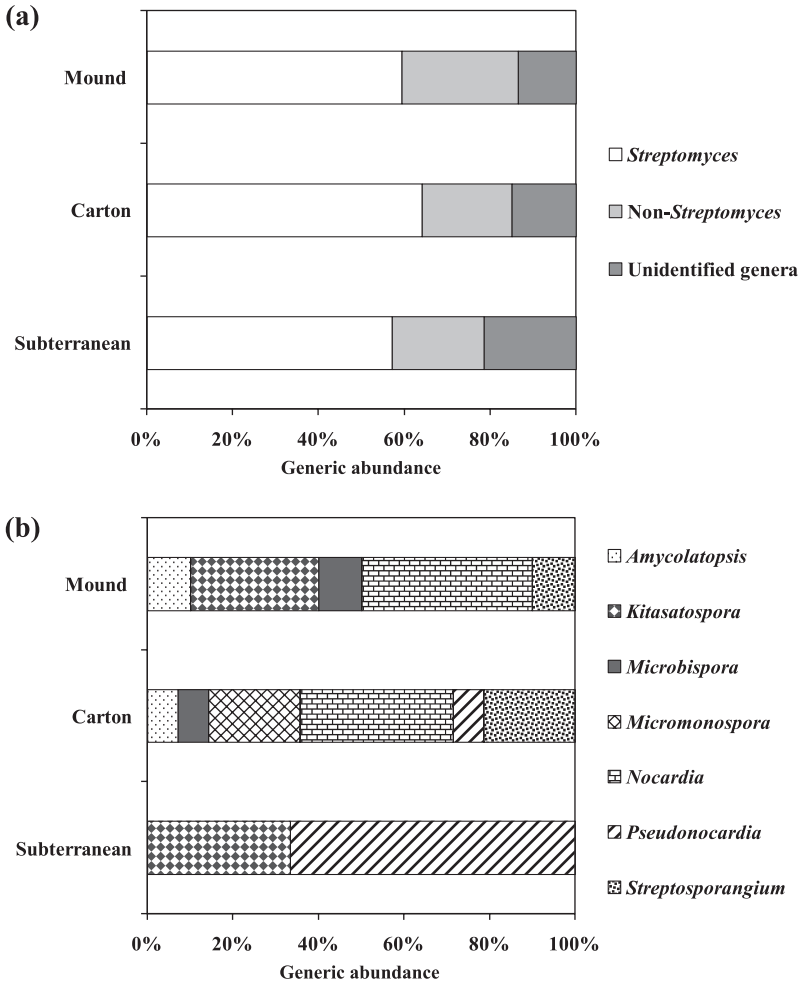


Fig. 3. Generic diversity of actinobacteria isolated from each type of termite nest. All actinobacteria found in each type of termite nest were classified into 3 groups including *Streptomyces*, non-*Streptomyces*, and unidentified genera (**a**), while members of the non-*Streptomyces* group were primarily identified into their genera (**b**). This identification was performed on the basis of some key phenotypic characterizations (see also the Materials and Methods section).

Table 3. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequences of distinctive antimicrobial actinobacteria isolated from different types of termite nests

Isolate number	Termite nests	Sequence length (nt)	Closest related bacteria in the GenBank database	Accession number	% Sequence similarity
CMU-NKS-2	Carton	1,239	*Amycolatopsis mediterranei* NRRL B-3240^T	KF746333	99
CMU-NKS-3	Carton	1,375	*Streptomyces padanus* MITKK-103^T	KF746332	99
CMU-NKS-5	Subterranean	1,435	*Streptomyces bungoensis* NBRC 15711^T	KF746334	98
CMU-NKS-7	Carton	1,340	*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NBRC 340^T	KF746335	99
CMU-NKS-12	Mound	1,359	*Streptomyces bingchengensis* HBUM 174849^T	KF746336	99
CMU-NKS-51	Carton	1,345	*Micromonospora echinofusca* HBUM 175187^T	KF746341	99
CMU-NKS-67	Mound	1,175	*Streptomyces roseocinereus* NBRC 13829^T	KF746337	99
CMU-NKS-70	Subterranean	1,342	*Pseudonocardia oroxyli* D10^T	KF746342	99
CMU-NKS-77	Carton	1,356	*Nocardia harenae* WS-26^T	KF746343	99
CMU-NKS-79	Mound	1,328	*Streptomyces griseocarneus* NBRC 13428^T	KF746338	99
CMU-NKS-110	Mound	1,071	*Streptomyces ginsengisoli* Gsoil 025^T	KF746339	99
CMU-NKS-111	Subterranean	1,330	*Streptomyces bingchengensis* HBUM174849^T	KF746340	99

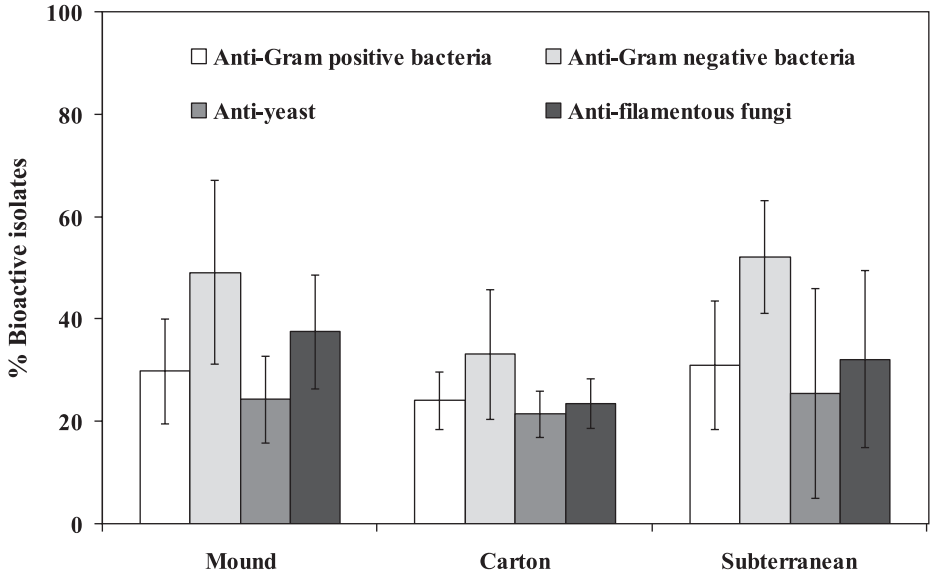


Fig. 4. Percentage of the bioactive isolates of actinobacteria isolated from each type of termite nest. The bioactive isolates were quantified based on their capacity to inhibit the growth of at least one test organism. The graph was plotted by means ± SDs computed based on the data derived from different population numbers (numbers of termite nest samples) taken from Table 2. Statistical comparisons can be found elsewhere in this study.

PDB and AMHU-5 were the optimal fermentation broths for the production of antimicrobial substances by the isolate, giving significant inhibitory activity that was equal to streptomycin or benomyl against *Bacillus cereus*^{F5}, *Enterococcus faecalis* ATCC 29217^{F6}, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213^{F7}, MRSA^{F8}, *Proteus mirabilis*^{F9}, and *Fusarium solani*^{F10} ($F5\text{-}10_{(6,14)}$ = 23.828, 64.253, 51.056, 49.000, 415.597, 383.140, P=0.01). F-4 was the poorest fermentation broth for the production of antimicrobial substances by the isolate. Although AMHU-5 was one of the optimal fermentation broths, the crude extract derived from this broth showed significantly weaker antifungal activities against *Cryptococcus neoformans*^{F11}, *Aspergillus flavus*^{F12}, *Rhizoctonia solani* AG-2^{F1}, and *Sclerotium solani*^{F14} than those derived from PDB ($F11\text{-}14_{(5,12)}$ = 245.169, 570.600, 181.413, 311.886, P=0.01). Several Gram negative bacteria were able to resist the inhibitory activity of the crude extract derived from the isolate grown in any fermentation broth (Table 1 and Fig. 6). However, the isolate showed board ranges of antimicrobial activity against the test organisms (Gram positive and Gram negative bacteria, yeasts, and filamentous fungi). The MIC values (Table 1) of the crude extract derived from the isolate grown in PDB ranged from 6.10×10^{-4} to 1.25 mg mL^{-1}, while the most susceptible test organisms were both yeasts (*Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*). However, most Gram negative bacteria and the Gram positive bacteria, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were the strongest antagonists among all the test organisms; no inhibition activity was observed when any concentration of the crude extract was tested. The strongest antagonist among all phytopathogenic fungi was *Aspergillus flavus*, with a MIC value of 1.25 mg mL^{-1}.

Discussion

In the present study, termite nests were shown to be an abundant source of actinobacteria; 118 actinobacterial isolates could be obtained. These actinobacteria were classified into 8 known genera in 4 families of the order *Actinomycetales*, excluding some unidentified genera. The highest number (67 isolates) and generic abundance (7 known genera) among all actinobacterial isolates were detected in carton nests. A previous study revealed that actinobacteria were microbiota in mound termite nests constructed by *Cubitermes niokoloensis* in eastern Casamance (Senegal) (11). The optimal isolation process used for actinobacteria in termite nest samples was HV agar together with a pretreatment by phenol solution. HV agar supplemented with some antibiotics was previously

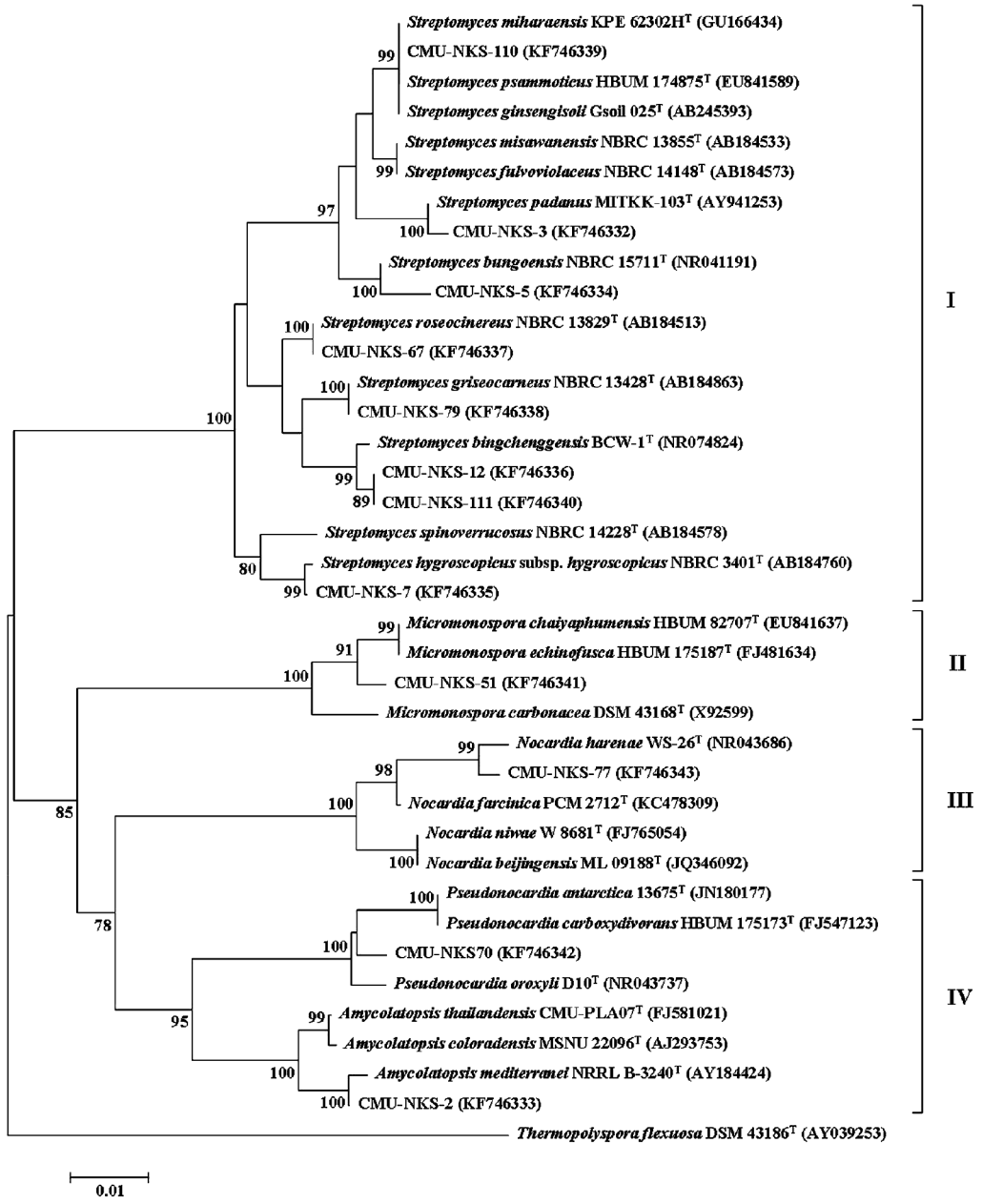


Fig. 5. A neighbour-joining phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences, showing the relationship between the distinctive antimicrobial actinobacteria isolated from termite nests and recognized members of the class Actinobacteria. *Thermopolyspora flexuosa* DSM 43186^T was used as an outgroup. Bootstrap values (>50%) based on 1000 replications are shown at the branch nodes. Bar = 0.01 substitutions per nucleotide position. The accession numbers of the gene sequences are indicated in parentheses. The phylogenetic tree was categorized into 4 families: (I) *Streptomycetaceae*, (II) *Micromonosporaceae*, (III) *Nocardiaceae*, and (IV) *Pseudonocardiaceae*.

reported to be an optimal selective medium for the isolation of actinobacteria from diverse soil habitats (9, 14, 16, 18). In addition, the pretreatment of samples prior to the isolation of actinobacteria is an important step that prevents contamination by low G+C and/or susceptible microorganisms that live in the same samples (13, 18). Termite nests constituted by different natural materials and different termite species lead to differences in the structural and physicochemical properties of the nests. This nest construction could be a selective ecological niche for actinobacteria. Our results showed that the pH of termite nests was slightly acid to neutral, while a higher abundance of actinobacteria was found in slightly acid termite nests than in neutral ones. We hypothesized that the location of termite nests may also influence the abundance of actinobacteria; a lower number of actinobacterial isolates was obtained from subterranean termite nests (found at a depth of 50–100 cm from the ground). This may be related to the oxygen limitation within this habitat because actinobacteria are aerobic microbes. In the present study, *Streptomyces* was the dominant genus found in every type of termite nest. However, a high generic abundance (8 genera) was also observed for the non-*Streptomyces* group, while the dominant genus within this group differed between the three termite nest types examined. Based on the results of our culture-dependent study, *Nocardia* (within the family *Nocardiaceae*) was the dominant genus found in carton and mound termite

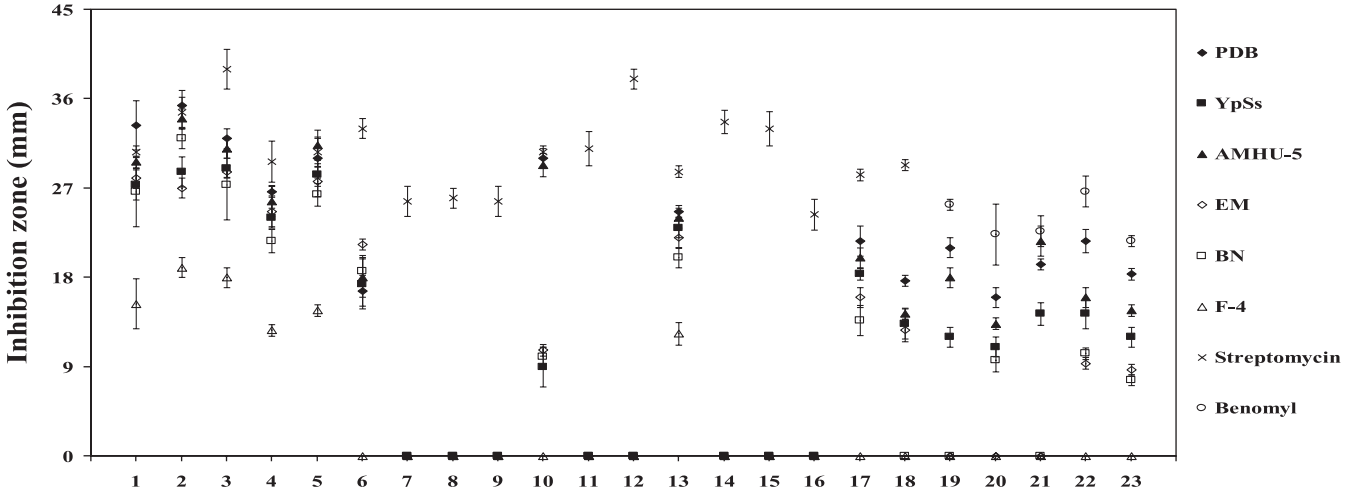


Fig. 6. Effects of fermentation broths on the production of antimicrobial substances by *Streptomyces* sp. CMU-NKS-3. PDB, YpSs, AMHU-5, EM, BN, and F-4 were used as the fermentation broths (see also the Materials and Methods section). Streptomycin (for test bacteria and yeasts) and benomyl (for test filamentous fungi) at a final concentration of 50 mg mL^{-1} were used as the positive controls. The numbers 1–23 represent the test organisms listed in Table 1. The graph was plotted by means ± SDs computed based on the data derived from triplicate experiments. Statistical comparisons can be found elsewhere in this study.

nests, which was similar to a metagenomic study of microbial biota living in mound termite nests reported by Fall *et al.* (11).

Previous studies demonstrated the biotechnological potentials of microbiota associated with termites. These microbes possess diverse bioactive functions to biosynthesize several applicable metabolites such as enzymes (3, 19, 26, 27, 29, 32) and antimicrobial substances (20, 21). Few studies have evaluated the antimicrobial function of cultivable actinobacteria isolated from termite-related sources especially in the termite gut (20, 21). We here demonstrated that termite nests housed abundant antimicrobial actinobacteria. *Streptomyces* has mainly been identified as the antagonist within termite-related habitats (20, 21), which was consistent with the results obtained in the present study. However, a high variety (4 genera within 3 families) of non-*Streptomyces* genera was also detected among the antimicrobial actinobacteria derived from the 3 termite nest types in this study. The ability to obtain novel actinobacteria that also exhibited antimicrobial activity was demonstrated. A previous study identified *Saccharopolyspora pathumthaniensis* sp. nov., a novel non-*Streptomyces* actinobacterium, in the termite gut. This novel species was closely related to *Saccharopolyspora endophytica*, as supported by 99.5% similarity in the 16S rRNA gene sequences, but a low DNA-DNA relatedness value of 53.3% (33). The 16S rRNA gene sequence generally needs to be examined to phylogenetically characterize microorganisms. However, the optimal range of this gene sequence similarity for determining differences in the genomic species varies depending on each phylogenetic species. The high sequence similarity (≥99%) of the gene, but low DNA-DNA relatedness (<70%) reported within the actinobacterial members is often found such as the example of the new species mentioned above. Therefore, recent studies (17, 28) assumed the novelty of actinobacterial isolates based on a lower % similarity in the gene sequences, approximately <99%, than their matched sequences available in the GenBank database. According to this predictive criterion, the actinobacterial isolate CMU-NKS-5, which showed 98% similarity in the gene sequence, could be assumed to be a novel species within the termite nest.

Different fermentation media were tested with the aim of evaluating the potential to form bioactive compounds of the most distinctive antimicrobial isolate, *Streptomyces* CMU-NKS-3. In a recent evaluation, potato and dextrose in PDB were the optimal nitrogen and carbon sources for the production of antimicrobial agents by the isolate. Differences in carbon and nitrogen sources together with increasing temperatures are known to be an important factor for the production of bioactive compounds by the genus *Streptomyces* (12, 37). The second optimal medium (AMHU-5) for the isolate composed of 4% carbon source (glucose) and 3% nitrogen sources (soybean meal and yeast extract) was less suitable for the production of antifungal agents. This was in contrast to a combination of 5% glucose and 1% soybean meal, which was found to be an optimal medium for the production of antifungal agents by *Streptomyces chattanoogensis* (12). Therefore, not only the nutrient composition and growing conditions, but also genetic variations in their different genomic species influence the production of bioactive compounds by actinobacteria. Isolate CMU-NKS-3 was identified as *Streptomyces padanus* MITKK-103^T, as supported by 99% sequence similarity in the 16S rRNA gene. Previous studies reported the potential to synthesize diverse antibiotics by *S. padanus* (39, 41). Recent studies by Wang *et al.* (39) and Ziong *et al.* (41) detected antifungal agents intracellularly within the mycelia of this *Streptomyces* species, while no antifungal activity was observed with the cell-free culture fluid. This was in contrast to our results in which antifungal activity was detected in the crude extract derived from the cell-free culture broth, which had relatively low MIC values against both single cell yeasts and phytopathogenic fungi (Table 1). This suggested that either the extracellular antifungal agents we gained may differ from the previously published compounds or isolate CMU-NKS-3 may be a novel species of the genus *Streptomyces*.

Conclusion

Termite nests represent an abundant source of cultivable actinobacteria that contribute diverse bioactive compounds for further applicable uses in the medical, pharmaceutical, and agricultural fields.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund RTA 5580007, the Office of Higher Education Commission of Thailand under National Research University (A1) program, and the Graduate School, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. We also acknowledge Dr. Nareeluk Nakaew, the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Thailand, for her assistance in improving the phylogenetic analysis.

References

1. Adegboye, M.F., and O.O. Babalola. 2013. Phylogenetic characterization of culturable antibiotic producing *Streptomyces* from rhizospheric soils. Mol. Biol. S1:001.
2. Atlas, R.M. 1946. Handbook of Microbiological Media, 2nd ed. CRC Press, Florida.
3. Basaglia, M., G. Concheri, S. Cardinali, M.B. Pasti-Grigsby, and M.P. Nuti. 1992. Enhanced degradation of ammonium-pretreated wheat straw by lignocellulolytic *Streptomyces* spp. Can. J. Microbiol. 38:1022–1025.
4. Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot. 58:1–26.
5. Berlanga, M., B.J. Paster, and R. Guerrero. 2009. The taxophysiological paradox: changes in the intestinal microbiota of the xylophagous cockroach *Cryptocercus punctulatus* depending on the physiological state of the host. Int. Microbiol. 12:227–236.
6. Bignell, D.E., H. Oskarsson, and J.M. Anderson. 1979. Association of actinomycetes-like bacteria with soil feeding termites (Termitidae, Termitinae). Appl. Environ. Microbiol. 37:339–342.
7. Butler, M.S., and A.D. Buss. 2006. Natural products—the future scaffolds for novel antibiotics. Biochem. Pharmacol. 71:919–929.
8. Cheeptham, N., T. Higashiyama, N. Phay, E. Fukushi, H. Matsuura, T. Mikawa, A. Yokota, A. Ichihara, and F. Tomita. 1999. Studies on an antifungal antibiotic from *Ellisiodothis inquinans* L1588-A8. Thai J. Biotechnol. 1:37–45.
9. Duangmal, K., A.C. Ward, and M. Goodfellow. 2005. Selective isolation of members of the *Streptomyces violaceoruber* clade from soil. FEMS Microbiol. Lett. 245:321–327.
10. Fall, S., S. Nazaret, J.L. Chotte, and A. Brauman. 2004. Bacterial density and community structure associated with aggregate size fractions of soil-feeding termite mounds. Microb. Ecol. 28:191–199.
11. Fall, S., J. Hamelin, F. Ndiaye, K. Assigbetse, M. Aragno, J.L. Chotte, and A. Brauman. 2007. Differences between bacterial communities in the gut of a soil-feeding termite (*Cubitermes niokoloensis*) and its mounds. Appl. Environ. Microbiol. 73:5199–5208.
12. Gupte, M.D., and P.R. Kulkarni. 2002. A study of antifungal antibiotic production by *Streptomyces chattanoogensis* MTCC 3423 using full factorial design. Lett. Appl. Microbiol. 35:22–26.
13. Hayakawa, H. 2008. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. Actinomycetologica. 22:12–19.
14. Hayakawa, M., and H. Nonomura. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for selective isolation of soil actinomycetes. J. Ferment. Technol. 65:501–509.
15. Hayakawa, M., Y. Yoshida, and Y. Iimura. 2004. Selection of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotype cluster. J. Gen. Appl. Microbiol. 96:973–981.
16. Hop, D.V., Y. Sakiyama, C.T. Binh, M. Otoguro, D.T. Hang, S. Miyadoh, D.T. Luong, and K. Ando. 2011. Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. J. Antibiot. 64:599–606.
17. Kaewkla, O., and C.M.M. Franco. 2013. Rational approaches to improving the isolation of endophytic actinobacteria from Australian native trees. Microb. Ecol. 65:384–393.
18. Khamna, S., A. Yokota, and S. Lumyong. 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. World J. Microbiol. Biotechnol. 25:649–655.
19. Khucharoenphaisan, K., U. Puangpetch, K. Puttaraksa, and K. Sinma. 2011. Grouping of Actinomycetes isolated from termites using biochemical character. J. Biol. Sci. 11:314–319.
20. Khucharoenphaisan, K., N. Sripairoj, and K. Sinma. 2012. Isolation and identification of actinomycetes from termite's gut against human pathogen. Asian J. Anim. Vet. Adv. 7:68–73.
21. Matsui, T., J. Tanaka, T. Namihira, and N. Shinzato. 2012. Antibiotics production by an actinomycete isolated from the termite gut. J. Basic Microbiol. 52:1–5.
22. Nakaew, N., W. Pathom-aree, and S. Lumyong. 2009. Generic diversity of rare actinomycetes from Thai cave soils and their possible use as new bioactive compounds. Actinomycetologica. 23:21–26.
23. Newman, D.J., and M.G. Cragg. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J. Nat. Prod. 70:461–477.
24. Ningthoujam, D.S., S. Sanasam, and S. Nimaichand. 2009. Screening of actinomycete isolates from niche habitats in Manipur for antibiotic activity. Am. J. Biochem. Biotechnol. 5:221–225.
25. Ohkuma, M., and T. Kudo. 1996. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. Appl. Environ. Microbiol. 62:461–468.
26. Pasti, M.B., and M.L. Belli. 1985. Cellulolytic activity of actinomycetes isolated from termites (Termitidae) gut. FEMS Microbiol. Lett. 26:107–112.
27. Pasti, M.B., A.L. 3rd Pometto, M.P. Nuti, and D.L. Crowford. 1990. Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut. Appl. Environ. Microbiol. 56:2213–2218.
28. Qin, S., J. Li, H.-H. Chen, G.-Z. Zhao, W.-Y. Zhu, C.-L. Jiang, L.-H. Xu, and W.-J. Li. 2009. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. Appl. Environ. Microbiol. 75:6176–6186.
29. Ramin, M., A.R. Alimon, K. Sijam, and N. Abdullah. 2008. Filter paper degradation by bacteria isolated from local termite gut. Res. J. Microbiol. 3:565–568.
30. Robert, O.E., U.O. Frank, and O.U. Agbonsalo. 2007. Influence of activities of termites on some physical and chemical properties of soils under different land use patterns: a review. Int. J. Soil Sci. 2:1–14.
31. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406–425.
32. Schafer, A., R. Konrad, T. Kuhnigk, P. Kampfer, H. Hertel, and H. Konig. 1996. Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. J. Appl. Microbiol. 80:471–478.
33. Sinma, K., Y. Ishida, T. Tamura, V. Kitpreechavanich, and S. Tokuyama. 2011. *Saccharopolyspora pathumthaniensis* sp. nov., a novel actinomycetes isolated from termite guts (*Speculitermes* sp.). J Gen. Appl. Microbiol. 57:93–100.
34. Subramani, R., and W. Aalbersberg. 2012. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. Microbiol. Res. 167:571–580.
35. Takizawa, M., R.R. Colwell, and R.T. Hell. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol. 59:997–1002.
36. Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28:2731–2739.
37. Theobald, U., J. Schimana, and H.P. Fiedler. 2000. Microbial growth and production kinetic of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. Antonie van Leeuwenhoek 78:307–313.
38. Verma, M., S. Sharma, and R. Prasad. 2009. Biological alternatives for termite control: a review. Int. Biodet. Biodeg. 63:959–972.
39. Wang, Y.F., S.J. Wei, Z.P. Zhang, T.H. Zhan, and G.Q. Tu. 2012. Antifungalmycin, an antifungal macrolide from *Streptomyces padanus* 702. Nat. Prod. Bioprospect. 2:41–45.
40. Goodfellow, M., P. Kämpfer, H.J. Busse, M.E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, and W.B. Whitmann. 2012. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 5. Springer, New York.
41. Xiong, Z.Q., Z.P. Zhang, J.H. Li, S.J. Wei, and G.Q. Tu. 2012. Characterization of *Streptomyces padanus* JAU4234, a producer of actinomycin X_2, fungichromin, and a new polyene macrolide antibiotic. Appl. Environ. Microbiol. 78:589–592.

Ann Microbiol (2015) 65:253–266
DOI 10.1007/s13213-014-0857-4

ORIGINAL ARTICLE

Promoting plant growth in a commercial rice cultivar by endophytic diazotrophic bacteria isolated from rice landraces

Chakrapong Rangjaroen · Benjavan Rerkasem · Neung Teaumroong · Rujirek Noisangiam · Saisamorn Lumyong

Received: 23 September 2013 / Accepted: 28 February 2014 / Published online: 11 April 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and the University of Milan 2014

Abstract Population density of endophytic diazotrophic bacteria (EDB) was highest in the rice landrace root tissues at nursery stage. Indole-3-acetic acid (IAA) production (0.85–16.66 μg mL^{-1}) was found in 21 strains tested. More than 80 % (18 isolates) of the isolates solubilized phosphate, while only 28.57 % (six isolates) of selected strains produced siderophore. Seventy-one percent of tested isolates produced ammonia. The effects of EDB isolated from rice landraces on seed and on the growth of the commercial jasmine rice cultivar Khao Dawk Mali 105 were evaluated in greenhouse. Inoculation of all EDB on rice seeds significantly increased nitrogen content in roots (P=0.05). The potentially useful isolates belonged to four different genera *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Novosphingobium* and *Sphingomonas*. In vivo colonization of *Burkholderia* sp. SS5, *Klebsiella* sp. SS2, *Novosphingobium* sp. TR4 and *Sphingomonas* sp. PS5 was confirmed using the commercial rice cultivar Khao Dawk Mali 105 as a model host. The inoculated roots with ß-glucuronidase (GUS)-tagged bacteria exhibited a blue color, which was most intense at the tip of root hairs, root tips, germination point and leaf tips.

C. Rangjaroen · S. Lumyong (✉)
Microbiology Division, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
e-mail: scboi009@gmail.com

C. Rangjaroen
e-mail: rangjaroen@gmail.com

B. Rerkasem
Lanna Rice Research Centre, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

N. Teaumroong · R. Noisangiam
School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand

Keywords Rice · Endophytic diazotrophic bacteria · Plant growth promoter · Symbiotic colonization

Introduction

Rice landraces mostly grown for household consumption in Thailand reveal potential for cultivation in natural farming systems (Rangjaroen et al. 2014). Previous studies reported some of their qualities, such as increased higher iron content in their rice grains (Pintasen et al. 2007), tolerance to soil acidity (Phattarakul 2008), and insect pest resistance (Oupkaew et al. 2011), in different sets of germplasms. Such qualities may be influenced by both genetic variation and cultivation condition. Although nitrogen fertilizer is generally required in rice production (Ladha and Reddy 2003; Ishii et al. 2011), demand for crops grown without chemical inputs is increasing. The rice landraces growing without nitrogen fertilizer are likely to use naturally available nitrogen, derived either from biological nitrogen fixation by free-living and plant-associated diazotrophs, or from microbial mineralization of soil nitrogen. There are a number of studies concerning the diazotrophic bacteria that live in association with the rice plant, in genera including *Pantoea*, *Bacillus*, and *Sphingomonas* in the seed (Mano et al. 2007), *Bacillus*, *Bukholderia*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, and *Novosphingobium* in the roots (Verma et al. 2004; Mano and Morisaki 2008), and *Azospirillum* and *Herbaspirillum* in the stem (Koomnok et al. 2007; Mano and Morisaki 2008). For one part of their life cycle, these endophytic bacteria inhabit the internal tissue of plants without eliciting any pathogenic symptoms or negative effect on their host (Ryan et al. 2008; Reinhold-Hurek and Hurek 2011). Many reports have revealed that these diazotrophic bacteria have the potential to promote plant growth, through various mechanisms, such as solubilization of inorganic phosphate and mineralization of organic phosphate (Jha and Kumar 2007), siderophore

production (Loaces et al. 2011) and synthesis of plant growth regulators like indole acetic acid (Piromyou et al. 2011; Arun et al. 2012), abscisic acid, gibberellic acid, cytokinins (Feng et al. 2006), vitamins (Baldani et al. 2000) and production of ACC-deaminase to reduce the level of ethylene (Tittabutr et al. 2008; Jha et al. 2012). Some of them, such as *Xanthomonas oryzae* and *Magnaporthe oryzae* (Yasuda et al. 2009), and *Botrytis cinerea* (Compant et al. 2005), exhibited biological control function against plant pathogens. These are evidences to support how the plant–microbe interaction has become one of the main factors of plant health and crop production development in natural production.

There are also many reports of application of EDB as a biofertilizer in the enhancement of rice growth and yield. Inoculation of *Azospirillum amazonense* increased dry matter accumulation of rice grain (7 to 11.6 %), the number of panicles (3 to 18.6 %) and nitrogen accumulation at grain maturation (3.5 to 18.5 %) (Rodrigues et al. 2008). Moreover, *A. brasilense* inoculum was reported to increase yield of rice up to 76.0 % (Thakuria et al. 2004). Some of these bacteria have already been applied as biofertilizers and they are available to farmers (Beatty and Good 2011). However, aside from environmental factors, the plant genotype is a very important agronomical aspect that should be considered during selection of diazotrophic strains, since it may act as selective filter for the endophytic bacteria that associate with the plants (Araújo et al. 2013). Many researchers have observed that wild (Engelhard et al. 2000; Elbeltagy et al. 2001; Chaudhary et al. 2012) and cultivated rice cultivars (Elbeltagy et al. 2001; Koomnok et al. 2007) are associated with different bacteria, and have suggested that it may result from plant breeding for higher yielding crop varieties. Rice landraces are known to have high genetic variation compared to modern improved cultivars. There are few reports about the isolation of EDB from rice landraces cultivated without fertilizer for their application in cultivation of commercial rice varieties. Among all rice-traded types, Thai jasmine rice has achieved recognition for its high quality. Since 1988, export volume of jasmine rice from Thailand has been growing at the average rate of 100,000 tons per year (Rerkasem 2007). Especially, the premium jasmine rice cultivar Khao Dawk Mali 105 is the most famous because of its aroma and tender cooking properties (Sapsirisopa et al. 2009). This study aimed to evaluate the potential of EDB isolated from different highland rice landraces for plant growth promotion. The possibility to apply EDB as a bio-fertilizer for cultivation of the commercial rice cultivar Khao Dawk Mali 105 was examined both in vitro and in vivo. In addition, the *in planta* symbiotic colonizations of the EDB were investigated to understand their existence for sustaining rice production.

Materials and methods

Sampling conditions and plant materials

Six rice landraces including Bue Po Lo-1 (BP1), Bue Po Lo-2 (BP2), Bue Pra Taw-1 (BPT-1), Bue Pra Taw-2 (BPT-2), Bue Pra Do (BPD) and Bue Saw Mi (BSM) were collected from a highland village at Chom Thong District, Chiang Mai, Thailand (1,137–1,214 m above sea level). Their geographical location was determined to be latitude N18.38798-N18.39682 and longitude E098.50261-E098.51631. The farm was established in 2005, and aimed to cultivate a variety of crops for household consumption of villagers living in the area. The farming system mainly involved natural organic practices with little or no chemical input. The rice seeds were obtained from the farmer in April, while other rice plant tissues at nursery, vegetative and reproductive stages were prepared from ten individual rice plants taken from the fields in June, August and September. Selected plants were transferred in plastic bags kept in an ice-box, and subsequently processed within 12 h.

Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from rice plant tissues

The fresh rice tissue samples were gently washed with tap water and rinsed with sterilized water several times. Leaf, stem and root were separated and cut into 2–3 cm pieces. Each tissue derived from ten plants at the same growth stage were pooled together and surface sterilized with 70 % (v/v) ethyl alcohol for 1 min, 2 % (v/v) NaOCl for 2 min, 95 % (*v/v*) ethyl alcohol for 30 s and 30 % (v/v) H_2O_2 for 1 min, respectively, followed by washing four times with sterilized distilled water; excess moisture was then removed with sterile absorbent papers. Five pieces of sterilized samples from each rice tissue type and growth stage were placed on nutrient agar to confirm surface sterilization.

N-free Rennie medium semisolid agar (Elbeltagy et al. 2001) was used as a medium in serial dilutions for selective isolation of EDB. The medium was incubated at 30 °C for 5 days. Population density was estimated by most probable number (MPN) (Roesch et al. 2006) using the freeware MPN calculator (Saengkerdsub et al. 2007). Positive tubes were then applied onto plates containing N-free agar (Döbereiner et al. 1972) and incubated at 30 °C for 3 days. Single colonies of bacteria were picked, kept growing as subsurface pellicles (Prakamhang et al. 2009) in N-free RMR semisolid agar, and grown at 30 °C for 5 days. The pathogenicity of the obtained bacteria was tested by induction of infection on *Nicotiana tabacum* leaf (Klement 1963). Briefly, each bacterial isolate (10^7 CFU mL^{-1}) was inoculated into the intercellular spaces of tobacco leaf by injection, and the presence of necrotic zones was estimated after 48 h compared to positive (sterilized water) and negative controls (*X. oryzae*).

Evaluation of plant growth promotion potential

Nitrogenase activity of diazotropic bacteria at free-living stage

The nitrogen-fixing activity of the bacterial isolates was determined by acetylene reduction assay (ARA). The bacterial isolates were grown in N-free RMR semisolid agar at 30 °C for 7 days in test tubes. Air was removed from the culture tubes. Acetylene gas was then injected into the culture tubes to replace the air, at a final concentration of 10 % (v/v). The cultures were then incubated at 30 °C for 24 h. The ethylene concentration in head space was measured using a gas chromatograph equipped with flame ionization detector and Porapak-N column (Koomnok et al. 2007).

Nitrogenase activity of diazotropic bacteria at symbiotic stage

Nitrogenase activity of the bacterial isolates associated with rice seedlings was evaluated using the ARA method, as previously mentioned. In order to prepare the rice seedlings, unhusked rice seed was sterilized for 3 min in 95 % ethanol, and the husk was removed by hand. The seed without husk was then surface sterilized by a sterilization solution (1 l of the sterilization solution contains 30 mL of 10 % (v/v) sodium hypochlorite, 1 g of Na_2CO_3, 30 g of NaCl and 1.5 g NaOH) (Hurek et al. 1994). The seed was washed three times with sterile distilled water and treated by shaking in 0.01 % (w/v) $HgCl_2$ solution at room temperature for 7 min, followed by washing with sterile distilled water (Sriskandarajah et al. 1993). Each seed was planted into a culture tube containing 5 mL of nitrogen-free rice growth medium (Elbeltagy et al. 2001), and inoculated with each bacterial isolate (approximately 10^8 CFU mL^{-1}). The rice was grown for 7 days, and acetylene was then injected into gas phase, followed by the measurement steps described above. The nitrogenase activity was compared with and without bacterial inoculation of the same rice cultivar, with five replicates for each treatment.

Production of indole-3-acetic acid (IAA)

The production of IAA was determined by a modified colorimetric method (Glickmann and Dessaux 1995). Selected isolates of the EDB (10^7 CFU mL^{-1}) were inoculated into JM medium supplemented with 10 mM NH_4Cl and 100 μg mL^{-1} DL-tryptophan (Hartmann et al. 1983) and incubated at 30 °C for 72 h. Bacterial cultures were centrifuged at 4 °C at 10,000×*g* for 15 min, and the supernatant was quantified colorimetrically at 530 nm using Salkowski's reagent (Gordon and Weber 1951) compared to a standard indole-3-acetic acid solution (Sigma, USA). All experiments were done in five replicates.

Production of ammonia

The selected isolates of EDB were tested for the production of ammonia in peptone water. The bacteria (10^7 CFU mL^{-1}) were grown in peptone water and incubated at 30 °C for 48 h. The culture broth was centrifuged at 4 °C at 10,000×*g* for 15 min. The supernatant was collected and mixed with 0.5 mL of Nessler's reagent (Hach company, Loveland, USA). Development of brown to yellow color was recorded as a positive test for ammonia production (Cappuccino and Sherman 2001). All experiments were done in five replicates.

Production of siderophore

Chrome azurol S (CAS) assay was used to detect siderophores produced by the selected isolates of EDB (Schwyn and Neilands 1987). The isolates were stabbed on CAS agar plates and incubated in the dark at 30 °C for 2 days. After incubation, the culture plates that changed in color from blue to purple or yellow were considered as positive for siderophore production. All experiments were done in five replicates.

Solubilization of phosphate

Phosphate solubilization by the selected EDB isolates was tested using modified Pikovskaya's agar plates (Chaiharn and Lumyong 2009). The isolates were spotted on the agar plates and incubated at 30 °C for 24 h. The presence of a clear zone around a bacterial colony was interpreted as a positive. Calculation of the phosphate solubilization index (SI) was carried out following the previously described method (Kumar and Narula 1999). These experiments were done in five replicates.

Assays for cellulolytic enzymes

Cellulase assay for the selected EDB was performed on modified nitrogen free agar (Döbereiner et al. 1972) supplemented with 0.25 % (w/v) carboxymethyl cellulose instead of glucose and 0.5 % (w/v) tryptone (Verma et al. 2001). The bacteria were spotted on the agar plate and incubated at 30 °C for 48 h, then soaked with Congo red solution for 1 min and then rinsed with 1 M NaCl solution (Reinhold-Hurek et al. 1993). The screening for pectinase production was tested by spotting bacteria on the same nitrogen free agar that was supplemented with 0.5 % (w/v) tryptone and 0.5 % (w/v) citrus pectin instead of glucose. The culture plates were incubated at 30 °C for 48, then soaked with 2 % (w/v) hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) solution for 30 min, and rinsed with 1 M NaCl solution to visualize the halo zone around the bacterial colonies (Mateos et al. 1992). Chitinase assay was carried out by spotting test of the bacteria onto chitin agar (Hsu and Lockwood 1975), while colloidal chitin component was

prepared following the protocol described by Chaiharn and Lumyong (2009). The culture plates were incubated at 30 °C for 72 h, and the presence of clear zone around inoculated colonies indicated positive chitinase activity.

Identification and classification of selected endophytic diazotrophic bacteria

The selected EDB were identified by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene. Total DNA of the bacteria was extracted using a modified potassium acetate method (Prakamhang et al. 2009) and used as a DNA template in PCR reactions. Amplification of the 16S rRNA gene was performed using a pair of universal primers, fD1 (5′-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3′) and rP2 (5′-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′) (Weisburg et al. 1991). DNA sequencing was performed by MACROGEN (Korea). The DNA sequences were aligned and compared to sequences available in GenBank. Phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining method using Mega 4 (Tamura et al. 2007), and confidence levels were estimated for 1,000 replicates by bootstrapping.

Tracking of *in planta* symbiotic colonization by endophytic diazotrophic bacteria

To obtain ß-glucuronidase (GUS)-marked strains, the plasmid pCAM120 (Wilson et al. 1995) was transferred into competent cells of selected EDB by electroporation. Conditions for the electroporation were 18 kv cm^{-1}, 100 Ω and 25 μF (Noisangiam et al. 2012). Blue colonies expressing GUS activity were selected in Luria-Bertani (LB) agar medium supplemented with streptomycin and gentamycin. Seeds of the commercial jasmine rice cultivar Khao Dawk Mali 105 were germinated on Petri dishes containing rice growth medium, and inoculated with the GUS-tagged bacteria. Rice seedlings were transferred into a test tube containing rice growth medium without nitrogen and grown at 25 °C under a light–dark cycle (16 h of light followed by 8 h of dark). Rice plant materials were sampled at various times, from 1 to 7 days after inoculation. Symbiotic colonization of the GUS-tagged bacteria within the rice plant tissues was examined by histochemical staining (Manassila et al. 2007).

Application of selected endophytic diazotrophic bacteria in commercial rice cultivar in vivo

The selected EDB for improving the growth of commercial jasmine rice cultivar Khao Dawk Mali 105 was evaluated in greenhouse. Seeds of the rice were surface sterilized as previously described. Five sterilized seeds were placed on nutrient agar to confirm the surface sterilization. The sterilized seeds were inoculated with each bacterial suspension (approximately 10^8 CFU mL^{-1}), transferred into seedbed and incubated for 7 days before transplantation into a plastic pot. The rice plants were grown hydroponically in nitrogen free solution (pH 5.5) (Elbeltagy et al. 2001). The pH of the nutrient solution was maintained by adding diluted NaOH or HCl daily, while the nutrient solution was changed twice weekly. Three replicate pots of five plants per pot were then transferred to a hydroponic cultivation system. Leaf nitrogen levels in rice were estimated weekly from 7 to 35 days after inoculation using a chlorophyll meter (Minolta SPAD502). Root and shoot lengths of inoculated plants were monitored at 7 and 35 days after inoculation. Thirty-five days after planting, shoot and root dry weight and % nitrogen were measured. The growth rate (GR) was calculated as followed, GR (cm day^{-1}) = $(W_2–W_1)/(T_2–T_1)$, where W_1 is the length of rice plant after 7 days from seedling emergence (T_1) and W_2 is the length of rice plant at the end of the experiment (T_2 : 35 days) (Medany et al. 2007).

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the SPSS 16.0 computer program (SPSS, Chicago IL, USA), applying the Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at significant level of $P=0.05$.

Results

Endophytic diazotrophic bacteria and their plant growth-promoting potentials

A total of 396 endophytic diazotrophic bacterial (EDB) strains were obtained from the different tissues (mature seeds, leaves, stems and roots) of different highland rice landraces, at different growth stages.

Subpellicel characteristics of isolated diazotrophic bacteria were observed in N-free semisolid medium inoculated with surface sterilized mature seeds, leaves, stems and root samples from six samples of different highland rice landraces. The population size of EDB in various parts and growth stages of these highland rice landraces ranged from 1.81±0.3 to 4.79±0.4 log MPN g^{-1} fresh tissue (Fig. 1). The highest population density of EDB from all rice samples was found in the root tissues at nursery stage, whereas the lowest population density was found in mature seeds from all rice cultivars. The EDB population density at all growth stages of the rice cultivars BP1, BP2, BPT2 and BPD was lower in leaves than in stems.

Out of 250 bacterial strains positive for ARA, 21 strains that were significantly positive ($P \leq 0.01$) were selected. As free-living bacteria, the selected strains showed nitrogenase activity ranging from 17.58 to 225.90 nmol ethylene h^{-1} mg

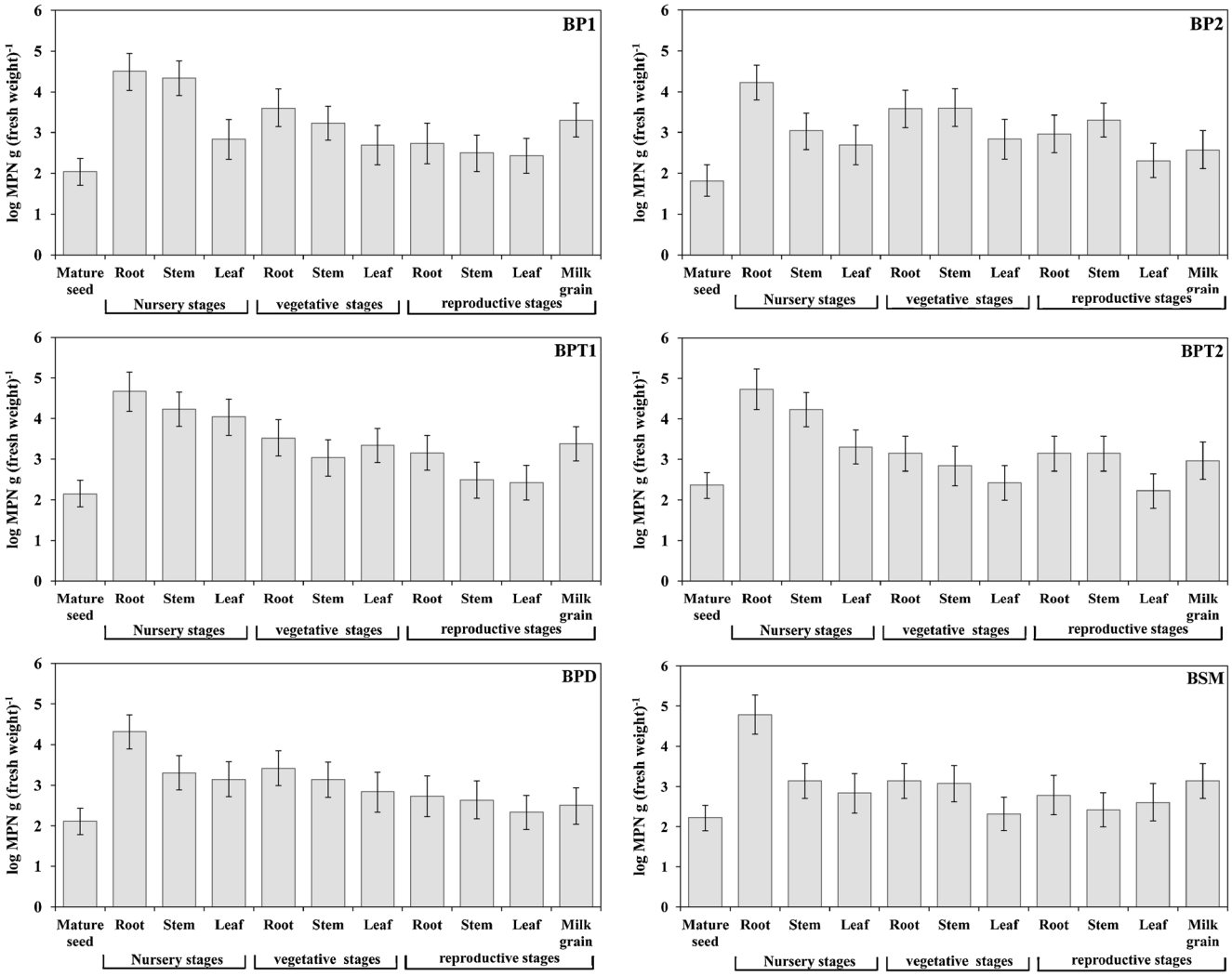


Fig. 1 Density of endophytic diazotrophic bacteria isolated from plant tissues of rice landraces. The rice cultivars include Bue Po Lo-1 (BP1), Bue Po Lo-2 (BP2), Bue Pra Taw-1 (BPT-1), Bue Pra Taw-2 (BPT-2), Bue Pra Do (BPD) and Bue Saw Mi (BSM). Each *bar* represents a most probable number±95 % confidence interval of five replicates

protein^{-1}. When endophytic, their nitrogenase activity ranged from 86.39 to 888.37 nmol ethylene h^{-1} g (dry weight)$^{-1}$ (Fig. 2).

The pathogenic activity of EDB was evaluated by inducing infection of the bacterium in the intercellular spaces of mature tobacco leaves and assessing the presence of necrotic zones. The results indicated the absence of hypersensitivity of tobacco plants to infection by any strain of EDB, while *X. oryzae* induced necrotic zones on the tobacco leaves 2 days after infection.

Nineteen selected EDB strains showed more than one trait of plant growth promotion. Out of 19 strains, four strains including RR3, RR5, SR6 and SS5 were positive for all tests of plant growth-promoting activities (Table 1). All selected EDB strains produced IAA in the presence of tryptophan, ranging from 0.85 to 16.66 μg mL^{-1}, with the significantly highest (P=0.05) IAA activity produced by bacteria strains PS7 and PS5 (16.67±0.42 and 16.16± 1.59 μg mL^{-1}, respectively). Among the selected bacterial strains, 15 (71.42 %) were able to produce ammonia in peptone water medium. Siderophores were detected in six strains (28.57 %). Five selected strains (PR3, PR4, RR3, RR5 and SR6) changed the medium from blue to a light yellow color, and only strain SS5 changed the medium to purple.

On the basis of the phosphate solubilization assay, 85.71 % of selected EDB were able to mobilize calcium phosphate. The strain TR5 showed the highest significant (P=0.05) solubilization index (2.24±0.10). Plant cell degrading enzymes activities were determined from the selected strains of EDB. Of these EDB, 95.24 % produced pectinase, while 85.71 % and 38.09 % of them showed activities of cellulase and chitinase, respectively. Seven (33.34 %) strains showed abilities to

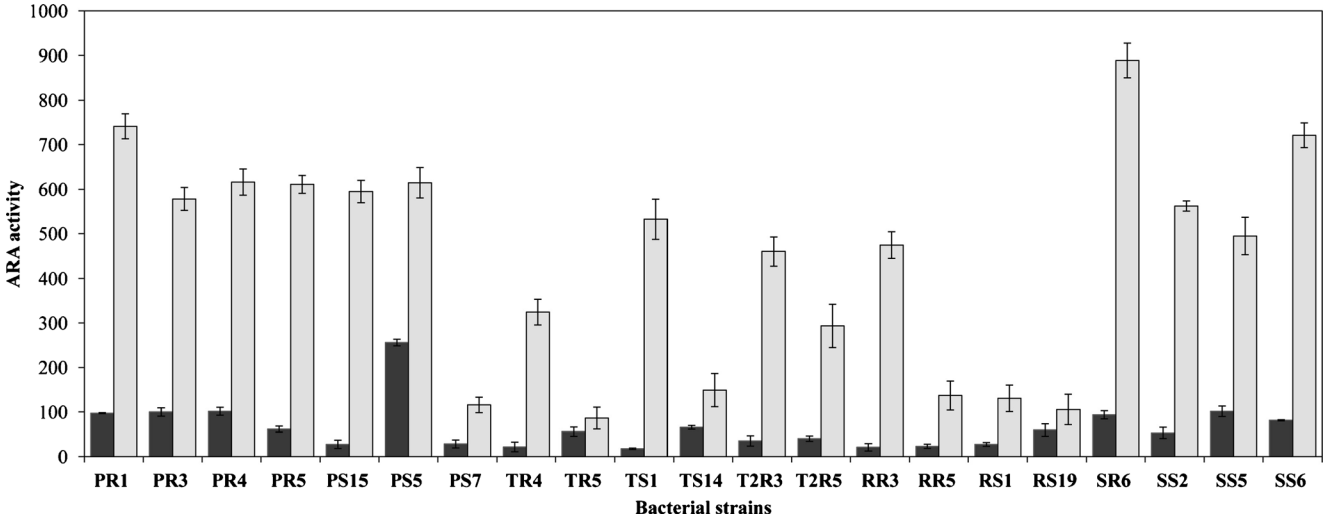


Fig. 2 Nitrogenase activity of diazotrophic bacteria under free-living (■, n mol C_2H_4 h^{-1} mg $protein^{-1}$) and symbiotic [□, n mol C_2H_4 h^{-1} g $(dry\ weight)^{-1}$] conditions, tested on the commercial rice cultivar Khao Dawk Mali 105 using an acetylene reduction assay. Each *bar* represents a means ± SD of five replicates

Table 1 Some characteristics of potential strains of endophytic diazotrophic bacteria

Strain[Φ]	Rice cultivar	Tissue type	Plant growth-promoting activities				Enzyme activities		
			IAA (ug mL^{-1})*	NH_3[Ξ]	Siderophore[Ψ]	SI[Φ]	Cel [♠]	Pec[♥]	Chi[♦]
PR1	Bue Po Lo 1	Root	6.47±0.34^{ef}	+	−	1.44±0.01^{cd}	+	+	+
PR3	Bue Po Lo 1	Root	0.85±0.03^{h}	−	+ (Yellow)	1.05±0.02^{ef}	+	+	+
PR4	Bue Po Lo 1	Root	2.12±0.23^{gh}	−	+ (Yellow)	1.18±0.05^{ef}	+	+	−
PR5	Bue Po Lo 1	Root	7.16±0.12^{ef}	+	−	1.71±0.08^{b}	+	+	+
PS15	Bue Po Lo 1	Mature seed	7.73±0.32^{de}	+	−	1.00±0.00^{f}	+	+	−
PS5	Bue Po Lo 2	Stem	16.16±1.59^{a}	+	−	1.26±0.05^{de}	+	+	−
PS7	Bue Po Lo 2	Stem	16.67±0.42^{a}	−	−	1.16±0.04^{ef}	+	+	+
TR4	Bue Pra Taw 1	Root	3.50±0.15^{g}	+	−	1.06±0.03^{ef}	+	+	+
TR5	Bue Pra Taw 1	Root	8.82±0.34^{d}	+	−	2.24±0.10^{a}	+	+	−
TS1	Bue Pra Taw 1	Mature seed	14.37±0.76^{b}	+	−	1.27±0.11^{de}	−	+	−
TS14	Bue Pra Taw 1	Mature seed	2.40±0.07^{g}	+	−	−	+	+	−
T2R3	Bue Pra Taw 2	Root	8.94±0.32^{d}	−	−	−	+	−	−
T2R5	Bue Pra Taw 2	Root	10.83±0.37^{c}	−	−	−	+	+	−
RR3	Bue Pra Do	Root	2.88±0.11^{g}	+	+ (Yellow)	1.12±0.03^{ef}	+	+	+
RR5	Bue Pra Do	Root	10.91±0.26^{c}	+	+ (Yellow)	1.17±0.00^{ef}	+	+	−
RS1	Bue Pra Do	Stem	11.57±0.39^{c}	+	−	1.08±0.03^{ef}	+	+	−
RS19	Bue Pra Do	Stem	11.29±0.28^{c}	−	−	1.17±0.00^{ef}	+	+	−
SR6	Bue Saw Mi	Root	6.50±0.16^{ef}	+	+ (Yellow)	1.44±0.12^{cd}	−	+	−
SS2	Bue Saw Mi	Stem	3.09±0.28^{g}	+	−	1.19±0.13^{ef}	−	+	+
SS5	Bue Saw Mi	Stem	5.75±0.19^{f}	+	+ (Purple)	1.53±0.09^{bc}	+	+	+
SS6	Bue Saw Mi	Stem	7.03±0.16^{ef}	+	−	1.24±0.03^{de}	+	+	−

[Φ] Endopytic diazotrophic bacterial strain; *IAA concentrations were estimated by a modified colorimetric method; [Ξ] Bacterial strains were tested for the production of ammonia in peptone water; [Ψ] Siderophore production by color change on CAS agar plates; [Φ]Solubilization index were estimated using modified Pikovskaya's agar plates; [♠] The activity of cellulase was determined by measuring the release of reducing sugars using carboxymethyl cellulose (CMC); [♥] The activity of pectinase was assayed on the indicator plates supplemented with citrus pectin; [♦] The activity of chitinase was assayed on the indicator plates supplemented with colloidal chitin

Value represents mean ± standard error (SE) and values followed by the same superscript letter ($^{a, b, c, d, e, f, g, h}$) in each column are not significantly different from each other as determined by DMRT ($p \leq 0.05$)

−, not detected; +, production

produce cellulase, pectinase and chitinase. Based on the differences in the multifunctions of promoting plant growth, ten strains (from 21 strains) were selected for further identification in greenhouse experiments.

Phylogeny of endophytic diazotrophic bacteria isolated from rice landraces

Phylogenetic analysis showed that the selected strains (ten strains) of EDB were clustered into three groups including α-β-proteobacteria and γ-proteobacteria (Fig. 3), which were *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Novosphingobium* and *Sphingomonas*. Based on 16S rDNA sequence similarity, strains PR1, PR5 and SS5 were similar to *Burkholderia kururiensis* (≥ 99 % sequence similarity), strains TS1 and SS2 were similar to *Klebsiella* sp. (100 % and 99 % sequence similarity, respectively), strains PS5, SR6 and SS6 were similar to *Sphingomonas* sp. (99 % sequence similarity), strain TR4 was similar to *Novosphingobium* sp. (99 % sequence similarity), and strain RR3 was similar to *Novosphingobium nitrogenifigens* (100 % sequence similarity).

Symbiotic colonization in commercial rice cultivar by endophytic diazotrophic bacteria

Four strains, belonging to four genera, *Burkholderia* sp. SS5 (Fig. 4a–d), *Klebsiella* sp. SS2 (Fig. 4e–h), *Novosphingobium* sp. TR4 (Fig. 4i–l) and *Sphingomonas* sp. PS5 (Fig. 4m–p) marked with GUS were selected to use for investigating rice colonization. Two days after inoculation, all bacteria entered into rice radicles and coleoptiles (Fig. 4a, e, i and m), and they accumulated in the root hairs and lateral root junction (Fig. 4b, f j and n). Seven days after inoculation, the bacterial cells spread further through the plant tissue, migrating to root tissue (Fig. 4c, g, k and o) and leaf tissue (Fig. 4d, h, l and p). In the radicle, *Burkholderia* sp. SS5 (Fig. 4a), *Klebsiella* sp. SS2 (Fig. 4e) and *Sphingomonas* sp. PS5 (Fig. 4m) showed the same colonization pattern, while *Novosphingobium* sp. TR4 (Fig. 4i) showed less GUS staining at the root tip than other bacterial strains. In the root hairs zone, *Burkholderia* sp. SS5 (Fig. 4b) and *Sphingomonas* sp. PS5 (Fig. 4n) obviously showed higher GUS activity than *Klebsiella* sp. SS2 (Fig. 4f) and *Novosphingobium* sp. TR4 (Fig. 4j).

Greenhouse application of endophytic diazotrophic bacteria for commercial rice

Chlorophyll content in leaves was affected by the different EDB inoculated to seeds (Fig. 5). However, at some monitoring time, there was a significant (P=0.05) increase in chlorophyll content in leaves of rice plants after inoculation with each bacterium. Inoculation with any of the EDB strains tested resulted in significantly (P=0.05) higher chlorophyll content at the time of harvest. However, *Burkholderia* sp. SS5 significantly (P=0.05) increased the chlorophyll content at all stages, compared to non-inoculated plants.

Seven days after inoculation, *Novosphingobium* sp. TR4 significantly (*P=0.05*) enhanced the root and shoot length (14.39±0.30 and 7.05±0.04 cm, respectively; Table 2) when compared to non-inoculated plants. The longest roots were found in *Klebsiella* sp. SS2 inoculated plants (16.19± 0.24 cm). The other bacterial strains showed significantly longer roots at 35 days after inoculation. Inoculated plants showed a root growth rate (GR) ranging from 0.76 to 0.96 cm day^{-1}, depending on the bacterial strain. For all bacterial strains, root growth rate was significantly higher than that detected in non-inoculated plants, and the root:shoot ratio growth rate (GR), ranging from 2.93 to 5.02, was also higher.

Thirty five days after inoculation with *Novosphingobium* sp. TR4 and *Sphingomonas* sp. SS6, plant dry weight was significantly (P=0.05) higher compared to non-inoculated plants (Fig. 6). Rice seedlings inoculated with selected strains also contained significantly higher levels of nitrogen content in their roots compared to non-inoculated plants (Fig. 7).

Discussion

The EDB activity is the main factor in promoting the growth of plants by the cycling of nutrients (Widmer et al. 2006). Our results found that the population density of EDB was highest in roots, whereas the population size was lower in stems and leaves. In addition, the results are similar to EDB from the cultivated rice cultivar Khao Dawk Mali 105 (Prakamhang et al. 2009) and wild rice cultivars *Oryza rufipogon, O. nivara* and *O. granulata* (Koomnok et al. 2007). Rice roots harboring endophytes are the primary site of interaction between plants and microorganisms (Sessitsch et al. 2012). The root exudates produced by rice plants promote the interaction between endophytic bacteria and root tissues (Bacilio-Jiménez et al. 2003). Mano et al. (2007) suggested that the endophytic bacteria found in roots were not related to those in seeds and leaves of the *O. sativa* cultivar Kinuhikari. Nitrogen fixing ability could be detected in leaf consortia or aerial parts of rice tissues, which are exposed to the air and to O_2 produced by photosynthesis (Minamisawa et al. 2004; Prakamhang et al. 2009). In this study, the EDB population was maximal at the nursery stage, and decreased in all tissues with rice growth stage. Our results are in agreement with Mano et al. (2007), who reported that the total number of endophytic root bacteria was greatest in the rice roots at the early stage (Mano et al. 2007). However, Koomnok et al. (2007) reported that the number of diazotrophic bacteria in cultivated rice varieties Khao Dawk Mali 105, Kum Doi Saket and Bue Po Lo increased with aeing of the plants, to a maximum at the heading stage. This difference might be due to the variety of

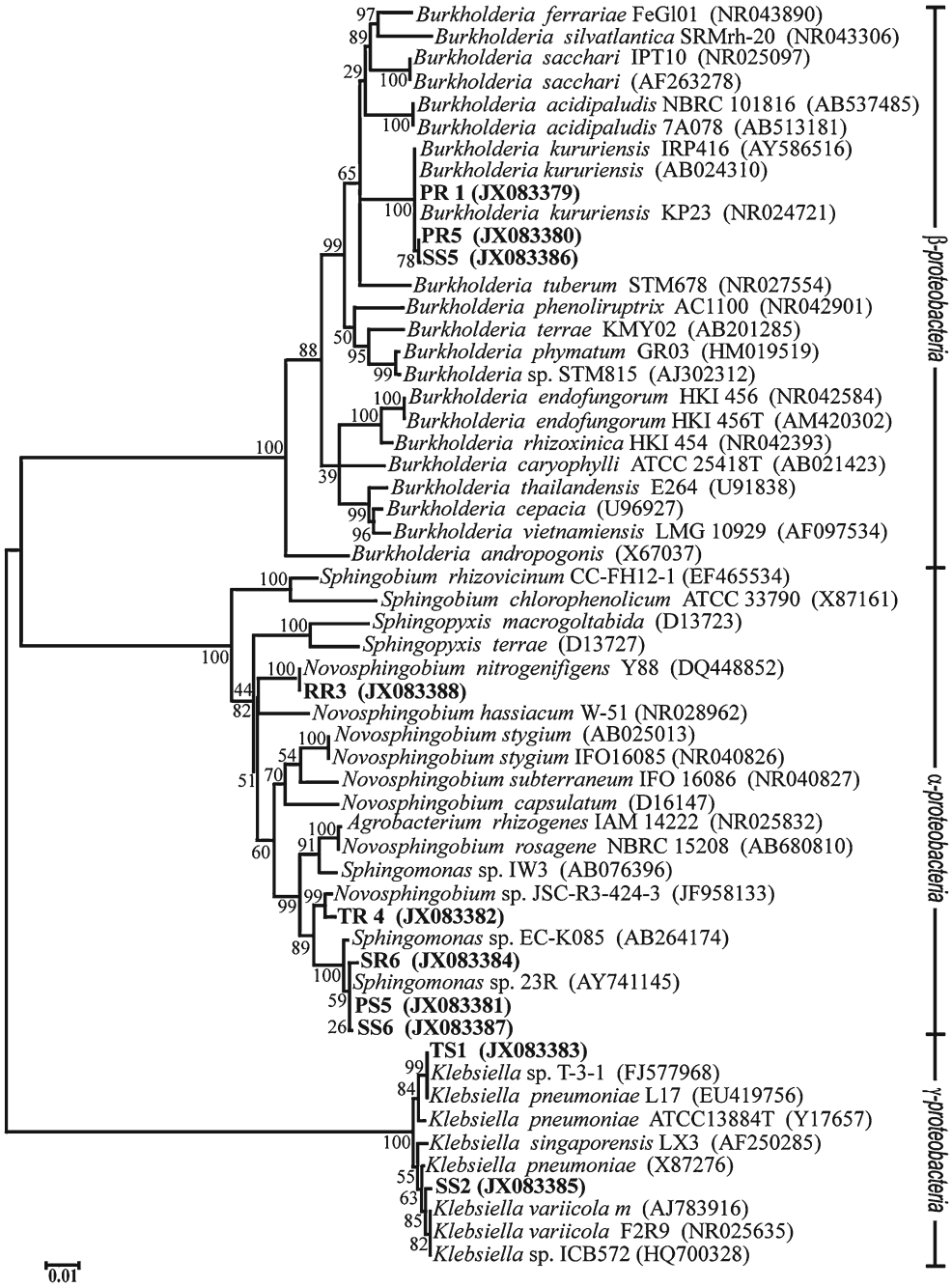


Fig. 3 Unrooted phylogenetic tree of nearly full-length 16S rRNA gene sequences showing the relationships among the endophytic diazotrophic bacteria isolated from highland rice landraces tissue and related genera. Bootstrap analysis was based on 1,000 replicates. Neighbor Joining tree and the scale bar present 0.01 nucleotide substitutions, where the accession numbers of the sequences are indicated in *parentheses*

rice, environmental parameters of rice cultivation, and plant genotype. The plant genotype affects the colonization and nutrient status of bacterial communities associated with the plant (Van Overbeek and Van Elsas 2008; Hardoim et al. 2011). According to Engelhard et al. (2000), the diazotrophic endophytic diversity was greater in modern rice cultivars than in wild rice.

The presence of diazotrophic bacteria in rice tissues was confirmed by acetylene reduction activity; inoculation with *Sphingomonas* sp. SR6 showed the highest activity (888.37 nmol C_2H_4 h^{-1} g dry $weight^{-1}$). Six strains of *Pseudomonas aeruginosa* grown on LGI media showed efficient reduction of acetylene, ranging from 23.34±1.8 to 28.91±3.5 nmol C_2H_4 h^{-1} mg $protein^{-1}$ (Gupta et al. 2013). Elbeltagy et al. (2001) found that the acetylene reduction activities of *O. officinalis* W0012 seedlings inoculated with diazotrophic *Herbaspirillum* sp. strain B501*gfp* showed ethylene production at a rate of 71.3±22.4 nmol h^{-1} g wet $weight^{-1}$. Nitrogen fixation was also detected in leaf consortia, which indicates the ability of EDB to fix nitrogen in plant leaves (Prakamhang et al. 2009). Nitrogen fixation activity in the endophytic stage did differ from nitrogen fixation in the free-living stage. One report on wheat root inoculated with *Azospirillum* spp. showed that the nitrogenase activity did not

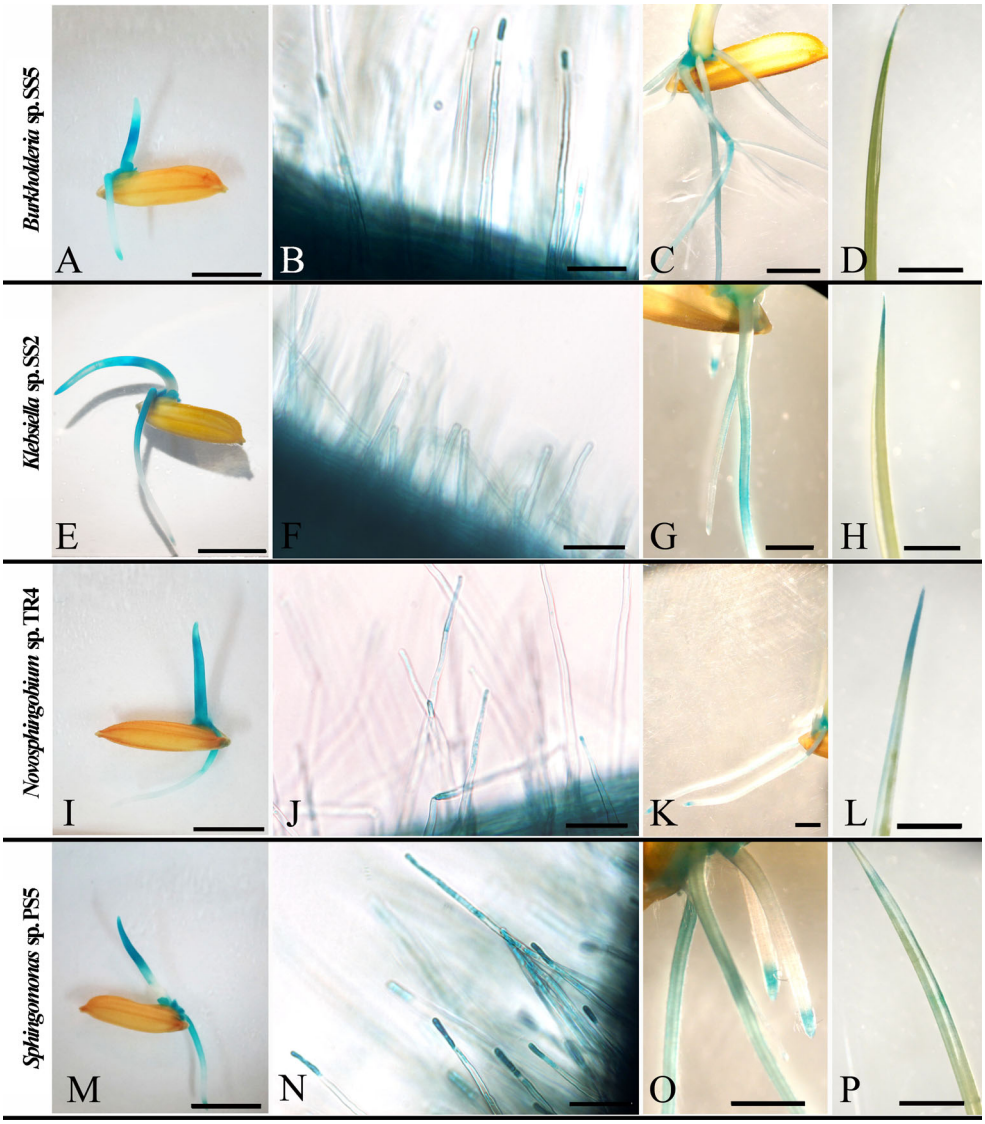


Fig. 4 The micrographs of Gus-tagged *Burkholderia* sp. SS5 (**a**–**d**), *Klebsiella* sp. SS2 (**e**–**h**), *Novosphingobium* sp. TR4 (**i**–**l**) and *Sphingomonas* sp. PS5 (**m**–**p**) during colonization on radical-coleoptiles (**a**, **e**, **i** and **m**; scale bar, 5 mm) and root hairs (**b**, **f**, **j** and **n**; scale bar, 20 μm) of rice 3 days after inoculation, and close-up view of bacterial infection of root tips (**c**, **g**, **k** and **o**); scale bar, 2 mm) and leaf tip (**d**, **h**, **l** and **p**; scale bar, 2 mm) at 7 days post inoculation

correlate well with nitrogen fixation in pure culture (Han and New 1998).

Multiple plant growth-promoting activities, such as production of IAA, ammonia, siderophore, and phosphate solubilization, varied according to the strain of EDB isolated from highland rice landraces (Table 1). Our results are similar to other findings for rhizobacteria, which exhibited more than two plant growth-promoting traits, including phytohormone production by the bacterium, enhancement of nutrient uptake (Souza et al. 2013), or prevention of the deleterious effects of one or more plant pathogen (Ahmad et al. 2008). The best-studied mechanisms of bacterial plant growth promotion include providing plants with resources/nutrients (Glick 2012). Some of the above-tested EDB stains were able to produce IAA, which may play a major role, as does plant growth-promoting phytohormone. The production may depend on species, but also depends on culture conditions, growth stage, and availability of substrate (Chaiharn and Lumyong 2011). IAA synthesized by bacteria may be involved at different levels in plant-bacterial interactions (Glick 2012).

Some strains of selected EDB are able to produce ammonia when grown on a nitrogen source. Production of ammonia was a common trait in free-living rhizospheric bacteria with multiple plant growth-promoting activities. Ammonia produced by bacteria accumulates and supplies nitrogen to host plants, promotes root and shoot elongation, and increases plant biomass (Rashid et al. 2012).

Siderophores are typically produced by bacteria, fungi, and monocotyledonous plants under iron-limited conditions (Loaces et al. 2011), making it antagonist against plant pathogens and inducing systemic resistance in plants (Ahmad et al. 2008). In our experiment, six isolates of EDB produced siderophores. The different color changes in the CAS agar to yellow or purple suggested the production of different types of siderophores, such as catecholates, hydroxamates and α-carboxylates, depending on the chemical nature of their

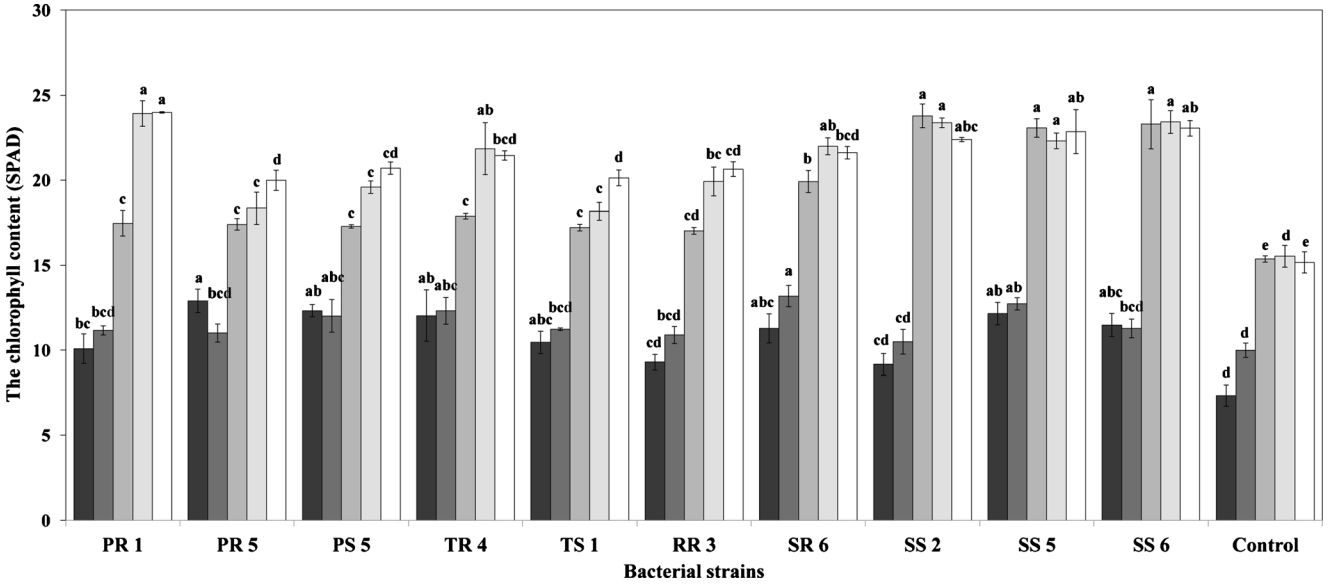


Fig. 5 The chlorophyll content of commercial rice cultivar Khao Dawk Mali 105 leaf inoculated with selected strains of endophytic diazotrophic bacteria grown in green house condition, detected by a SPAD meter after 7 (■), 14 (■), 21 (■), 28 (■) and 35 (■) days. Each *bar* represents a means ± standard error (SE) of three replicate; each replicate had five plants for each treatment. Means in each data followed by the same letter are not statistically different at the 0.05 level using Duncan's multiple range test (DMRT)

coordination sites with iron (Winkelmann 1990; Pérez-Miranda et al. 2007). The present study clearly revealed that more than 85 % of selected EDB could produce siderophores.

The ability to solubilize inorganic phosphate by transforming it into bioavailable forms is an important property of plant growth-promoting bacteria. Phosphorus is an important plant macronutrient that is required for growth and development. Therefore, the mobilization of this nutrient may enhance plant growth promotion and crop productivity. It is also involved in plant growth activity such as

Table 2 Effect of inoculation with selected isolates of endophytic diazotrophic bacteria from highland rice landraces on the length growth parameters of commercial jasmine rice cultivar Khao Dawk Mali 105 grown in greenhouse

Strain[Φ]	Days after inoculation						GR ratio[†]
	Root length (cm)[Ψ]			Shoot length (cm)[Ψ]			
	7	35	GR[¶]	7	35	GR	
PR1	13.59±0.25^{c}	40.59±0.68^{a}	0.96	5.78±0.05^{b}	11.15±0.22^{a}	0.19	5.02
PR5	11.37±0.16^{f}	34.46±1.17^{bc}	0.82	4.78±0.11^{cd}	11.25±0.52^{a}	0.27	3.40
PS5	12.28±0.13^{e}	38.39±1.51^{abc}	0.93	5.45±0.12^{b}	11.99±0.41^{a}	0.27	2.93
TR4	14.39±0.30^{b}	36.48±1.19^{abc}	0.79	7.05±0.04^{a}	12.53±0.55^{a}	0.23	3.57
TS1	13.69±0.49^{bc}	34.85±0.33^{bc}	0.76	4.51±0.29^{d}	11.17±0.36^{a}	0.25	3.14
RR3	12.43±0.24^{de}	33.83±0.90^{c}	0.76	4.49±0.29^{d}	11.11±0.70^{a}	0.23	3.99
SR6	13.16±0.29^{cd}	39.02±0.80^{ab}	0.92	5.51±0.11^{b}	12.11±0.41^{a}	0.21	4.69
SS2	16.19±0.24^{a}	38.10±2.72^{abc}	0.78	4.49±0.23^{d}	11.97±0.20^{a}	0.20	4.03
SS5	13.19±0.22^{cd}	35.69±2.27^{bc}	0.80	4.57±0.16^{d}	12.01±0.30^{a}	0.26	3.31
SS6	13.40±0.18^{c}	34.61±1.82^{bc}	0.76	5.26±0.15^{bc}	11.60±0.65^{a}	0.24	3.18
Control	13.31±0.14^{c}	21.71±0.48^{d}	0.30	4.57±0.21^{b}	11.44±0.28^{a}	0.23	2.91
% CV	4.44	6.91		8.14	6.20		

[Φ] Endopytic diazotrophic bacterial strain; [Ψ] Fresh root and shoot length was measured at 7 and 35 Days after inoculated by endopytic diazotrophic bacterial; [¶]GR, The growth rate; [†] GR ratio, the mean of GR root : shoot ratio

Values are means ± standard error (SE) of three experiments, each experiment had 10 plants for each treatment after 7 days growth and 5 plants for each treatment after 35 days growth. Means in a column followed by the same superscript letter ($^{a, b, c, d, e, f}$) are not statistically different from each other as determined by DMRT ($p \leq 0.05$). Coefficient of variation (%CV) is the percentage of the mean represented by the standard deviation

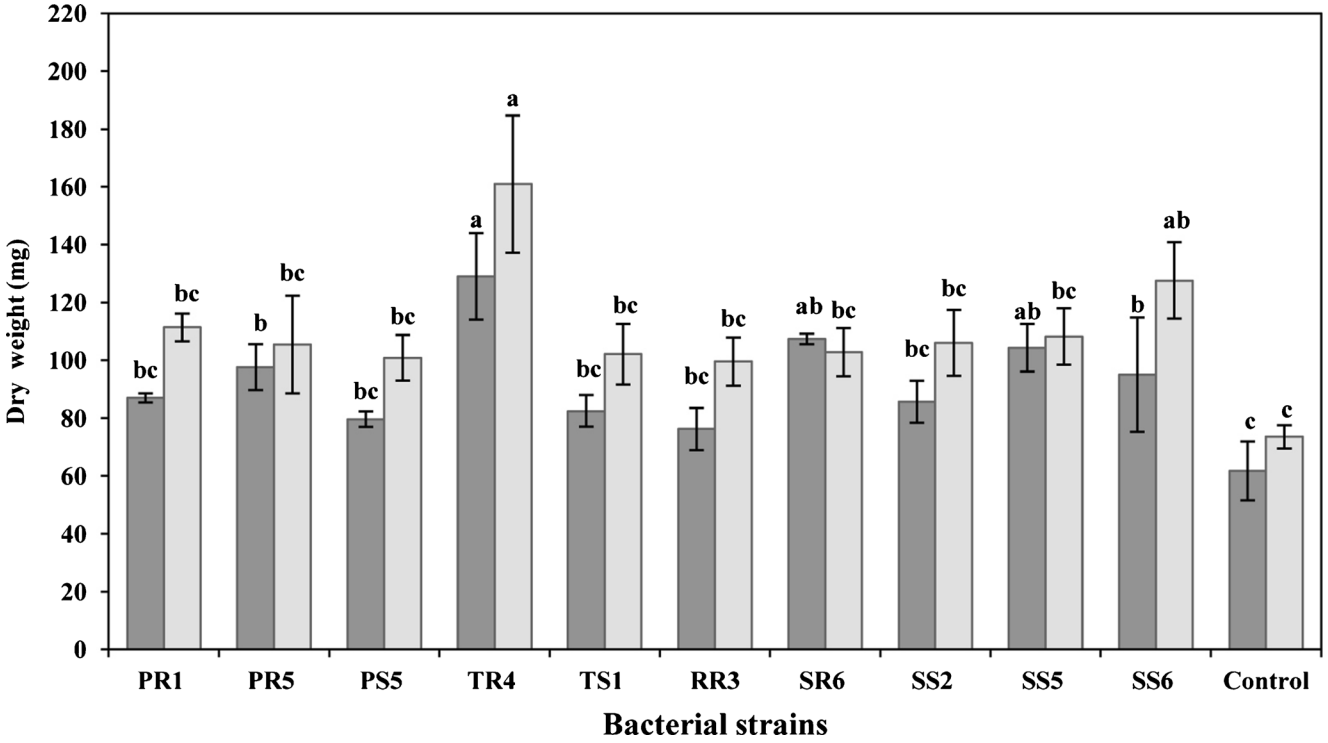


Fig. 6 Dry weight of the commercial rice cultivar Khao Dawk Mali 105 applied with selected isolates of endophytic diazotrophic bacteria, after 35 days of growth in green house experiment. Each *bar* represents a means ± standard error (SE) of three replicates; each replicate had five plants for each treatment. Means in each data set [root (■) and shoot (□)] followed by the same letter are not statistically different at the 0.05 level using Duncan's multiple range test (DMRT)

photosynthesis, energy transfer, signal transduction, macromolecular biosynthesis and respiration (Laslo et al. 2012). All selected EDB strains were not phytopathogenic. In the present study, each EDB strain was inoculated into rice seeds cultivated under nitrogen-free hydroponic conditions, and rice growth promoted by EDBs was better compared to non-inoculated treatment. The promotion activity increased plant dry weight, percent nitrogen and chlorophyll content. Root

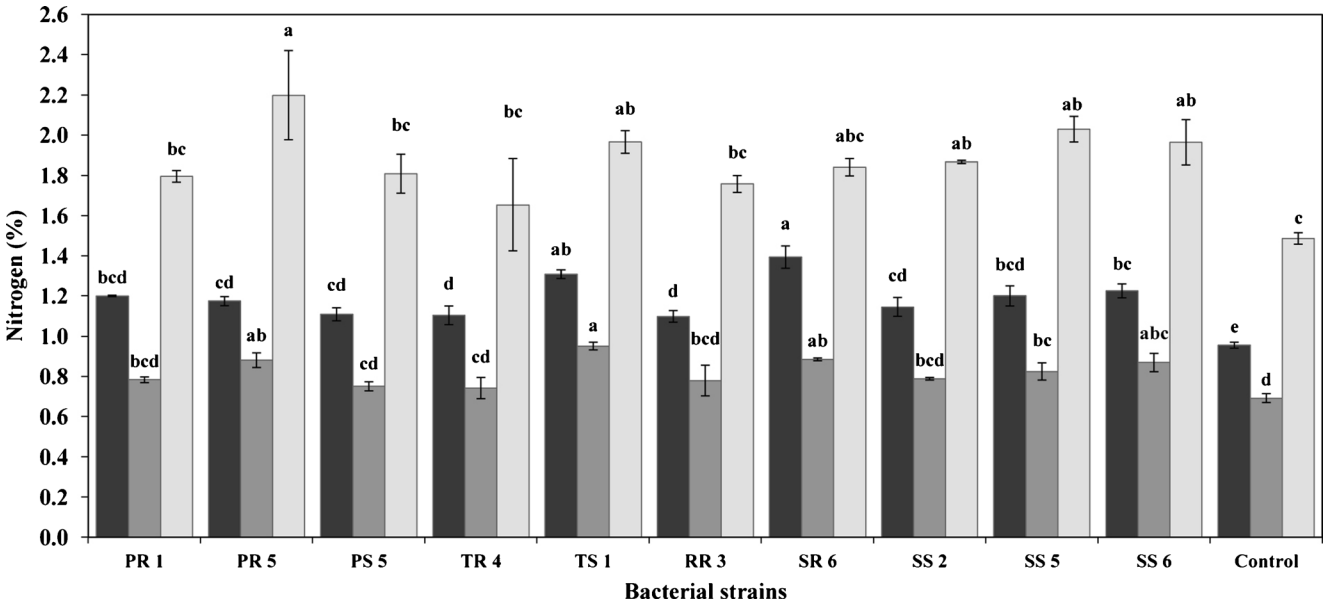


Fig. 7 Nitrogen in tissues of the commercial rice cultivar Khao Dawk Mali 105 receiving different selected isolates of endophytic diazotrophic bacteria, after 35 days of growth in green house experiment. Each *bar* represents a means ± standard error (SE) of three experiments; each experiments had five plants for each treatment. Means in each data set (■ root, ■ stem and □ leaf) followed by the same letter are not statistically different at the 0.05 level using Duncan's multiple range test (DMRT)

elongation effect was similar to that evidenced in a study on *Azospirillum* inoculated rice seedlings, where reduced length and root surface area were observed (Radwan et al. 2004; Rodrigues et al. 2008). This inhibition may be related to the production of auxin by bacteria in seedling roots (Rodrigues et al. 2008). Earlier studies reported that inoculating endophytic diazotrophs *Burkholderia* species to rice plants increased the biomass by 69 % and could fix 31 % of the total nitrogen captured by the plant (Baldani et al. 2000). *Azospirillum amazonense* inoculated on rice showed an increase of 7 to 11.6 % in rice grain dry matter and 3.5 to 18.5 % of nitrogen accumulation at grain maturation (Rodrigues et al. 2008). Moreover, rice inoculated with *A. brasilense* increased the maximum grain yield by up to 76.0 % (Thakuria et al. 2004). We consider that our selected EDB strains are likely to promote plant growth from multiple mechanisms, and can be applied as biofertilizer for promotion of cultivated plant growth.

Based on 16S rRNA sequence analysis, selected EDB were identified as members of four different genera: *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Novosphingobium* and *Sphingomonas*. The results agreed to others investigators. The most common endophytic bacteria were isolated from plant tissue in the genera *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Phyllobacterium* and *Pseudomonas* (Mano and Morisaki 2008). While *Burkholderia* is commonly found in rice roots, *Sphingomonas* could be isolated from seeds and leaves (Mano and Morisaki 2008) and *Novosphingobium* could be isolated from rice roots (Sun et al. 2008).

In addition, colonization of rice was confirmed using GUS-marked *Burkholderia* sp. SS5, *Klebsiella* sp. SS2, *Novosphingobium* sp. TR4, and *Sphingomonas* sp. PS5. In inoculated roots staining was most intense at the tip of root hairs, root tip, germination point and leaf tip. This colonization pattern of rice tissues is probably due to the effect of cell wall-degrading enzymes such as cellulase, and/or pectinase properties of EDB. Similar results have been reported for rice inoculated with GUS-marked *Rheinheimera* strain VFR5-3 (Prakamhang et al. 2009), GUS-marked *Serratia marcescens* strain IRBG500 (Gyaneshwar et al. 2001), GFP-tagged *Herbaspirillum* sp. strain B501 (Elbeltagy et al. 2001; Zakria et al. 2007), and green fluorescent protein (GFP)-labeled *Bacillus megaterium* strain C4 (Liu et al. 2006). From our study on rice inoculation, it is clear that the root tips, the lateral roots junctions and the germination point were the three sites for the bacteria entry into rice tissues. It has been reported that many microorganisms enter into and persist in plants by primary colonization via the cracks formed in lateral root junctions (James 2000; Hardoim et al. 2008), and the root tip at the zone of elongation and differentiation (Reinhold-Hurek and Hurek 1998), and then quickly spread to the intercellular and intracellular spaces (Reinhold-Hurek and Hurek 1998; Chi et al. 2005). Cellulase and pectinase have also been suspected to play a role for internal colonization (Compant et al. 2005; Reinhold-Hurek and Hurek 2011). Finally, bacterial gene expression and regulation within a plant and the effect of co-inoculation of bacteria into rice under greenhouse and filed experiment should be further investigated.

Acknowledgments This research was supported by Office of the Higher Education Commission, Thailand under the National Research University Project and The Thailand Research Fund (Research-Team Promotion Grant RTA5580007). We thank The Graduated School of Chiang Mai University, Thailand for support, as well as The Model Farm Project, the Royal Initiatives of Her Majesty the Queen, Khun Tae Village, Thailand for assistance in sampling collection.

References

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol Res 163:173–181

Araújo AES, Baldani VLD, Galisa PS, Pereira JA, Baldani JI (2013) Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil. Appl Soil Ecol 64:49–55

Arun B, Gopinath B, Sharma S (2012) Plant growth promoting potential of bacteria isolated on N free media from rhizosphere of *Cassia occidentalis*. World J Microbiol Biotechnol 28:2849–2857

Bacilio-Jiménez M, Aguilar-Flores S, Ventura-Zapata E, Pérez-Campos E, Bouquelet S, Zenteno E (2003) Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. Plant Soil 249:271–277

Baldani VLD, Baldani JI, Döbereiner J (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. Biol Fertil Soils 30:485–491

Beatty PH, Good AG (2011) Future prospects for cereals that fix nitrogen. Science 333:416–417

Cappuccino JC, Sherman N (2001) Microbiology: a laboratory manual, 6th edn. Benjamin/Cummings Publishing Company, New York

Chaiharn M, Lumyong S (2009) Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. World J Microbiol Biotechnol 25:305–314

Chaiharn M, Lumyong S (2011) Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. Curr Microbiol 62: 173–181

Chaudhary H, Peng G, Hu M, He Y, Yang L, Luo Y, Tan Z (2012) Genetic diversity of endophytic diazotrophs of the wild rice, *Oryza alta* and identification of the new diazotroph, *Acinetobacter oryzae* sp. nov. Microb Ecol 63:813–821

Chi F, Shen S-H, Cheng H-P, Jing Y-X, Yanni YG, Dazzo FB (2005) Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. Appl Environ Microbiol 71:7271–7278

Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Ait Barka E (2005) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. Appl Environ Microbiol 71:1685–1693

Döbereiner J, Day JM, Dart PJ (1972) Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugarcane and some other tropical grasses. Plant Soil 37: 191–196

Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Appl Environ Microbiol 67:5285–5293

Engelhard M, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2000) Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. Environ Microbiol 2:131–141

Feng Y, Shen D, Song W (2006) Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. J Appl Microbiol 100:938–945

Glick BR (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica 2012:1–15

Glickmann E, Dessaux Y (1995) A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl Environ Microbiol 61:793–796

Gordon SA, Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indole acetic acid. Plant Physiol 26:192–195

Gupta G, Panwar J, Jha PN (2013) Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. Appl Soil Ecol 64: 252–261

Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-Hurek B, Ladha JK (2001) Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. J Bacteriol 183: 2634–2645

Han SO, New PB (1998) Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. Microb Ecol 36:193–201

Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol 16:463–471

Hardoim PR, Andreote FD, Reinhold-Hurek B, Sessitsch A, van Overbeek LS, van Elsas JD (2011) Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. FEMS Microbiol Ecol 77:154–164

Hartmann A, Singh M, Klingmüller W (1983) Isolation and characterization of *Azospirillum mutants* excreting high amounts of indole acetic acid. Can J Microbiol 29:916–923

Hsu SC, Lockwood JL (1975) Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of Actinomycetes in water and soil. Appl Microbiol 29:422–426

Hurek T, Reinhold-Hurek B, Van Montagu M, Kellenberger E (1994) Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. J Bacteriol 176:1913–1923

Ishii S, Ikeda S, Minamisawa K, Senoo K (2011) Nitrogen cycling in rice paddy environments: past achievements and future challenges. Microbes Environ 26:282–292

James EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crop Res 65:197–209

Jha PN, Kumar A (2007) Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. J Appl Microbiol 103:1311–1320

Jha B, Gontia I, Hartmann A (2012) The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. Plant Soil 356:265–277

Klement Z (1963) Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic Pseudomonads. Nature 199:299–300

Koomnok C, Teaumroong N, Rerkasem B, Lumyong S (2007) Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. ScienceAsia 33:429–435

Kumar V, Narula N (1999) Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. Biol Fertil Soils 28:301–305

Ladha JK, Reddy PM (2003) Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. Plant Soil 252:151–167

Laslo É, György É, Mara G, Tamás É, Ábrahám B, Lányi S (2012) Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. Crop Prot 40:43–48

Liu X, Zhao H, Chen S (2006) Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. Curr Microbiol 52:186–190

Loaces I, Ferrando L, Fernández Scavino A (2011) Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. Microb Ecol 61:606–618

Manassila M, Nuntagij A, Kotepong S, Boonkerd N, Teaumroong N (2007) Characterization and monitoring of selected rhizobial strains isolated from tree legumes in Thailand. Afr J Biotechnol 6:1393–1402

Mano H, Morisaki H (2008) Endophytic bacteria in the rice plant. Microbes Environ 23:109–117

Mano H, Tanaka F, Nakamura C, Kaga H, Morisaki H (2007) Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. Microbes Environ 22:175–185

Mateos PF, Jimenez-Zurdo JI, Chen J, Squartini AS, Haack SK, Martinez-Molina E, Hubbell DH, Dazzo FB (1992) Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Appl Environ Microbiol 58:1816–1822

Medany MA, Hegazy AK, Kabiel HF, Maez MM (2007) Prediction of seed germination and seedling growth of four crop plants as affected by root zone temperature. World J Agric Sci 3:714–720

Minamisawa K, Nishioka K, Miyaki T, Ye B, Miyamoto T, You M, Saito A, Saito M, Barraquio WL, Teaumroong N, Sein T, Sato T (2004) Anaerobic nitrogen-fixing consortia consisting of *Clostridia* isolated from Gramineous plants. Appl Environ Microbiol 70:3096–3102

Noisangiam R, Teamtisong K, Tittabutr P, Boonkerd N, Toshiki U, Minamisawa K, Teaumroong N (2012) Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Aeschynomene americana* L. in Thailand. Appl Environ Microbiol 78:6236–6250

Oupkaew P, Pusadee T, Sirabanchongkran A, Rerkasem K, Jamjod S, Rerkasem B (2011) Complexity and adaptability of a traditional agricultural system: case study of a gall midge resistant rice landrace from northern Thailand. Genet Resour Crop Evol 58:361–372

Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ (2007) O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. J Microbiol Methods 70:127–131

Phattarakul N (2008) Genotypic variation in tolerance to acid soil in local upland rice varieties. Chiang Mai University, Chiang Mai

Pintasen S, Prom-u-thai C, Jamjod S, Yimyam N, Rerkasem B (2007) Variation of grain iron content in a local upland rice germplasm from the village of Huai Tee Cha in Northern Thailand. Euphytica 158:27–34

Piromyou P, Buranabanyat B, Tantasawat P, Tittabutr P, Boonkerd N, Teaumroong N (2011) Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. Eur J Soil Biol 47:44–54

Prakamhang J, Minamisawa K, Teamtaisong K, Boonkerd N, Teaumroong N (2009) The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). Appl Soil Ecol 42:141–149

Radwan TE-SE-D, Mohamed ZK, Reis VM (2004) Effect of inoculation with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* on production of indolic compounds and growth of wheat and rice seedlings. Pesq Agrop Brasileira 39:987–994

Rangjaroen C, Rerkasem B, Teaumroong N, Sungthong R, Lumyong S (2014) Comparative study of endophytic and endophytic diazotrophic bacterial communities across rice landraces grown in the highlands of Northern Thailand. Arch Microbiol 196:35–49

Rashid S, Charles TC, Glick BR (2012) Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. Appl Soil Ecol 61:217–224

Reinhold-Hurek B, Hurek T (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends Microbiol 6:139–144

Reinhold-Hurek B, Hurek T (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. Curr Opin Plant Biol 14:435–443

Reinhold-Hurek B, Hurek T, Claeyssens M, van Montagu M (1993) Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotroph. J Bacteriol 175:7056–7065

Rerkasem B (2007) Having your rice and eating it too: a view of Thailand's green revolution. ScienceAsia 33:75–80

Rodrigues EP, Rodrigues LS, Oliveira ALM, Baldani VLD, Teixeira KRS, Urquiaga S, Reis VM (2008) *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N_2 fixation of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Soil 302:249–261

Roesch L, Olivares F, Pereira Passaglia L, Selbach P, de Sá E, de Camargo F (2006) Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. World J Microbiol Biotechnol 22:967–974

Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiol Lett 278:1–9

Saengkerdsub S, Anderson RC, Wilkinson HH, Kim W-K, Nisbet DJ, Ricke SC (2007) Identification and quantification of methanogenic archaea in adult chicken ceca. Appl Environ Microbiol 73:353–356

Sapsirisopa S, Chookietwattana K, Maneewan K, Khaengkhan P (2009) Effect of salt-tolerant Bacillus inoculum on rice KDML 105 cultivated in saline soi. As J Food Ag-Ind 2009:S69–S74

Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem 160:47–56

Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, van Overbeek L, Brar D, van Elsas JD, Reinhold-Hurek B (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. Mol Plant-Microbe Interact 25:28–36

Souza R, Beneduzi A, Ambrosini A, Costa PB, Meyer J, Vargas LK, Schoenfeld R, Passaglia LMP (2013) The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. Plant Soil 366:585–603

Sriskandarajah S, Kennedy I, Yu D, Tchan Y-T (1993) Effects of plant growth regulators on acetylene-reducing associations between *Azospirillum brasilense* and wheat. Plant Soil 153:165–178

Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X, Song W (2008) Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. Microb Ecol 55:415–424

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24:1596–1599

Thakuria D, Talukdar NC, Goswami C, Hazarika S, Boro RC, Khan MR (2004) Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. Curr Sci 86:978–985

Tittabutr P, Awaya JD, Li QX, Borthakur D (2008) The cloned 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene from *Sinorhizobium* sp. strain BL3 in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 promotes nodulation and growth of *Leucaena leucocephala*. Syst Appl Microbiol 31:141–150

Van Overbeek L, Van Elsas JD (2008) Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). FEMS Microbiol Ecol 64:283–296

Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. J Biotechnol 91:127–141

Verma SC, Singh A, Chowdhury SP, Tripathi AK (2004) Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. Biotechnol Lett 26:425–429

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 173:697–703

Widmer F, Rasche F, Hartmann M, Fliessbach A (2006) Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment. Appl Soil Ecol 33:294–307

Wilson KJ, Sessitsch A, Corbo JC, Giller KE, Akkermans ADL, Jefferson RA (1995) b-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. Microbiology 141:1691–1705

Winkelmann G (1990) Structural and stereochemical aspects of iron transport in fungi. Biotechnol Adv 8:207–231

Yasuda M, Isawa T, Shinozaki S, Minamisawa K, Nakashita H (2009) Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. Biosci Biotechnol Biochem 73: 2595–2599

Zakria M, Njoloma J, Saeki Y, Akao S (2007) Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp. strain B501 gfp1 and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice. Microbes Environ 22:197–206

Available online at www.sciencedirect.com

MYCOSCIENCE

ISSN 1340-3540 (print), 1618-2545 (online)

journal homepage: www.elsevier.com/locate/myc

Short communication

Improvement of yield for a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, cultivation in northern Thailand

Jaturong Kumla [a], *Eric Danell* [b], *Saisamorn Lumyong* [a,*]

[a] *Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*
[b] *Dokmai Garden, 386 Moo 10, Namprae, Hang Dong, Chiang Mai 50230, Thailand*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 December 2013
Received in revised form
15 April 2014
Accepted 15 April 2014
Available online 3 June 2014

Keywords:
Edible mushroom
Fruiting body production
Pure culture

ABSTRACT

Phlebopus portentosus is an edible bolete mushroom with the ability to produce fruiting bodies in the absence of a host plant. In this study, the improved yield of *P. portentosus* cultivation was evaluated. As a supplemental solution, fungal host solution was found to be better comparing with two other solutions. Cultivation experiment indicated that both the highest number of primordial formation and yield of fruiting bodies were obtained on 1:1 (v/v) of mixed sorghum grains supplemented with fungal host solution and sawdust. The identification of cultivated fruiting bodies was confirmed by both morphological and molecular methods.

© 2014 The Mycological Society of Japan. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Edible ectomycorrhizal mushrooms are favorite food in northern Thailand. They produce the fruiting bodies in the rainy season (June to September) and local farmers keep them for consumption and sell in the local, road-side or city markets. The preliminary investigations at small local markets reveal many different ectomycorrhizal mushrooms such as *Amanita*, *Astraeus*, *Cantharellus*, *Boletus*, *Lactarius* and *Russula* (Sanmee et al. 2003). At present, edible ectomycorrhizal mushrooms are always cultivated with their host plants (Hall et al. 2003; Wang and Hall 2004). However, some strains of edible ectomycorrhizal mushrooms such as *Boletus* sp. (Ohta and Fujiwara 2003), *Boletus reticulatus* (Yamanaka et al. 2000), *Lyophyllum shimeji* (Ohta 1994), *Hebeloma radicosum* (Ohta 1998), *Phlebopus portentosus* (Lumyong et al. 2007; Sanmee et al. 2010; Ji et al. 2011; Kumla et al. 2012) and *Tylopilus castaneiceps* (Kikuchi et al. 2009) are known to form fruiting bodies without a host plant.

Tropical black bolete, *P. portentosus* is one of the most popular edible ectomycorrhizal mushrooms in northern Thailand. The common name in central Thailand is "Hed Tub Tao Dam" that refers to black bolete and a local name in northern Thailand is "Hed Har" that refers to mushroom associate with *Syzygium cumini*. *Phlebopus portentosus* produces fruiting bodies at the end of the hot season until the early rainy season (May–July), and sometimes a second flush at the end of the rainy season (October). According to field observation, this mushroom grows together with trees such as *Dimocarpus longan*, *Elaeocarpus hygrophilus*, *Mangifera indica*, *Mimosa pigra*, *Quercus* spp. and *Syzygium cumini* (Lei et al. 2009; Sanmee et al. 2010; Ji et al. 2011; Kumla et al. 2012; Mortimer

* *Corresponding author*. Tel.: +66 53 941947x144; fax: +66 53 892259.
E-mail addresses: saisamorn.l@cmu.ac.th, jaturong_yai@hotmail.com (S. Lumyong).
http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2014.04.005
1340-3540/© 2014 The Mycological Society of Japan. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

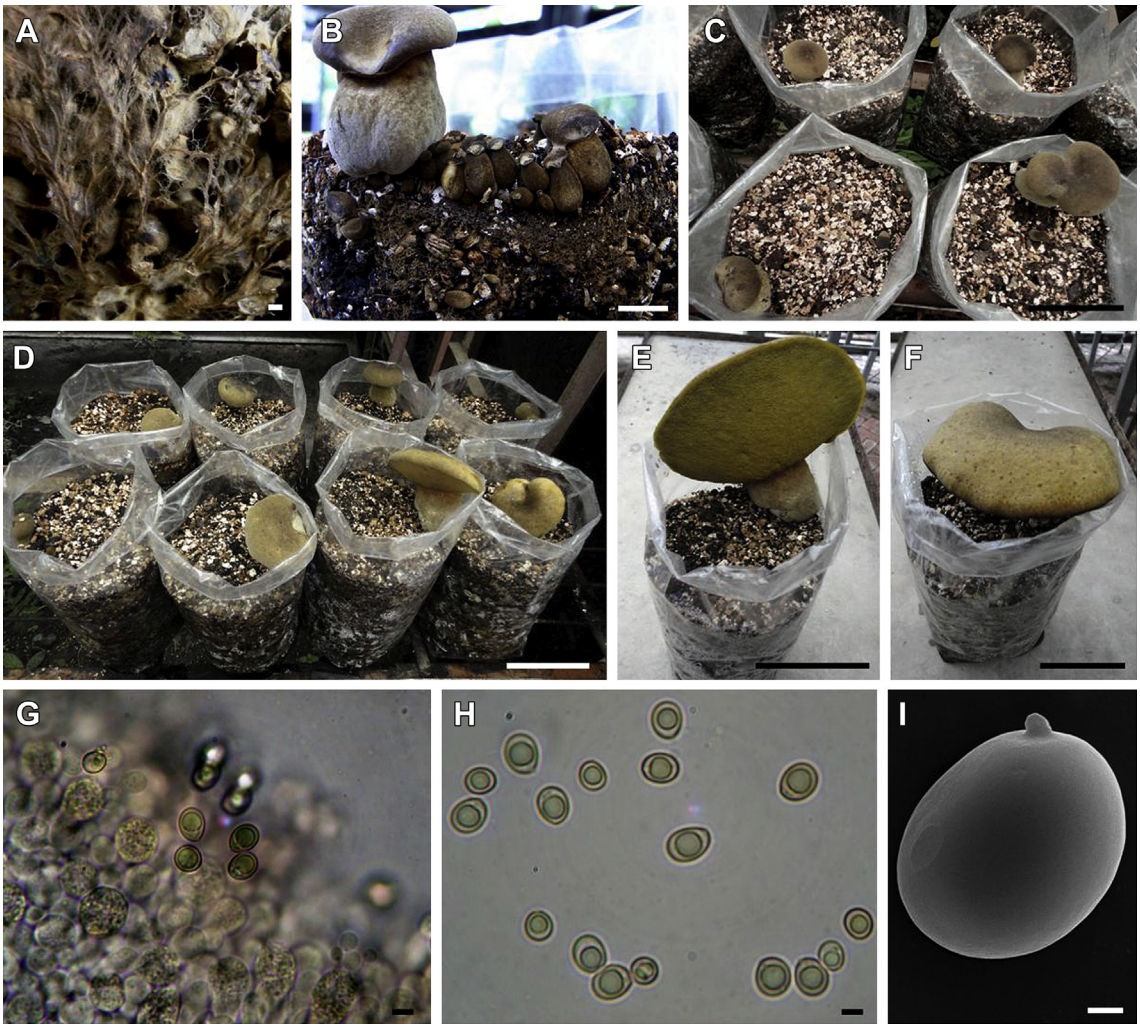


Fig. 1 – Cultivation of *Phlebopus portentosus* CMU51-320-2 in absence of a host plant. A: Brown rhizomorphs under a stereomicroscope. B: Brown rhizomorphs and primordia. C, D: Young fruiting bodies. E, F: Mature fruiting bodies. G: Basidia bearing four spores. H: Basidiospores under a compound microscope. I: Basidiospore under a scanning electron microscope. *Bars*: A 1 mm; B 10 mm; C–F 5 cm; G, H 5 μm; I 1 μm.

et al. 2012). It has been discussed whether this mushroom is a saprotrophic, parasitic or facultative ectomycorrhizal fungus (Lumyong et al. 2007; Sanmee et al. 2010; Ji et al. 2011). Our previous works showed that *P. portentosus* isolate CMU51-320-2 showed the ability to form primordia which developed to mature fruiting bodies in the absence of a host plant in greenhouse (Kumla et al. 2012). The aim of this study was to investigate the modified techniques for the improvement *P. portentosus* yield when cultivated in the absence of host plants.

The pure culture of *P. portentosus* CMU51-320-2 used in this study was from the Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources, Faculty of Science, Chiang Mai University. The fungal mycelia were maintained on fungal host (FH) agar (Vaario et al. 2000 for FH agar and FH solution). *Phlebopus portentosus* grown on mixed sorghum grain and FH solution (10:1, w/v) (SGFH medium; Kumla et al. 2012) was used as a master spawn.

The substrates, 800 g each, were composed of different ratios of mixed SGFH medium and sawdust of *Samanea saman* (1:1, 1:2 and 1:3 v/v) placed into polypropylene bags (30 cm long and 8.5 cm wide). The moisture content of each mixed substrate was 65% (w/w) on a wet basis. The bags were autoclaved twice at 121 °C for 30 min and sterilized bags were allowed to cool for 24 h. The sterilized substrates were inoculated with 5 g of three-week-old of master spawn and inoculated bags were kept at 30 °C in darkness. The fungal mycelia were completely covered the mixed substrate 1:1, 1:2 and 1:3 (v/v) after 85–95 days, 120–135 days and 145–156 days of inoculation, respectively. After each period, the bags were cased with a layer of a saturated peat:vermiculite (1:1, v/v) with water on top (3 cm height) and 150 ml of water was added every other day. The casing bags were maintained in greenhouse conditions during June–September 2012, with a daytime temperature range of 27–37 °C and a relative humidity range of 55–80%. The brown rhizomorphs and primordia were found after two weeks of incubation in the greenhouse conditions (Fig. 1A, B). No primordia were formed in the control (non-casing) experiment. The number of primordia

Table 1 – Cultivation of *Phlebopus portentosus* CMU51-320-2 on SGFH and sawdust mixed substrate with different ratio.

Mixed SGFH: sawdust (v/v)	Number of primordial formation per bag[a]	Number of mature fruiting bodies per bag[a]	Fresh weight of fruiting bodies per bag (g)[a]	Total fresh weight of fruiting bodies (g)
1:1	7.20 ± 2.31a	1.27 ± 0.59a	14.29 ± 6.14a	214.33
1:2	5.93 ± 1.79b	1.20 ± 0.77a	13.55 ± 5.54a	203.19
1:3	5.40 ± 1.40b	1.13 ± 0.52a	12.90 ± 4.62a	193.51

[a] Results are means ± SD of fifteen replicates. Data with different letters within the same column indicate a significant difference at $P < 0.05$ according to Fisher's LSD multiple comparison test.

Table 2 – Cultivation of *Phlebopus portentosus* CMU51-320-2 on SGFH and sawdust mixed substrate (1:1) with different supplement solution.

Supplement solution	Number of primordial formation per bag[a]	Number of mature fruiting bodies per bag[a]	Fresh weight of fruiting bodies per bag (g)[a]	Total fresh weight of fruiting bodies (g)
Water (control)	7.40 ± 2.03c	1.33 ± 0.62b	15.02 ± 6.18c	225.35
FH solution	13.27 ± 3.28a	2.07 ± 0.88a	33.08 ± 15.34a	496.16
MS solution	10.33 ± 1.45b	1.73 ± 0.70ab	26.61 ± 10.88ab	399.08
Vitamin solution	9.93 ± 1.71b	1.40 ± 0.63b	20.31 ± 8.72bc	304.69

[a] Results are means ± SD of fifteen replicates. Data with different letters within the same column indicate a significant difference at $P < 0.05$ according to Fisher's LSD multiple comparison test.

formations in each treatment is shown in Table 1. The results indicated that the highest number of primordial formation was obtained from a mixed substrate of 1:1 (v/v). Only a few primordia developed into young fruiting bodies and matured later within 10–15 days (Fig. 1C–F) and produced basidiospores. Though rice seeds mixed with rubber tree (*Hevea brasiliensis*) sawdust are used in China (Ji et al. 2011), it was not necessary to use it in the present study.

Three different nutrient solutions such as FH, Murashige and Skoog (MS; Sanmee et al. 2010) and vitamin (Ohta and Fujiwara 2003) solutions were used to replace water. The cased mushroom spawns were supplemented with each nutrient solution and maintained in greenhouse as explained above. Two weeks after supplementing with nutrient solutions, the brown rhizomorphs and primordia were observed. The results showed that the highest number of primordia formation, mature fruiting bodies development and the fresh weight of fruiting bodies were obtained when supplemented the cultivation with FH solution (Table 2).

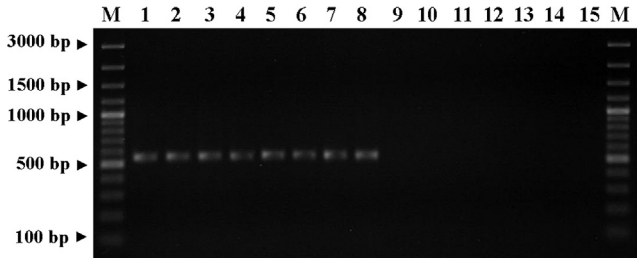


Fig. 2 – PCR amplification using ITS1F and HAR2A primers of cultivated fruiting bodies of *Phlebopus portentosus* CMU51-320-2. Lane 1: A fruiting body collected from field. Lanes 2–8: Cultivated fruiting bodies. Lane 9: *Astraeus odoratus*. Lane 10: *Scleroderma sinnamariense*. Lane 11: *Pisolithus albus*. Lane 12: *Bolentinellus* sp. Lane 13: *Boletellus emodensis*. Lane 14: *Suillus bovines*. Lane 15: negative control. Lane M: DNA ladder.

After harvesting mature fruiting bodies, identification was made mainly with morphological characteristics and was supported by some molecular data. A chemical reaction of KOH on pileus resulted in a dark reddish brown and on context of pileus resulted in an orange color. NH_4OH reaction on pileus was dark reddish brown and on context faint pink flush. The pileus of cultivated fruiting bodies were 3.02–7.75 cm in diameter, olive brown to dark olive brown, convex to subconvex, centrally depressed, context sometimes slowly bruising blue. Stipes 4.0–7.2 × 2.3–5.1 cm, clavate or tapering to apex, concolorous with pileus. Basidia 20–45 × 8.5–17.5 μm, clavate, bearing 4 spores, sterigma 4–10 μm (Fig. 1G). Hyphae with clamp connections, cystidia absent. Basidiospores 8.0–13.5 × 5.0–8.5 μm, ellipsoid, surface smooth, light brown under microscope in 3% KOH solution (Fig. 1H, I). Spore deposit olive-ocher in mass. These characters agreed well with the morphological taxonomic concept of *P. portentosus* (Heinemann and Rammeloo 1982; Singer et al. 1983; Lei et al. 2009). Moreover, DNA of those cultivated fruiting bodies was analyzed by the polymerase chain reaction (PCR) (Kumla et al. 2012). Internal transcribed spacer region of ribosomal DNA was amplified using specific primers, ITS1F and HAR2A primers with the regular thermal condition (Lumyong et al. 2007; Sanmee et al. 2010). The result showed that the cultivated fruiting bodies produced 550 bp PCR products, the same size in the positive control (fruit body collected from the field) (Fig. 2). Our result showed that the techniques and protocols we used have a potential to produce fruiting bodies of *P. portentosus* without a host plant for a large scale commercial production in Thailand.

Acknowledgments

This work was supported by grants from The Thailand Research Fund for The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0309/2550), Research Team Association Grant

RTA5580007 and Chiang Mai University. We thank Dr. Nakarin Suwannarach, Department of Biology, Chiang Mai University, for his helpful contribution.

REFERENCES

Hall I, Wang Y, Amicucci A, 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology* 21: 433–438; http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00204-X.

Heinemann P, Rammeloo J, 1982. Observations sur le genre *Phlebopus* (Boletineae). *Mycotaxon* 15: 384–404.

Ji KP, Cao Y, Zhang CX, He MX, Liu J, Wang WB, Wang Y, 2011. Cultivation of *Phlebopus portentosus* in southern China. *Mycological Progress* 10: 293–300; http://dx.doi.org/10.1007/s11557-010-0700-7.

Kikuchi K, Matsushita N, Suzuki K, 2009. Fruit body formation of *Tylopilus castaneiceps* in pure culture. *Mycoscience* 50: 313–316; http://dx.doi.org/10.1007/s10267-009-0481-5.

Kumla J, Bussaban B, Suwannarach N, Lumyong S, Danell E, 2012. Basidiome formation of an edible wild, putatively ectomycorrhizal fungus, *Phlebopus portentosus* without host plant. *Mycologia* 104: 597–603; http://dx.doi.org/10.3852/11-074.

Lei QY, Zhou JJ, Wang QB, 2009. Notes on three bolete species from China. *Mycosystema* 28: 56–59.

Lumyong S, Sanmee R, Lumyong P, 2007. Is large scale cultivation of boletes possible? *Opera Mycologica* 1: 34–37.

Mortimer PE, Karunarathna SC, Li Q, Gui H, Yang X, Yang X, He J, Ye L, Guo J, Li H, Sysouphanthong P, Zhou D, Xu J, Hyde KD, 2012. Prized edible Asian mushrooms: ecology, conservation and sustainability. *Fungal Diversity* 56: 31–47; http://dx.doi.org/10.1007/s13225-012-0196-3.

Ohta A, 1994. Production of fruit-bodies of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*, in pure culture. *Mycoscience* 35: 147–151; http://dx.doi.org/10.1007/BF02318492.

Ohta A, 1998. Fruit-body production of two ectomycorrhizal fungi in the genus *Hebeloma* in pure culture. *Mycoscience* 39: 15–19; http://dx.doi.org/10.1007/BF02461573.

Ohta A, Fujiwara N, 2003. Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture. *Mycoscience* 44: 295–300; http://dx.doi.org/10.1007/s10267-003-0120-5.

Sanmee R, Dell B, Lumyong P, Izumori K, Lumgyong S, 2003. Nutritive value of popular wild edible mushroom from northen Thailand. *Food Chemistry* 82: 527–532.

Sanmee R, Lumyong R, Dell B, Lumyong S, 2010. In vitro cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand. *Mycoscience* 51: 15–22; http://dx.doi.org/10.1007/s10267-009-0010-6.

Singer R, Araujo I, Ivory MH, 1983. The ectotrophically mycorrhizal fungi of the neotropical lowlands, especially central Amazonia. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 77: 1–352.

Vaario LM, Gill WM, Lapeyrie F, Matsushita N, Suzuki K, 2000. Aseptic ectomycorrhizal synthesis between *Abies firma* and *Cenococcum geophilum* in artificial culture. *Mycoscience* 41: 395–399; http://dx.doi.org/10.1007/BF02463953.

Wang Y, Hall IR, 2004. Edible ectomycorrhizal mushroom: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany* 82: 1063–1073; http://dx.doi.org/10.1139/b04-051.

Yamanaka K, Namba K, Tajiri A, 2000. Fruit body formation of *Boletus reticulatus* in pure culture. *Mycoscience* 41: 189–191; http://dx.doi.org/10.1007/BF02464330.

Phytoparasitica (2015) 43:57–59
DOI 10.1007/s12600-014-0429-y

First report of Alternaria leaf blight disease on oil palm caused by *Alternaria longipes* in Thailand

Nakarin Suwannarach · Jaturong Kumla · Saisamorn Lumyong

Received: 20 May 2014 / Accepted: 11 July 2014 / Published online: 24 July 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract A leaf blight on oil palm, caused by *Alternaria longipes*, was found in an *Elaeis guineensis* plantation for the first time in Chiang Mai Province, Thailand. The fungus was isolated from the lesions and its pathogenicity was confirmed. The fungus was identified based on morphological characteristics and confirmed using comparisons of DNA sequences of internal transcribed spacer (ITS) regions 1 and 2 plus 5.8S rDNA. This report is the first on oil palm leaf blight disease caused by *A. longipes*.

Keywords *Elaeis guineensis* · Leaf blight · Plant pathogenic fungi

Introduction

The African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is one of the economically important tropical tree crops and is most important for the industrial production of vegetable oil. Indonesia and Malaysia lead Southeast Asia in oil palm production (Carter *et al.* 2007). Nowadays, oil palm consumption is increasing as a precursor in biodiesel production. Areas planted with oil palm have increased in Thailand and as more plantations are established on less suitable sites, disease problems have increased. The total area of oil palm production in Thailand is approximately 625,600 ha, of which approximately 528,400 ha is in the southern part (Chavananand 2011).

In general, leaf blight and leaf spot diseases caused by fungi are considered to be minor diseases of oil palm, but they can spread rapidly in oil palm growth areas (Aderungboye 1977) and these diseases affect both the seedling and mature stage of oil palm. Leaf blight diseases of palm are caused by plant pathogenic fungi from several genera: *Bipolaris*, *Cervularia*, *Cylidrocladium*, *Exserohilum* and *Pestalotiopsis* (Elliott 2005; Suwannarach *et al.* 2013; Kittimorakul *et al.* 2013; Sunpapao *et al.* 2014).

There has been no prior report on leaf blight of oil palm in Thailand. The initial symptoms of this disease appear as dark spots surrounded by a yellow to rust-brown zone that gradually increases from 5 to 10 mm in diameter, changing from circular to elliptical lesions on the leaves. Lesions enlarge and coalesce, causing diseased leaves to become blighted (Fig. 1a). The aim of this study was to determine the etiological agent of the oil palm leaf blight disease observed in northern Thailand.

Material and methods

Sample collection and fungal isolation Mature oil palm leaves showing typical symptoms were collected from *E. guineensis* plantations in Chiang Mai Province, Thailand (18°45'35"N, 98°55'37"E). Specimens were collected during April 2014. Ten symptomatic leaves from ten palms were kept in a plastic box with wet filter

N. Suwannarach · J. Kumla · S. Lumyong (✉)
Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
e-mail: saisamorn.l@cmu.ac.th

N. Suwannarach
e-mail: suwan_461@hotmail.com

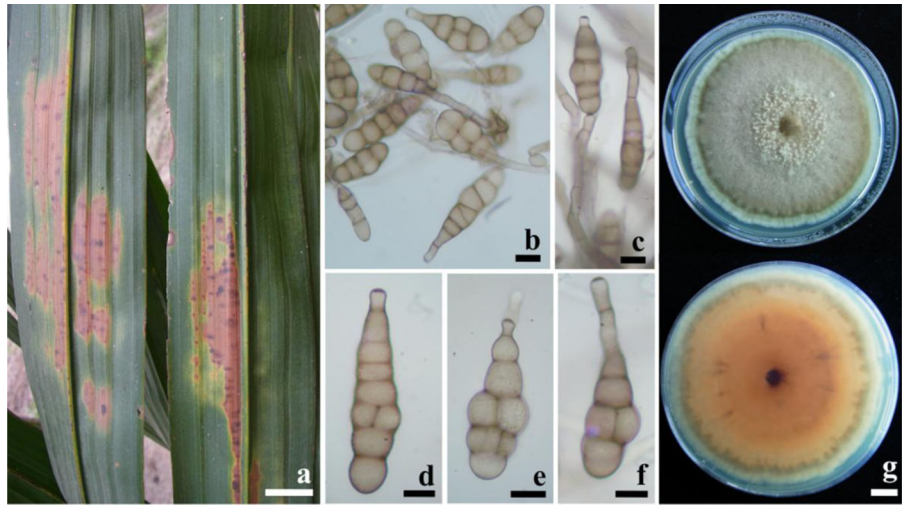


Fig. 1 Natural symptoms of *Elaeis guineensis* leaf blight caused by *Alternaria longipes* (**a**), conidiophore and conidia of *A. longipes* on *E. guineensis* leaf (**b** − **f**), colonies on PDA culture from both the top side (upper) and bottom side (lower) (**f**). Scale bars: **a** = 5 mm; **b** − **f** = 10 μm; **g** = 1cm.

paper to induce sporulation. Spore masses were then suspended in 250 μl of sterilize distilled water on sterilized glass slides and dropped on 2 % (w/v) water agar containing 0.5 mg l^{-1} of chloramphenicol. After 24 h incubation at 25 °C, individual germinating spores were selected and transferred directly to potato dextrose agar (PDA) according to the procedures described by Choi *et al.* (1999). Pure fungal isolates were deposited in the Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources (SDBR), Chiang Mai University, Thailand.

Fungal identification Conventional morphological characters tentatively identified the fungal isolate collected in this study to genus and species (Ellis 1971). The morphological data of anatomical features were based on at least 50 measurements of each structure under a light microscope (Olympus CX51, Japan).

Genomic DNA of the fungus was extracted using the SDS-CTAB method described by Suwannarach *et al.* (2010) and the ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified using ITS4 and ITS5 primer under the following cycling thermal conditions: 95°C for 2 min, 30 cycles of 95°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 1 min and a final cycle of 72°C for 10 min. The PCR products were directly sequenced with the same primers. Sequences obtained in this study were compared with those from GenBank database using the BLAST software on the NCBI website: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Pathogenicity test To confirm pathogenicity, the surface of ten healthy *E. guineensis* leaves was disinfected with 70 % ethanol (Sezer & Dolar 2012) and then placed in a plastic box with wet sterile filter paper. A conidial suspension of the fungus was adjusted to 15×10^6 conidia ml^{-1} and dropped on the leaves. The fungus was re-isolated from the disease symptoms, confirming Koch's postulates. The test was repeated twice.

Result and Discussion

Sporulation in the form of conidia and conidiophores was observed. The sporulation area of the leaf was first gray in color and then turned black. Conidiophores were observed singly or in groups, erect or ascending, simple or loosely branched, straight or flexuous, cylindrical, septate, rather pale olivaceous brown, up to 85 μm in length, 3–5 μm thick, with one or several conidial scars. Conidia sometimes solitary but usually in chains,

obclavate, rostrate, pale to mid pale brown, smooth or verrucose, overall length 75 ± 45 μm, body of conidium 6 ± 4 μm thick in the broadest part, 3–9 transverse septa, 1–2 longitudinal or oblique septa (Figs. 1b–1f). The fungus was initially identified as *Alternaria longipes* (Ellis & Everh) Mason (Ellis 1971) based on these morphological characteristics. Fungal colonies on PDA medium grew to 70–80 mm diam in one week at room temperature (25 ± 2°C). The colony is flat, downy to woolly, grayish surface initially and greenish to olive brown later. The reverse side is initially orange in color and later dark brown (Fig. 1g).

The partial ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA sequence of this pathogenic fungus, containing 596 bp, was deposited in GenBank as KJ722535. BLAST searches of the database showed that this sequence had 100 % similarity with *A. longipes* AY154684 and KJ082101. Therefore, the pathogenic fungus that caused leaf blight disease on oil palm was identified as *A. longipes*, based on both morphological and molecular characters.

For the pathogenicity test, the symptoms seen in the plantation were observed on inoculated *E. guineensis* leaves 2 weeks after incubation. The same fungus was re-isolated from the disease symptoms and culture on PDA to complete Koch's postulates.

Several pathogenic fungi cause diseases of oil palm that inhibit growth and reduce yield (Aderungboye 1977; Elliott 2005; Flood 2006; Kittimorakul *et al.* 2013). Curvularia leaf blight of oil palm caused by *Curvularia eragrostidis* was reported as a common disease in southeastern Asia (Aderungboye 1977). Oil palm plantations in South America can be affected by a leaf blight caused by *Pestalotiopsis palmarum* and *P. glandicola* (Labarca *et al.* 2006). Kittimorakul *et al.* (2013) recently reported the Pestalotiopsis-like leaf blight on oil palm in southern Thailand. The disease symptom on oil palm caused by *A. longipes* in the current study is similar to that caused by those pathogens. Therefore, we propose that *A. longipes* be added as one of the causal agents of leaf blight disease on oil palm.

Acknowledgments This work was supported by grants from TRF Research-Team Association Grant RTA5580007 and Chiang Mai University, Thailand. We are grateful to Mr. Keegan Kennedy for improving the English text.

References

Aderungboye, F. O. (1977). Diseases of the oil palm. *Tropical Pest Management, 23*, 305–326.

Carter, C., Finley, W., Fry, J., Jackson, D., & Willis, L. (2007). Palm oil markets and future supply. *European Journal of Lipid Science and Technology, 109*, 307–314.

Chavananand, K. (2011). Future of the Thai palm oil. www.Thaipalmoil.com Accessed 11 June 2013

Choi, Y. W., Hyde, K. D., & Ho, W. W. H. (1999). Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity, 3*, 29–38.

Elliott, M. L. (2005). *Leaf spots and leaf blights of palm*. Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. Gainesville: University of Florida.

Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous hyphomycetes*. London: Commonwealth Mycological Institute.

Flood, J. (2006). A review of Fusarium wilt of oil palm caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*. *Phytopathology, 96*, 660–662.

Kittimorakul, J., Pornsuriya, C., Sunpapao, A., & Petcharat, V. (2013). Survey and incidence of leaf blight and leaf spot disease of oil palm seedling in southern Thailand. *Plant Pathology Journal, 12*, 149–153.

Labarca, M., Sanabria, N., & Arcia, A. (2006). *Pestalotiopsis palmarum* Cooke pathogenicity on nursery-oil palm (*Elaeis guiueensis* Jacq.) plants. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, 23*, 414–421.

Sezer, A., & Dolar, F. S. (2012). *Colletotrichum acutatum*, a new pathogen of hazelnut. *Journal of Phytopathology, 160*, 428–430.

Sunpapao, A., Kittimorakul, J., & Pornsuriya, C. (2014). Disease note: identification of *Curvularia oryzae* as cause of leaf spot disease on oil palm seedlings in nurseries of Thailand. *Phytoparasitica*. doi:10.1007/s12600-014-0390-9.

Suwannarach, N., Bussaban, B., Hyde, K. D., & Lumyong, S. (2010). *Muscodor cinnamomi*, a new endophytic species from *Cinnamomum bejolghota*. *Mycotaxon, 114*, 15–23.

Suwannarach, N., Sujarit, K., Kumla, J., & Saisamorn, L. (2013). First report of leaf spot disease on oil palm caused by *Pestalotiopsis theae* in Thailand. *Journal of General Plant Pathology, 79*, 277–279.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Characterization of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Communities of *Aquilaria crassna* and *Tectona grandis* Roots and Soils in Thailand Plantations

Amornrat Chaiyasen[1], J. Peter W. Young[2], Neung Teaumroong[3], Paiboolya Gavinlertvatana[4], Saisamorn Lumyong[1]*

1 Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, **2** Department of Biology, University of York, York, United Kingdom, **3** Schoool of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, **4** Thai Orchid Labs Co. Ltd., Khannayao, Bangkok, Thailand

Abstract

Aquilaria crassna Pierre ex Lec. and *Tectona grandis* Linn.f. are sources of resin-suffused agarwood and teak timber, respectively. This study investigated arbuscular mycorrhizal (AM) fungus community structure in roots and rhizosphere soils of *A. crassna* and *T. grandis* from plantations in Thailand to understand whether AM fungal communities present in roots and rhizosphere soils vary with host plant species and study sites. Terminal restriction fragment length polymorphism complemented with clone libraries 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*. AM fungal communities in *T. grandis* samples from different sites were similar, as were those in *A. crassna*. The estimated average minimum numbers of AM fungal taxa per sample in roots and soils of *T. grandis* were at least 1.89 vs. 2.55, respectively, and those of *A. crassna* were 2.85 vs. 2.33 respectively. 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* were not affected by host plant species and sample source (root vs. soil) but affected by collecting site. Future inoculum production and utilization efforts can be directed toward the identified symbiotic associates of these valuable tree species to enhance reforestation efforts.

Citation: Chaiyasen A, Young JPW, Teaumroong N, Gavinlertvatana P, Lumyong S (2014) Characterization of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Communities of *Aquilaria crassna* and *Tectona grandis* Roots and Soils in Thailand Plantations. PLoS ONE 9(11): e112591. doi:10.1371/journal.pone.0112591

Editor: Zhengguang Zhang, Nanjing Agricultural University, China

Received May 30, 2014; **Accepted** October 10, 2014; **Published** November 14, 2014

Copyright: © 2014 Chaiyasen et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. The nucleotide sequences of the clones retrieved in this study have been deposited in GenBank (accession numbers JQ8643324-JQ864355).

Funding: This research was supported by the Thailand Research Fund for Research-Team Promotion Grant (RTA5580007) and the Commission of Higher Education for National Research University (A1) (http://www.trf.or.th/). AC was funded by the Thailand Research Fund; The Royal Golden Jubilee PhD Program (PHD/0150/2550: http://rgj.trf.or.th/indexth.asp). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Paiboolya Gavinlertvatana is employed by a commercial company (Thai Orchid Labs Co. Ltd). The affiliation does not alter the authors' adherence to all PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* Email: saisamorn.l@cmu.ac.th

Introduction

Tropical forests are disappearing at the rate of 13.5 million hectares each year owing to logging, burning and clearing for agriculture and shifting cultivation [1]. At present, managed woodlands are required for timber and non-timber products in many countries. *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec. (agarwood) and *Tectona grandis* Linn.f. (teak) are perennial plants that are used extensively to provide aromatic resin-infused wood products [2] and good quality teak wood products [3], respectively. The depletion of wild trees from indiscriminate cutting of *Aquilaria* species has resulted in the trees being listed and protected as endangered species. All *Aquilaria* species were listed in Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora in 2005 [4]; however, a number of countries have outstanding reservations regarding that listing. Plantlets of *A. crassna* and *T. grandis* are produced in Thailand for domestic and foreign markets such as Jamaica, Guatemala, Mozambique, Sri Lanka, Indonesia, Laos, Malaysia, and Australia. Most *T. grandis* plantations in Thailand are planted in the northern provinces such as Chiang Mai, Chaing Rai and Phetchabun, while *A. crassna* plantations are mostly in eastern (Rayong, Trat and Chanthaburi provinces) and central (Nakhon-Nayok) Thailand.

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are soil fungi in the phylum Glomeromycota [5] that are mutualistically associated with roots of a wide spectrum of tropical and temperate tree species [6]. AM fungi have major effects on plant growth such as enhance the nutrient uptake by plant roots (especially phosphorus), particularly in low fertility soils [7,8], protected plant against drought stress [9,10], protect plant from soil-borne plant pathogenic infection [11], and improve soil aggregate stability through the action of mycelia and glomalin [12,13,14]. AMF inocula applied to plantlets and plant seedlings increased growth

during early tree establishment in the field [2,15,16]. AM fungi have been used to inoculate and enhance growth of *T. grandis* [3,17] and *Aquilaria* spp. [2,18] prior to planting out. Therefore, studying the AM fungal communities of these plants in the field should aid plantation establishment and reforestation efforts. Information about the diversity of AM fungi associated with both plants has been reported mostly from natural forests in India [19,20,21,22,23] and only in *T. grandis* from Thailand [24]. These studies characterized communities based upon spore morphology. However, there are no reports of AM fungal communities of either tree using molecular tools. Identification of AM fungi based on spore morphology inevitably has some limitations, e.g. omission of AM fungi that did not produce spores during the sampling period and inability to identify the AM fungi within the roots.

PCR-based methods have been widely used in AM fungal community studies. Various studies have designed sets of specific primers for AM fungi [25,26,27] to facilitate rapid detection and identification directly from field-grown plant roots. Previously, Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) has been used to study the AM fungi community in roots of arable crops [28], perennial herbs [29], herbaceous flowering plants [30], grass species [31,32], grass species with herbaceous flowering plants [33,34], and temperate deciduous trees [35]. Populations of AM fungi have been well studied in a number of ecosystems around the world, but there is scant information available for tropical forests and plantations of tropical and sub-tropical species.

This study provides the first molecular community analysis of AM fungi associated with field-collected roots and rhizosphere soils of the tropical trees *A. crassna* and *T. grandis*, and is part of a long term goal of optimizing AM fungus inoculation strategies to enhance reforestation efforts with these trees. It also provides an early insight into the biodiversity of AM fungi in Thailand to test the hypothesis that differences in AM fungal communities present in the roots and rhizosphere soils are determined by collecting sites, host plant species, and local environmental factors.

Materials and Methods

Ethics Statement

No specific permits were required to carry out research in the plantations: Chiang Mai (99°15' E, 18°58' N), Chiang Rai (99°29′ E/19°14′ N), Nakhon-Nayok (101°16′ E, 14°9′ N), Phetchabun (100°47' E, 16°2' N) and Thai Orchids Lab Ltd. (101°7′ E, 14°16′ N). The field studies did not involve endangered or protected species in Thailand. *Aquilaria crassna* is defined to be the forbidden forest item in only the forest area as the Forest Act. Therefore, the *A. crassna* planting and deforestation in the land of ownership is legal. All *A. crassna* samples were obtained from privately-owned plantations and are therefore not subject to the restrictions of the Forest Act of Thailand. Permission to sample the *T. grandis* and *A. crassna* were granted by the landowner.

Study sites and sampling

Rhizosphere soils and roots were sampled from plantations of *T. grandis* and *A. crassna* in four provinces of Thailand (Table 1). Two sampling sites were located in Chiang Mai and Chiang Rai provinces in the northern region. These sites are monocultures of *T. grandis* planted at 2 m spacings and left to grow naturally with accumulated leaf litter and negligible understory perennial plants. Only roots attached to the main roots of *T. grandis* were sampled. At the sites in the central region; Nakhon-Nayok and Thai Orchids Lab Ltd., Nakhon-Nayok province, and in the northern region; Phetchabun province, *T. grandis* and *A. crassna* were planted alternately 2 m apart at Thai Orchids Lab Ltd. and Phetchabun. At both sites, weeds were controlled by ploughing and herbicide treatment. Thus, both species were planted without any above-ground vegetation, while in Nakhon-Nayok site, *A. crassna* was left to grow naturally. Paired soil and root samples from each plant species were randomly collected from 3 locations per site at 0–15 cm depth within 50 m^2 and taken to the laboratory. All collections were carried out in July 2010. Root fragments were washed free of soil and air dried on tissue paper. Root fragments and soil samples were stored frozen at −20°C until further analysis.

Soil analyses

Soil pH and electrical conductivity (EC) were determined in a 1:1 soil: water slurry by direct measurement with pH-meter (Waterproof EC Testr, EUTECH instruments). Available phosphorus was measured employing the Bray II method [36]. Total inorganic nitrogen, exchangeable potassium and soil organic carbon were quantified following the methods of soil analysis outlined in Sparks et al. [37].

Molecular analysis

Three replicate rhizosphere soil and root samples from each plant species were used to represent each site of collection. DNA was extracted from rhizophere soils and roots using the PowerSoil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, CA) and Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren), respectively according to the manufacturers' protocols. DNAs were amplified separately by nested PCR and then 20 µl of each of the three replicates from each sampling site were pooled and purified before restriction digestion [38]. The first round of AMF-specific PCR amplification was performed using the unlabelled primers AML1 and AML2 [26] with 30 cycles. In this first PCR, 40 µl reactions were carried out and each mixture contained 10 pmol of each primer, 1 unit of Taq polymerase (Promega) and 25 mM of each dNTP (Invitrogen) in manufacturer's reaction buffer (Promega). PCR was performed on a PTC100 thermocycler (MJ Research) with an initial denaturation at 94°C for 15 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 57°C for 45 s, extension at 72°C for 45 s, followed by a final extension of 72°C for 5 min. PCR products were visualized on a 1% agarose gel containing 0.1× SybrSafe (Invitrogen). The second round primers, 0.5 unit of Taq polymerase (Promega) and 20 pmol of HEX-labeled NS31 and FAM-labeled AML3 were added directly into 24 µl of each resulting product. Second-round PCR was conducted with 5 additional cycles using the same PCR conditions as the first PCR. The PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). The purified PCR products were digested separately with the selected restriction enzymes, HinfI, Hsp92II and MboI (Promega) [31,39] for 3 h at 37°C. Digested products were purified as mentioned above. Terminal restriction fragment (TRF) sizes from each sample were determined using the ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems) with GeneScan LIZ-600 (Applied Biosystems) as internal size standards. The GeneMapper software (Applied Biosystems) was used for the analysis of fragment data. To reduce data noise, only fragments containing intensity above a baseline threshold (50 fluorescence units) were recorded. Relative peak heights were calculated and fragments with an average relative abundance <5% were excluded from further analysis.

Screening and DNA sequence analysis

The remainders of the first PCR products were combined and purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen).

Table 1. Chemical characteristic of soils (mean value ± SEM) in wet season (July 2010) which soils and roots were sampled.

Study plot	Soil pH[a]	Electrical conductivity [a]	Soil organic carbon (%)[a]	Total inorganic N (g kg^{-1} soil)[a]	Available P (mg kg^{-1} soil)[a]	Exchangeable K (mg kg^{-1} soil)[a]	Agricultural management
Phetchabun (PB)	5.77±0.25ab	0.18±0.02a	4.26±0.45ab	222±15a	156±72ab	449±163a	plowing, organic fertilizer, herbicide
Thai Orchid Lab (TO)	6.68± 0.28a	0.14±0.01a	4.15±1.48ab	188±57a	370±158a	296±81a	plowing, organic fertilizer, herbicide
Chiang Mai (CM)	5.70± 0.26bc	0.11±0.05a	6.10 ±0.87a	210±68a	171±133ab	284±10a	No management
Chiang Rai (CR)	5.23±0.11c	0.10±0.04a	2.83±0.25b	140±17a	24±3b	243±28a	No management
Nakhon Nayok (NN)	6.19±0.14ab	0.21±0.07a	3.08±0.66b	200±8a	149±63ab	347±78a	No management

[a]Means of three observations. Means in the same column followed by the same letter are not significantly different ($\alpha = 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0112591.t001

Purified DNA was cloned into pGEM-T Easy Vector (Promega) and transformed into *Escherichia coli* JM109. One hundred transformants were selected randomly and their insertion checked by PCR using the same primers, AML1 and AML2. The amplified DNAs were digested by the restriction enzymes HinfI and Hsp92II separately. One clone of each RFLP type was screened and sequenced using sequencing primers SP6 and T7 on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems). Sequences were trimmed to the NS31-AML3 region and virtually digested with the restriction enzymes HinfI, Hsp92II, and MboI using an online restriction mapping website (RestrictionMapper).

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was carried out on the sequences obtained in this study and those corresponding to the closest matches from Genbank, as well as sequences from cultured AMF taxa including representatives of the major groups of Glomeromycota from GenBank. All sequences obtained from this study were aligned by ClustalX using the BioEdit sequence alignment editor [40] along with 28 AMF sequences from GenBank. The aligned SSU rRNA dataset was trimmed to 450 bp by excluding the terminal primer sequences. A neighbour-joining (NJ) phylogeny was constructed using PAUP*4b10 [41] with the Kimura 2-parameter model and 1000 bootstraps. The nucleotide sequences of the clones retrieved in this study have been deposited in GenBank (accession numbers JQ8643324-JQ864355).

Statistical analysis

The total number of TRFs was used as an AM fungal community diversity measurement [31]. The main and interaction effects of collecting sites, host plant species and sample source (root vs. soil) on number of TRFs using three restriction enzymes were tested with two-way factorial ANOVA using SPSS 11.5 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Jaccard similarity coefficients were calculated for the T-RFLP patterns of root and soil samples of both plants, which were clustered by the unweighted pair-group average (UPGMA) algorithm with 1000 bootstrap replicates to obtain confidence estimates. These calculations were performed using FreeTree [42] and the results displayed using TreeView [43].

Results

Soil analyses and correlation with TRFs

Chemical characteristics of soil varied among sites (Table 1). Soil pH values ranged from 5.23 to 6.68. No significant different was observed in electrical conductivity, exchangeable potassium, and total inorganic nitrogen. Available phosphorus in soils tended to be highest at the Thai Orchid Lab site (370 mg kg^{-1}soil) and differed significantly from the Chiang Rai site (24 mg kg^{-1}soil). Soil organic carbon was highest at the Chiang Mai site (6.10%) and differed significantly from the Chiang Rai and Nakhon Nayok sites. Pearson correlation analysis between the soil properties measured and TRFs showed that TRFs were positively correlated with available phosphorus, organic matter, and pH (Table S1).

AM fungal community of root and soil samples from *T. grandis* and *A. crassna*

The total number of different TRFs was used as a measure of AM fungal community diversity. Thirty eight TRFs were found in total for the AML3 (FAM-labelled) primer, while the NS31 (HEX-labelled) primer identified 30 TRFs. Since the AML3 primer revealed many more TRFs than the NS31 primer, only the AML3 fragments were used. Overall, in the roots and soils of *T. grandis*

and *A. crassna*, we found 13 different AML3 TRFs after digestion with HinfI, 14 after digestion with Hsp92II and 11 after digestion with MboI. The mean number of TRFs in *T. grandis* root and soil samples was 5.67 and 7.67, respectively when the TRF data of the three enzymes were pooled (Figure 1). It is possible to estimate the minimum average number of AM fungi colonizing the *T. grandis* root samples by dividing the average number of TRFs by 3 (three enzymes and one labeled end) [31]. Thus, there were on average at least 1.89 fungal taxa colonizing each *T. grandis* root sample and 2.55 fungal taxa in surrounding soils, respectively. The values for *A. crassna* were at least 2.85 fungal taxa per root sample and 2.33 fungal taxa in surrounding soils. The mean number of TRFs per sample was not significantly affected by source of samples (root and soil) ($F = 0.159$, $P = 0.693$) and host plant ($F = 3.452$, $P = 0.074$) (Table S2), but there was a statistically significant effect of collecting sites ($F = 42.77$, $P<0.01$), and a significant interaction among those three factors (Table S2). The cluster analysis of TRF patterns in roots (R-) and rhizosphere soils (S-) of *A. crassna* and *T. grandis*, based on Jaccard similarities, showed no significant grouping of samples by sites and source of samples (root and soil) (Figure 2a). This suggested that the AM fungal community in roots and rhizosphere soils was almost independent in *A. crassna* (A) and *T. grandis* (T) plots. Some TRF patterns in roots and rhizosphere soils that were collected from the same site were similar, e.g. R-CRT versus S-CRT and R-TOA versus R-TOT. Combining roots and rhizosphere soils of each plant by sampling site (CM: Chiang Mai, CR: Chiang Rai, NN: Nakhon-Nayok, PB: Phetchabun and TO: Thai Orchids Lab) indicated a tendency for *T. grandis* plots to be grouped together (PBT, CMT and TOT) as well as some *A. crassna* plot samples (PBA and TOA) (Figure 2b). This suggests that the AM fungal community associated with each tree species was more similar across plots than were communities for different trees species at the same location. The response for CRT and NNA, however, does not support this.

Occurrence of AM fungi in soils and roots of both plants

Nearly all of the distinct TRFs (31 out of 38) were found in both host plant species (Figure 3). There were some differences in AM fungal communities between *T. grandis* and *A. crassna* because the TRF 329c (TRFs are identified by their relative mobility and a code indicating the restriction enzyme that generated them: a: MboI, b: HinfI and c: Hsp92II) was not found in *T. grandis*, while 5 TRFs (135c, 141b, 158c, 176b, and 435b) were not found in *A. crassna*. Comparison of the population in roots and soils of *T. grandis* (Fig 3a) showed that 6 TRFs (135c, 158c, 176b, 181c, 435b and 438b) were found only in roots, while 141b and 281a were only found in soils. In *A. crassna* (Figure 3b), TRFs 176c, 181c and 438b were only found in root samples.

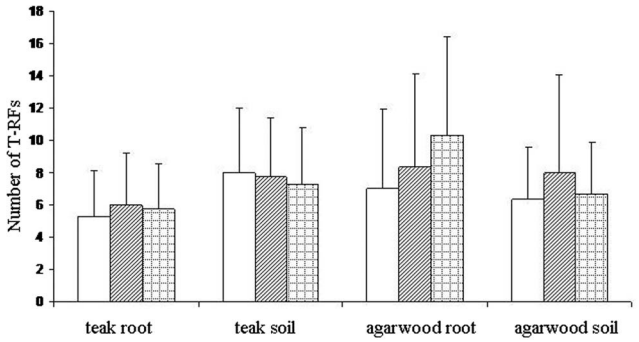


Figure 1. Effects of host plant, *Aquilaria crassna* (agarwood) and *Tectona grandis* (teak), and source of samples (root and soil) on mean number of terminal restriction fragments (TRFs) per sample using three restriction enzymes *MboI* (open bars), *HinfI* (hatched bars) and *Hsp92II* (cross-hatched bars). Values are mean ± SEM (n = 4 for teak and n = 3 for agarwood).
doi:10.1371/journal.pone.0112591.g001

Sequence and phylogenetic analysis

Clones were selected for sequencing on the basis of HinfI and Hsp92II RFLP typing. DNA sequences of 32 selected clones were determined, 7 clones from *A. crassna* and 25 clones from *T. grandis*. Predicted TRFs from the 32 virtually digested clone sequences were compared to observed TRFs from all three restriction enzymes (Table S3). A difference in size of up to 7 nucleotides was accepted as a match, because migration in capillary electrophoresis is sequence-specific, so that mobility (in rmu) is only approximately equivalent to sequence length (in bp). All predicted TRFs were observed, and the great majority of the observed TRFs were represented in the cloned sequences.

Our phylogenetic analysis was based on the new classification of Krüger et al. [44]. The 32 clone sequences were aligned with 23 sequences identified as closely related reference sequences in GenBank and a phylogenetic tree was constructed using the 18S rRNA gene sequences of *Paraglomus occultum* (GenBank accessions AJ276081 and JN687477) as outgroup. This indicated the presence of five AM fungal clades belonging to the families Claroideoglomeraceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae, and Glomeraceae (Figure 4), the most frequent sequences corresponding to Glomeraceae. The subclusters contained close matches to taxa previously identified by Singh et al. [22] based on spore morphology of AM fungi in rhizosphere soils of *T. grandis*: TR1-16, TR1-43, TS4-4, AR5-7 and TS6-1 are close to *Rhizophagus intraradices* or *R. irregularis*, while TR1-27 is close to *Redeckera fulvum*. Clone sequences TS4-9 and TS4-32 are similar to *Diversispora aurantia*, while TR3-R10 is probably *Gigaspora margarita*. When sequence data are compared with individual TRFs (Table S3 and Figure 4), it is clear that individual TRFs cannot be used to identify sequence type, because many different species may generate a TRF of the same size. For example, the FAM fragment at 164b could equally well be from *G. indicum*, *Re. fulvum* or *Claroideoglomus etunicatum*.

Discussion

This study examined the AM fungal communities of *A. crassna* and *T. grandis* plantations in Thailand. The estimated numbers of AM fungal taxa in roots and soils of *T. grandis* seedlings were 1.89 and 2.55 respectively, while in roots and soils of *A. crassna* there were 2.85 and 2.33 respectively. The AM fungal diversity was low compared with other plants. Using similar methodologies and definitions, Vandenkoornhuyse et al. [31] reported an average of 6.1 AM fungal taxa colonizing grass roots in a temperate seminatural grassland system, and 5.5 AM fungal taxa were found colonizing each *Solidago virgaurea* L. seedling root sample in low-Arctic meadow habitat [29].

Previous studies quantified the AM fungal diversity in rhizospheres of *T. grandis* and *A. crassna* mainly based on spore morphology and aimed to select efficient AM fungal isolates for growth enhancement. For example, Singh et al. [22] found an average of nine species per 100 g dry soil in a Jhum fallow site at which *T. grandis* was the dominant tree species, and most species belonging to the genus Glomus. Tamuli and Boruah [21] studied the AM fungi association of agarwood (*Aquilaria malaccensis*) plantations in Jorhat District of the Brahmaputra Valley, India. They found that the genus *Glomus* was dominant; among these

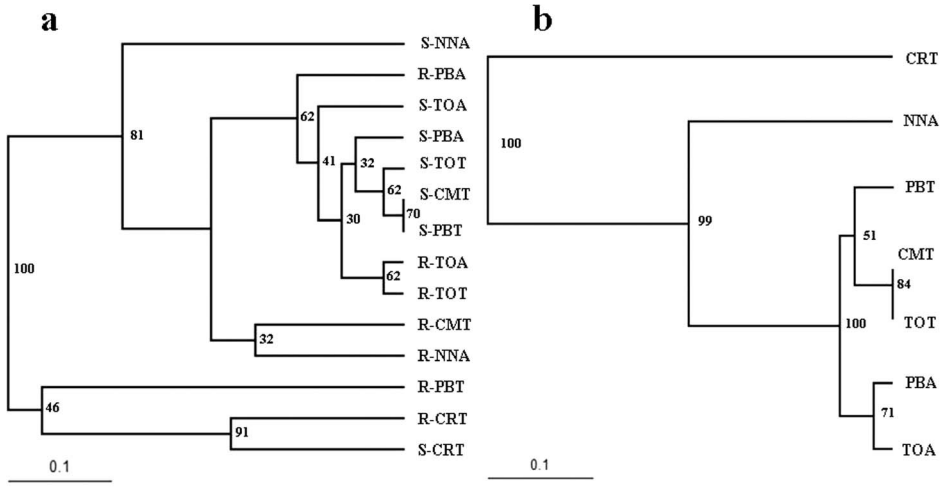


Figure 2. Cluster analysis of terminal restriction fragment length polymorphism patterns from AM fungal communities associated with *Aquilaria crassna* (A) and *Tectona grandis* (T); a) TRFs patterns in roots (R-) and rhizosphere soils (S-) and b) TRFs patterns in five sites (CM: Chiang Mai, CR: Chiang Rai, NN: Nakhon-Nayok, PB: Phetchabun and TO: Thai Orchid Labs). The unweighted pair-group average (UPGMA) algorithm was used to cluster patterns based on Jaccard similarities. Percentage values based on 1000 bootstrap replicates are given at each node.
doi:10.1371/journal.pone.0112591.g002

G. fasciculatum (now known as *Rhizophagus fasciculatus*; [45]) was the most dominant followed by *G. aggregatum*. We are not aware of any information on the diversity of AM fungi on *A. crassna*. According to previous studies, we also found that most sequences belonged to the family Glomeraceae that includes *Glomus* and *Rhizophagus*. This result is consistent with previously

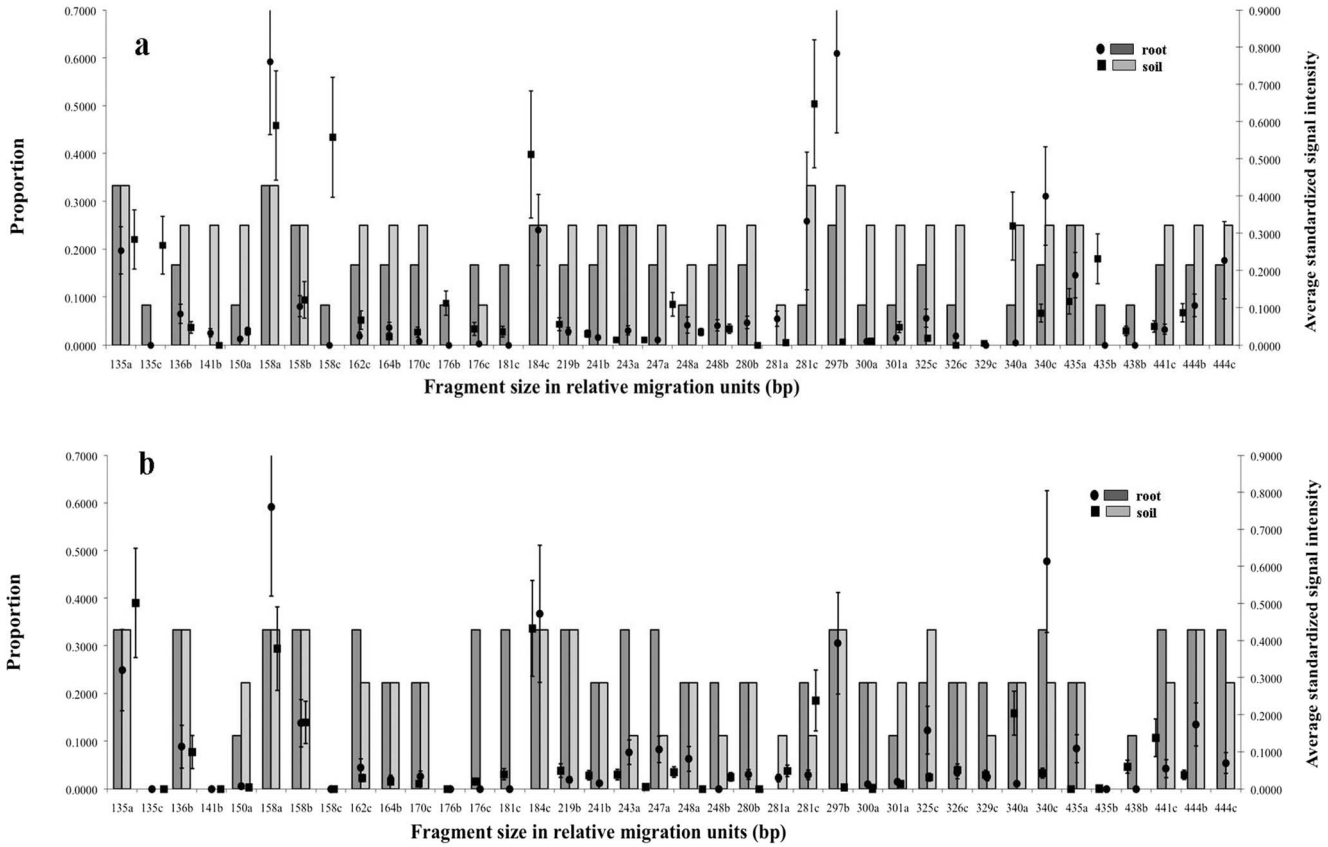


Figure 3. Occurrence of TRFs from roots and soils in (a) *Tectona grandis* and (b) *Aquilaria crassna*. Bars indicate the proportion of samples that yielded each TRF; dots indicate the average intensity of that fragment (± SEM) in those samples. The letters indicate the restriction enzyme involved in each fragment size, a: *MboI*, b: *HinfI* and c: *Hsp92II*.
doi:10.1371/journal.pone.0112591.g003

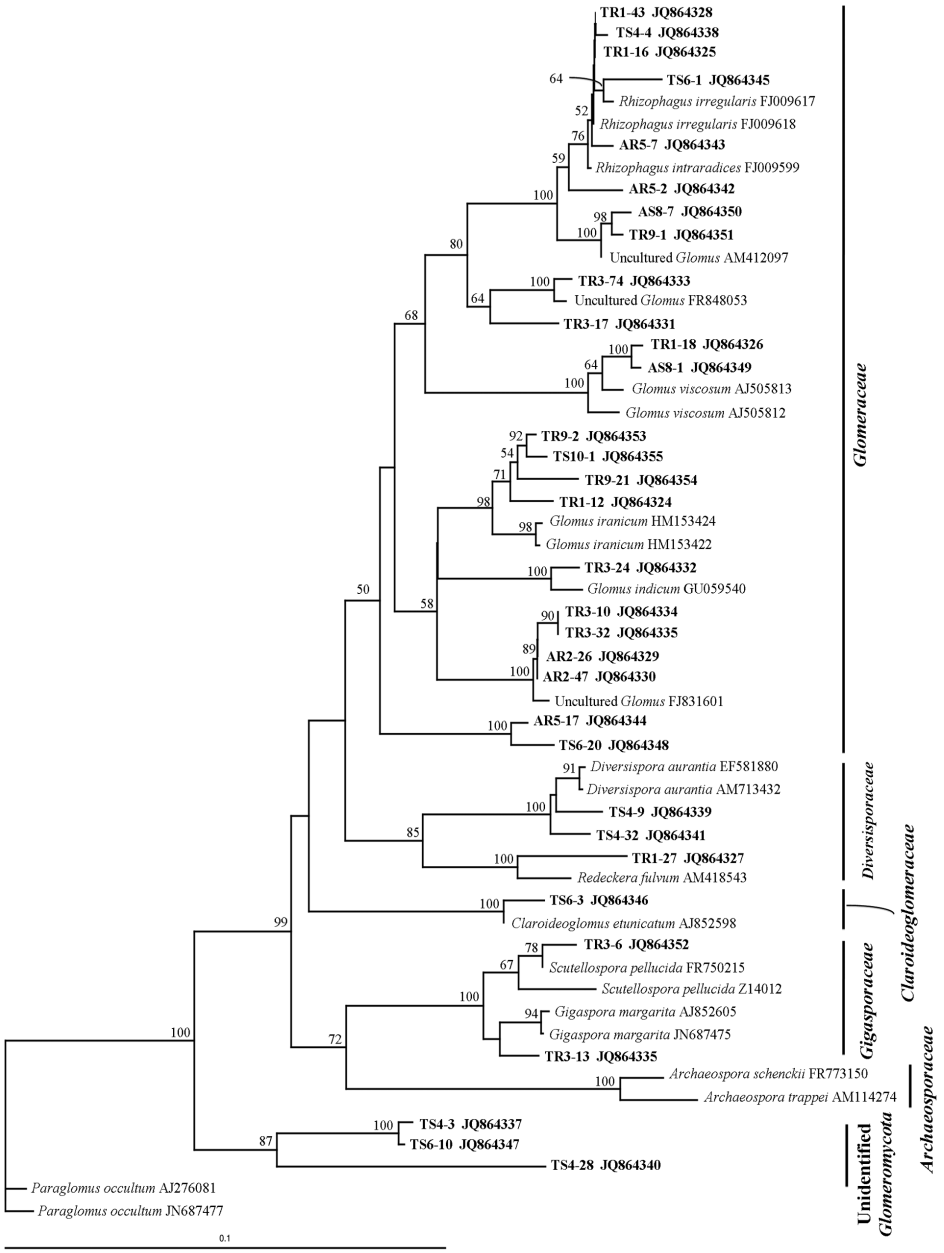


Figure 4. Neighbour-joining (NJ) phylogenetic tree of partial small subunit rRNA gene. Phylogeny was constructed using the region from NS31 to AML3. The percentage support values are based on 1000 bootstraps.
doi:10.1371/journal.pone.0112591.g004

published phylogenies [29,39,46]. The dominance of this family suggests that they able to survive under various agricultural conditions such as soil disturbance from plowing and cultivation and pesticide usage like that used here in the Phetchabun and Nakhon-Nayok sites. Those conditions may be unfavorable for other AM fungi. One possible reason why *Glomus* species have the ability to survive in a disturbed system is related to differences in propagation strategies [29]. Glomeraceae are capable of colonizing via fragments of mycelium, mycorrhizal root pieces, and spores, while Gigasporaceae are only capable of propagation via spores because they do not produce intra-radical vesicles: lipid-rich storage structures which allow for re-growth of hyphae from previously colonized root pieces [46,47,48,49]. This difference can explain the dominance of the Glomeraceae over Gigasporaceae members in an environment with repetitive agricultural disturbance. Oehl et al. [50] revealed a clear seasonal and successional AMF sporulation dynamics and implied that different life strategies of different ecological AMF groups could be defined on the basis of diverging temporal sporulation dynamics.

This study shows that the choice of restriction enzymes (HinfI, Hsp92II, MboI) did not significantly affect AM fungal diversity found per sample. Using a combination of those three restriction enzymes could detect possible species of AM fungi in the samples, even if they resulted in similar-sized fragments. HinfI and Hsp92II were chosen in this study because they showed the highest polymorphism of cleavage sites at the extremities of the amplified DNA fragment [31]. Mummey and Rillig [39] and Wolfe et al. [51] also found that HinfI and MboI can separate different closely-

related species of AM fungi identified from phylogenetic analyses. For example, *R. irregularis* and *R. intraradices* are closely related species that group in the same clade (Figure 4). Six clone sequences (TR1-16, TR1-43, TS4-4, AR5-2, AR5-7and TS6-1) that were related to both species were not completely separated using phylogenetic analysis, but virtual digesting with those three enzymes did separate them by using the combination of restriction pattern of each enzyme (Table S3). Clone sequences TR1-16, 1-43, and 6-1 grouped with *R. irregularis* and TS4-4, 5-2, 5-7 grouped with *R. intraradices*.

Some TRFs were only found in roots or only in soils, suggesting that some AM fungi may be rare in soil but produce fungal structures in roots that are rich enough for T-RFLP detection, while some were found only as spores in soils and did not colonize roots. While the majority of TRFs were associated with both *T. grandis* and *A. crassna*, some TRFs were associated with just one plant (i.e. 135c, 141b, 158c, 176b, 329c and 435b). In clustering analysis, samples from each plant species were grouped together even if they were collected from different sites. *A. crassna* samples seemed to group together, but since many AMF taxa were shared by both trees, *A. crassna* shared some AM fungal community patterns with *T. grandis* (Figure 2). Statistical analysis revealed significant effects of collecting sites and the interaction between collecting sites, host plant species and source of samples on TRFs (Table S2). Thus, specific AM taxa in roots and soils of *T. grandis* and *A. crassna* were affected by site but not affected by host plant species and source of samples (root and soil). This is in accordance with the observation of Bever et al. [52] that the host-dependence of the relative growth rates of fungal populations may play an important role in the maintenance of fungal species diversity. Previously, it has been reported that neighboring plants may have a significant impact on the AM fungal colonization and community composition of AM fungi in plant roots [34]. Although *T. grandis* at the Chiang Mai site had other *T. grandis* as closest neighbors with some negligible understory perennial plants, and at the other two sites the closest neighbors were *A. crassna*, the cluster analysis did not reveal any effect of this difference in neighbors. AM fungal community patterns in CMT were grouped with PBT and TOT sites in which weeds were controlled by agricultural management.

In conclusion, we demonstrated here that AM fungal community patterns in rhizosphere soils and roots of *T. grandis* and *A. crassna* were similar even if they were collected from different sites. AM fungal communities of *T. grandis* samples from different sites were similar, as were those in *A. crassna* samples. We also found that most sequences represented Glomeraceae, including *Glomus* spp. and *Rhizophagus* spp. Virtual digestion of sequences using the target sequences of the restriction enzymes HinfI, Hsp92II and MboI yielded expected fragments that mostly matched observed TRFs, linking possible AM fungal species to each TRF. Specific AM taxa in roots and soils of *A. crassna* and *T. grandis* were affected by site but were not affected by host plant species and source of samples (root and soil). Although the T-RFLP technique can provide important information about the AM fungal diversity associated with plant species of interest, trap cultures and cultured spores from the field site are still important in order to assess the ability of the AM fungi to enhance the growth of the plants, and to provide effective candidates for inoculum production targeted for these economically important tree species.

Supporting Information

Table S1 Correlation matrix of soil factors and terminal restriction fragments (TRFs) of study areas in wet season (July 2010) which soils were sampled.
(DOC)

Table S2 Summary of two-way analysis of variance for main and interaction effects of host plants (*Aquilaria crassna* and *Tectona grandis*), sites, and source of samples (root and soil) on AM fungal community diversity measured as the number of different TRFs per sample. Significant P-values are shown in bold.
(DOC)

Table S3 Clone sequences and TRFs derived from roots and rhizosphere soils of *T. grandis* and *A. crassna*. Values in bold indicate TRFs that match the sizes of virtual digest fragments (with differences ranging from 0 to 7 bp).
(DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SL JY. Performed the experiments: AC JY. Analyzed the data: AC JY. Contributed reagents/materials/analysis tools: JY NT PG SL. Wrote the paper: AC JY SL. Collected samples: PG.

References

1. Kobayashi S (2004) Landscape rehabilitation of degraded tropical forest ecosystems, Case study of the CIFOR/Japan project in Indonesia and Peru. Forest Ecol Manag 201: 13–22.
2. Turjaman M, Tamai Y, Santoso E, Osaki M, Tawaraya K (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi increased early growth of two nontimber forest product species *Dyera polyphylla* and *Aquilaria filaria* under greenhouse conditions. Mycorrhiza 16: 459–464.
3. Rajan SK, Reddy BJD, Bagyaraj DJ (2000) Screening of arbuscular mycorrhizal fungi for their symbiotic efficiency with *Tectona grandis*. Forest Ecol Manag 126: 91–95.
4. CITES (2004) Amendments to Appendices I and II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna (CITES). Thirteenth meeting of the conference of the parties, Bangkok, Thailand, 3–14 October, pp. 1–9.
5. Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. Mycol Res 105 (12): 1413–1421.
6. Habte M (2000) Mycorrhizal fungi and plant nutrition. In: Silva JA, Uchida R, editors. Plant Nutrient Management in Hawaii's Soils, Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture. College of Tropical Agriculture and Human Resources, Manoa: University of Hawaii. pp. 127–131.
7. Brundrett MC, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research Monograph 32, Canberra.
8. Smith S, Read D (2008) Mycorrhizal Symbiosis. New York: Academic Press.
9. Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2004) Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. J Exp Bot 55: 1743–1750.
10. Doubková P, Vlasáková E, Sudová R (2013) Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates drought stress imposed on *Knautia arvensis* plants in serpentine soil. Plant Soil 370: 149–161.
11. Azcón-Aguilar C, Barea JM (1996) Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza 6: 457–464.
12. Wright SF, Upadhyaya A (1998) A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 198: 97–107.
13. Rillig MC (2004) Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. Can J Soil Sci 84: 355–363.
14. Rillig MC, Ramsey PW, Morris S, Paul EA (2003) Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. Plant Soil 253: 293–299.
15. Habte M, Miyasaka SC, Matsuyama DT (2001) Arbuscular mycorrhizal fungi improve early forest-tree establishment. In: Horst WJ et al., editors. Plant nutrition–Food Security and Sustainability of Agro-ecosystems. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 644–645.
16. Urgiles N, Loján P, Aguirre N, Blaschke H, Günter S, et al. (2009) Application of mycorrhizal roots improves growth of tropical tree seedlings in the nursery: a

step towards reforestation with native species in the Andes of Ecuador. New Forest 38: 229–239.
17. Swaminathan C, Srinivasan VM (2006) Influence of microbial inoculants on seedling production in teak (*Tectona grandis* L.f.). J Sustain Forest 22 (3): 63–76.
18. Tabin T, Arunachalam A, Shrivastava K, Arunachalam K (2009) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on damping-off disease in *Aquilaria agallocha* Roxb. seedlings. Trop Ecol 50 (2): 243–248.
19. Thapar HS, Khan SN (1988) Seasonal frequency of *Endogone* spores in new-forest soils. In: Khosla PK, Sehgal RN, editors. Trends in Tree Sciences. Solan: Indian Society of Tree Scientists. pp.161–162.
20. Kanakadurga VV, Manoharachary D, Rama RP (1990) Occurrence of endomycorrhizal fungi in teak. In: Bagyaraj DJ, Manjunath A, editors. Mycorrhizal symbiosis and plant growth.Bangalore: University of Agricultural Sciences. pp.17.
21. Tamuli P, Boruah P (2002) Vesicular-abuscular mycorrhizal (VAM) association of agarwood tree in Jorhat District of the Brahmatputra Valley. Indian For 128 (9): 991–994.
22. Singh SS, Tiwari SC, Dkhar MS (2003) Species diversity of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi in Jhum fallow and natural forest soils of Arunachal Pradesh, north eastern India. Trop Ecol 44 (2): 207–215.
23. Dhar PP, Mridha MAU (2012) Arbuscular mycorrhizal associations in different forest tree species of Hazarikhil forest of Chittagong, Bangladesh. J For Res 23 (1): 115–122.
24. Ramanwong K (1998) Species diversity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi of teak (*Tectona grandis* Linn.f.) and their effects on growth of teak seedlings. M.S. Thesis, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok.
25. Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998) Ploughing up the wood-wide web? Nature 394: 431.
26. Lee J, Lee S, Young JPW (2008) Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiol Ecol 65: 339–349.
27. Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A (2009) DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 183: 212–223.
28. Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. FEMS Microbiol Ecol 36: 203–209.
29. Pietikäinen A, Kytöviita MM, Husband R, Young JPW (2007) Diversity and persistence of arbuscular mycorrhizas in a low-Arctic meadow habitat. New Phytol 176: 691–698.
30. Mummey DL, Rillig MC (2006) The invasive plant species Centaurea maculosa alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. Plant Soil 288: 81–90.
31. Vandenkoornhuyse P, Ridgway KP, Watson IJ, Duck M, Fitter AH, et al. (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. Mol Ecol 12: 3085–3095.
32. Johnson D, Vandenkoornhuyse PJ, Leake JR, Gilbert L, Booth RE, et al. (2004) Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. New Phytol 161: 503–515.
33. van der Heijden MGA, Wiemken A, Sanders IR (2003) Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. New Phytol 157: 569–578.
34. Mummey DL, Rillig MC, Holben WE (2005) Neighbouring plant influences on arbuscular mycorrhizal fungal community composition as assessed by T-RFLP analysis. Plant Soil 271: 83–90.
35. Barto EK, Antunes PM, Stinson K, Koch AM, Klironomos JN, et al. (2011) Differences in arbuscular mycorrhizal fungal communities associated with sugar maple seedlings in and outside of invaded garlic mustard forest patches. Biol Invasions 13: 2755–2762.
36. Houba VJG, Van Der Lee JJ, Novozamsky I, Wallinga J (1988) Soil and Plant analysis. Part 5: Soil Analysis Procedure. Agricultural University, Wageningen.
37. Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, et al. (1996) Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America
38. Render C, Weißhuhn K, Kellner H, Buscot F (2006) Rationalizing molecular analysis of field-collected roots for assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi: to pool, or not to pool, that is the question. Mycorrhiza 16: 525–531.
39. Mummey DL, Rillig MC (2007) Evaluation of LSU rRNA-gene PCR primers for analysis of arbuscular mycorrizal fungal communities via terminal restriction fragment length polymorphism analysis. J Microbiol Meth 70: 200–204.
40. Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. Nucl Acid S 41: 95–98.
41. Swofford DL (2002) PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). version4b10. Sunderland. MA: Sinauer Associates
42. Hampl V, Pavlícek A, Flegr J (2001) Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites. Int J Syst Evol Micr 51: 731–735.
43. Page RDM (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci 12: 357−358.
44. Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüßler A (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species-level. New Phytol 193: 970–984.
45. Schüßler A, Walker C (2010) The Glomeromycota: A species list with new families and new genera (Libraries at the Royal Botanic Garden Edinburgh, Edinburgh, UK; The Royal Botanic Garden Kew, Kew, UK; Botanische Staatssammlung Munich, Munich, Germany; and Oregon State University, Corvallis, Oregon, pp.1–56.
46. Helgason T, Fitter AH, Young JPW (1999) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. Mol Ecol 8: 659–666.
47. Gazey C, Abbott KK, Robson AD (1993) VA mycorrhizal spores from 3 species of *Acaulospora*—germination, longevity and hyphal growth. Mycol. Res. 97: 785–790.
48. INVAM Newsletter 3 (1993) Properties of infective propagules at the suborder level (*Glomineae* versus *Gigasporineae*). West Virginia University Web Services. Available: http//invam.caf.wvu.edu/articles/propagules.htm. Accessed 9 July 2012.
49. Brundrett M, Abbott LK, Jasper DA (1999) Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia. I. Comparison of the effectiveness and specificity of different isolation procedures. Mycorrhiza 8: 305–314.
50. Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, et al. (2009) Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. Agr Ecosyst Environ 134: 257–268.
51. Wolfe BE, Mummey DL, Rillig MC, Klironomos JN (2007) Small-scale spatial heterogeneity of arbuscular mycorrhizal fungal abundance and community composition in a wetland plant community. Mycorrhiza 17: 175–183.
52. Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA (1996) Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. J Ecol 84: 71–82.

Biological Control 90 (2015) 25–33

Contents lists available at ScienceDirect

Biological Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybcon

Characterization and efficacy of *Muscodor cinnamomi* in promoting plant growth and controlling Rhizoctonia root rot in tomatoes

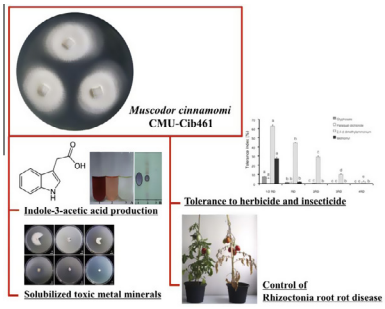
Nakarin Suwannarach [a,b], Jaturong Kumla [a,b], Kenji Matsui [c], Saisamorn Lumyong [a,b,*]

[a] Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
[b] Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
[c] Department of Applied Molecular Bioscience, Graduate School of Medicine and Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan

HIGHLIGHTS

- *Muscodor cinnamomi* produced indole-3-acetic acid plays a role in plant growth.
- This fungus solubilized toxic metal and tolerance to herbicide and insecticide.
- We report on plant growth promoting and root rot disease control of *M. cinnamomi*.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 January 2015
Accepted 19 May 2015
Available online 28 May 2015

Keywords:
Biocontrol
Fungal endophytes
Plant growth promotion
Plant disease

ABSTRACT

Muscodor cinnamomi was selected and investigated for its *in vitro* ability to produce indole-3-acetic acid (IAA) to solubilize different toxic metal (Ca, Co, Cd, Cu, Pb, Zn)-containing insoluble minerals and tolerance to metals, herbicides and an insecticide. The results indicated that this fungus is able to produce IAA (45.36 ± 2.40 μg ml^{-1}) in liquid media. This phytohormone stimulated coleoptile elongation, and increased seed germination and root elongation of tested plants. The metal tolerance and solubilizing ability depended on the type of insoluble minerals. *M. cinnamomi* showed the highest growth tolerance on Ca-containing media at 150 mM, followed by Zn-containing media at 100 mM and Cd-containing media at 10 mM. This fungus tolerated the three herbicides (2,4-D-dimethylammonium, glyphosate and paraquat dichloride) and an insecticide (methomyl) at the recommended dosages for field application. Moreover, *M. cinnamomi* completely controlled *Rhizoctonia solani* AG-2 root rot in tomato plants, and increased root length, shoot dry weight and root dry weight. This is the first report of *in vitro* IAA production, solubilization of insoluble metal minerals, and tolerance to herbicides, an insecticide and metals as well as the plant growth promoting ability of *M. cinnamomi*.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Soil-borne pathogenic fungi including, *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*, significantly reduce the quality and quantity of agricultural crops, and these pathogens survive in soil for many years (Jetiyanon and Kloepper, 2002; Ploetz, 2003; Wiwattanapatapee

* Corresponding author at: Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand. Fax: +66 53 892259.
E-mail address: saisamorn.l@cmu.ac.th (S. Lumyong).

http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.008
1049-9644/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

et al., 2004). *R. solani* Kühn [Teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk.] is an anamorphic soil-borne pathogen which causes serious plant diseases, such as damping-off, leaf blights, leaf spots, and root rot that significantly reduce yield (Taheri and Tarighi, 2012). The pathogen survives as mycelia or resistant structures known as sclerotia in plant debris and on weeds in crop growing areas. Thirteen anastomosis groups (AGs) in addition to AG-bridging isolates (AG-BI) of *R. solani* have been reported based on hyphal anastomosis criteria (Carling et al., 2002). *R. solani* causes various diseases on important crops worldwide including species in the *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Poaceae* and *Solanaceae* families (Carling et al., 2002; Mikhail et al., 2010). Management of plant diseases has been largely based on the application of chemical compounds (fungicides). Many effective chemical compounds have been used against many plant diseases, but this has not been considered a long-term solution because of health and environmental hazards, residue persistence and chemical resistance in pathogens and pests (Ahemad et al., 2009; Damalas and Eleftherohorinos, 2011). Currently, plant diseases in Thailand are controlled by fungicides and 13–68% of agricultural crops in Thai markets have been contaminated with fungicides during the past 10 years (Worapong and Strobel, 2009). Replacement of chemical compounds with biocontrol agents is an alternative, sustainable ecofriendly way to manage plant pathogens, produce safe food and reduce environmental pollution (Barakat and Al-Masri, 2005).

Most plants in natural ecosystems form mutualistic, symbiotic associations with fungi which are important to the structure, function, and health of plant communities (Clay and Holah, 1999; Schulz and Boyle, 2005; Hyde and Soytong, 2008; Mejia et al., 2008). Colonization by endophytic fungi may also improve the ecological adaptability of the host by enhancing its tolerance to biotic and abiotic stresses (Morton, 2000; Redman et al., 2002). These fungi can defend the plant against predators and microbial pathogens (Seigel and Bush, 1997), in addition to promoting growth (Bacon and White, 2000; Scannerini et al., 2004). Recent studies have shown that plant growth promotion may be attributed to the secretion of secondary metabolites by the endophytic fungi (Dai et al., 2008; Hamayun et al., 2009, 2010; Kajula et al., 2010; Waqas et al., 2012, 2014). *Muscodor* species are endophytic fungi that have been isolated from tropical and temperate trees (Suwannarach et al., 2013; Saxena et al., 2014). An important characteristic of the genus *Muscodor* is its ability to produce volatile organic compounds that have biological activities against many plant pathogenic microorganisms, and the genus is thus potentially important as a biocontrol agent (Strobel et al., 2001; Strobel and Daisy, 2003; Macías-Rubalcava et al., 2010). Our previous work showed that *Muscodor cinnamomi* inoculum could effectively control *R. solani* AG-2 both *in vitro* and *in vivo* (Suwannarach et al., 2012). However, the characteristics of the plant growth promotion abilities of *Muscodor* species including *M. cinnamomi* have not been reported. This study determined the *in vitro* indole-3-acetic acid (IAA) producing ability of *M. cinnamomi* and the biological effects of fungal IAA. Moreover, the ability of *M. cinnamomi* to solubilize toxic metal (Ca, Co, Cd, Cu, Pb, Zn)-containing minerals and tolerate toxic metals, herbicides and pesticides in solid culture were investigated. The potential of *M. cinnamomi* as an *in vivo* biological agent to control *R. solani* AG-2, root rot in tomato, was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Fungal cultures

The endophytic fungus, *M. cinnamomi* CMU-Cib461 was isolated from *Cinnamomum bejolghota* (Buch.-Ham.) Sweet. (Suwannarach et al., 2010) and pathogenic *R. solani* AG-2 was isolated from damaged tomato plants in Saraphi district, Chiang Mai Province, Thailand (18°42′47″N, 98°58′35″E). Both fungi were deposited at the Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, and cultured on potato dextrose agar (PDA; CONDA®, Madrid, Spain) and incubated at 25 ± 2 °C.

2.2. Determination of fungal IAA production

M. cinnamomi was grown in 25 mL of potato dextrose broth (PDB; CONDA®, Madrid, Spain), pH 6.0 supplemented with 2 mg mL^{-1} of L-tryptophan in 100 mL Erlenmeyer flask. Five mycelial plugs (5 mm in diameter) from the periphery of a colony growing on PDA in an incubator (25 ± 2 °C) for 2 week were transferred to PDB. Incubation was performed on a reciprocal shaker, at 150 rpm in the dark at 25 ± 2 °C. After 2 week of incubation, the cultures were centrifuged at 11,000 rpm for 15 min to harvest the supernatant. For IAA production screening, a colorimetric assay was used (Tsavkelova et al., 2007). Two milliliters of Salkowski's reagent (1 mL of 0.5 M $FeCl_3$ in 50 mL of 35% $HClO_4$) was mixed with 1 mL of the supernatant and incubated in the dark for 30 min. A pink to red color was considered positive for IAA production.

2.3. Extraction, detection and quantification of fungal IAA

The extraction of fungal IAA followed the methods descript in Kumla et al. (2014). The supernatant was adjusted to pH 4.5 with 0.1 M HCl and extracted using two volumes of ethyl acetate. The ethyl acetate fraction was evaporated until dry using a rotary evaporator. The crude extracts were dissolved in 1.0 mL of 75% methanol and 1% acetic acid (pH 4.5) and analyzed by thin layer chromatography (TLC) using Silica gel 60 F_{254} aluminum sheet. The mobile phase contained chloroform:methanol:water (84:14:1, v/v/v). Spots with R_f values identical to standard IAA were identified under UV light (254 nm), and sprayed with Salkowski's reagent (Ehmann, 1977) and Ehmann's reagent (mixed 1 volume of 50 mL of 0.2% (w/v) *p*-dimethylaminobenzaldehyde in concentrated HCl combined with 50 mL of absolute ethanol and 3 volumes of 2.03 g of $FeCl_3.6H_2O$ in 500 mL of water and 300 mL of conc. H_2SO_4).

Production of fungal IAA was confirmed by high performance liquid chromatography (HPLC). The samples were analyzed using the Shimadzu Prominence UFLC system equipped with an LC-20AD pump, SIL-20ACHT autosampler, CTO-20AC column oven, CBM-20A system controller and SPD-20A UV/VIS detector (Shimadzu, Japan). Mightysil RP-18 (250 × 4.6 mm, 5 μm) at 40 °C was used as an analytical column. The mobile phase contained 45% solvent A (1% acetic acid) and 55% solvent B (100% methanol). The injection volume was 10 μL and the flow rate was controlled at 0.5 mL min^{-1}. The detection wavelength was 280 nm. The presence of IAA was confirmed by retention time and co-injection with an IAA standard. A standard curve was constructed with different levels of IAA standard. Fungal IAA was quantified by correlating the peak area of the sample and the standard curve.

2.4. Biological assay of fungal IAA

Coleoptile elongation and seed germination assays (Chutima and Lumyong, 2012; Kumla et al., 2014) were used to investigate the biological activity of crude fungal IAA. Crude fungal IAA was dissolved in 0.5 ml of 0.1 N NaOH, then diluted with 40 μg mL^{-1} of sterile distilled water before use. An IAA standard stock solution

at 40 μg mL^{-1} was used as the positive control, and sterile distilled water was used as the negative control. Three replications were used for each experiment.

Coleoptile elongation: Oat (*Avena sativa* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles were used in disc bioassays of coleoptile elongation. Seeds were surface sterilized by soaking in 0.2% Tween 80 and 0.05% sodium hypochlorite (NaClO) in sterile water for 3 min, followed by sterile distilled water for 30 s and 70% ethanol for 30 s. The sterile seeds were placed on a sponge saturated with sterile distilled water and grown in the dark at 25 °C. After 3 days, the apical 1.5–2.0 mm of each coleoptile was removed and the coleoptile segments of rice and oat were adjusted to 5.0 and 10.0 mm length, respectively. Sections of coleoptiles were submerged in distilled water for 2 h before use. One milliliter of the tested solutions was pipetted onto a filter paper disc (4 cm in diameter). Ten coleoptiles were placed on filter paper discs for each treatment in Petri dishes, then incubated in the dark at 25 °C. After 24 h, the length of coleoptile segments was measured.

Seed germination: Seeds of black kidney bean (*Bruguiera parviflora*) and corn (*Zea mays*) were used in the experiment. Seeds were surface-sterilized as mentioned above. The surface-sterilized seeds were soaked in 250 mL of the fungal IAA solution (40 μg mL^{-1}), IAA standard solution (40 μg mL^{-1}) or water for 24 h with three replicates of 100 seeds per treatment, and then sown in plastic pots (11 cm in height and 15 cm in width) containing sterile sand:soil (1:1, v/v), pH 6.8. All pots were maintained in a greenhouse during March–April, 2013 with a daytime temperature of 28–37 °C and a relative humidity of 57–70%. After 1 week, the percent seed germination was calculated and the root length was measured.

2.5. Metal mineral solubilization ability and metal tolerance

This experiment was carried out using PDA, pH 6.5 with the addition of insoluble metal minerals including $Ca_3(PO_4)_2$, $CdCO_3$, $CoCO_3$, $CuCO_3{\cdot}Cu(OH)_2$, $2Pb(CO_3)\cdot Pb(OH)_2$ and $ZnCO_3$ to the desired final concentration (2.5–200 mM), according to the method described by Fomina et al. (2005). The components of PDA were dissolved in deionized water and autoclaved at 121 °C for 15 min. After autoclaving, metal minerals dissolved in sterile deionized water were added under sterile conditions by filtration on a 0.45 μm membrane to avoid formation of precipitates. Twenty-five milliliters of tested media for each experiment were poured onto Petri dishes and a sterilized cellophane disc was placed on the surface of the test medium after solidification. Mycelial plugs (5 mm in diameter) were inoculated onto the center of the tested media. All plates were sealed with Parafilm and incubated at 25 ± 2 °C in darkness for one month. Colony diameter and solubilization zone (halo zone) were measured. The solubilization index (SI) was calculated as a halo zone diameter divided by a fungal colony diameter (Vitorino et al., 2012). SI values less than 1.0, between 1.0 and 2.0, and more than 2.0 were low, medium and high solubilization activities, respectively. The fungal covered cellophane discs of each experiment were removed, dried at 60 °C for 48 h and maintained in desiccators for 20 min before weighting. Mycelium dry weights and tolerance results were expressed in terms of a tolerance index (TI) based on the dry weights of fungal biomass (Fomina et al., 2005). A TI values was calculated as the dry weight of fungal biomass of treated mycelium divided by dry weight of fungal biomass of control mycelium, and expressed as percentage. TI values less than 50% indicated a growth inhibition effect and 0% indicated a lethal effect.

2.6. Herbicides and insecticide tolerance

Three commercially available herbicides, glyphosate (Glyphosate 48®, *N*-(phosphonomethyl)-glycine), paraquat dichloride (Grammoxone®, 1,1′-dimethyl-4,4′-bipyridinium dichloride) and 2,4-D-dimethylammonium (DMA6®) and one commercial insecticide, methomyl (Garnet®, (*E*,*Z*)-methyl *N*-(methylamino)-carbonyl-oxy-ethanimidothioate) were tested. The recommended field dosages of glyphosate, paraquat dichloride, 2,4-D-dimethylammonium and methomyl were 6, 6.25, 2.5 and 1000 ppm, respectively. Aqueous stocks of each compound were prepared and added to autoclaved PDA to obtain final concentrations of half recommended dosage to quintuple recommended dosage. A sterile cellophane disc was placed on the surface of the test media which was inoculated with mycelial plugs. The inoculated plates were sealed with Parafilm and incubated at 25 ± 2 °C in darkness for 2 week. Fungal dry weights were measured and TI was calculated as mentioned above. Three replicates were used for each treatment.

2.7. Control of tomato root rot caused by *R. solani* AG-2 with *M. cinnamomi*

2.7.1. Seedlings

Selected locally grown plum tomato (*Solanum lycopersicum* L. var. roma) seeds were used. Before planting, seeds were soaked in sterile distilled water overnight, and the seeds that sunk to the bottom of the vessel were selected for the experiments. Commercial soil (Mae-On Company, Chiang Mai, Thailand) was used in all experiments with a pH of 6.8. Soil was autoclaved at 121 °C for 30 min and distributed into each 14 cm × 19 cm pot. Pots contained 500 g sterile soil and five seeds per pot. Pots were placed under ambient conditions during July to December 2013, under blue screen netting to protect plants from insect infestation. The temperature varied during incubation from 22 to 34 °C, while the relative humidity ranged from 63% to 84%. The maximum daily-light intensity ranged from 13,540 to 59,000 lux. Three week-old plant seedlings were used in this experiment.

2.7.2. Inoculum preparation

Rye grain was prepared by boiling for 10–15 min and placed 50 g of boiled grains in 250 mL glass bottle. The bottles were autoclaved at 121 °C for 30 min and allowed to cool down for 24 h. Five mycelial plugs (5 mm in diameter) of *M. cinnamomi* were immediately inoculated and incubated at 25 ± 2 °C in the darkness. A mycelial plug (5 mm in diameter) of *R. solani* was inoculated at the center of PDA in Petri dishes and incubated at 25 ± 2 °C in the darkness. Three week-old rye grains and five d-old PDA which completely covered by mycelium of *M. cinnamomi* and *R. solani*, respectively were used as inocula.

2.7.3. Experimental design

The *M. cinnamomi* and *R. solani* inocula were scraped, cut and minced and mixed into the soil. Four treatments were established to test the effectiveness of *M. cinnamomi* on controlling tomato root rot caused by *R. solani in vivo*. The first treatment was non-infested control pots containing 500 g of sterile soil. The second treatment consisted of 500 g soil and 30 g *M. cinnamomi* inoculum. The third treatment had 500 g soil, 30 g *M. cinnamomi* inoculum and 25 g of *R. solani* inoculum. The fourth treatment consisted of 500 g soil and 25 g of *R. solani* inoculum. One seedling was grown in each pot and pots were grown under the same conditions as in the seedling experiment. After 4 month of incubation, the symptoms of root rot were observed. Plant height, root length, dry weight of shoot and root, number of fruits per plant and fruit fresh weight were recorded. Each experiment was conducted in a completely randomized design with ten replicates and repeated twice.

2.8. Statistical analysis

All experimental data were analyzed by SPSS program version 16.0 for Windows. The data regarding solubilization of toxic metal minerals, the tolerance to toxic metals, herbicides and insecticide were subjected to analysis of variance using Tukey's test ($P < 0.05$). The analysis of variance of tomato seedling experiment was analyzed with Fisher's LSD multiple comparison test ($P < 0.05$).

3. Results

3.1. Determination of fungal IAA production

The culture filtrate of *M. cinnamomi* was IAA positive, indicated by the formation of red-pink color when tested with Salkowski's reagent. A TLC chromatogram of an ethyl acetate extract from *M. cinnamomi* and IAA standard showed the same R_f value (0.46) under UV light and presented a clear bluish-violet spot and red spot with Ehmann's reagent and Salkowski's reagent, respectively, while, the uninoculated medium extract did not have an IAA spot (Fig. S1).

The HPLC analysis of the ethyl acetate extract from *M. cinnamomi* indicated the presence of a fungal IAA at a retention time of 10.1 min compared to the IAA standard and a maximum absorption at 279 nm. In addition, the identity of fungal IAA was confirmed by a co-injection with the IAA standard. No peak of IAA was identified in the uninoculated medium. The fungal IAA levels were also quantified by HPLC. The results indicated that *M. cinnamomi* produced IAA at a level of 45.36 ± 2.40 μg mL^{-1} (Fig. S2).

3.2. Biological assay of fungal IAA

Elongation of oat and rice coleoptile segments induced by crude fungal IAA is shown in Fig. 1A. The oat coleoptile length treated with crude IAA extract of *M. cinnamomi* (11.58 ± 0.97 mm) and IAA standard (11.66 ± 0.78 mm) were not statistically different but they were significantly higher than the water treatment (10.13 ± 0.21 mm). Moreover, the rice coleoptile segment length treated with IAA standard (6.42 ± 0.89 mm) and crude IAA extract of *M. cinnamomi* (6.35 ± 0.73 mm) were not statistically different but they were longer than the water treatment (5.25 ± 0.34 mm).

The highest percentage of seed germination for both black kidney bean and corn seeds was obtained in the IAA standard (40 μg mL^{-1}) treatment. However, the percentage of seed germination of both plants after treatment with the crude fungal IAA solution, was not significantly different from the IAA standard, but was higher than the water treatment (Fig. 1B). The root length of both black kidney bean and corn treated with crude fungal IAA solution were significantly higher than the IAA standard and water (Fig. 1C). These results confirmed that the crude fungal IAA was biologically active and played a role in promoting plant growth.

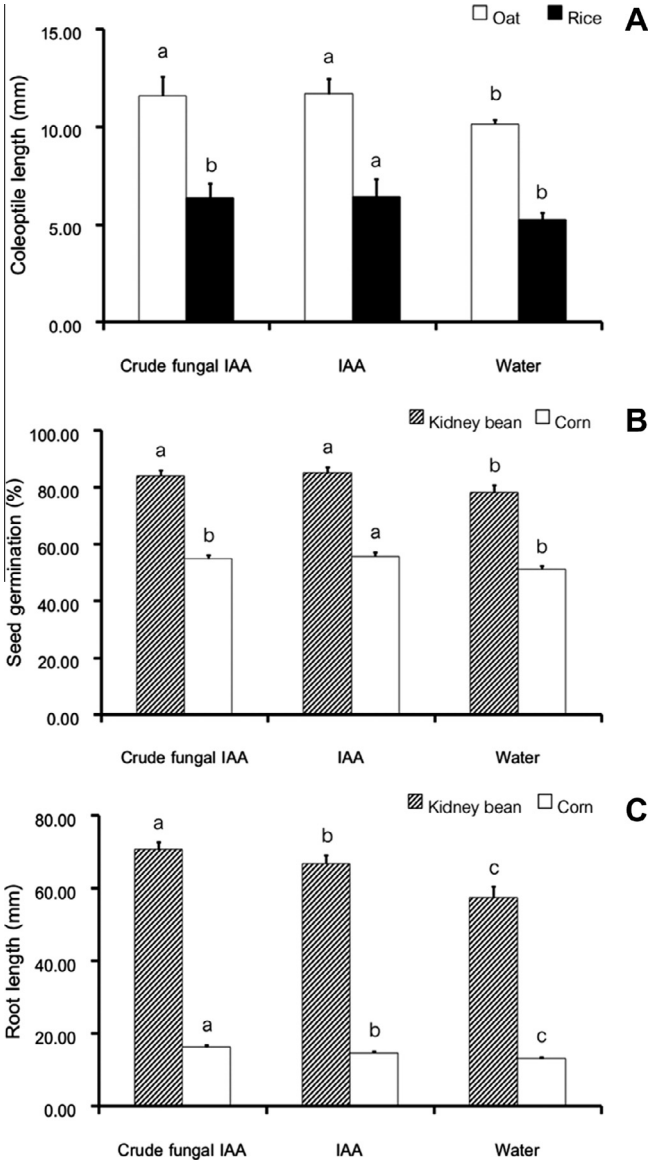


Fig. 1. Biological assay of crude fungal IAA. The concentration of fungal IAA and IAA standard was adjusted at 40 μg ml^{-1}. (A) Coleoptile elongation of oat and rice. (B) Percentage of seed germination of black kidney bean and corn. (C) Root length of black kidney bean and corn. Data were means of three replicates. Error bar at each point indicated that ± SD. Different letters above each graph in the same experiment indicate the means are significantly different by Tukey's Test ($P < 0.05$). Water = water treatment and IAA = IAA standard treatment.

3.3. Metal mineral solubilization ability and metal tolerance

The ability to solubilize metal minerals depended on type of minerals. In some cases *M. cinnamomi* produced a solubilization zone in the agar which was found beneath, and was the same size as the fungal colonies (Fig. 2A–C), while in other cases the solubilization zones were larger than the fungal colony (Fig. 2D and E). However, the fungus was not able to produce the solubilization zone for $CuCO_3$ (Fig. 2F). The solubilization activity of tested fungi were expressed in terms of a solubilization index (SI) and shown in Fig. 3A. The results showed that the SI value decreased when the concentration of the tested insoluble minerals increased. The solubilization activity of *M. cinnamomi* in the presence of $CdCO_3$ and $2Pb(CO_3)\cdot Pb(OH)_2$ was characterized as medium ($1 < SI < 2$) in concentration 2.5–5 and 2.5 mM, respectively (Fig. 3A). While this fungus showed a low SI ($SI < 1$) solubilization activity for $Ca_3(PO_4)_2$, $CoCO_3$ and $ZnCO_3$.

The tolerance index (TI) of *M. cinnamomi* to each metal mineral is shown in Fig. 3B. It was found that the TI varied for different types and concentrations of metal minerals. TI values decreased when the concentration of the tested insoluble minerals increased. The analysis showed that the growth of *M. cinnamomi* was inhibited ($TI < 50\%$) by all tested minerals containing metal, except $Ca_3(PO_4)_2$ at 2.5–5 mM. The highest growth tolerance was found on Ca-containing medium (150 mM), followed by Zn-containing medium (100 mM). *M. cinnamomi* showed the highest growth tolerance on Co-, Cu- and Pb-containing media at 5 mM and Cd-containing medium at 10 mM.

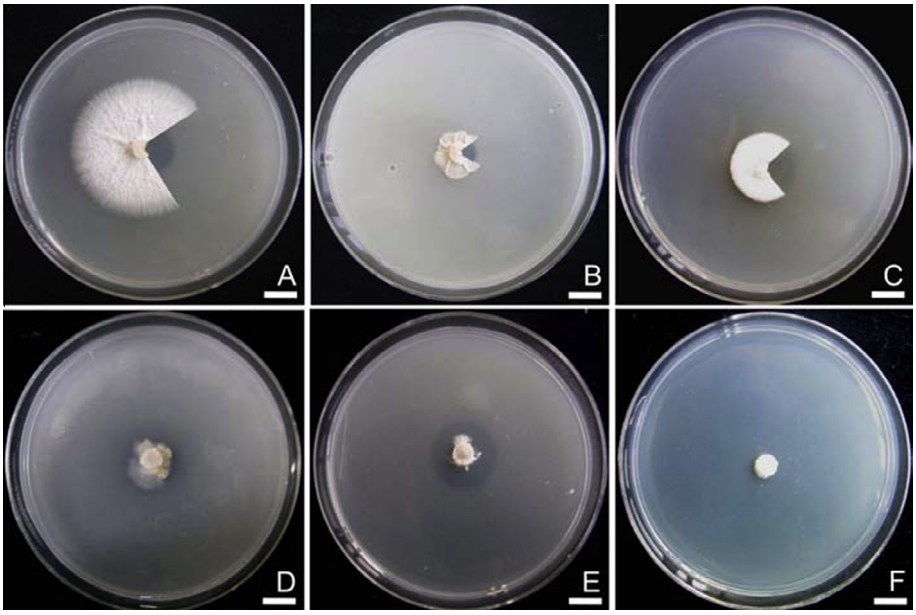


Fig. 2. Solubilization of metal minerals in agar media by *Muscodor cinnamomi*. (A) 2.5 mM $Ca_3(PO_4)_2$. (B) 2.5 mM $CoCO_3$. (C) 2.5 mM $ZnCO_3$. (D) 2.5 mM $CdCO_3$. (E) 2.5 mM $2Pb(CO_3)\cdot Pb(OH)_2$. (F) 2.5 mM $CuCO_3$. Bars = 10 mm. Figure A–C = Fungal colonies were cut for the solubilization area (halo zone) observation.

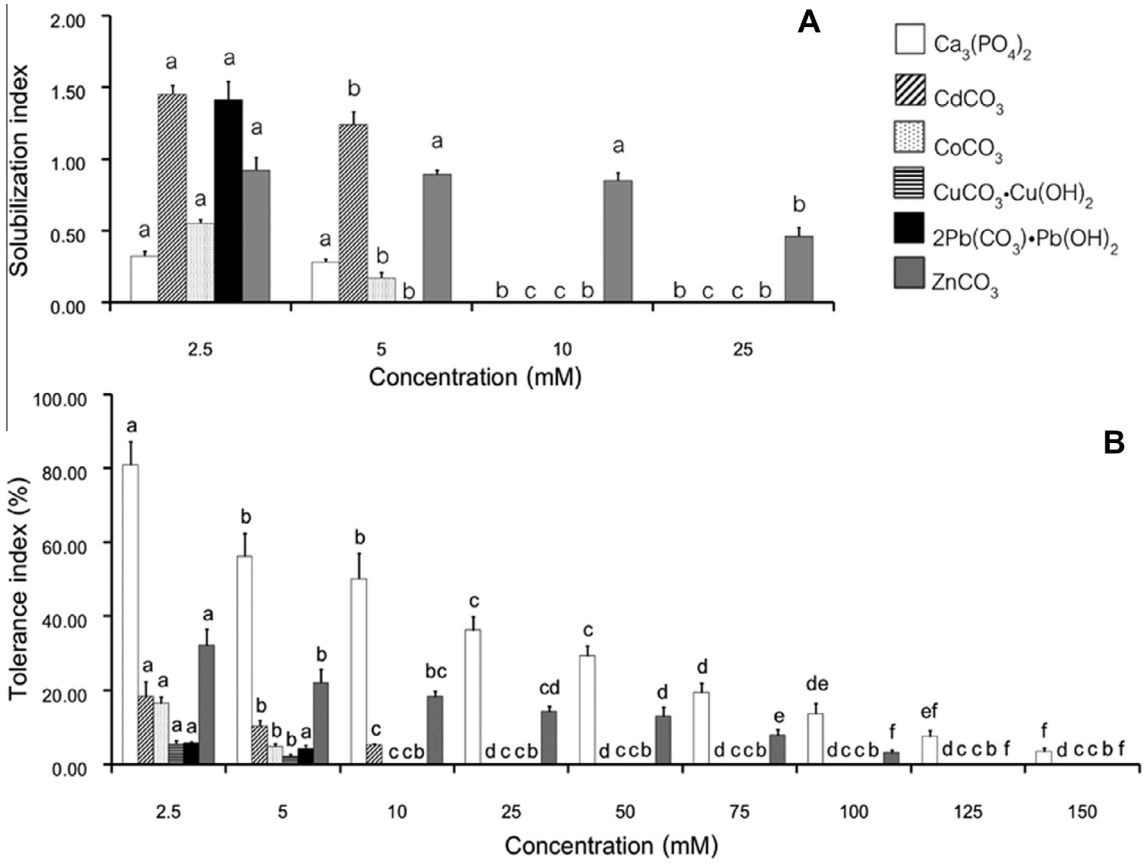


Fig. 3. Metal mineral solubilization ability and metal tolerance of *Muscodor cinnamomi*. (A) Solubilization index. (B) Tolerance index. Data were means of three replicates. Error bar at each point indicated that ± SD. Different letters above each graph indicated that the means are significantly different by Tukey's Test ($P < 0.05$).

3.4. Herbicides and insecticide tolerance

The herbicide and insecticide tolerances of *M. cinnamomi* were also expressed in terms of a tolerance index (TI) and are presented in Fig. 4. The analysis showed that the growth of *M. cinnamomi* was inhibited (TI < 50%) by all tested chemical compounds, except 2,4-D-dimethylammonium at half the recommend concentration. This fungus could grow at the recommended dosages of all tested

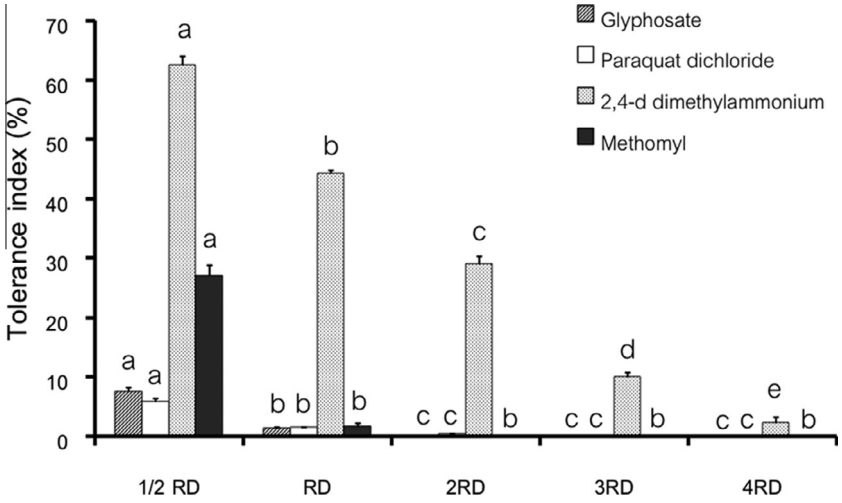


Fig. 4. Tolerance herbicides and pesticide index of *Muscodor cinnamomi*. Data were means of three replicates. Error bar at each point indicated that ± SD. Different letters above each graph indicate that the means are significantly different by Tukey's Test ($P < 0.05$). 1/2 RD = half recommended dosage, RD = recommended dosage, 2RD = double recommended dosage, 3RD = triple recommended dosage, 4RD = quadruple recommended dosage.

chemical compounds. The highest growth tolerance was found on the 2,4-D-dimethylammonium-containing medium (quadruple recommended dosages). *M. cinnamomi* showed the highest growth tolerance on glyphosate- and methomyl-containing media at double the recommended dosages.

3.5. *M. cinnamomi* control of tomato root rot caused by *R. solani* AG-2

Four months after planting, plant disease symptoms were not found on the non-infested control, *M. cinnamomi*, and *M. cinnamomi* mixed with *R. solani* treatment. Only the *R. solani* infested soil showed disease symptoms (Fig. 5). The symptoms on infected tomato plants included yellow leaves at the basal stem, blighting and defoliation of leaves starting from the base of the stem and progressing upwards. A brown basal stem surface, brown roots and rotting were also observed. The plants eventually showed dieback. The results showed that plant height of non-infested control was not statistically differed from other treatments, whereas it was statistically higher than the *R. solani* infested treatment (Fig. 6A). The shoot dry weight, root length and root dry weight of plants in the *M. cinnamomi* treatment were significantly higher than those found with the other treatments (Fig. 6B–D). Moreover, the number of fruits per plant of non-infested control, *M. cinnamomi*, and *M. cinnamomi* mixed with *R. solani* treatment were not statistically different, while the yield from the *R. solani* infested plants was significantly lower (Fig. 6E). The fresh weight of fruits per plant showed the same trend (Fig. 6F). This result indicated that *M. cinnamomi* inoculum could completely control tomato root rot caused by *R. solani* AG-2 and promote plant growth, by which shoot dry weight, root length and root dry weight of plant are increased.

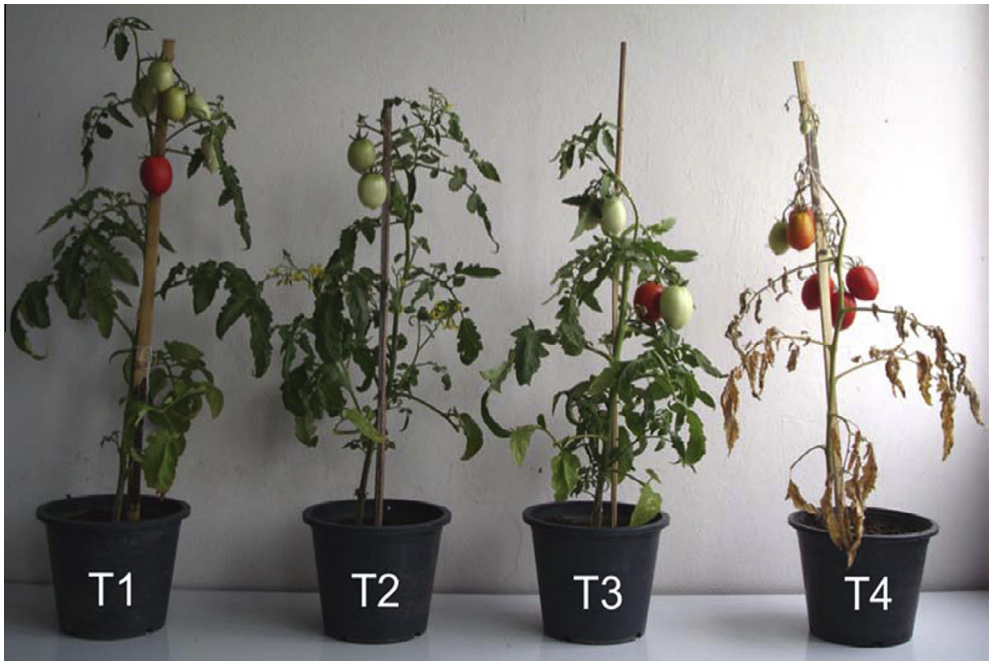


Fig. 5. Control of tomato root rot disease by *Muscodor cinnamomi* 4 month after planting. T1 = non-infected control, T2 = *M. cinnamomi*, T3 = *M. cinnamomi* + *R. solani* AG-2 and T4 = *R. solani* AG-2.

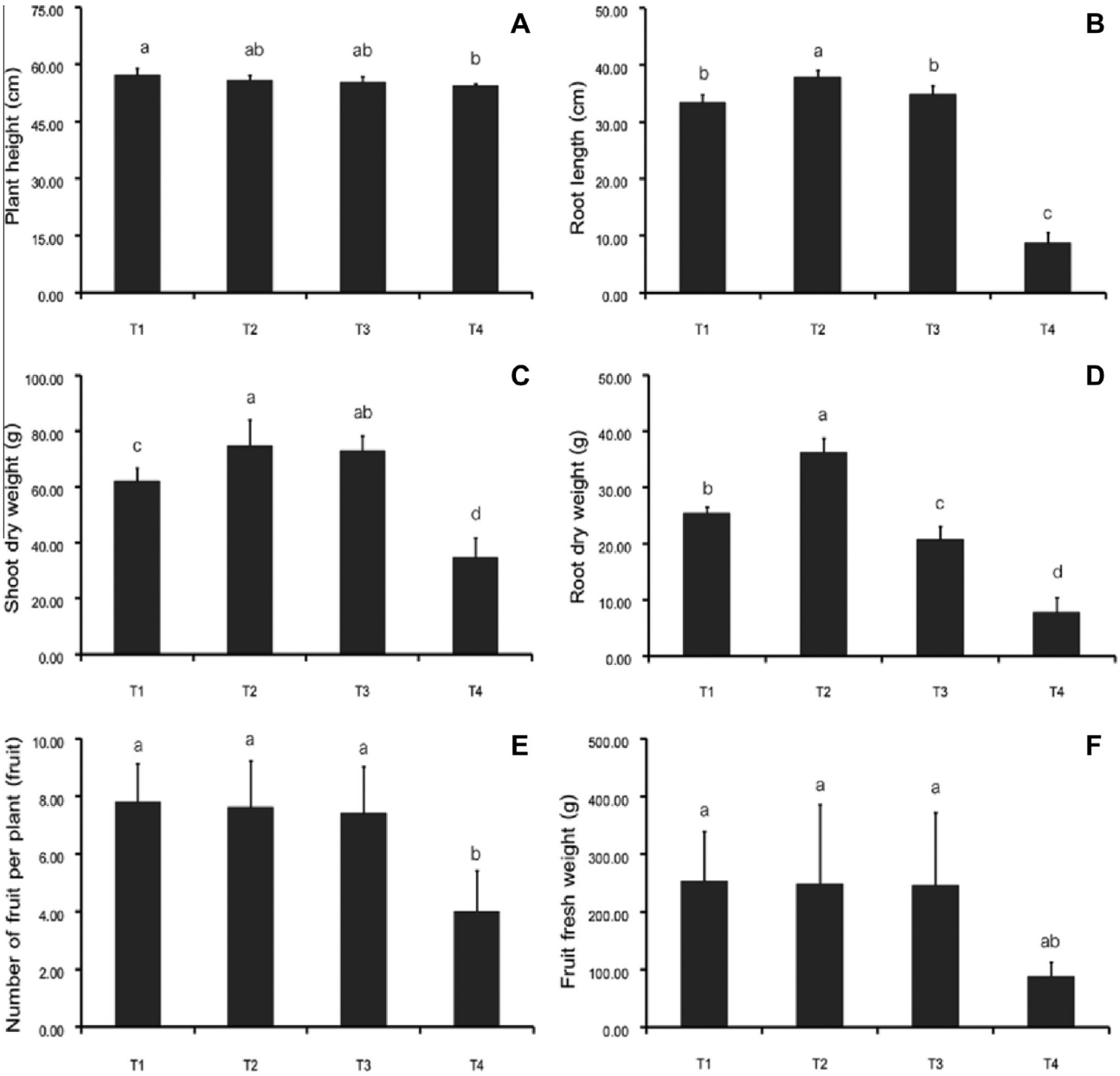


Fig. 6. Effect of *Muscodor cinnamomi* and *Rhizoctonia solani* AG-2 treatments on the growth of tomato plant. (A) Plant height. (B) Root length. (C) Shoot dry weight. (D) Root dry weight. (E) Number of fruit per plant and (F) Fruit fresh weight. Data were means of ten replicates. Error bar at each point indicated that ± SD. Different letters above each graph indicate that the means are significantly different by Fisher's LSD ($P < 0.05$).

4. Discussion

IAA producted by plant-associated microorganisms has been widely studied and reported (Hasan, 2002; Tsavkelova et al., 2007; Khan et al., 2012; Kumla et al., 2014). In this study, *M. cinnamomi* produced IAA *in vitro*. This result is similar to previous studies that showed pure cultures of endophytic fungi can produce IAA *in vitro* (Hasan, 2002; Dai et al., 2008; Hamayun et al., 2010; Khan et al., 2012). However, this is the first report that describes IAA production by *M. cinnamomi*. This fungus produced IAA at a level of 45.36 ± 2.40 μg mL^{-1}. Our results agreed with the results of a number of previous studies that showed that microbial IAA production was less than 100 μg mL^{-1} (Tsavkelova et al., 2007; Vitorino et al., 2012; Kumla et al., 2014). However, The IAA production yield of endophytic fungi varied with different fungal species, and higher levels of IAA production have been detected in some endophytic fungal isolates. For example, Hasan (2002) showed that three *Fusarium oxysporum* isolates from soybean, sesame and melochia could produce higher levels of IAA (140, 120 and 100 μg mL^{-1}, respectively). *Colletotrichum gloeosporioides* CMU-AU 006 isolated from *Spathoglottis affinis* and *Epulorhiza* sp. CMU-SLP 007 isolated from *Paphiopedilum bellatulum* produced IAA at 214.83 ± 11.36 and 149.35 ± 6.16 μg mL^{-1}, respectively (Chutima and Lumyong, 2012). Crude fungal IAA of *M. cinnamomi* promoted elongation of both oat and rice coleoptile segments. Similarly, IAA production by endophytic fungi (*C. gloeosporioides* and *Epulorhiza* spp.) and ectomycorrhizal fungi (*Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense*) significantly increased the length of oat and rice coleoptile segments (Chutima and Lumyong, 2012; Kumla et al., 2014). Moreover, crude fungal IAA promoted plant-growth based on seed germination and root elongation. These results are in accordance

with previous studies which demonstrated that IAA produced by microorganisms can improve the percentage of seed germination and root length of tested plants (Hasan, 2002; Chutima and Lumyong, 2012; Kumla et al., 2014; Rai et al., 2014).

M. cinnamomi culture was able to solubilize different metal (Ca, Cd, Co, Pb, Zn) containing minerals, and this solubilization ability varied with different minerals, and is similar to the previous reports. For example, endophytic fungal isolates of *Hyptis marrubioides*, including *Papulaspora* sp., *Trichoderma* sp. and *Fusarium* sp., showed solubilization activity in Ca-containing medium and the ability to solubilize minerals depended on the strain (Vitorino et al., 2012). Nath et al. (2012) reported pure cultures of *Penicillium* sp. isolated from tea plants had different Ca-solubilization activities. Moreover, metal chelating substances released by the fungus have been suggested as a possible solubilization mechanism of metal minerals (Gadd, 2004, 2010; Nath et al., 2012). In addition, several studies of the effect of toxic metals on fungal culture reported that generally the fungal toxicity increased with increasing concentration of toxic metal, which supports our results (Blaudez et al., 2000; Jones and Hutchinson, 1988). Low concentrations of Ni, Cd, Co, Cr, Hg and Pb were strongly toxic, whereas Zn was the least toxic (Tam, 1995; Fomina et al., 2005; Kumla et al., 2014). However, in this study Ca also showed the less toxicity. This result is in accordance with previous reports that the metal tolerance of fungal cultures depends and its specific physiology (Blaudez et al., 2000; Fomina et al., 2005; Gadd, 2010).

The herbicide and insecticide tolerances or resistance of microorganisms indicate the capability to degrade herbicides and insecticide, and tolerance activities varied in different depending on herbicide and insecticide, as well as fungal isolates (Wardle and Parkinson, 1990; Van Eerd et al., 2003; Ortiz-Hernández and Sánchez-Salinas, 2010; Mohiddin and Khan, 2013). In our study, *M. cinnamomi* could tolerate the selected herbicides at their recommended dosages in the field. Similarly, the *in vitro* test of glyphosate at field concentration did not affect the growth of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* and *Neozygites floridana* (Morjan et al., 2002) and a biocontrol agent, *Trichoderma atroviride* (Santoro et al., 2014). While, previous studies reported that glyphosate could increase the population of various fungi in soil including soil-borne fungi (Lévesque et al., 1993; Descalzo et al., 1998; Meriles et al., 2006). *M. cinnamomi* showed tolerance ability of the selected insecticide (methomyl) at the recommended field dosage. Similarly, Mohiddin and Khan (2013) reported that the fungal biocontrol agents e.g. *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* and *Pochonia chlamydosporia* could tolerate different pesticide compounds and showed varying tolerances. Therefore, the information on effect of herbicides and pesticides on plant pathogens could help with *in vivo* application, allowing for a competitive advantage for introduced biocontrol agents, improving the overall biocontrol process.

The present *in vivo* study demonstrated the biocontrol of tomato root rot caused by *R. solani* AG-2 using 30 g of rye grain culture of *M. cinnamomi* in 500 g soil. This inoculum dosage completely controlled damping off disease caused by *R. solani* AG-2, suggesting mycofumigation (control of other organism using the volatile compounds produced by fungi) (Mercier et al., 2007) and showed slight phytoinhibitory activity to seedlings of tested plants (Suwannarach et al., 2012). In addition, this study showed that using 30 g of *M. cinnamomi* inoculum could increase the root length, shoot dry weight and root dry weight of tomato plants, which showed plant growth promotion abilities as well as control of root rot. Similarly, previous studies showed that rye grain or ground barley grain cultures of *Muscodor albus* and *Micrococcus roseus* successfully controlled soil-borne pathogens, such as *Aphanomyces cochlioide*, *Colletotrichum coccodes*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *R. solani* and *Verticillium dahliae* (Stinson et al., 2003; Mercier and Manker, 2005; Grimme et al., 2007; Camp et al., 2008). However, mycofumigation for controlling soil-borne diseases by endophytic fungi varied for different fungal species, type of disease and amount of inocula used. For example, *Rhizoctonia* damping off of broccoli seedlings and *Phytophthora* root rot of bell pepper were completely controlled using 15–30 g and 25 g, respectively of *M. albus* 620 inocula (Mercier and Jiménez, 2009). Potato stem disease caused by *R. solani* was controlled by rye grain culture of *Epicoccum nigrum* and *T. atroviride* (Lahlali and Hijri, 2010). Additionally, 125 mg of a rye grains culture of *M. albus* per gram of infected seed controlled common bunt of wheat caused by *T. caries* in field conditions (Goates and Mercier, 2009).

In conclusion, *M. cinnamomi* could produce IAA *in vitro*, which plays an important role in plant growth promotion. This fungus could also solubilized toxic metal minerals and increased tolerance to toxic metals, herbicides and an insecticide. This information may expand application of *M. cinnamomi* in metal, herbicide and insecticide contaminated areas. It is possible that *M. cinnamomi* can be used as a plant growth promoting and biological control agent to eliminate soil-borne diseases without adverse effects on plants by adding active cultures of the fungus to soil, which replaces the use of chemical fungicides.

Acknowledgments

This work was supported by grants from The Thailand Research Fund (RTA5580007), Chiang Mai University, Thailand and Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) in Core-to-Core Program. We are grateful to Prof. Dr. Robert J. McGovern and Mr. Keegan Kennerdy for English proofreading.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.008.

References

Ahemad, M., Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., 2009. Remediation of herbicides contaminated soil using microbes. In: Khan, M.S., Zaidi, A., Musarrat, J. (Eds.), Microbes in Sustainable Agriculture. Nova, New York, pp. 261–284.

Bacon, C.W., White, J.F., 2000. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In: Bacon, C.W., White, J.F. (Eds.), Microbial Endophytes. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 237–261.

Barakat, R.M., Al-Masri, M.I., 2005. Biological control of gray mold diseases (*Botrytis cinerea*) on tomato and bean plants by using local isolates of *Trichoderma harzianum*. Dirasat Agric. Sci. 32, 145–156.

Blaudez, D., Jacob, C., Turnau, K., Colpaert, J.V., Ahonen-jonnarth, U., Finlay, R., Botton, B., Chalot, M., 2000. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals *in vitro*. Mycol. Res. 104, 1366–1371.

Camp, A.R., Dillard, H.R., Smart, C.D., 2008. Efficacy of *Muscodor albus* for the control of *Phytophthora* blight of sweet pepper and butternut squash. Plant Dis. 92, 1488–1492.

Carling, D.E., Kuninaga, S., Brainard, K.A., 2002. Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group-2 (AG-2) and AG-BI. Phytopathology 92, 43–50.

Chutima, R., Lumyong, S., 2012. Production of indole-3-acetic acid by Thai native orchid-associated fungi. Symbiosis 56, 35–44.

Clay, K., Holah, J., 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. Science 285, 1742–1744.

Dai, C.C., Yu, B.Y., Li, X., 2008. Screening of endophytic fungi that promote the growth of *Euphorbia pekinensis*. Afr. J. Biotechnol. 7, 3505–3510.

Damalas, C.A., Eleftherohorinos, I.G., 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. Int. J. Environ. Res. Public Health 8, 1402–1419.

Descalzo, R.C., Punja, Z.K., Lévesque, C.A., Rahe, J.E., 1998. Glyphosate treatment of bean seedlings causes short-term increases in *Pythium populations* and damping off potential in soils. Appl. Soil Ecol. 8, 25–33.

Ehmann, A., 1977. The van Urk-Salkowski reagent-a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. J. Chromatogr. 132, 267–276.
Fomina, M.A., Alexander, I.J., Colpaert, J.V., Gadd, G.M., 2005. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. Soil Biol. Biochem. 37, 851–866.
Gadd, G.M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma 122, 109–119.
Gadd, G.M., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology 156, 609–645.
Goates, B.J., Mercier, J., 2009. Effect of biofumigation with volatiles from *Muscodor albus* on the viability of *Tilletia* spp. teliospores. Can. J. Microbiol. 55, 203–206.
Grimme, E., Zidack, N.K., Sikora, R.A., Strobel, G.A., Jacobsen, B.J., 2007. Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. Plant Dis. 91, 220–225.
Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L., Rehman, G., Sohn, E., Shah, A.A., Kim, S., Joo, G., Lee, I.J., 2009. *Phoma herbarum* as a new gibberellin-producing and plant growth-promoting fungus. J. Microbiol. Biotechnol. 19, 1–6.
Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L., Rehman, G., Kim, Y., Iqbal, I., Hussain, J., Sohn, E., Lee, I.J., 2010. Gibberellins production and plant growth promotion from pure cultures of *Cladosporium* sp. MH-6 isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.). Mycologia 102, 989–995.
Hasan, H., 2002. Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 49, 105–118.
Hyde, K.D., Soytong, K., 2008. The fungal endophyte dilemma. Fungal Divers. 33, 163–173.
Jetiyanon, K., Kloepper, J.W., 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. Biol. Control 24, 285–291.
Jones, M.D., Hutchinson, T.C., 1988. Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus* or *Scleroderma flavidum*. I. Effects on growth, photosynthesis, respiration and transpiration. New Phytol. 108, 451–459.
Kajula, M., Tejesvi, M.V., Kolehmainen, S., Mäkinen, A., Hokkanen, J., Mattila, S., Pirttilä, A.M., 2010. The siderophore ferricrocin produced by specific foliar endophytic fungi *in vitro*. Fungal Biol. 114, 248–254.
Khan, A.L., Hamayun, M., Waqas, M., Kang, S.M., Kim, Y.H., Kim, D.K., Lee, I.J., 2012. *Exophiala* sp. LHL08 association gives heat stress tolerance by avoiding oxidative damage to cucumber plants. Biol. Fertil. Soils 48, 519–529.
Kumla, J., Suwannarach, N., Bussaban, B., Matsui, K., Lumyong, S., 2014. Indole-3-acetic acid production, solubilization of insoluble metal minerals and metal tolerance of some sclerodermatoid fungi collected from northern Thailand. Ann. Microbiol. 64, 707–720.
Lahlali, R., Hijri, M., 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. FEMS Microbiol. Lett. 311, 152–159.
Lévesque, C.A., Rahe, J.E., Eaves, D.M., 1993. Fungal colonization of glyphosate-treated seedlings using a new root plating technique. Mycol. Res. 97, 299–306.
Macías-Rubalcava, M.L., Hernandez-Bautista, B.E., Oropeza, F., Duarte, G., Gonzalez, M.C., Glenn, A.E., Hanlin, R.T., Anaya, A.L., 2010. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. J. Chem. Ecol. 36, 1122–1131.
Mejia, L.C., Rojas, E.I., Maynard, Z., Bael, S.V., Arnold, A.E., Hebbar, P., Samuels, G.J., Robbins, N., Herre, E.A., 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. Biol. Control 46, 4–14.
Mercier, J., Jiménez, J.I., 2009. Demonstration of the biofumigation activity of *Muscodor albus* against *Rhizoctonia solani* in soil and potting mix. Biocontrol 54, 797–805.
Mercier, J., Manker, D., 2005. Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodor albus*. Crop Prot. 24, 355–362.
Mercier, J., Jiménez-Santamaría, I., Tamez-Guerra, P., 2007. Development of the volatile-producing fungus *Muscodor albus* Worapong, Strobel, and Hess as a novel antimicrobial biofumigant. Rev. Mex. Fitopatol. 25, 173–179.
Meriles, J.M., Vargas, G.S., Haro, R.J., March, G.J., Guzmán, C.A., 2006. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut-corn-soybean rotations. J. Phytopathol. 154, 309–316.
Mikhail, M.S., Sabet, K.K., Omar, M.R., Asran, A.A., Kasem, K.K., 2010. Current *Rhizoctonia solani* anastomosis groups in Egypt and their pathogenic relation to cotton seedlings. Afr. J. Microbiol. Res. 4, 386–395.
Mohiddin, F.A., Khan, M.R., 2013. Tolerance of fungal and bacterial biocontrol agents to six pesticides commonly used in the control of soil borne plant pathogens. Afr. J. Agric. Res. 8, 5331–5334.
Morjan, W.E., Pedigo, L.P., Lewis, L.C., 2002. Fungicidal effect of glyphosate and glyphosate formulation on four species of entomopathogenic fungi. Environ. Entomol. 31, 1206–1212.
Morton, J.B., 2000. Biodiversity and evolution in mycorrhizae in the desert. In: Bacon, C.W., White, J.F.J. (Eds.), Microbial Endophytes. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 3–30.
Nath, R., Sharma, G.D., Barooah, M., 2012. Efficiency of tricalcium phosphate solubilization by two different endophytic *Penicillium* sp. isolated from tea (*Camellia sinensis* L.). Eur. J. Exp. Biol. 2, 1354–1358.
Ortiz-Hernández, M.L., Sánchez-Salinas, E., 2010. Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México. Rev. Int. Contam. Ambient 26, 27–38.
Ploetz, R.C., 2003. Diseases of Tropical Fruit Crops, Ed. Wallingford, Oxon.
Rai, M., Rathod, D., Agarkar, G., Dar, M., Brestic, M., Pastore, G.M., Junior, M.R.M., 2014. Fungal growth promotor endophytes: a pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. Symbiosis 62, 63–79.
Redman, R.S., Sheehan, K.B., Stout, R.G., Rodriguez, R.J., Henson, J.M., 2002. Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. Science 298, 1581.
Santoro, P.H., Cavaguchi, S.A., Alexandre, T.M., Zorzetti, J., Neves, P.M.O.J., 2014. *In vitro* sensitivity of antagonistic *Trichoderma atroviride* to herbicides. Braz. Arch. Biol. Technol. 57, 238–243.
Saxena, S., Meshram, V., Kapoor, N., 2014. *Muscodor tigerii* sp. nov.-volatile antibiotic producing endophytic fungus from the Northeastern Himalayas. Ann. Microbiol. 65, 47–57.
Scannerini, S., Fusconi, A., Mucciarelli, M., 2004. The effect of endophytic fungi on host plant morphogenesis. In: Seckbach, J. (Ed.), Symbiosis: Mechanisms and Model Systems. Kluwer Academic Publishing, New York, pp. 427–447.
Schulz, B., Boyle, C., 2005. The endophyte continuum. Mycol. Res. 109, 661–686.
Seigel, M.R., Bush, L.P., 1997. Toxin production in grass/endophyte associations. In: Carroll, G.C., Tudzynski, P. (Eds.), The Mycota. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 185–207.
Stinson, M., Ezra, D., Hess, W.M., Sears, J., Strobel, G., 2003. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. Plant Sci. 165, 913–922.
Strobel, G.A., Daisy, B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 491–502.
Strobel, G.A., Dirksie, E., Sears, J., Markworth, C., 2001. Volatile antimicrobials from a novel endophytic fungus. Microbiology 147, 2943–2950.
Suwannarach, N., Bussaban, B., Hyde, K.D., Lumyong, S., 2010. *Muscodor cinnamomi*, a new endophytic species from *Cinnamomum bejolghota*. Mycotaxon 114, 15–23.
Suwannarach, N., Kumla, J., Bussaban, B., Lumyong, S., 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* AG-2, the causal agent of damping off by *Muscodor cinnamomi* CMU-Cib 461. World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 3171–3177.
Suwannarach, N., Kumla, J., Bussaban, B., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., Mutsui, K., Lumyong, S., 2013. Molecular and morphological evidence support four new species in the genus *Muscodor* from northern Thailand. Ann. Microbiol. 63, 1341–1351.
Taheri, P., Tarighi, S., 2012. The role of pathogenesis-related proteins in the tomato-Rhizoctonia solani interaction. J. Bot., ID137037
Tam, P.C.F., 1995. Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. Mycorrhiza 5, 181–187.
Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Botina, S.G., Netrusov, A.I., 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiol. Res. 162, 69–76.
Van Eerd, L.L., Hoagland, R.E., Zablotowicz, R.M., Hall, J.C., 2003. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. Weed Sci. 51, 472–495.
Vitorino, L.C., Silva, F.G., Soares, M.A., Souchie, E.L., Costa, A.C., Lima, W.C., 2012. Solubilization of calcium and iron phosphate and *in vitro* production of indole acetic acid by endophytic isolates of *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae). Int. Res. J. Biotechnol. 3, 47–54.
Waqas, M., Khan, A.L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H., Lee, I.J., 2012. Endophytic fungi produce gibberellins and indole-acetic acid and promotes host-plant growth during stress. Molecules 17, 10754–10773.
Waqas, M., Khan, A.L., Lee, I.J., 2014. Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. J. Plant Interact. 9, 478–487.
Wardle, D.A., Parkinson, D., 1990. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. Plant Soil 122, 29–37.
Wiwattanapatapee, R., Pengnoo, A., Kanjanamaneesathian, M., Nilratana, L., Jantharangsri, A., 2004. Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice formulations, viability and bacterial release studies. J. Control. Release 95, 453–460.
Worapong, J., Strobel, G.A., 2009. Biocontrol of root rot of kale by *Muscodor albus* strain MFC2. Biocontrol 54, 301–306.

Research Article

Received: 9 October 2014 Revised: 14 January 2015 Accepted article published: 23 January 2015 Published online in Wiley Online Library: 13 February 2015

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.7099

Evaluation of *Muscodor suthepensis* strain CMU-Cib462 as a postharvest biofumigant for tangerine fruit rot caused by *Penicillium digitatum*

Nakarin Suwannarach,[a,b] Boonsom Bussaban,[a,b,c] Wipornpan Nuangmek,[d] Wasna Pithakpol,[d] Bantoon Jirawattanakul,[e] Kenji Matsui[f] and Saisamorn Lumyong[a,b,c*]

Abstract

BACKGROUND: This study investigated both the *in vitro* and *in vivo* biofumigant ability of the endophytic fungus *Muscodor suthepensis* CMU-Cib462 to control *Penicillium digitatum*, the main cause of tangerine fruit rot.

RESULTS: Volatile compounds from *M. suthepensis* inhibited mycelial growth of the pathogen. The most abundant compound was 2-methylpropanoic acid, followed by 3-methylbutan-1-ol. They showed median effective doses (ED_{50}) on *P. digitatum* growth of 74.91 ± 0.73 and 250.29 ± 0.29 μL L^{-1} airspace respectively. Rye grain was found to be a suitable solid medium for *M. suthepensis* inoculum production. The results indicated that mycofumigation with a 30 g rye grain culture of *M. suthepensis* for 12 h controlled tangerine fruit rot. The percentage weight loss and soluble solids concentration of fumigated tangerines were similar to those of non-infected and non-fumigated fruits.

CONCLUSION: *Muscodor suthepensis* has potential as a biofumigant for controlling postharvest disease of tangerine fruit.
© 2015 Society of Chemical Industry

Keywords: biocontrol; fungal endophytes; mycofumigant; postharvest disease

INTRODUCTION

Tangerine fruit (*Citrus tangerina* Tanaka) cv. Sai Num Phung is the main citrus crop in northern Thailand. Postharvest losses due to green mold, caused by *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc., during handling of tangerine fruits are the major cause of yield loss worldwide.[1–3] The primary infection of this pathogen is caused by wounds on fruits where nutrients are available to stimulate spore germination. Wounds on the fruits, inflicted during harvest and subsequent handling, are infected by spores of *P. digitatum*, and these infections must be eradicated to achieve acceptable levels of control. It is essential to control postharvest diseases in order to maintain the quality and prolong the shelf life of citrus fruit, particularly in a market where storage in packinghouses and transport from producers to consumers may take several weeks.[4] Currently, *Penicillium* rot in northern Thailand is controlled by application of imazalil and thiabendazole. However, alternative methods are needed, because the widespread use of these agrochemicals in commercial packinghouses has led to proliferation of resistant strains of the pathogens.[5] Replacement of fungicides with biocontrol agents is an alternative way to manage plant pathogens, to produce safe food and to reduce environmental pollution.[6]

Microbial endophytes have been found to provide effective control of pathogens on numerous crops under both preharvest and postharvest conditions.[7] Thus the search for novel endophytic fungi is ongoing, accompanied by an examination of the bioactivities of their natural products encompassing such uses as antibiotics and insecticides.[7–11] Previous studies showed that endophytic fungi could produce volatile antimicrobial substances.[12–14] The term 'mycofumigation' refers to the control

* *Correspondence to: Saisamorn Lumyong, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand. E-mail: saisamorn.l@cmu.ac.th*

a *Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

b *Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Bangkok 10400, Thailand*

c *Postharvest Technology Research Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

d *Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand*

e *Chiang Mai Thanatorn Co., Ltd, 98 M.17 Mae Soon, Fang, Chiang Mai 50110, Thailand*

f *Graduate School of Medicine and Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan*

of other organisms using the antimicrobial volatiles produced by fungi.[8] The endophytic fungus *Muscodor albus* has been used for the development of mycofumigation agents.[10,15] *Muscodor albus* strains CZ-620 and MFC2 have been shown to be effective in mycofumigation of grain smut fungi[13,16] and fungal fruit decay.[17,18] A number of volatiles produced by strain CZ-620 showed insecticidal and nematicidal activities.[19,20] Moreover, several endophytic volatile-producing fungi, e.g. *Hypoxylon* spp., *Nodulisporium* spp., *Oxyporus latemarginatus*, *Phoma* spp. and *Phomopsis* spp., have also been used to control fruit decay.[21–26] In this study we aimed to evaluate the ability of the volatile-producing endophytic fungus *Muscodor suthepensis* CMU-Cib462 as a potential mycofumigation agent to control *P. digitatum* both *in vitro* and *in vivo*. The volatile organic compounds (VOCs) were identified by gas chromatography/mass spectrometery (GC/MS). The fungal growth inhibition of the pathogen by the most abundant individual VOCs was tested. In addition, the effects of inoculum dose and fumigation period on tangerine fruit rot control were evaluated.

EXPERIMENTAL

Fungal culture

Pathogenic *P. digitatum* CMU-Pen022 was isolated from damaged tangerine fruit cv. Sai Nam Peung in Chiang Mai province, Thailand. The pathogenicity of the isolate to tangerine was confirmed by fulfilling Koch's postulates. Seven-day-old *P. digitatum* agar plugs (0.5 mm diameter) were stored in 150 g L^{-1} glycerol solution at −20 °C. Inocula of the pathogenic fungus were prepared by transferring *P. digitatum* agar plugs from the stock culture to the center of fresh potato dextrose agar (PDA) (CONDA®, Madrid, Spain) plates and incubating for 7 days at room temperature (25 ± 2 °C).

Muscodor suthepensis strain CMU-Cib462, described previously by Suwannarach *et al.*,[27] was stored in 150 g L^{-1} glycerol solution at −20 °C at the Sustainable Development of Biological Resources Laboratory, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. This fungus was maintained and subcultured regularly on PDA until it was used in the experiment.

In vitro assay for fumigation activity of *M. suthepensis*

A dual culture volatile assay was used against *P. digitatum in vitro* as described by Strobel *et al.*[13] Both sides of a two-compartment plastic plate were loaded with PDA. A mycelial plug (5 mm diameter) from a 12-day-old culture of *M. suthepensis* was inoculated on one side of the plate and grown for 3 days at room temperature (25 ± 2 °C). A mycelial plug from the margin of 7-day-old *P. digitatum* was then placed on the other side of the plate. All inoculated plates were sealed with Parafilm M® and incubated at room temperature for 7 days. The inhibition percentage of *P. digitatum* was then recorded and its viability was investigated by subculture of the pathogen on the tested plate onto a non-treated PDA plate. The experiment was repeated twice with three replicates (plates).

Determination of a suitable solid medium for *M. suthepensis* inoculum preparation

Nine solid seed media, namely barley, corn, GABA rice, kidney bean, mung bean, red kidney bean, rye, sorghum and soybean, were evaluated as potential substrates for *M. suthepensis* inoculum production following the method proposed by Suwannarach *et al.*[28] Each boiled substrate was placed in an 18 mm × 180 mm test tube to a depth of approximately 100 mm and autoclaved at 121 °C for 30 min. After cooling for 24 h, an *M. suthepensis* mycelial plug (5 mm diameter) cut from the periphery of a growing colony on PDA was inoculated on each medium and incubated at room temperature (25 ± 2 °C) for 45 days in the dark; four replicates (tubes) were used. Linear growth of the mycelium was measured and the growth rate was calculated.

Analysis of volatile compounds produced by *M. suthepensis*

The solid phase microextraction (SPME) technique was used to identify the VOCs produced by *M. suthepensis* grown for 2 weeks at 25 ± 2 °C on PDA and rye grain medium (suitable solid medium) according to the method described by Suwannarach *et al.*[26] An SPME fiber consisting of 50/30 μm divinylbenzene/carboxen on polydimethylsiloxane on a stable flex fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was exposed to the vapor phase above the fungal culture for 45 min. The fiber was inserted into the splitless injection port of a GC 2010 gas chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a DB-WAX capillary column (0.25 mm × 30 m i.d., 0.25 μm film thickness; Supelco). The column temperature was held at 40 °C for 2 min and then increased to 200 °C at 5 °C min^{-1}. The carrier gas was helium at an initial column head pressure of 60 kPa. The volatiles on the fiber were desorbed at 250 °C for 57 min under a flow of helium gas prior to being trapped. A 30 s injection time was used to introduce the adsorbed volatiles into the gas chromatograph interfaced with an MS-QP2010 Plus mass spectrometer (Shimadzu). The mass spectrometer was operated at unit mass resolution. Data acquisition and data processing were performed by software systems. The VOCs produced by *M. suthepensis* were tentatively identified through a comparison with the National Institute of Standards and Technology (NIST) library database.

In vitro effects of selected individual volatile compounds on growth of *P. digitatum*

To study the effects of individual volatile compounds on radial growth of green mold, two highly abundant VOCs, 2-methylpropanoic acid and 3-methylbutan-1-ol, were selected and tested by dual culture volatile assay. One side of a two-compartment plastic plate was loaded with PDA. A mycelial plug (5 mm diameter) of 7-day-old *P. digitatum* was inoculated on the PDA side. A sterile filter paper disc (20 mm diameter) was placed on the other side of the two-compartment plate and the selected VOCs 2-methylpropanoic acid (isobutyric, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and 3-methylbutan-1-ol (isoamyl alcohol, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) were added individually at different concentrations ranging from 5 to 1000 μL L^{-1} airspace. Sterile distilled water was used as a control. All tested plates were sealed with Parafilm M® and incubated at room temperature. After 1 week of incubation, the percentage inhibition of *P. digitatum* growth was recorded. The median effective dose (ED_{50}, the effective dose to achieve 50% fungal viability) was calculated by linear regression analysis (inhibition percentage *vs* log concentration). The experiment was repeated twice with three replicates (plates).

In vivo assay for fumigation activity of *M. suthepensis*

The VOCs produced by *M. suthepensis* were tested *in vivo* for the control of green mold decay of tangerine caused by *P. digitatum* following the method of Suwannarach *et al.*[26] Tangerine fruits (*C. tangerina* Tanaka) cv. Sai Num Phung were surface sterilized by soaking in 20 mL L^{-1} sodium hypochlorite solution for 3 min,

 © 2015 Society of Chemical Industry

washed three times with sterile distilled water and air dried. Uniform wounds (1 mm width, 2 mm depth) were made at six positions on the equator of each fruit using needles. A spore suspension of *P. digitatum* was adjusted to 15×10^6 spores mL^{-1}, and 30 µL of this suspension was dropped onto each wound. The inoculated fruits were arranged in 4 L plastic boxes (six fruits per box).

Effect of M. suthepensis dose on control of tangerine fruit rot

One-month-old *M. suthepensis* in rye grain was used as inoculum. Different doses of inoculum (0, 10, 20, 30, 40 and 50 g) were applied separately to each box. The infected tangerine fruits were placed in a box and doses of the fungal inoculum were added to each, sealed with Parafilm M® and stored at 25 ± 2 °C. The fungal inoculum was removed after 24 h of fumigation and the boxes were re-stored at 25 ± 2 °C. The diameters of decay lesions were measured after 9 days of storage. The experiment was repeated twice with three replicates (fruit boxes). The minimum dose of inoculum that completely controlled the disease was selected for further experiments.

Effect of fumigation period on control of tangerine fruit rot

Five treatments were established to test the effect of the fumigation period of *M. suthepensis* inoculum on controlling tangerine fruit rot caused by *P. digitatum in vivo*. A dose of 30 g of *M. suthepensis* inoculum (the minimum dose that completely controlled tangerine fruit rot symptoms) was chosen for all treatments. Four treatments consisted of *P. digitatum* infection and 0, 6, 12 and 24 h of *M. suthepensis* fumigation. The last treatment was a non-infected and non-fumigated control. The fungal fumigant was removed after fumigation and the boxes were re-stored at 25 ± 2 °C. Diameters of rot lesions, weight loss, color and soluble solids concentration (SSC) of tangerine fruits from each experiment were monitored every 3 days for 15 days. The infection percentage was calculated. Weight loss was determined by weighing whole tangerine fruits before and after the storage period and expressed as percentage weight loss. The surface color of tangerine fruits was measured with a CR-300 colorimeter (Minolta, Osaka, Japan). The analysis of L (light/dark) and b^* (yellow/blue) values was performed at three points on each tangerine fruit. Juice from fruit samples was analyzed for SCC using a digital 3810 PAL-1 refractometer (Atago, Tokyo, Japan). The experiment was repeated twice with three replicates (fruit boxes).

Statistical analysis

All data were analyzed by SPSS Version 16.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and Fisher's least significant difference (LSD) multiple comparison test was used to determine significant differences ($P < 0.05$) between treatments.

RESULTS

In vitro effect of _M. suthepensis_ volatiles on growth and viability of _P. digitatum_

The inhibitory effect of VOCs produced by *M. suthepensis* on mycelial growth of *P. digitatum* was tested using a dual culture volatile assay. The results showed that the VOCs caused 100% inhibition of *P. digitatum* mycelial growth. No growth of *P. digitatum* was observed when it was transferred to fresh PDA after 1 week of exposure to *M. suthepensis* VOCs.

Table 1. *Muscodor suthepensis* growth on solid media after incubation in test tubes for 45 days

Solid seed medium	Growth rate (mm day^{-1})
Barley	1.41 ± 0.12d
Corn	0.35 ± 0.11 g
GABA rice	1.82 ± 0.12b
Kidney bean	0.65 ± 0.14f
Soybean	0.00 ± 0.00 h
Sorghum	1.61 ± 0.13c
Mung bean	1.29 ± 0.36e
Red kidney bean	0.00 ± 0.00 h
Rye	2.11 ± 0.21a

Data represent mean ± standard deviation of four replicates. Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) according to Fisher's LSD test.

Determination of a suitable solid medium for _M. suthepensis_ inoculum preparation

The mycelial growth rates of *M. suthepensis* in test tube culture on various media were investigated after 45 days. The results indicated that the mycelial growth rate of *M. suthepensis* varied on different solid media (Table 1). The fungus grew significantly faster on rye grain (2.11 ± 0.21 mm day^{-1}), followed by GABA rice grain (1.82 ± 0.12 mm day^{-1}) and sorghum grain (1.61 ± 0.13 mm day^{-1}). The lowest mycelial growth was obtained on corn grain (0.35 ± 0.11 mm day^{-1}). *Muscodor suthepensis* did not develop on soybean or red kidney bean medium.

Analysis of volatile compounds produced by _M. suthepensis_

Muscodor suthepensis produced at least 26 and 15 VOCs on PDA and rye grain respectively (Table 2). The compounds were identified primarily on the basis of their mass spectral properties by comparison with the NIST database. The most abundant compounds produced by this microorganism on both PDA and rye grain were 2-methylpropanoic acid and 3-methylbutan-1-ol.

In vitro effects of selected individual volatile compounds on growth of _P. digitatum_

The effects of 2-methylpropanoic acid and 3-methylbutan-1-ol on mycelial growth of *P. digitatum* were represented by ED_{50} values. The results showed that the percentage inhibition of mycelial growth of *P. digitatum* increased when the concentration of both compounds increased. 2-Methylpropanoic acid and 3-methylbutan-1-ol showed ED_{50} values of 74.91 ± 0.73 and 250.29 ± 0.29 µL L^{-1} airspace respectively.

Effect of _M. suthepensis_ dose on _in vivo_ assay for control of tangerine fruit rot

Citrus tangerina fruits were fumigated with 1-month-old rye grain culture of *M.* suthepensis at six different doses. The results showed that the VOCs produced by *M. suthepensis* suppressed green mold on tangerine fruit, with the effect being dependent on fumigation dose (Fig. 1). In non-treated tangerine fruit, inoculation with *P. digitatum* led to rot lesions around the infection site. Increasing the inoculum dose of *M. suthepensis* significantly decreased rot lesions; 30 g of infested rye grain was the minimum dose that completely controlled tangerine fruit rot caused by green mold fungus.

 © 2015 Society of Chemical Industry

Table 2. Effect of medium on production of volatile compounds by *Muscodor suthepensis* through SPME/GC/MS analysis

RT (min)	Volatile compound	*m/z*	Total area (%) PDA	RG
3.47	Ethyl 2-methylpropanoate	116	2.11	–
4.32	Methyl 2-methylbutanoate	116	0.14	–
4.41	2-Methylpropyl acetate	116	1.56	–
4.56	Methyl 3-methylbutanoate	116	1.71	–
6.82	2-Methylpropyl propanoate	144	0.22	–
7.11	2-Methylpropan-1-ol	74	0.12	0.14
7.92	3-Methylbutanoyl acetate	130	4.78	0.57
10.14	2-Methylbutyl 2-methylpropanoate	158	0.67	–
10.65	3-Methylbutan-1-ol	88	12.44	7.28
12.88	3-Hydroxy-2-butanone	88	0.12	–
13.86	3-Ethyl-2-methylpentane	114	0.10	–
14.51	6-Methyl-5-hepten-2-one	126	0.09	–
16.07	3-Methylhexane	100	0.43	–
16.20	2,4-Dimethyl-1-heptene	126	–	–
17.11	2-Ethylhexyl acetate	172	–	0.43
19.00	Bicyclo[5.2.0]nonane, 2-methylene-4,8,8-trimethyl-4-vinyl-	204	–	1.07
20.01	4,5-Dimethyl-1,3-cyclopentanedione	126	0.21	–
21.22	2-Methylpropanoic acid	88	47.12	61.59
21.47	Ethyl 2-hydroxypropanoate	118	0.11	
21.59	2,3-Butanediol	90	–	0.14
21.73	Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1*S*-(1α,4α,7α)]-	204	0.12	–
21.80	Caryophyllene	204	0.21	2.49
21.87	2-Undecanone	170	–	1.03
22.55	Carbitol	134	–	0.50
23.80	Octanoyl chloride	170	–	1.35
24.19	2-Methylbutyric acid	102	0.85	0.38
24.65	Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, [4a*R*-(4aα,7α,8aβ)]-	204	0.33	0.41
24.78	Azulene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1*S*-(1α,7α,8aβ)]-	204	1.72	0.30
24.80	Spiro[3.4]octan-5-one	124	0.02	–
26.54	2-Methylpropanamide	138	0.19	–
27.88	2-Phenylethyl acetate	164	1.43	–
28.43	3-Hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl 2-methyl-propanoate	216	–	0.71
31.11	Pentyl 2-methyl-2-propenoate	156	0.12	–
32.42	2-(2-Methyl-2-propenyl)-2-cyclohexen-1-one	150	0.44	–

Compounds were identified based on the NIST library. Compounds present in control PDA and rye grain have been subtracted from the data. Unknown compounds represent those with a quality % value less than 80. RT, retention time; *m/z*, mass/charge ratio; total area (%), % of peak area; PDA, potato dextrose agar; RG, rye grain; —, not detected.

Effect of fumigation period on *in vivo* control of tangerine fruit rot

A 30 g 1-month-old rye grain culture of *M. suthepensis* was used as inoculum for all treatments. The results indicated that the fumigation period affected the level of infection by the pathogen (Table 3). Non-infected and non-fumigated tangerine fruits (control treatment) did not show rot lesions caused by *P. digitatum*, but latent plant pathogens (*Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium expansum* and *Phyllosticta* spp.) were found. Fruits in the *P. digitatum*-infected and non-fumigated treatment showed initial rot symptoms after 3 days, with an infection level of 23.11 ± 1.01%. In the 6 h fumigation treatment, initial rot symptoms occurred at 12 days, with 36.10 ± 1.04% infection. Interestingly, the 12 and 24 h fumigation treatments completely controlled *P. digitatum* infection, and no latent pathogens were found. This result showed that 12 h of fumigation was the minimum period for controlling tangerine fruit rot.

The percentage weight loss of tangerine fruits in each treatment was calculated (Fig. 2(A)). It was found that the percentage weight loss increased as the storage period increased in all treatments. After 3 days of storage, weight losses ranged from 3.00 to 8.67%. The highest weight loss was found in the infected and non-fumigated treatment (40.20%) after 15 days of storage, while the 24 h fumigation treatment showed the lowest weight loss (27.33%). The SSC of tangerine fruits was monitored during storage and is shown in Fig. 2(B). The infected and non-fumigated treatment caused the SSC to increase rapidly and showed the highest SSC (10.07 °Brix) after 15 days of storage when compared with other treatments. The other treatments did not show significant differences in SSC after 15 days of storage. In addition, the change in external color of tangerine fruits was monitored. The initial L and b^* values of tangerine fruits for all treatments ranged from 48.70 to 49.22 (Fig. 2(C)) and from 27.62 to 28.41 (Fig. 2(D)) respectively. The L value of tangerine fruits in the infected and

 © 2015 Society of Chemical Industry

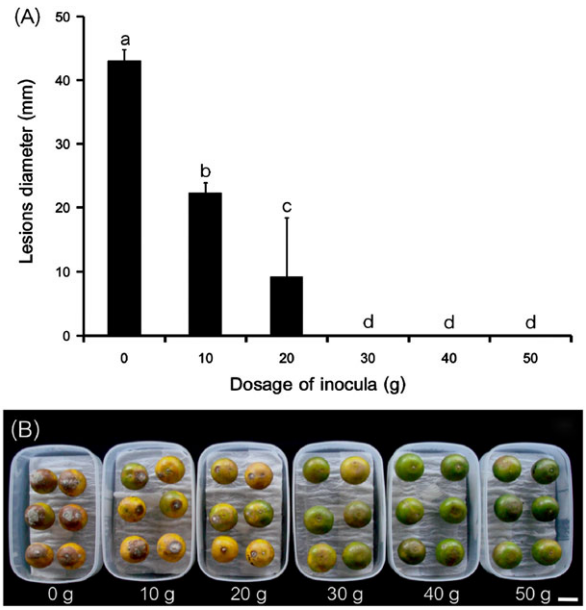


Figure 1. Effect of *Muscodor suthepensis* inoculum dose on biofumigation of *Penicillium digitatum* causing fruit rot of tangerine. (A) Fruit rot diameter. Data represent mean of three replicates (fruit boxes) repeated twice. Error bars indicate ± standard deviation. Different letters indicate that means are significantly different ($P < 0.05$) according to Fisher's LSD multiple comparison test. (B) Corresponding fruit rot symptoms. Bar = 5 cm.

non-fumigated treatment clearly decreased after 3 days of storage and was the lowest throughout storage when compared with other treatments. All fumigation treatments showed a similar *L* value. The b^* value increased as the storage period progressed in all treatments. The infected and non-fumigation treatment showed the highest b^* value after storage for 15 days.

DISCUSSION

The present study demonstrates the biocontrol of green mold fruit rot caused by *P. digitatum* both *in vitro* and *in vivo* using the endophytic fungus *M. suthepensis*. The results indicate that *M. suthepensis* produces VOCs that can completely inhibit *in vitro* mycelial growth of *P. digitatum*. Similarly, VOCs produced by other fungi of the genus *Muscodor* have also been shown to inhibit and kill *in vitro* mycelial growth of a wide variety of plant pathogenic fungi, including species of the genera *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* and *Verticillium*.[13,14,16,29–33] Goates and Mercier[16] reported that VOCs from *M. albus* had the potential to reduce *in vitro* spore germination of the *Tilletia* species *T. horrida*, *T. indica* and *T. tritici*. In addition, many endophytic fungi such as *Nodulisporium* spp., *Trichoderma* spp., *Phomopsis* spp. and *O. latemarginatus* also produce VOCs that inhibit mycelial growth of plant pathogenic fungi.[21,22,26,34,35] Some bacterial strains such as *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia odorifera*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces platensis* and *Streptomyces globisporus* are also able to produce VOCs that inhibit *in vitro* mycelial growth of plant pathogenic fungi.[36–39] 2-Methylpropanoic acid and 3-methylbutan-1-ol were the most abundant compounds produced by *M. suthepensis* identified by GC/MS analysis. Both VOCs were able to inhibit mycelial growth of *P. digitatum*. 2-Methylpropanoic acid and 3-methylbutan-1-ol have also been found to be produced by other *Muscodor* species such as *M. albus*, *M. crispans*, *M. equiseti*, *M. fengyangensis*, *M. musae*, *M. oryzae* and *M. sutura*,[14,27.29,31,33,40] and 2-methylpropanoic acid has been reported to be an antimicrobial volatile.[10,41] Moreover, previous studies have reported that seven VOCs from *M. albus*, namely aciphyllene, 3-methylbutanoyl acetate, 2-butanone, 2-methylbutan-1-ol, 2-methylfuran and tetrahydofuran, showed antibiotic activity.[10,41,42] However, the present study represents the first report of 3-methylbutan-1-ol as a volatile antifungal compound from a *Muscodor* species.

This study showed that a rye grain culture of *M. suthepensis* completely controlled tangerine fruit rot caused by green mold fungus (*P. digitatum*), suggesting a biological fumigation effect. Biofumigation with 30 g of *M. suthepensis* inoculum was the minimum dose for controlling green mold of tangerine. This study was similar to previous studies which reported that 30 g of rye culture of *M. albus* completely controlled sour rot of lemon caused by *Geotrichum citri-aurantii* and *P. digitatum*[18] and blue mold (*P. expansum*) and gray mold (*Botrytis cinerea*) of apple.[17] However, the effectiveness of biofumigation for the control of postharvest diseases by endophytic fumigants varied with different fungal species, amount of inoculum used and type of postharvest disease. For example, the effective control of brown rot of peaches caused by *Monilinia fructicola* occurred with a rye culture containing 140 g of *M. albus*.[17] Biofumigation with 50 and 60 g of jasmine rice grain culture of *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34 completely controlled green mold decay of lime and blue mold of lemon.[27] Lee *et al.*[21] found that mycofumigation with 50 g of wheat bran/rice hull culture of *O. latemarginatus* EF069 also effectively reduced the development of postharvest apple decay caused by *B. cinerea*. Park *et al.*[22] reported that fumigation with 50 g of wheat bran/rice hull culture of *Nodulisporium* sp. CF016 suppressed lesion development of gray mold and blue mold on apple fruits by 88 and 76% respectively. In addition, fumigation experiments with rye grain cultures of *M. albus* and *Muscodor cinnamomi* and ground barley

Table 3. Infection percentage after different periods of fumigation with 30 g of *Muscodor suthepensis* inoculum for control of tangerine fruit rot

	Infection percentage (%)				
Treatment	Day 3	Day 6	Day 9	Day 12	Day 15
Non-infected and non-fumigated	0	0	0	0/LP	0/LP
Infected and fumigated for 6 h	0	0	0	36.10 ± 1.04	39.23 ± 0.39
Infected and fumigated for 12 h	0	0	0	0	0
Infected and fumigated for 24 h	0	0	0	0	0
Infected and non-fumigated	23.11 ± 1.01	46.43 ± 0.83	54.21 ± 1.68	80.47 ± 0.69	100/FS

Data represent mean ± standard deviation of three replicates repeated twice. LP, latent pathogens found; FS, tangerine fruit completely spoiled.

 © 2015 Society of Chemical Industry

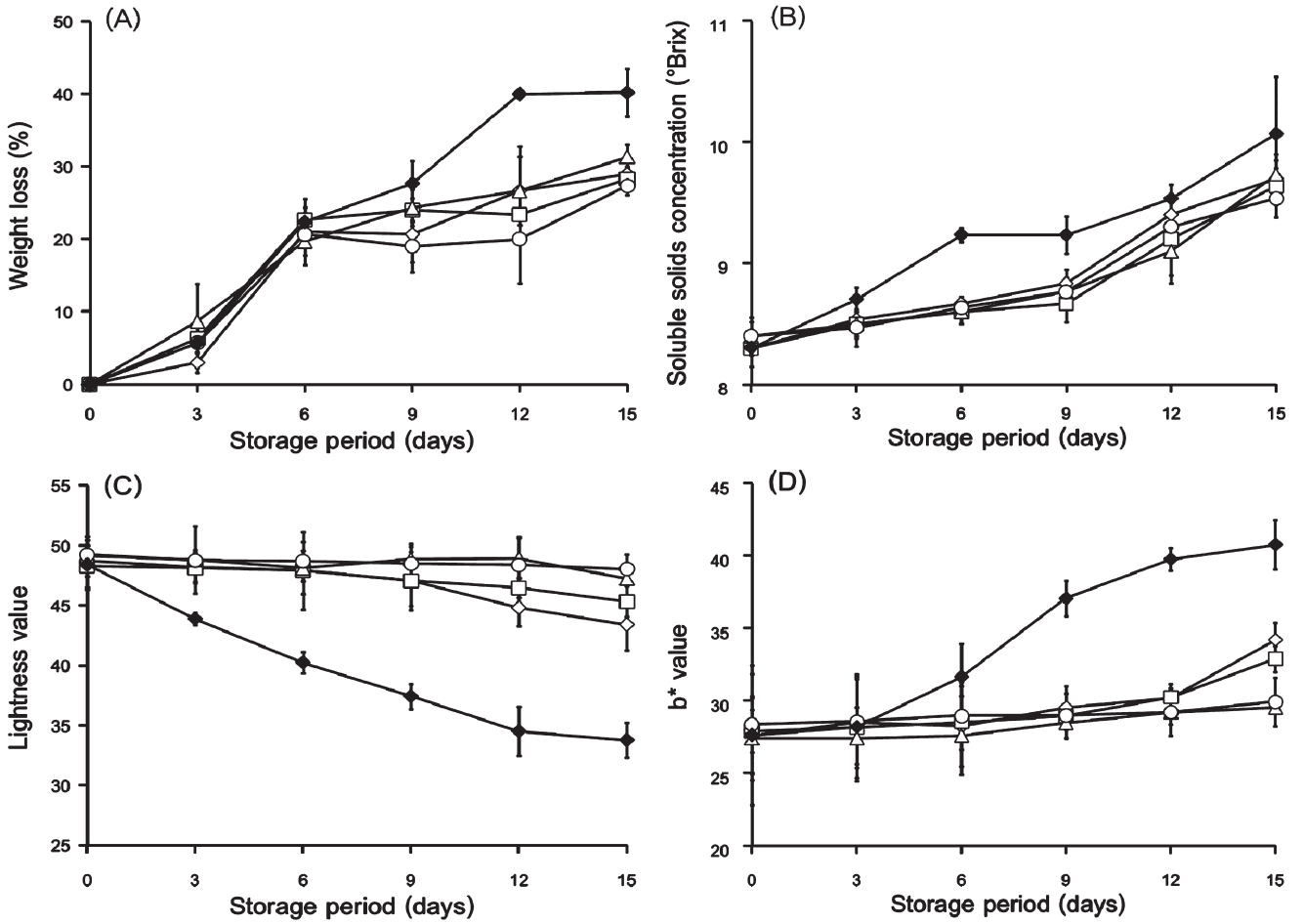


Figure 2. Effect of storage period with 30 g of rye grain culture of *Muscodor suthepensis* on green mold of tangerine: A, fruit weight loss; B, soluble solids content; C, lightness (light/dark) value; D, b^* (yellow/blue) value. Symbols: ◇, non-infected and non-fumigated; □, infected and fumigated for 6 h; △, infected and fumigated for 12 h; ○, infected and fumigated for 24 h; ◆, infected and non-fumigated. Data represent mean of three replicates repeated twice. Error bars indicate ± standard deviation.

cultures of *M. albus* and *Muscodor roseus* resulted in the successful control of soil-borne pathogens such as *Aphanomyces cochlioides*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Veticillium dahliae*.[3,15,28,43]

Our results indicated that 12 h of fumigation with 30 g per 4 L of rye grain culture of *M. suthepensis* provided complete control of tangerine fruit rot caused by *P. digitatum*. In this study the fumigation period differed from other reports on biocontrol of postharvest diseases using *M. albus*. For example, 24 h of fumigation with 30 g per 11.4 L of *M. albus* inoculum controlled blue mold (*P. expansum*) and gray mold (*B. cinerea*) decay of apple and 24 h of fumigation with 140 g per 11.4 L of *M. albus* inoculum also controlled brown rot of peach caused by *M. fructicola*.[17] Mercier and Smilanick[18] reported that 24 h of biofumigation with 30 g per 11.4 L of rye grain culture of *M. albus* controlled *P. digitatum* and *G. citri-aurantii*. The present study showed that the percentage weight loss, SSC and color development of fumigated tangerines in each treatment changed normally, which was similar in a non-infected and non-fumigated treatment. Mercier and Smilanick[18] also reported that color development of lemon was similar in an *M. albus* fumigation treatment and a non-infected and non-fumigated treatment. It is possible that *M. suthepensis* can be used as a biological control agent to eliminate postharvest diseases in various fruits and thus replace the use of chemical fungicides. The optimal techniques of inoculum production will be further studied with the goal of finding low-cost and easily maintained production methods for biofumigants in agriculture on a commercial scale in Thailand.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Bangkok, Thailand, TRF Research-Team Association Grant RTA5580007 and Chiang Mai University. We thank Dr Jaturong Kumla, Department of Biology, Chiang Mai University for his helpful contribution. We are grateful to Dr Robert J McGovern for English proofreading.

REFERENCES

1 Plaza P, Usall J, Torres R, Abadias M, Smilanick JL and Viñas I, The use of sodium carbonate to improve curing treatments against green and blue moulds on citrus fruits. *Pest Manag Sci* **60**:815–821 (2004).
2 Kinay P, Mansour MF, Gabler FM, Margosan DA and Smilanick JL, Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protect* **26**:647–656 (2007).
3 Inkha S and Boonyakiat D, Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in tangerine fruit cv. Sai Nam Phung flavedo by hot water treatment. *Songklanakarin J Sci Technol* **32**:445–451 (2010).
4 Smilanick JL, Mansour MF, Gabler FM and Goodwine WR, The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum*

© 2015 Society of Chemical Industry

and to control citrus green mold after harvest. *Postharv Biol Technol* **42**:75–85 (2006).
5 Palou L, Marcilla A, Rojas-Argudo C, Alonso M, Jacas J and Ángel del Rio M, Effects of X-ray irradiation and sodium carbonate treatments on postharvest *Penicillium* decay and quality attributes of clementine mandarins. *Postharv Biol Technol* **46**:252–261 (2007).
6 Barakat R and Al-Masri M, Biological control of gray mold disease (*Botrytis cinerea*) on tomato and bean plants by using local isolates of *Trichoderma harzianum*. *Dirasat Agric Sci* **32**:145–156 (2005).
7 Strobel GA and Daisy B, Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:491–502 (2003).
8 Stinson AM, Zidack NK, Strobel GA and Jacobsen BJ, Effect of mycofumigation with *Muscodor albus* and *Muscodor roseus* on seedling diseases of sugar beet and Verticillium wilt of eggplant. *Plant Dis* **87**:1349–1354 (2003).
9 Dai J, Krohn K, Flörke U, Draeger S, Schulz B, Kiss-Szikazai A *et al.* Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. *Eur J Org Chem* **2006**:3498–3506 (2006).
10 Mercier J, Jiménez-Santamaría JI and Tamez-Guerra P, Development of the volatile-producing fungus *Muscodor albus* Worapong, Strobel, and Hess as a novel antimicrobial biofumigant. *Rev Mex Fitopatol* **25**:173–179 (2007).
11 Wu ZC, Li DL, Chen YC and Zhang WM, A new isofuranonaphthalenone and benzopyrans from endophytic fungus *Nodulisporium* sp. A4 from *Aquilaria sinensis*. *Helv Chim Acta* **93**:920–924 (2010).
12 Dennis C and Webster J, Antagonistic properties of species-group of Trichoderma I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans Br Mycol Soc* **57**:25–39 (1971).
13 Strobel GA, Dirske E, Sears J and Markworth C, Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **147**:2943–2950 (2001).
14 Ezra D, Hess WM and Strobel GA, New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile antibiotic producing fungus. *Microbiology* **150**:4023–4031 (2004).
15 Worapong J and Strobel GA, Biocontrol of root rot of kale by *Muscodor albus* strain MFC2. *BioControl* **54**:301–306 (2009).
16 Goates BJ and Mercier J, Effect of biofumigation with volatiles from *Muscodor albus* on the viability of *Tilletia* spp. teliospores. *Can J Microbiol* **55**:203–206 (2009).
17 Mercier J and Jiménez JI, Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharv Biol Technol* **31**:1–8 (2004).
18 Mercier J and Smilanick JL, Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *BioControl* **32**:401–407 (2005).
19 Lacey LA and Neven LG, The potential of the fungus, *Muscodor albus*, as a microbial control agent of potato tuber moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in stored potatoes. *J Invertebr Pathol* **91**:195–198 (2006).
20 Riga E, Lacey L and Guerra N, *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. *BioControl* **45**:380–385 (2008).
21 Lee SO, Kim HY, Choi GJ, Lee HB, Jang KS, Choi YH *et al.* Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and Rhizoctonia root rot on moth orchid. *J Appl Microbiol* **106**:1213–1219 (2009).
22 Park MS, Ahn J, Choi GJ, Choi YH, Jang KS and Kim JC, Potential of the volatile-producing fungus *Nodulisporium* sp. CF016 for the control of postharvest diseases of apple. *Plant Pathol J* **26**:253–259 (2010).
23 Tomsheck AR, Stroble GA, Booth E, Geary B, Spakowicz D, Knighton B *et al. Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. *Microb Ecol* **60**:903–914 (2010).
24 Singh SK, Stroble GA, Knighton B, Geary B, Sears J and Ezra D, An endophytic *Phomopsis* sp. bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds. *Microb Ecol* **61**:729–739 (2011).
25 Strobel GA, Singh SK, Riyaz-Ul-Hassan S, Mitchell AM, Geary B and Sears J, An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. *FEMS Microbiol Lett* **320**:87–94 (2011).
26 Suwannarach N, Kumla J, Bussaban B, Nuangmek W, Matsui K and Lumyong S, Biofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit. *Crop Protect* **45**:63–70 (2013).
27 Suwannarach N, Kumla J, Bussaban B, Hyde KD, Matsui K and Lumyong S, Molecular and morphological evidence support four new species in the genus *Muscodor* from northern Thailand. *Ann Microbiol* **63**:1341–1351 (2013).
28 Suwannarach N, Kumla J, Bussaban B and Lumyong S, Biocontrol of *Rhizoctonia solani* AG-2, the causal agent of damping off by *Muscodor cinnamomi* CMU-Cib 461. *World J Microbiol Biotechnol* **28**:3171–3177 (2012).
29 Worapong J, Strobel GA, Ford EJ, Li JY, Baird G and Hess WM, *Muscodor albus* anam. gen et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. *Mycotaxon* **79**:67–79 (2001).
30 Worapong J, Strobel GA, Daisy B, Castillo UF, Baird G and Hess WM, *Muscodor roseus* anam. sp. nov., an endophyte from *Grevillea pteridifolia*. *Mycotaxon* **81**:463–475 (2002).
31 Mitchell AM, Strobel GA, Hess WM, Vargas PN and Ezra D, *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. *Fungal Divers* **31**:37–44 (2008).
32 González MC, Anaya AL, Glenn AE, Macías-Rubalcava ML, Hernández Bautista BE and Hanlin RT, *Muscodor yucatanensis*, a new endophytic ascomycete from Mexican chakah, *Bursera simaruba*. *Mycotaxon* **110**:363–372 (2009).
33 Zhang C, Wang G, Mao L, Komon-Zelazowska M, Yuan Z, Lin F *et al. Muscodor fengyangensis* sp. nov. from southeast China: morphology, physiology and production of volatile compounds. *Fungal Biol* **114**:797–808 (2010).
34 Ajith PS and Lakshmidevi N, Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on bell peppers. *Nat Sci* **8**:265–269 (2010).
35 Amin F, Razdan VK, Mohiddin FA, Bhat KA and Sheikh PA, Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in vitro*. *J Phytol* **2**:34–37 (2010).
36 Kai M, Effmert U, Berg G and Piechulla B, Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch Microbiol* **187**:351–360 (2007).
37 Wan M, Li G, Zhang J, Jiang D and Huang H, Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biol Control* **46**:552–559 (2008).
38 Sarangi N, Athukorala P, Dilantha-Fernando WG, Rashid KY and Kievit TD, The role of volatile and non-volatile antibiotics produced by *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 in its root colonization and control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biocontrol Sci Technol* **20**:875–890 (2010).
39 Li Q, Ning P, Zheng L, Huang J, Li G and Hsiang T, Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. *Postharv Biol Technol* **58**:157–165 (2010).
40 Kudalkar P, Strobel G, Hassan S, Geary B and Sears J, *Muscodor sutura*, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities. *Mycoscience* **53**:319–325 (2012).
41 Ramin AA, Braun PG, Prange RK and DeLong JM, *In vitro* effects of *Muscodor albus* and three volatile components on growth of selected postharvest microorganisms. *HortScience* **40**:2109–2114 (2005).
42 Atmosukarto I, Castillo U, Hess WM, Sears J and Strobel G, Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3 s, a volatile antibiotic producing fungus. *Plant Sci* **169**:854–861 (2005).
43 Grimme E, Zidack NK, Sikora RA, Strobel GA and Jacobsen BJ, Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. *Plant Dis* **91**:220–225 (2007).

 © 2015 Society of Chemical Industry

Ann Microbiol
DOI 10.1007/s13213-015-1126-x

ORIGINAL ARTICLE

Existence of *Muscodor vitigenus*, *M. equiseti* and *M. heveae* sp. nov. in leaves of the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.), and their biocontrol potential

Sakuntala Siri-udom[1,3] · **Nakarin Suwannarach**[1,2] · **Saisamorn Lumyong**[1,2]

Received: 12 March 2015 / Accepted: 26 June 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and the University of Milan 2015

Abstract We isolated volatile metabolite-producing endophytic fungi from the leaves of the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.) and studied their antimicrobial competence. A total of three isolates was obtained, and their phenotypic and phylogenetic relationship with the genus *Muscodor* in the family *Xylariaceae* was studied. 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 as 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 the *Muscodor* isolates have the potential for biological control of bacteria, yeast and filamentous fungi. Furthermore, the VOCs of *M. heveae* were active against the pathogenic fungi *Phellinus noxius* and *Rigidoporus microporus* that cause root disease in the rubber tree. We concluded that rubber trees could be an alternative source for discovery of fungi that produce volatile metabolites, and the genus *Muscodor* could be found abundantly in this habitat.

Keywords Endophytic fungi · *Muscodor* · Rubber tree · Taxonomy · Volatile antibiotics

✉ Saisamorn Lumyong
saisamorn.l@cmu.ac.th

Sakuntala Siri-udom
sakuntalasiriudom@gmail.com

Nakarin Suwannarach
suwan_461@hotmail.com

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2] Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[3] Program in Biology, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University, Udon Thani 41000, Thailand

Introduction

Microbial endophytes are bacteria or fungi which live within plants without causing apparent disease (Huang et al. 2001; Chaverri and Gazis 2011). As symbionts, most endophytes enhance plant growth and a plant's defensive system (Strobel and Daisy 2003; Tejesvi et al. 2007). Because of such benefits, endophytes are one of the promising microbial resources for biocontrol agents applied in agriculture. A mode of action of endophytes in prevention and/or suppression of plant diseases caused by phytopathogens is the production of antimicrobial substances. The bioactive compounds in the form of volatile metabolites produced by endophytes have not been commonly reported. Some fungi that belong to the families *Diaporthaceae*, *Hypocreaceae*, and *Xylariaceae* of the phylum Ascomycota are notable for their capacity to form volatile metabolites with antimicrobial activity (Stinson et al. 2003; Suwannarach et al. 2013b). In the family *Xylariaceae*, *Muscodor albus* is the first known fungal endophyte isolated from *Cinnamomum zeylanicum*, which produces bioactive volatile metabolites (Strobel et al. 2001; Ezra et al. 2004).

The genus *Muscodor* does not produce spores and is classified into the family *Xylariaceae* based on the polyphasic approach (Kudalkar et al. 2011). Although morphological characteristics can be used to classify the members of *Muscodor* at the genetic level, a more appropriate genotypic

Published online: 10 July 2015

classification method is needed for identification at the species level and to understand their phylogenetic lineage. In addition, profiling and comparison of unique volatile metabolites produced by members of the genus *Muscodor* are important criteria for its classification (Strobel 2006; González et al. 2009). The major volatile metabolite produced by the genus *Muscodor* is 2-methylpropanoic acid (Kudalkar et al. 2011; Suwannarach et al. 2013a), which differs from other endophytic genera in the same family, e.g., *Nodulisporium* spp. that produces eucalyptol (Tomsheck et al. 2010). Recently, many novel species of the genus *Muscodor* (*M. cinnamomi*, *M. equiseti*, *M. musae*, *M. oryzae*, and *M. suthepensis*) were isolated from diverse plant hosts growing in northern Thailand (Suwannarach et al. 2010; 2013a). Other species of *Muscodor* have been isolated from tropical trees and vines in Australia, Central and South America, and Central, South and Southeast Asia (Meshram et al. 2013; Suwannarach et al. 2013a; Saxena et al. 2015), while a previous report showed that *Penicillium*, *Pestalotiopsis* and *Trichoderma* were the most frequently isolated fungi from rubber trees (Gazis and Chaverri 2010). However, a diversity study of the genus *Muscodor* that lives in association with rubber trees has not been reported previously.

The rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.) is an economic crop that produces natural latex as a major raw material for rubber manufacture. Most of the world's plantation areas of rubber trees are located in countries in South East Asia such as Malaysia, Indonesia and Thailand (van Beilen and Poirier 2007). Although recent farming practices for the rubber tree have achieved a high yield of latex, plant diseases that cause reduction of latex yield and mortality in rubber trees are still common (Jayasuriya and Deacon 1995; Evueh and Ogbebor 2008). In addition, post-harvest products of natural latex in the form of air-dried rubber sheets are commonly contaminated by airborne fungi (Linos and Steinbüchel 2001). This contamination reduces both the quality and price of rubber sheets. Thus, volatile metabolite-producing endophytes may be an alternative biological approach as biofumigation in control of plant diseases and fungal contamination of rubber tree seedlings and their latex products. It is known that sapwood and leaf fragments of rubber trees are a rich source of fungal endophytes (Evueh and Ogbebor 2008; Rocha et al. 2010; Gazis 2012), but few studies have reported their antimicrobial activities (Evueh and Ogbebor 2008; Gazis 2012). Moreover, no volatile metabolite-producing endophytes have yet been reported from rubber trees.

In this study, we aimed to evaluate the variety of volatile metabolite-producing ascomycetes that live in association with rubber trees, giving a high priority to the genus *Muscodor*. Leaves of the rubber tree were used as a source for isolation of fungal endophytes that can produce volatile metabolites. The genetic diversity of such endophytes and the antimicrobial activity of their volatile metabolites were investigated. A novel species of these endophytes was proposed and described in this article. The possible applications of these endophytes as a potent biocontrol agent in rubber farming were also discussed.

Materials and methods

Preparation and surface sterilization of plant materials

Healthy rubber tree leaves were used as a source for isolation of endophytic fungi. A total of 45 leaves were collected from rubber trees planted in Nongbualamphu province, northeastern Thailand (geographical location: 17°12′14″ N, 102°26′26″ E). They were placed in plastic bags and stored in an icebox before transport to the laboratory within 24–48 h after sampling. The age of the rubber trees was approximately 6 years, which is considered as the mature phase for latex harvest. The leaves were prepared and surface sterilized following the method described by Suwannarach et al. (2010). Briefly, plant leaves were rinsed with tap water for 15 min and randomly cut into small segments (25 mm^2). All segments were sterilized by soaking in 75 % ethanol for 30 s, 2 % sodium hypochlorite for 3 min, and 95 % ethanol for 30 s.

Isolation of volatile metabolite-producing endophytic fungi

Endophytic fungi that form volatile metabolites were isolated using a parallel-growth isolation technique (Worapong et al. 2001). Briefly, a part of a two-compartment Petri dish was filled with potato dextrose agar (PDA, Himedia Laboratories, India), while the other side contained half-strength PDA supplemented with rose bengal and chloramphenicol at final concentrations of 0.033 g L^{-1} and 50 mg L^{-1}, respectively. A strain producing volatile antibiotic metabolites, *M. cinnamomi* (MB518008) (Suwannarach et al. 2010) was used as a reference strain for this isolation. An agar plug (6-mm diameter) of *M. cinnamomi* grown previously on PDA at ambient temperature (25±2 °C) for 7 days was placed on the PDA side of the prepared two-compartment Petri dish. This inoculation was incubated at 25±2 °C for 4 days. Then, five surface sterilized plant segments were placed on the half strength PDA, where they were exposed to the volatile metabolites produced by *M. cinnamomi*. The Petri dish was sealed with parafilm® M, and incubated at 25±2 °C for 2 weeks. The production of its VOCs facilitated selection pressure, allowing the growth of only fungal species that tolerated these volatiles. Then, the hyphal tips of endophytic fungi that grew out from the plant segments were aseptically transferred to a separate PDA plate. This technique can be used to select for other isolates of *Muscodor* (Worapong et al. 2001; Mitchell et al. 2008). The endophytic fungi were tested with *Colletotrichum gloeosporioides*, following a protocol described by Strobel et al. 2001, if they produced volatile antibiotics. Spore

production of endophytic fungi was studied on four different media, including corn meal agar (CMA), malt agar (MA), PDA and water agar (WA). The microscopic structures, such as hyphal characteristics, cellular bodies and spore production, were observed under a light microscope (Olympus SZ40, Japan). The colony texture, color and fruiting body were observed under a stereomicroscope (Olympus CH30, Japan). The pure cultures of endophytic fungi were subsequently stored in 20-% (v/v) glycerol at −20 °C and deposited at the Sustainable Development of Biological Resources (SDBR) Lab, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, and the BIOTEC Culture Collection (BCC), Bangkok, Thailand.

Phenotypic classification

Colony and hyphal characteristics of all endophytic fungal isolates were initially observed with a light microscope (Olympus CH30, Japan). The morphological characteristics were observed also with a scanning electron microscope (JEOL JSM- 5910LV, Japan), following a protocol described by Ezra et al. (2004). All endophytic fungal isolates whose morphology was typical of the genus *Muscodor* were grouped and selected for further classification.

Genotypic classification

All *Muscodor* isolates were grown on PDA at 25±2 °C for 10 d. The aerial mycelium of each isolate was scraped from the PDS surface. This fungal biomass was then freeze-dried and ground into a fine powder with a pestle and mortar. A modified SDS-CTAB method (Suwannarach et al. 2013a) was used for the DNA extraction. The internal transcribed spacer regions 1 and 2 including 5.8S rDNA (ITS1-5.8-ITS2 rDNA) was a targeted nucleotide sequence for the amplification using a pair of universal primers (ITS4 and ITS5). The amplification was carried out using a GeneAmp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) with the following polymerase chain reaction (PCR) conditions: initial denaturization at 95 °C (2 min), 30 cycles of reaction [denaturization at 95 °C (30 s), annealing at 50 °C (30 s), and extension at 72 °C (1 min)], and final extension at 72 °C (10 min). The reaction mixture (25 μL) contained 1 μL of the DNA template, 0.2 μM dNTP, 0.2 μL of FastTaq (Applied Biosystems), 0.2 μM each primer, 2.5 μL of $MgCl_2$ buffer, and sterile water to bring the volume to 25 μL. The PCR product was confirmed by gel electrophoresis and purified with a PCR cleanup Gel Extraction NucleoSpin® Extract II Purification Kit (Macherey-Nagel, Germany) following the manufacturer's manual. The purified PCR product was then sequenced by 1st Base, Malaysia. All DNA sequences obtained were aligned and compared to the available sequences in the GenBank database using the BLASTN facility within the NCBI website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Phylogenetic analysis of all sequences was conducted by the neighbor-joining method using MEGA6 software (Tamura et al. 2013).

In vitro antimicrobial assay of VOCs

Antagonistic activity of all *Muscodor* isolates was tested against a set of pathogenic microbes listed in Table 1. The test microbes were comprised of bacteria, yeast and filamentous fungi. The parallel-growth isolation technique was adapted for the antagonism test. Briefly, part of a two-compartment Petri dish was filled with PDA, while the other side contained nutrient agar for the test bacteria, yeast extract-malt extract agar for the test yeast, or PDA for the test filamentous fungi. An agar plug from the mycelial margin of each *Muscodor* isolate growing on PDA was inoculated on the PDA part of the Petri dish, and allowed to grow at 25±2 °C for 4 days. Then, each test bacterium or yeast was individually streaked on its respective agar medium in the Petri dish. For the filamentous fungi test, an agar plug (6-mm diameter) of their 4-day-old PDA culture was inoculated on PDA on the opposite side of the Petri dish. All Petri dishes were wrapped with parafilm® M, and incubated at 25±2 °C for 6 days. The percent inhibition of fungal growth after the dual culture test was calculated with the following equation: $[(R_1\text{-}R_2)\times 100] \div R_1$, where R_1 is the average colony radius of each test microbe measured in the control plates (without *Muscodor* isolate), and R_2 is the average colony radius calculated from the test plates. In the case of bacteria and yeast, the microbes were checked for visible growth and viability. The viability of the test microbes was observed by transferring them from the test plates and re-growing in fresh media (Strobel et al. 2001).

Profiling and comparison of volatile metabolites

Only the *Muscodor* isolate that was a possible novel species (having a <86-% similarity to the ITS1-5.8-ITS2 rDNA sequence of other members of the genus *Muscodor*), was analyzed for its profile of volatile metabolites. The mixture of volatile metabolites in the headspace of the *Muscodor* isolate growing on PDA at 25±2 °C for 10 days was identified by a modified gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) procedure with solid phase microextraction (SPME; Strobel et al. 2001). The SPME equipped with a syringe consisting of gray hub fiber material made by divinylbenzene/carboxen (50/30) on polydimethylsiloxane affixed on a stable flex fiber was used for trapping the volatile metabolites produced in the headspace of the *Muscodor* culture for 45 min. The syringe was inserted into the splitless injection port of an Agilent 7890A gas chromatograph equipped with a mass spectrometer MSD 5975C (EI) mass selective detector. A DB-wax capillary column (30 m × 0.25 mm I.D.) with a film thickness of 0.25 μm was used for separation of volatile metabolites. The column

Table 1 Antimicrobial activity of volatile metabolite-producing *Muscodor* isolates

Test microbes	Percent inhibition of microbial growth (viability) after exposure to different isolates of *Muscodor*		
	RTM5IV1	RTM5IV2	RTM5IV3
Gram positive bacteria			
Bacillus cereus	100 (Dead)	0 (Alive)	100 (Alive)
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)	0 (Alive)	0 (Alive)	100 (Dead)
Micrococcus luteus	0 (Alive)	0 (Alive)	100 (Dead)
Staphylococcus aureus ATCC 29213	100 (Dead)	0 (Alive)	100 (Dead)
Gram negative bacteria			
Enterobacter aerogenes	100 (Dead)	0 (Alive)	100 (Dead)
Enterococcus faecalis	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Escherichia coli ATCC 35218	0 (Alive)	0 (Alive)	100 (Dead)
Klebsiella pneumoniae (ESBL+)	0 (Alive)	0 (Alive)	100 (Dead)
Proteus mirabilis	0 (Alive)	100 (Dead)	100 (Dead)
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27859	0 (Alive)	0 (Alive)	0 (Alive)
Salmonella sp. Group D	0 (Alive)	0 (Alive)	100 (Dead)
Yeast			
Cryptococcus neoformans	100 (Dead)	0 (Alive)	100 (Dead)
Filamentous fungi			
Aspergillus flavus	100 (Alive)	98.4±1.3 (Alive)	100 (Dead)
Aspergillus niger	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)
Colletotrichum gloeosporioides	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)
Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum*	39.8±2.2 (Alive)	47.4±1.5 (Alive)	62.8±2.2 (Alive)
Ganoderma australe BCC22321	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)
Phellinus noxius BCC26237	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)
Phytophthora parasitica BCC15560	100 (Dead)	97.1±1.3 (Alive)	100 (Dead)
Rhizoctonia solani AG-2	100 (Alive)	71.1±2.1 (Alive)	100 (Dead)
Rigidoporus microporus	100 (Dead)	100 (Dead)	100 (Dead)

All tests were done in triplicate and repeated twice, the % inhibition is shown as the mean±standard deviation (SD) while without SD refers to the absence of the mean difference

was initiated with a thermal program of 40 °C for 2 min, increasing to 200 °C at a rate of 5 °C min^{-1}. Ultra-high purity helium was used as a carrier gas with an initial column head pressure of 60 kPa. Before trapping the volatile metabolites, the fiber material was conditioned at 250 °C for 34 min under a flow of helium gas. A 30-s injection time was used to introduce the adsorbed volatile metabolites into the GC. The volatile metabolites were identified through a library comparison with the National Institute of Standards and Technology (NIST) database by considering their quality match (80 % or higher).

Results

Volatile metabolite-producing endophytic fungi of the rubber tree leaf

A total of three isolates of volatile metabolite-producing endophytic fungi was isolated from leaves of rubber trees, using the parallel-growth isolation technique with *M. cinnamomi* as a reference strain. All isolates (100 %) were classified morphologically into the genus *Muscodor*. This phylogenetic relationship was supported by 100 % similarity of the gene sequence and morphological characteristics. The phylogenetic analysis of ITS1-5.8-ITS2 rDNA sequences derived from all *Muscodor* isolates revealed the different closest related species and displayed three major clades, A, B, and C, containing all known species of *Muscodor*, and all isolates from this study with a high bootstrap support (91 %) (Fig. 4). Isolate RTM5IV3 showed the lowest sequence similarity (86 %) to *M. albus* cz620[1], *M. cinnamomi*, *M. musae*, and *M. oryzae*. In clade A, it separated from the *M. albus* group, *M. strobelii* and *M. suthepensis* with 93-% bootstrap support (Fig. 4). Isolates RTM5IV1 and RTM5IV2 showed a maximum homology of 100 % with *M. vitigenus* and *M. equiseti*, respectively, and were classified into clade B with 99 % bootstrap support (Fig. 4). Morphological data and bioinformatics were insufficient to place the *Muscodor* isolates into exact lineages.

Nevertheless, we could suppose that the isolates giving a % sequence similarity lower than 100 % could be novel members of the genus *Muscodor*. With this hypothesis, one of the *Muscodor* isolates (33.3 %) found in this work was possibly a novel species isolated from rubber tree leaves.

Volatile analysis of *Muscodor* spp.

Isolate RTM5IV3 produced a mixture of 12 volatile metabolites which were identified by GC/MS through a library comparison with the NIST database (Table 3). Its volatile profile was compared with its closest phylogenetic species; *M. albus* cz620[1], *M. cinnanomi*, *M. musae*, and *M. oryzae*. The volatile compound produced by isolate RTM5IV3 with the highest percentage peak area (11.26) was 3-methylbutan-1-ol, the same as produced by *M. albus* cz620 and *M. oryzae*. The minor volatile compounds were 3-methylbutyl acetate and 2-methylpropanoic acid. These volatile compounds are also produced by *M. albus* cz620. However, the volatile profile of isolate RTM5IV3 was different from other *Muscodor* spp. (Table 3). In addition, isolate RTM5IV3 produced two volatile compounds, 1,1,9-trimethyl-5-methylidenespiro[5.5]undec-9-ene and methyl (*Z*)-*N*-hydroxybenzenecarboximidate, compounds that are not found in other *Muscodor* spp. (Table 3).

Antimicrobial activity of volatile metabolites produced by *Muscodor* isolates

The volatile metabolites produces by different *Muscodor* isolates were tested for their antimicrobial activity against a set of test microbes (Table 1). The volatile metabolites produced by *Muscodor* isolates RTM5IV1 and RTM5IV3 exhibited antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeast and filamentous fungi, while isolate RTM5IV2 inhibited only the growth of some Gram-negative bacteria and filamentous fungi. Isolate RTM5IV3 showed the greatest antimicrobial activity with all test organisms. *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* was more susceptible to the volatile metabolites of RTM5IV3 than those of other isolates. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27859, the most resistant test microbe, was insensitive to the volatile metabolites produced by every isolate of *Muscodor*. All the *Muscodor* volatiles exhibited significant control of all tested pathogenic fungi of the rubber tree (*C. gloeosporioides, Phellinus noxius* and *Rigidoporus microporus*) compared with other tested fungi.

Taxonomic description of a novel species

Muscodor isolate RTM5IV3 did not produce spores on any medium, similar to the original *Muscodor*, and had rope-like mycelium with coiled structures (Strobel 2011). Although the isolate formed pale orange colonies when exposed to natural light similar to *M. cinnamomi* and *M. oryzae*, its mycelial morphology was wavy and hair-like at the mycelial edge and produced a unique unidentified structure (Fig. 1 and Table 2). The isolate RTM5IV3 was classified and identified with the polyphasic approach. Both phenotype and genotype revealed that the isolate belongs to the genus *Muscodor*. It shared relatively low sequence similarity of ITS1-5.8-ITS2 rDNA gene (86 %) with many species of the genus *Muscodor*. The phylogenetic tree showed isolate RTM5IV3 was separated from the other 12 *Muscodor* spp. in clade A with high bootstrap support (Fig. 4). The phylogenetic dendrogram also supported the node separating isolate RTM5IV3 in clade A from five species of *Muscodor* in clade B and C with 88 % and 91 % bootstrap support, respectively. The isolate RTM5IV3 was able to form volatile metabolites with antimicrobial activity against a diverse set

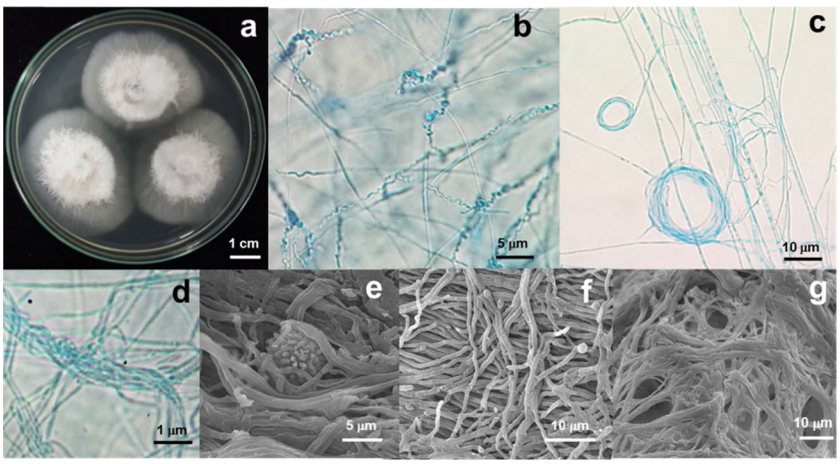


Fig. 1 Morphological characteristics of *M. heveae* (RTM5IV3) isolated from leaves of the rubber tree. A difference in colony morphology was observed after growing on PDA in the dark (**a**) for 10 days. The hyphal morphology of *M. heveae* was observed further with light (**b**–**d**) and scanning electron (**e**–**g**) microscopes. The wavy mycelium from the colony edge (**b**), formation of coiling hypha (**c**), rope-like mycelium (**d**, **g**), unique unidentified structure (**e**), and swollen-like hyphal tips (**f**) were found as a typical morphology of *M. heveae*

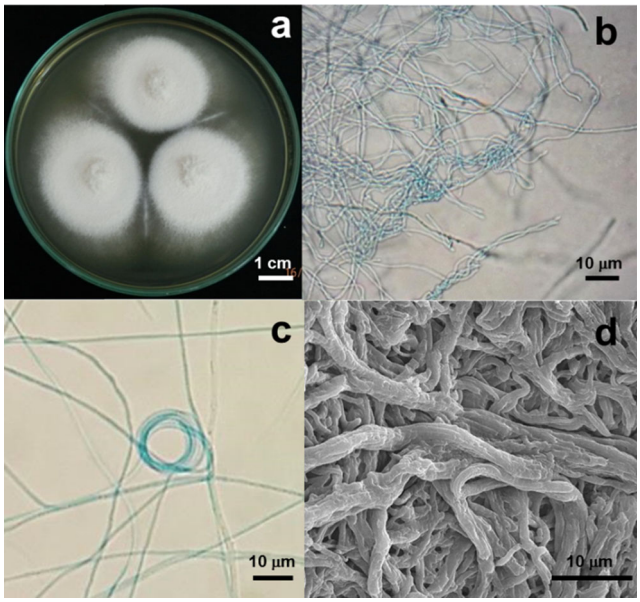


Fig. 2 Morphological characteristics of *M. vitigenus* (RTM5IV1) isolated from leaves of the rubber tree. A difference in colony morphology was observed after growing on PDA in the dark (**a**) for 10 days. The hyphal morphology of *M. vitigenus* was observed further with light (**b**–**c**) and scanning electron (**d**) microscopes. The formation of rope-like mycelium (**b**, **d**), and coiling hypha were found as a typical morphology of *M. vitigenus*

of test microbes, which is a typical phenotype of the genus *Muscodor* (Table 1). However, the profile of volatile metabolites produced by the isolate was different than its closely related phylogenetic species. However, the major component of the volatile metabolites was 3-methylbutan-1-ol, which was the same as the type species of the genus *Muscodor*, *M. albus* cz620[1] (Table 3). Based on the phenotypic, genotypic and phylogenetic evidence, isolate RTM5IV3 represents a novel species of the genus *Muscodor*, for which the name *Muscodor heveae* sp. nov. was proposed. The taxonomic description includes the following:

Taxonomy

Muscodor heveae S. Siri-Udom & S. Lumyong, sp. nov. (Fig. 1)

MycoBank: MB809310.

Diagnosis: Pale orange colonies on PDA in natural light, hyphae 1.2 - 3.7 μm thick, coils 14.8 - 27.1×19.7 - 39.4 μm in diameter, and producing a fruity odor.

Etymology: *heveae*, refers to the name of the host plant, *Hevea brasiliensis*.

Holotype: THAILAND, Nongbualamphu province, Chiang Mai, Chiang Mai University, from a healthy leaf of *Hevea brasiliensis* (*Euphorbiaceae*) during May 2011-December 2012. (ex-type living culture BCC 70461 and SDBR-CMU RTM5IV3), GenBank sequence KF850712.

Teleomorph: Unknown.

Description: In nature, the fungus is associated with *Hevea brasiliensis*. It is an ascomycete and does not produce spores. Colony color of the fungus on PDA in natural light is pale orange but becomes whitish in the dark (Fig. 1a). The edge of colony was wavy mycelium (b). Hyphae (1.2 - 3.7 μm thick) with coils (14.8 - 27.1×19.7 - 39.4 μm diameter; Fig. 1c), common intertwining of mycelium into a twisted cable-like strand and a rope like strand (4.9 - 7.4 μm thick; Fig. 1d, 1 g). Mycelium forms unique unidentified structures (3.8 - 7.5 μm diameter; Fig. 1e) and swollen cells at hyphal tips (2.5 - 4.9 μm diameter; Fig. 1f). A culture on PDA produced a fruity odor, which contains 3-methylbutan-1-ol as a major

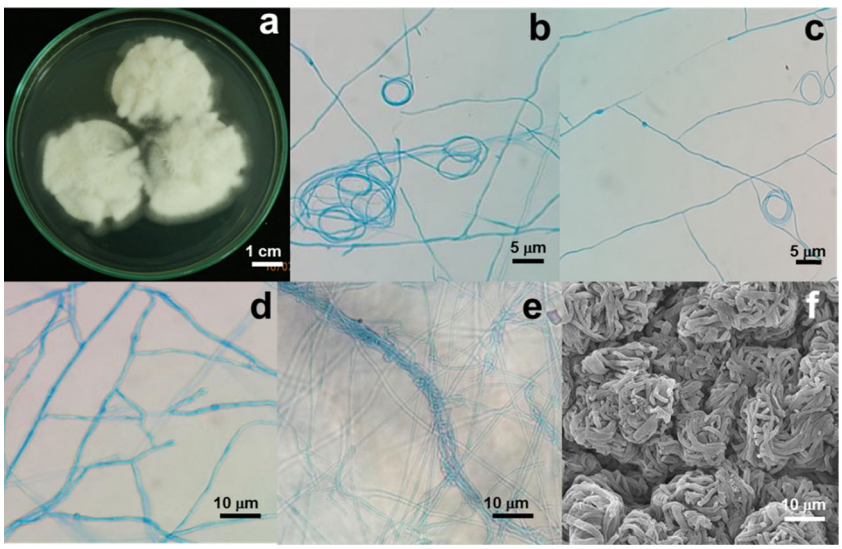


Fig. 3 Morphological characteristic of M. *equiseti* (RTM5IV2) isolated from leaves of the rubber tree. A difference in colony morphology was observed after growing on PDA in the dark (**a**) for 10 days. The hyphal morphology of *M. equiseti* was observed further with light (**b**–**e**) and scanning electron (**f**) microscopes. The formation of coiling hyphae (**b**–**c**), a triangular branching pattern (**d**), swollen cells (**c**–**d**), rope-like mycelium (**e**), and cottony-like mycelium (**f**) were found as a typical morphology of *M. equiseti*

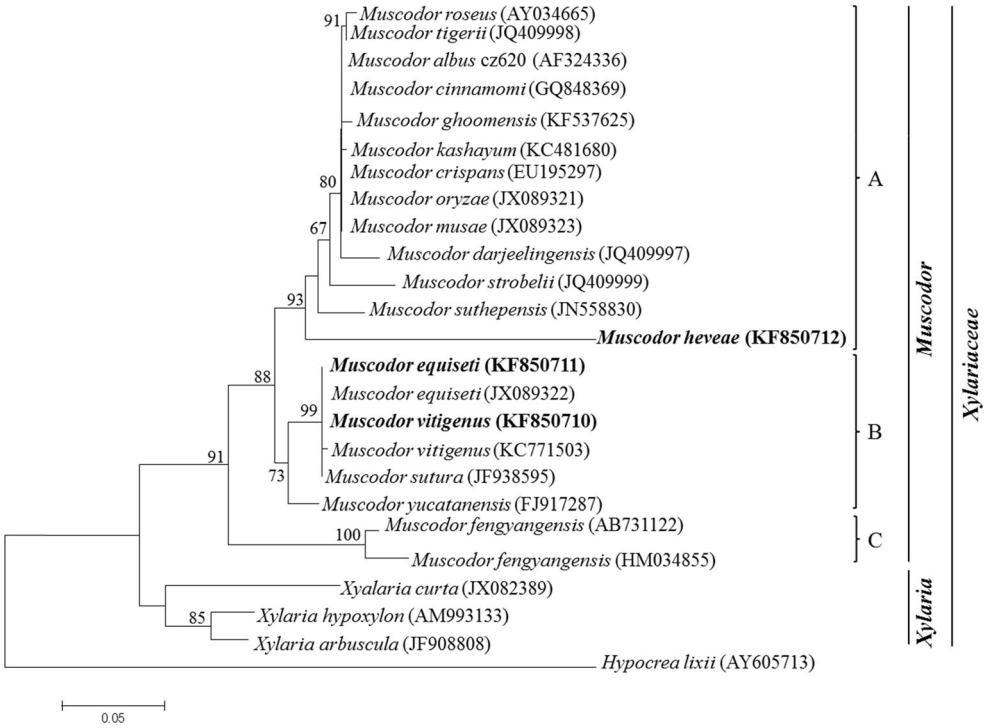


Fig. 4 Maximum parsimony tree of *Muscodor* spp. based on ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequence alignment of 25 sequences. *Hypocrea lixii* was used as an out group. The isolate RTM5IV3 was proposed as a novel species, *M. heveae* (see text for the description of this novel species). The isolate RTM5IV1 and RTM5IV2 were proposed as *M. vitigenus* and *M. equiseti*, respectively. The codes indicated in parentheses refer to the accession numbers of the sequences available in the GenBank database

component. Spores and other fruiting bodies did not appear under any of the test conditions.

The other two isolates of *Muscodor* tested, isolates RTM5IV1 and RTM5IV2, were identified as *M. vitigenus* (Mycobank: MB373747) (Fig. 2) and *M. equiseti* (Mycobank: MB800814) (Fig. 3), respectively, based on morphology and phylogenetic analysis. The description of *M. vitigenus* and *M. equiseti* were showed in previous publications of Daisy et al. (2002) and Suwannarach et al. (2013a), respectively.

Discussion

It is known that ascomycetes including the following notable genera, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, and *Trichoderma* are dominant fungal endophytes of the rubber tree (Gazis and Chaverri 2010; Gazis 2012). However, there is no report of volatile metabolite-producing endophytes that live associated with the rubber tree. We were the first to find that the rubber tree can be a source for discovering volatile metabolite-producing endophytes. The isolation technique

Table 2 Morphology and bioactivity of *M. heveae* and its closely related phylogenetic species

Morphology and bioactivity	*M. heveae*	*M. albus* cz620[1]	*M. cinnamomi*	*M. musae*	*M. oryzae*
Mycelial growth	Rope-like strand and swollen cells with a coil structure	Rope-like with a coil structure	Rope-like with cauliflower-like bodies	Rope-like with a coil structure	Rope-like with a coil structure
Hyphal growth at colony front	Wavy and hairy-like mycelium	Straight	Straight	Straight and hairy-like mycelium	Straight
Pigment production					
in the light	Pale orange	Whitish	Pale orange	Whitish	Pale orange
in the dark	Whitish	ND	Whitish	Whitish	Pale orange
Host	*Hevea brasiliensis*	*Cinnamomum zeylanicumin*	*Cinnamomum bejolghota*	*Musa acuminata*	*Oryza rufipogon*
Bioactivity	Antifungal/ antibacterial	Antifungal/ antibacterial	Antifungal/antibacterial	Antifungal/ antibacterial	Antifungal/ antibacterial
Reference	This work	Worapong et al. (2001)	Suwannarach et al. (2010)	Suwannarach et al. (2013a)	Suwannarach et al. (2013a)

ND refers to not determined

Table 3 Composition of the volatile metabolites produced by *Muscodor* spp. as determined via GC/MS

Retention time (min)	Possible compound	Molecular formula	M/z	% Total area					
				Blank	MH[a]	MA[b]	MC[c]	MM[d]	MO[d]
5.41	cyclopentane	C_5H_{10}	7.69	0	0	0	7.69	0	0
5.56	ethyl acetate	$C_4H_8O_2$	88	0	0	7.63	0	0	0
5.60	2-methylpropan-1-ol	$C_4H_{10}O$	74	0	0.76/86*	0	0	0	0
6.03	3-methylbutyl acetate	$C_7H_{14}O_2$	130	0	6.92/90*	0	0	0	0
6.38	methyl 2-methylbutanoate	$C_6H_{12}O_2$	116	0	0	0	14.90	0	0
6.51	methyl propanoate	$C_4H_8O_2$	102	0	0	0.31	0	0	0
7.07	2-methylpropan-1-ol	$C_4H_{10}O$	74	0	0	0	0	0	3.48
7.16	ethanol	C_4H_6O	ND	0	0	6.24	0	0	0
7.77	3-methylbutanoyl acetate	ND	130	0	0	0	0	20.41	4.70
8.03	ethyl 2-methylpropanoate	$C_6H_{12}O_2$	116	0	0	2.07	0	0	0
8.29	3-methylbutan-1-ol	$C_5H_{12}O$	88	0	11.26/83*	0	3.12	0	0
10.32	2-methylbutyl 2-methylpropanoate	$C_9H_{18}O_2$	158	0	0	0	0	0.21	0
10.88	3-methylbutan-1-ol	$C_5H_{12}O$	88	0	0	0	0	13.34	32.69
11.45	2-methylpropyl 2-methylpropanoate	$C_8H_{16}O_2$	ND	0	0	0.58	0	0	0
12.05	2-methylpropan-1-ol	$C_4H_{10}O$	74	0	0	2.06	0	0	0
12.10	3-methyl-3-buten-1-ol	$C_5H_{10}O$	86	0	0	0	0	0	0.27
12.20	ethyl 2-hydroxy-2-methylpropanoate	$C_6H_{12}O_3$	132	0	0	0	0	0	0.88
12.50	3-methylbutyl acetate	$C_7H_{14}O_2$	ND	0	0	22.24	0	0	0
12.66	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11-dodecamethyl-2,4,6,8,10,12-hexaoxa-1,3,5,7,9,11-hexasilacyclododecane	$C_{12}H_{36}O_6Si_6$	445	0.67/91*	0	0	0	0	0
12.97	3-hydroxybutan-2-one	$C_4H_8O_2$	88	0	0	0	0	0.59	2.00
14.57	3-methylbutyl 2-methylpropanoate	$C_9H_{18}O_2$	ND	0	0	1.53	0	0	0
15.28	3-methylbutan-1-ol	$C_5H_{12}O$	88	0	0	22.99	0	0	0
15.88	benzaldehyde	C_7H_6O	106	4.61/96*	0	0	0	0	0
16.08	2-pentylfuran	$C_9H_{14}O$	138	0	0	0.29	0	0	0
16.19	2,4-dimethyl-1-heptene	C_9H_{18}	126	0	0	0	0	0	0.13
16.31	1-isobutoxy-2-ethylhexane	$C_{12}H_{26}O$	186	0	0	0	0	0	0.31
17.13	2-methylpropanoic acid	$C_4H_8O_2$	88	0	4.73/91*	0	0	0	0
19.04	(1*R*,4*E*,9*S*)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo[7.2.0] undec-4-ene	$C_{15}H_{24}$	204	0	0.41/93*	0	0	0	0
19.43	isopropyl-4-piperidone	$C_8H_{15}NO$	141	0	0	0	0	0.23	0
19.50	4,5-dimethyl-1,3-cyclopentanedione	$C_7H_{10}O_2$	126	0	0	0	0	0	0.37
19.77	1,1,9-trimethyl-5-methylidenespiro [5.5]undec-9-ene	$C_{15}H_{24}$	204	0	0.51/95*	0	0	0	0
20.38	nonan-2-one	$C_9H_{18}O$	142	0	0	0.41	0	0	0
20.75	azulene,1,2,3,5,6,7,8,8α-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1*S* (1.α.,7.α.,8α.β.)]-	$C_{15}H_{24}$	204	0	2.03/99*	0	0	0	0
21.03	2-methylpropanoic acid	$C_4H_8O_2$	88	0	0	0	0	33.17	15.41
21.07	8α-methyl-4-methylidene-6-propan-2-ylidene-2,3,4α,5,7,8-hexahydro-1*H*-naphthalene	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	0.30	0	0	0
21.69	[1*S*-(1. α.,4. α.,7. α)]-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1methylethenyl)-azulene	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	0	0	0.29	0
21.81	(4*Z*)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	0	0	0	2.19
21.92	methyl (*Z*)-*N*-hydroxybenzenecarboximidate	$C_8H_9NO_2$	151	0	0.31/83*	0	0	0	0
22.54	azulene	$C_{10}H_8$	204	0	0	1.51	0	0	0
22.61	2-phenylethyl acetate	$C_{10}H_{12}O_2$	164	0	0.9/83*	0	0	0	0

Table 3 (continued)

Retention time (min)	Possible compound	Molecular formula	M/z	% Total area					
				Blank	MH[a]	MA[b]	MC[c]	MM[d]	MO[d]
23.16	1-methyl-4-[(2*E*)-6-methylhepta-2,5-dien-2-yl]cyclohexene	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	0.94	0	0	0
23.76	2-methylbutanoic acid	$C_{15}H_{10}O_2$	102	0	0	0	0	1.10	0
24.72	2-phenylethanol	$C_8H_{10}O$	122	0	1.28/97*	0	0	0	0
24.75	azulene,1,2,3,5,6,7,8,8α-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1*S* (1.α.,7.α.,8α.β.)]-	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	0	0	1.01	0.44
25.20	1*H*-3α,7-methanoazulene, 2,3,4,7,8,8 α-hexahydro-3,6,8,8 tetramethyl-, [1*R*-(1.α., 4α.α., 8α.α.)]	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	3.63	0	0	0
25.30	2-methylpropanoic acid	$C_4H_8O_2$	88	0	0	6.08	0	0	0
25.72	3,7-dimethyl-1,6-octadiene	$C_{10}H_{18}$	138	0	0	0	0	0.05	0
26.04	(1*R*,4*E*,9*S*)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	0.48	0	0	0
26.45	phenol	C_6H_6O	94	1.80/95*	0	0	0	0	0
26.91	2-methyl-propanamide	C_4H_9NO	87	0	0	0	0	0.07	0
27.05	2-phenylethyl acetate	$C_{10}H_{12}O_2$	164	0	0	0	0	3.28	1.46
27.27	6-nitro-2-picoline	$C_6H_6N_2O_2$	138	0	0	0	0	0.12	0
27.42	(1*E*,5*E*)-1,4,4-trimethyl-8-methylidenecycloundeca-1,5-diene	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	0	3.23	0	0
27.55	naphthalene,1,2,4α,5,6,8α-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-,[1*R*-(1.α., 4α.α., 8α.α.)]	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	0.34	0	0	0
28.34	(*R*)-11-methylene-3,7,7-trimethylspiro[5.5]undec-2-ene	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	0.36	0	0	0
28.50	azulene,1,2,3,5,6,7,8,8α-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1*S* (1.α.,7.α.,8α.β.)]-	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	1.07	0	0	0
28.57	(2*R*)-8,8,8α-trimethyl-2-prop-1-en-2-yl-1,2,3,4,6,7-hexahydronaphthalene	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	3.24	0	0	0
30.18	azulene,1,2,3,5,6,7,8,8α-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1*S* (1.α.,7.α.,8α.β.)]-	$C_{15}H_{24}$	204	0	3.30/95*	0	0	0	0
30.89	azulene,1,2,3,5,6,7,8,8α-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1*S* (1.α.,7.α.,8α.β.)]-	$C_{15}H_{24}$	204	0	0	0	8.58	0	0
30.90	(3*R*,α *S*,α *R*)-α -methyl-5-methylidene-3-prop-1-en-2-yl-1,2,3,4,α ,6,7,8-octahydronaphthalene	$C_{15}H_{24}$	107	0	0	0	7.32	0	0
31.12	2-phenylethyl acetate	$C_{10}H_{12}O_2$	ND	0	0	1.74	0	0	0
31.72	2-(2-methyl-2-propenyl)-2-cyclohexane-1-one	ND	150	0	0	0	0	0.25	0
33.17	2-phenylethanol	$C_8H_{10}O$	122	0	0	1.06	0	0	0

The volatile metabolites produced by *M. heveae* (MH) and its closest phylogenetic species; *M. albus* cz620[1] (MA), *M. cinnamomi* (MC), *M. musae* (MM), and *M. oryzae* (MO) were identified by GC-MS. The results were reported with retention time (RT), possible compound (with IUPAC name), molecular formula, mass to charge ratio (M/z), % total area and % quality*. The data may be obtained from [a] this study or be taken from [b] Strobel (2011), [c] Suwannarach et al. (2010), and [d] Suwannarach et al. (2013a). The *red highlight* refers to the major composition in each profile of the volatile metabolites. Compounds presented in a control PDA plate are not included in this Table. The analysis for *M. heveae* was done in triplicate

used in this study was highly selective for the genus *Muscodor*. This was similar to a number of previous studies that used the same technique for isolation of volatile metabolite-producing endophytic fungi (Suwannarach et al. 2010; 2013a). Moreover, there was no contamination found during such isolations, suggesting that the volatile metabolites produced by either the reference strain and the emerging isolates exhibited strong and broad-spectrum antimicrobial activity. In addition, determining the distribution of volatile metabolite-producing endophytes in different plant tissues of rubber trees would be a further study to understand their spatial and temporal dynamics within the plant host.

In this study, we proposed a novel species, *M. heveae*, that has a phenotypic and phylogenetic relationship with the genus *Muscodor*, but showing a distinct morphology, genotype, and profile of volatile metabolites produced. The phylogenetic analysis based on partial sequences of 18S rDNA, ITS1-5.8-ITS2 rDNA was required for accurate genetic classification. These sequences have been demonstrated to be highly conserved regions of DNA and very useful in the classification of fungi (von der Schulenburg et al. 2001). The sequence data obtained on *Muscodor* indicated that it was a xylariaceous fungus with incomplete molecular identity to other fungi in family *Xylariacea* (Ezra et al. 2004). In addition, a high percent similarity (99-100 %) of ITS1-5.8-ITS2 rDNA sequences among several emerging species of the genus *Muscodor* was often found (Suwannarach et al. 2010; Kudalkar et al. 2011). However, the authors are still confident that their isolates could be proposed as a novel species. The most notable property of *Muscodor* was its ability to produce a mixture of volatile metabolites with antibiotic activity against variety of pathogenic fungi and bacteria (Ezra et al. 2004). Thus, detailed phenotypes of the isolates, volatile gas composition analysis and comparison with their closely related phylogenetic species are priority criteria for assigning their novelty. At the early stage, colony and mycelial characteristics are the only available phenotypes to identify the *Muscodor* species (Zhang et al. 2010). Subsequently, analysis and comparison of volatile metabolites produced by *Muscodor* isolates have been used as an important tool for their classification and novelty determination. Variation in the volatile metabolite profile is commonly found across member species of the genus *Muscodor*, but they often share the same major volatile components (Kudalkar et al. 2011; Suwannarach et al. 2013a). The volatile profiles (Table 3) of four *Muscodor* spp. have been compared with *M. heveae*. All species are prevalent in Thailand except *M. albus* cz620. However, previous reports have shown that there are many isolates of *M. albus* in local host plants in many countries (Ezra et al. 2004; Atmosukarto et al. 2005; Strobel et al. 2007; Banerjee et al. 2010). One such isolate is *M. albus* MFC2, which has been isolated from *Myristica fragrans* in Thailand and produced bulnesene, ledol, (−)-globulol and azulene derivatives as major volatiles (Sopalun et al. 2003). Variable profiles of volatile metabolites may be a result of a diversity factors, including the growing media and environment, and enzyme activity for biosynthesis of such metabolites by the test microbes (Morath et al. 2012). The bioactive volatile components for the genus *Muscodor* are 2-methylpropanoic acid, 3-methylbutyl acetate and 3-methylbutan-1-ol (Strobel 2006; Mitchell et al. 2010), which are in agreement to those detected in *M. heveae*.

In nature, *Muscodor* spp. live within host plants under symbiotic conditions, where they produce and expose their volatile metabolites into the surrounding environments of the host plants for preventing the invasion of pathogens (Mitchell et al. 2010; Zhang et al. 2010). A number of endophytes produce extremely biologically active compounds against pathogenic microbes (Yang et al. 1994). Thus, *Muscodor* spp. seem to be beneficial to the host by providing protection from plant pathogens. Such volatile metabolites are formed as a mixture, and not all volatile metabolites exhibit antimicrobial activity. However, applying the mixture of volatile metabolites for antimicrobial activity has been suggested to be more potent than using them individually (Strobel et al. 2001). The major volatile metabolites in the mixture are not always the bioactive ones, and this is different between either species or taxa. In the genus *Muscodor*, the major volatile antimicrobial metabolite is 2-methylpropanoic acid (Mitchell et al. 2010). This bioactive volatile metabolite has been found to be formed by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, but the most active compounds of its mixture of volatiles were 2-methyl-1-butanol and 3-methylbutan-1-ol (Fialho et al. 2011). Most pathogenic fungi in diverse economic plants were inhibited after exposure to the volatile metabolites produced by *Muscodor* isolates. The inhibitory mechanism on fungal growth indicate it is likely that volatile metabolites influence protein expression and the function of metabolic enzymes (Humphris et al. 2002; Fialho et al. 2011).

Since bioactive volatile metabolites are found in the genus *Muscodor*, they have been considered for uses in agricultural, medical and industrial applications (Strobel 2006). Biological control via volatile metabolite-producing fungi could be a sustainable alternative method to prevent plant diseases at the nursery and postharvest stages, with reduced used of chemical fungicides (Mercier and Manker 2005). Biological fumigation was a strategy for applying the volatile metabolite-producing fungi, which has been approved for controlling diverse postharvest infections caused by *Botrytis cinerea, Penicillium expansum,* and *Sclerotinia sclerotiorum* (Ramin et al. 2005). The applications of biological fumigation using the genus *Muscodor* for controlling root diseases has also been demonstrated (Worapong and Strobel 2009; Suwannarach et al. 2012). Based on the potent antimicrobial activity of the volatile metabolite-producing fungi that we observed, the *Muscodor* isolates could be used effectively for controlling infectious diseases in rubber trees. Further evaluation of the *Muscodor* isolates for their antimicrobial activity in applied biofumigation are required not only for agricultural aspects but also for medical and industrial relevance.

Acknowledgments This study was supported by grants from the Graduate School of Chiang Mai University, The Higher Education Commission, Thailand, under the National Research University (A1) program, Chiang Mai University, and Thailand Research Fund (RTA5580007). The authors wish to thank Dr. Rungroch Sungthong (Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla [IRNAS-CSIC], Seville, Spain) and Prof. Dr. Robert J. McGovern for valuable comments and English proofreading.

References

Atmosukarto I, Castillo U, Hess WM, Sears J, Strobel G (2005) Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. Plant Sci 169:854–861

Banerjee D, Strobel G, Geary B, Sears J, Ezra D, Liarzi O, Coombs J (2010) *Muscodor albus* strain GBA, an endophytic fungus of *Ginkgo biloba* from United States of America produces volatile antimicrobials. Mycology 1:179–186

Chaverri P, Gazis RO (2011) Linking *ex planta* fungi with their endophytic stages: *Perisporiopsis*, a common leaf litter and soil fungus, is a frequent endophyte of *Hevea* spp. and other plants. Fungal Ecol 4:94–102

Daisy B, Strobel G, Ezra D, Castillo U, Baird G, Hess WM (2002) *Muscodor vitigenus* anam. sp. nov., an endophyte from *Paullinia paullinioides*. Mycotaxon 84:39–50

Evueh GA, Ogbebor NO (2008) Use of phylloplane fungi as biocontrol agent against *Colletotrichum* leaf disease of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Afr J Biotechnol 7:2569–2572

Ezra D, Hess WM, Strobel GA (2004) New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. Microbiology 150:4023–4031

Fialho MB, Duarte de Moraes MH, Tremocoldi AR, Pascholati SF (2011) Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. Pesq Agrop Brasileira 46: 137–142

Gazis RO (2012) Evaluating the endophytic fungi community in planted and wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*). Dissertation, University of Maryland

Gazis R, Chaverri P (2010) Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. Fungal Ecol 3:240–254

González MC, Anaya AL, Glenn AE, Macías-Rubalcava ML, Hernández-Bautista BE, Hanlin RT (2009) *Muscodor yucatanensis*, a new endophytic ascomycete from Mexican chakah, *Bursera simaruba*. Mycotaxon 110:363–372

Huang Y, Wang J, Li G, Zheng Z, Su W (2001) Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. FEMS Immunol Med Microbiol 31:163–167

Humphris SN, Bruce A, Buultjens E, Wheatley RE (2002) The effects of volatile microbial secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. FEMS Microbiol Lett 210:215–219

Jayasuriya KE, Deacon JW (1995) *In vitro* interactions between *Rigidoporus lignosus*, the cause of white root disease of rubber and some potentially antagonistic fungi. J Rubb Res Inst Sri Lanka 76:36–54

Kudalkar P, Strobel G, Riyaz-Ul-Hassan S, Geary B, Sears J (2011) *Muscodor sutura*, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities. Mycoscience 53:319–325

Linos A, Steinbüchel A (2001) Biodegradation of natural and synthetic rubbers. In: Koyama T, Steinbüchel A (eds) Biopolymer 2, 1st edn. Wiley-VCH, Weinheim, pp 321–359

Mercier J, Manker DC (2005) Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodor albus*. Crop Prot 24:355–362

Meshram V, Kapoor N, Saxena S (2013) *Muscodor kashayum* sp. nov.–a new volatile antimicrobial producing endophytic fungus. Mycology 4:196–204

Mitchell AM, Strobel GA, Hess WM, Vargas PN, Ezra D (2008) *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. Fungal Divers 31:37–43

Mitchell AM, Strobel GA, Moore E, Robison R, Sears J (2010) Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. Microbiology 156:270–277

Morath SU, Hung R, Bennett JW (2012) Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. Fungal Biol Rev 26:73–83

Ramin AA, Braun PG, Prange RK, DeLong JM (2005) *In vitro* effects of *Muscodor albus* and three volatile components on growth of selected postharvest microorganisms. HortSci 40:2109–2114

Rocha ACS, Garcia D, Uetanabaro APT, Carneiro RTO, Araújo IS, Mattos CRR, Góes-Neto A (2010) Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. Fungal Divers 47:75–84

Saxena S, Meshram V, Kapoor N (2015) *Muscodor tigerii* sp. nov.-volatile antibiotic producing endophytic fungus from the northeastern Himalayas. Ann Microbiol 65:47–57

Sopalun K, Strobel GA, Hess WM, Worapong J (2003) A record of *Muscodor albus*, an endophyte from *Myristica fragrans* in Thailand. Mycotaxon 88:239–247

Stinson M, Ezra D, Hess WM, Sears J, Strobel G (2003) An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. Plant Sci 165:913–922

Strobel G (2006) Harnessing endophytes for industrial microbiology. Curr Opin Microbiol 9:240–244

Strobel G (2011) *Muscodor* species-endophytes with biological promise. Phytochem Rev 10:165–172

Strobel G, Daisy B (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol Mol Biol Rev 4:491–502

Strobel GA, Dirkse E, Sears J, Markworth C (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. Microbiology 147:2943–2950

Strobel GA, Kluck K, Hess WM, Sears J, Ezra D, Vargas PN (2007) *Muscodor albus* E-6, an endophyte of *Guazuma ulmifolia* making volatile antibiotics: isolation, characterization and experimental establishment in host plant. Microbiology 153:2613–2620

Suwannarach N, Bussaban B, Hyde KD, Lumyong S (2010) *Muscodor cinnamomi*, a new endophytic species from *Cinnamomum bejolghota*. Mycotaxon 114:15–23

Suwannarach N, Kumla J, Bussaban B, Lumyong S (2012) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* AG-2, the causal agent of damping-off by *Muscodor cinnamomi* CMU-Cib 461. World J Microbiol Biotechnol 28:3171–3177

Suwannarach N, Kumla J, Bussaban B, Hyde KD, Matsui K, Lumyong S (2013a) Molecular and morphological evidence support four new species in the genus *Muscodor* from northern Thailand. Ann Microbiol 63:1341–1351

Suwannarach N, Kumla J, Bussaban B, Nuangmek W, Matsui K, Lumyong S (2013b) Biofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit. Crop Prot 45:63–70

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725–2729

Tejesvi MV, Nalini MS, Mahesh B, Prakash HS, Kini KR, Shetty HS, Subbiah V (2007) New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. Bol Soc Quím Méx 1:19–26

Tomsheck AR, Strobel GA, Booth E, Geary B, Spakowicz D, Knighton B, Floerchinger C, Sears J, Liarzi O, Ezra D (2010) *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. Microb Ecol 60:903–914

van Beilen JB, Poirier Y (2007) Establishment of new crops for the production of natural rubber. Trends Biotechnol 25:522–529

von der Schulenburg JH, Hancock JM, Pagnamenta A, Sloggett JJ, Majerus ME, Hurst GD (2001) Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera; Coccinellidae). Mol Biol Evol 18:648–660

Worapong J, Strobel GA (2009) Biocontrol of a root rot of kale by *Muscodor albus* strain MFC2. Biol Control 54:301–306

Worapong J, Strobel GA, Ford EJ, Li JY, Baird G, Hess WM (2001) *Muscodor albus* anam. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. Mycotaxon 79:67–79

Yang X, Strobel GA, Stierle A, Hess WM, Lee J, Clardy J (1994) A fungal endophytes tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. Plant Sci 102:1–9

Zhang CL, Wang GP, Mao LJ, Komon-Zelazowska M, Yuan ZL, Lin FC, Druzhinina IS, Kubicek CP (2010) *Muscodor fengyangensis* sp. nov. from southeast China: morphology, physiology and production of volatile compounds. Fungal Biol 114:797–808

Mycorrhiza
DOI 10.1007/s00572-015-0672-1

ORIGINAL ARTICLE

The ectomycorrhizal status of a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, assessed using mycorrhizal synthesis and isotopic analysis

Jaturong Kumla[1] · **Erik A. Hobbie**[2] · **Nakarin Suwannarach**[1] · **Saisamorn Lumyong**[1]

Received: 6 May 2015 / Accepted: 30 November 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract *Phlebopus portentosus* is one of the most popular wild edible mushrooms in Thailand and can produce sporocarps in the culture without a host plant. However, it is still unclear whether *Phlebopus portentosus* is a saprotrophic, parasitic, or ectomycorrhizal (ECM) fungus. In this study, *Phlebopus portentosus* sporocarps were collected from northern Thailand and identified based on morphological and molecular characteristics. We combined mycorrhizal synthesis and stable isotopic analysis to investigate the trophic status of this fungus. In a greenhouse experiment, ECM-like structures were observed in *Pinus kesiya* at 1 year after inoculation with fungal mycelium, and the association of *Phlebopus portentosus* and other plant species showed superficial growth over the root surface. Fungus-colonized root tips were described morphologically and colonization confirmed by molecular methods. In stable isotope measurements, the $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ of natural samples of *Phlebopus portentosus* differed from saprotrophic fungi. Based on the isotopic patterns of *Phlebopus portentosus* and its ability to form ECM-like structures in greenhouse experiments, we conclude that *Phlebopus portentosus* could be an ECM fungus.

Keywords Edible bolete · Mycorrhizal synthesis · Stable isotope · Trophic status

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00572-015-0672-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Saisamorn Lumyong
saisamorn.l@cmu.ac.th

Jaturong Kumla
Jaturong_yai@hotmail.com

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2] Earth Systems Research Center, Morse Hall, University of New Hampshire, Durham, NH 03824, USA

Introduction

Ectomycorrhizal (ECM) fungi form a mutualistic relationship with roots, and these modified roots enhance nutrient and water uptake, increase tolerance to environmental stresses, promote plant growth, and protect against pathogens (Brundrett et al. 1996, 2004; Chung et al. 2002; Dell 2002). Probably between 20,000 and 25,000 species of ECM fungi exist, and about 2500 recorded species are considered to be edible (Taylor and Alexander 2005; Rinaldi et al. 2008; Tedersoo et al. 2010). Whether viable ECM associations between fungi and host plants can form has traditionally been determined by inoculating fungi onto potential hosts in the field or in the laboratory and demonstrating the necessary exchange of carbohydrates and nutrients (Brundrett et al. 1996; Dell 2002; Tedersoo et al. 2010). However, mycorrhizal resynthesis trials require that the putative ECM fungus be isolated into pure culture. Unfortunately, conditions required for culturing a significant number of ECM fungal species have not been identified. Moreover, whether a fungus–plant pairing results in the formation of an ECM association may change depending on experimental conditions (Rinaldi et al. 2008; Tedersoo et al. 2010).

In ecosystems, ECM fungi and saprotrophic fungi often acquire carbon and nitrogen from different sources which may differ in the natural abundance ratios of the heavy and light isotopes of carbon ($^{13}C/^{12}C$) and nitrogen ($^{15}N/^{14}N$). The carbon sources of ECM fungi are primarily plant sugars whereas saprotrophic fungi primarily assimilate carbon from complex carbohydrates that are in wood or litter (Gebauer and Taylor 1999; Hobbie et al. 1999, 2001; Kohzu et al. 1999). ECM fungi can assimilate inorganic and organic nitrogen from soil and

Published online: 15 December 2015

transfer the nitrogen to their host plant, but saprotrophic fungi acquire nitrogen directly from their growing substrates (wood or litter) and do not transfer this nitrogen to plants (Hobbie et al. 1999, 2001; Kohzu et al. 1999; Taylor et al. 2003; Hobbie et al. 2005). In general, stable carbon and nitrogen isotope ratios (expressed as $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values) in ECM are usually, but not always, lower in $\delta^{13}C$ and higher in $\delta^{15}N$ than in saprotrophic fungi (Gebauer and Taylor 1999; Hobbie 2005; Hobbie et al. 1999, 2001, 2006; Kohzu et al. 1999; Henn and Chapela 2001; Taylor et al. 2003; Mayor et al. 2009; Seitzman et al. 2011; Hou et al. 2012). Therefore, patterns in stable carbon and nitrogen isotope values can be used to assign fungal trophic status in taxa where status is uncertain (Hobbie et al. 2001; Wilson et al. 2007; Mayor et al. 2009; Hou et al. 2012).

The tropical black bolete, *Phlebopus portentosus* (Berk. & Broome) Boedijn, is a fleshy pored edible mushroom which is distributed in Asia (China, Indonesia, Laos, Malaysia, Myanmar, Sri Lanka, Thailand, and Vietnam) and Australasia (Australia and New Zealand) (McKenzie et al. 2000; Watling 2001; Sanmee et al. 2010; Ji et al. 2011). The sporocarp of this fungus contains high concentrations of protein and is considered a delicacy in northern and northeastern Thailand, southern China, Laos, and Myanmar (Sanmee et al. 2003; Zhang et al. 2010). The local northern Thai names are "Hed Har" or "Hed Tub Tao Dam." In northern Thailand, *Phlebopus portentosus* produces sporocarps at the end of the hot season until the early wet season (May–July) and sometimes produces a second flush at the end of the wet season (October). In field observation, this fungus associated with a range of trees species such as *Arachis duranensis* Krapov. & W.C. Gregory, *Coffea arabica* Linn., *Dimocarpus longan* Lour., *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz., *Mangifera indica* Linn., *Mimosa pigra* Linn., *Quercus* spp., *Salix tetrasperma* Roxb., and *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels (Lei et al. 2009; Sanmee et al. 2010; Ji et al. 2011; Mortimer et al. 2012; Zhang et al. 2015). *Phlebopus portentosus* is currently placed within the family *Boletinellaceae* of the order *Boletales* (Binder and Hibbett 2006). This family is known to contain both saprotrophic and ECM species (Singer 1986; Brundrett and Kendrick 1987; Kirk et al. 2008; Nouhra et al. 2008). In culture, this fungus successfully produced mature sporocarps without a host plant (Lumyong et al. 2007; Sanmee et al. 2010; Ji et al. 2011; Kumla et al. 2012, 2015). In addition, anecdotal evidence suggests that *Phlebopus portentosus* may sometimes be parasitic, as cultivators of Thai longan (*D. longan*) orchards have reported that dieback of longan trees was caused by sporocarp production. The immediate cause of the dieback was a parasitic mealybug, *Paraputo banzigeri*, which fed on longan roots and colonized the mycelium that surrounded the root near sporocarps of *Phlebopus portentosus* (Stone and Schönrogge 2003; Williams 2004; Lumyong et al. 2007). Lumyong et al. (2007) and Sanmee et al. (2010) reported that *Phlebopus portentosus* may be an ECM fungus based on in vivo mycorrhizal synthesis tests between *Phlebopus portentosus* and *Pinus kesiya*. In contrast, *Phlebopus portentosus* has also been suggested to be saprotrophic because mycorrhizal structures were absent in field investigations between the fungus and the putative host trees and also not formed in in vitro mycorrhizal synthesis trials, although the mycelium of this fungus was found growing on the root surface of *Pinus kesiya* var. *langbianensis* (Ji et al. 2009, 2011; Zhang et al. 2015). Currently, it is unclear whether *Phlebopus portentosus* is saprotrophic or ECM. Therefore, the purpose of this study was to investigate the ECM status of *Phlebopus portentosus* through a mycorrhizal synthesis experiment in the greenhouse and by comparing stable carbon and nitrogen isotope ratios of *Phlebopus portentosus* sporocarps with plant foliage, litter, soil, and sporocarps of known saprotrophic fungi and ECM fungi. We also investigated the isotopic composition of *Phlebopus portentosus* sporocarps relative to its carbon and nitrogen sources by culturing it asymbiotically.

Materials and methods

Collection and identification of *Phlebopus portentosus*

Phlepobus portentosus were surveyed and collected from their natural habitats in Chiang Mai, Chiang Rai, and Lamphun Provinces, northern Thailand, in 2008–2012 (Table 1). Specimens were transported to the laboratory where notes on morphological features and photographs were taken within 24 h and dried at 40–45 °C in a commercial food dryer. Dried specimens were placed in a desiccator overnight, placed in zip-lock plastic bags, and stored in plastic boxes containing silica gel for long-term herbarium storage at room temperature (25±2 °C) to avoid degeneration of tissue and DNA. All specimens were deposited at the Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources, Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand (SDBR-CMU).

The collected sporocarps of *Phlebopus portentosus* were identified based on morphological characteristics (Heinemann and Rammeloo 1982; Singer et al. 1983) and a molecular analysis of the DNA of dried specimen extracted through a modified CTAB method (Den et al. 2004). The internal transcribed spacer (ITS) regions of the ribosomal RNA gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with ITS4 and ITS5 primers (White et al. 1990). Amplification was under the following thermal conditions: 94 °C for 2 min; 35 cycles of 95 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min; and 72 °C for 10 min. PCR products were checked on 1.5 % agarose gels stained with ethidium bromide under UV light and purified using PCR cleanup Gel Extraction NucleoSpin® Extract II Purification Kit

Table 1 Origin, associated plant, collection date, GenBank number of ITS sequence, and carbon and nitrogen isotopes of *Phlebopus portentosus* sporocarps in this study

Fungal strain	Origin	Associated plant	Collection date[a]	GenBank no.	$\delta^{15}N$ (‰)	$\delta^{13}C$ (‰)
CMU51-110-1	Wiang Pa Pao, CR	*Elaeocarpus hygrophilus*	12/6/2008	JQ623510	5.0	−23.4
CMU51-210-2	Phrao, CM	*Mangifera indica*	7/5/2008	HQ687224	7.5	−25.5
CMU51-241-1	San Pa Thong, CM	*Syzygium cumini*	10/5/2008	HQ687223	4.5	−24.2
CMU51-251-1	Doi Saket, CM	*Syzygium cumini*	14/6/2008	JQ695908	3.8	−24.4
CMU51-261-1	San Sai, CM	*Dimocarpus longan*	20/5/2008	JQ695904	5.4	−24.6
CMU51-271-1	Mueang, CM	*Barringtonia acutangula*	28/6/2008	JQ623508	4.9	−26.2
CMU51-271-2	Mueang, CM	*Barringtonia acutangula*	28/6/2008	JQ695903	4.7	−25.7
CMU51-281-1	Lee, LP	*Dimocarpus longan*	10/6/2008	JQ695907	7.0	−24.4
CMU51-320-2	Mae Tha, LP	*Dimocarpus longan*	10/5/2008	HQ687218	6.9	−26.0
CMU52-320-1	Lee, LP	*Dimocarpus longan*	14/7/2009	KF768404	4.1	−24.2
CMU52-320-2	Lee, LP	*Dimocarpus longan*	14/7/2009	KF768405	4.9	−23.5
CMU55-271-1	Mueang, CM	*Quercus* sp.	25/7/2012	KF768407	7.9	−26.0

CM Chiang Mai Province, *CR* Chiang Rai Province, *LP* Lamphun Province

[a] Date format is date/month/year

(Macherey-Nagel, Germany). The purified PCR products were directly sequenced. Sequencing reactions were performed and the sequences were automatically determined in the genetic analyzer at 1st Base Company (Kembangan, Malaysia) using the PCR primers mentioned above. For the phylogenetic analysis, we used the multiple alignment subroutine in Clustal X (Thomson et al. 1997) and constructed a phylogenetic tree using PAUP beta 10 software version 4.0 (Swofford 2002). In maximum parsimony analysis, all characters were equally weighted and gaps were treated as missing data. Heuristic searches with 100 random-addition sequence replicates and tree-bisection reconnection branch swapping were performed. Bootstrap analysis was conducted with 1000 replicates using the same settings as above (Felsenstein 1985). The parsimony tree scores, including tree length and consistency, retention, rescaled consistency, and homoplasy indices (CI, RI, RC, and HI), also were calculated. Moreover, amplification of ITS regions using the fungal primer, ITS1F (Gardes and Bruns 1993) and the *Phlebopus portentosus*-specific primer, HAR2A (Sanmee et al. 2010) in combination was tested under these thermal conditions: 94 °C for 2 min; 35 cycles of 94 °C for 30 s, 62 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min; and a cycle of 72 °C for 5 min.

Evaluation of ECM status of *Phlebopus portentosus* by mycorrhizal synthesis

Fungal strain

Pure culture of *Phlebopus portentosus* CMU51-320-2 isolated from a sporocarp collected from field during this study (Table 1) was used in this experiment. The fungus was cultivated on fungal-host (FH) agar (Vaario et al. 2000). The composition of this medium was KNO_3 2.5 g, $(NH_4)H_2PO_4$ 0.3 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0.2 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 15 mg, $Na_2EDTA \cdot H_2O$ 20 mg, H_3BO_3 0.5 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1 mg, $Na_2Mo_4 \cdot 2H_2O$ 0.01 mg, KI 0.1 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02 mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01 mg, charcoal 0.3 g, myo-inositol 100 mg, thiamine HCl 5 mg, nicotinic acid 5 mg, pyridoxine HCI 0.5 mg, glucose 10 g, agar 15 g, and distilled water 1000 ml, pH 5.6. Pure fungus was deposited in the Culture Collection of SDBR-CMU as ID number SDBR-CMU51-320-2. This strain was used in this study because it produced mature sporocarps in artificial substrates without host plants (Kumla et al. 2012, 2015).

Mycelial inoculum preparation

A 50-ml volume of mixed peat/vermiculite (1:9, *v*/*v*) was placed in a 200-ml glass bottle, after which 35 ml of FH liquid medium, pH 4.0, was added and then the mixture was autoclaved at 121 °C for 30 min. After cooling, three mycelial plugs (5 mm diameter) of strain CMU51-320-2 from the periphery of a 3-week-old growing colony on FH agar were transferred to the glass bottle and incubated at 30 °C in darkness. After 1 month, the fungal mycelium completely covered the surface and was used as an inoculum for the mycorrhizal synthesis experiment.

Plant seedlings

Six seedlings of selected plant species *Castanopsis tribuloides* (Smith) A. DC. (ECM plant), *D. longan* Lour. (arbuscular mycorrhizal (AM) plant), *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz. (AM plant), *Mangifera indica* Linn. (AM plant), *Pinus kesiya* Royle ex Gordon (ECM plant), and *Syzygium cumini* (Linn.)

Skeels (AM plant) were tested. All selected plants are trees associated with *Phlebopus portentosus* in nature (Sanmee et al. 2010; Ji et al. 2011; Mortimer et al. 2012; Zhang et al. 2015). Plant seeds were obtained from the Forest Restoration Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University. All seeds were washed three times in sterilized 0.01 % Tween-80 solution using a vortex mixer, surface-sterilized in 1.0 % sodium hypochlorite solution for 10 min, and rinsed three times with sterilized distilled water. The sterile seeds were set into plastic pots (11 cm high and 15 cm wide) containing a sterile peat/vermiculite (1:1, *v*/*v*) mixture, and pots were placed in a greenhouse at the Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University. Pots were watered every other day.

Mycorrhizal synthesis

Three plants of 2-month-old seedlings were transplanted into the potting mix in plastic pots (30.5 cm diameter × 30 cm height) that was lined inside with a new plastic bag with drainage holes at the bottom. A peat/vermiculite/soil mixture (1:9:10, *v*/*v*/*v*), pH 6.5–6.8, was used as the main planting material. Mycelial inoculum was rinsed three times with sterile distilled water to remove excess sugars and nutrients before use. The 30 ml of inoculum was placed around the roots after transplanting. There were ten replicate pots per each plant species. Pots were placed on raised benches in a greenhouse. Pots were hand-watered every other day.

Morphological and molecular characterization of the fungal colonized root

Fungal colonization was investigated every 2 months after inoculation for 3 years. The plant roots of each plant were sampled to assess mycorrhizal development under a stereomicroscope (Olympus TL3, Japan). Morphological characteristics of ten fungal-colonized roots were examined under a light microscope (Olympus CX51, Japan) following Agerer (1991, 2006). The presence of an ECM mantle and Hartig net was assessed on handmade sections of root tips mounted in 3 % KOH or 1 % Congo red. For molecular analysis, fungus-colonized roots were washed three times with sterilized water. Genomic DNA was extracted from single fungus-colonized root tips as described by Paolocci et al. (1999) using the Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturers' protocols. The ITS regions of the rDNA of the fungal symbiont were amplified by PCR with ITS1F and HAR2A primers under the thermal conditions as mentioned above. Negative controls lacking fungal DNA were run for each experiment to check for contamination of the reagents. PCR products were checked on 1.5 % agarose gels stained with ethidium bromide under UV light.

Evaluation of ECM status of *Phlebopus portentosus* by isotopic analysis

Sample collection

Samples of ECM and saprotrophic fungi were surveyed and collected from Chiang Mai, Chiang Rai, and Lamphun Provinces, northern Thailand, in 2011–2013 (Table 2). At the SDBR Laboratory, morphological features of fungal sporocarps were recorded and the sporocarps tentatively identified to genus and species. Samples of foliage of dominant trees (*Betula alnoides* Buch.-Ham. ex G.Don, *Castanopsis acuminatissima* (Blume) A.DC., and *Cinchona pubescens* Vahl.), surface soil (top 5 cm), and litter were collected in Chiang Mai Province in 2012. All samples of fungal sporocarps, foliage, litter, and soil were then dried at 40–45 °C. Dried specimens were placed in a desiccator overnight, placed in zip-lock plastic bags, and stored in plastic boxes containing silica gel.

Isotopic analysis

The isotopic analysis in this study followed the methods described in Hobbie et al. (2001). A total of 44 sporocarp samples (20 samples of ECM fungi, 12 samples of *Phlebopus portentosus* from natural habitat, and 12 samples of saprotrophic fungi) were used. Dried fungal samples were ground to a fine powder using a mortar and pestle. Two milligrams of each sample was used for analysis. Sporocarps of *Phlebopus portentosus* CMU51-320-2 from asymbiotic cultures were also analyzed. All samples were analyzed for stable carbon and nitrogen isotopes at the University of New Hampshire Stable Isotope Laboratory by continuous flow with a Costech ECS4010 elemental analyzer (Costech Analytical Technologies Inc., USA) coupled with a $DELTA_{plus}$ XP isotope ratio mass spectrometer (Thermo Scientific, Germany). Stable isotope abundances are reported as $\delta^{15}N$ or $\delta^{13}C$ (‰)=$(R_{sample}/R_{standard}-1)\times 1000$, where R is the ratio $^{13}C/^{12}C$ or $^{15}N/^{14}N$. All $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values were normalized on VPDB ($\delta^{13}C$) and AIR ($\delta^{15}N$) reference scales with laboratory working standards of NIST 1515 (apple leaves), NIST 1575a (pine needles), and tuna muscle, as well as an internal *Boletus* standard. The mean and standard deviation of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ values of each sample groups were plotted in Excel 2007 to view the differences between groups.

Results

Collection and identification of *Phlebopus portentosus*

Twelve samples of *Phlebopus portentosus* were collected in this study (Table 1). Morphology of the specimens agreed well

Table 2 List of collected ECM fungi, saprotrophic fungi, carbon isotope composition, and nitrogen isotope composition analyzed by isotope ratio mass spectrometry

Fungal taxa	Strain	Origin	$\delta^{15}N$ (‰)	$\delta^{13}C$ (‰)
Ectomycorrhizal fungi				
Amanita fritillaria	CMU56-E73	CM	11.0	−24.2
Amanita hemibapha	CMU55-E64	CM	10.1	−24.1
Amanita princes	CMU52-E65	LP	8.3	−24.7
Amanita subglobosa	CMU55-E36	CM	8.4	−25.5
Amanita sculpta	CMU55-E73	CM	11.0	−24.5
Astraeus odoratus	CMU54-E66	CM	9.2	−23.8
Boletellus emodensis	CMU55-E29	CM	9.6	−25.1
Boletus regius	CMU56-E15	CM	9.5	−24.8
Laccaria vinaceoavellanea	CMU56-E18	CM	4.2	−25.7
Phylloporus rubiginosus	CMU56-E27	CM	6.3	−27.4
Pisolithus albus	CMU54-E72	CM	6.1	−25.4
Pisolithus orientalis	CMU54-E72	CM	9.6	−25.1
Russula alboareolata	CMU55-EP13	CM	4.8	−23.2
Russula emetica	CMU55-E10	CM	11.3	−24.8
Russula virescens	CMU56-E70	CM	9.8	−25.1
Strobilomyces floccopus	CMU55-E01	CM	6.1	−26.0
Suillus intermedius	CMU55-E31	CM	10.9	−25.1
Scleroderma suthepense	CMU55-E02	CM	9.2	−27.7
Strobilomyces floccopus	CMU55-E01	CM	6.1	−26.0
Tylopilus vinosobrunneus	CMU55-E08	CM	5.5	−27.6
Saprotrophic fungi				
Auricularia auricula	CMU55-S29	CM	−0.4	−24.2
Auricularia delicata	CMU55-S12	CM	−0.3	−23.6
Cyptotrama asprata	CMU56-SP7	CM	−2.0	−23.5
Favolaschia calocera	CMU55-S6	CM	−0.4	−24.7
Filoboletus manipularis	CMU56-S35	CM	0.4	−22.4
Lentinus velutinus	CMU56-S30	LP	1.2	−23.8
Lycoperdon sp.	CMU56-S5	CM	1.2	−23.9
Marasmius haematocephalus	CMU54-S18	CM	1.1	−24.2
Marasmius purpureostriatus	CMU54-S23	CM	0.8	−24.0
Morganella purpurascens	CMU55-LY1	CM	−0.5	−24.8
Piptoporus soloniensis	CMU55-S27	CM	1.4	−23.2
Xylaria hypoxylon	CMU55-S32	CM	2.6	−20.2

CM Chiang, *CR* Chiang Rai Province, *LP* Lamphun Province

with the morphological taxonomic concept of *Phlebopus portentosus* (Heinemann and Rammeloo 1982; Singer et al. 1983; Lei et al. 2009). The ITS regions from rDNA sequence analyses of 12 specimens of *Phlebopus portentosus* were obtained and deposited in the GenBank database (Table 1). All sequences were analyzed phylogenetically and clustered with sequences of *Phlebopus portentosus* from the GenBank which are placed within the family *Boletinellaceae* of the order *Boletales* (Binder and Hibbett 2006; Wilson et al. 2011). Moreover, the amplification of all specimens by the *Phlebopus portentosus*-specific primers showed positive bands with product size of about 550 bp. Therefore, this result confirmed that all collected specimens in this study were *Phlebopus portentosus*.

Evaluation of ECM status of *Phlebopus portentosus* by mycorrhizal synthesis

Morphological and molecular characterization of the fungal colonized root

Six selected hosts, *Castanopsis tribuloides*, *D. longan*, *Elaeocarpus hygrophilus*, *Mangifera indica*, *Pinus kesiya*, and *Syzygium cumini* were tested for colonization by

Phlebopus portentosus strain CMU51-320-2. Under the conditions we employed for mycorrhizal synthesis, colonized root tips were first observed on *Pinus kesiya* at 1 year after inoculation, while no colonization was observed in the uninoculated pine control. The colonized roots were forked and dichotomously branched, 1.5–5.0 mm in length, and 0.3–1.0 mm in diameter (Fig. 1a, b). Rhizomorphs and sclerotia were absent. The color of colonized roots varied at different development stages, light yellow when young and then becoming pale yellow and yellow brown when older. The emanating hyphae were hyaline, 2.0–3.0 μm in diameter and with clamp connections. Cystidia were absent. The outer and inner mantle layers were plectenchymatous and consisted of hyphae 2.5–5.0 μm in diameter, arranged net-like, repeatedly and squarrosely branched, and therefore classified as E type according to the classification of Agerer (1991, 2006) (Fig. 1c). A cross-section of colonized roots showed a 20–30-μm-thick mantle arranged in four to six cell layers, a Hartig net that extended from the epidermal cells to the outer cortex (Fig. 1d), and thus we tentatively consider it an ECM association.

Colonized root tips of *Elaeocarpus hygrophilus* were first observed at 1 year after inoculation. No colonization was observed in the uninoculated control. Fungus-colonized roots were short, partly curved, and somewhat thickened, 0.5–1.5 mm in length, and 0.5–1.0 mm in diameter (Figs. 1e, f). Rhizomorphs were found and sclerotia were absent. The color

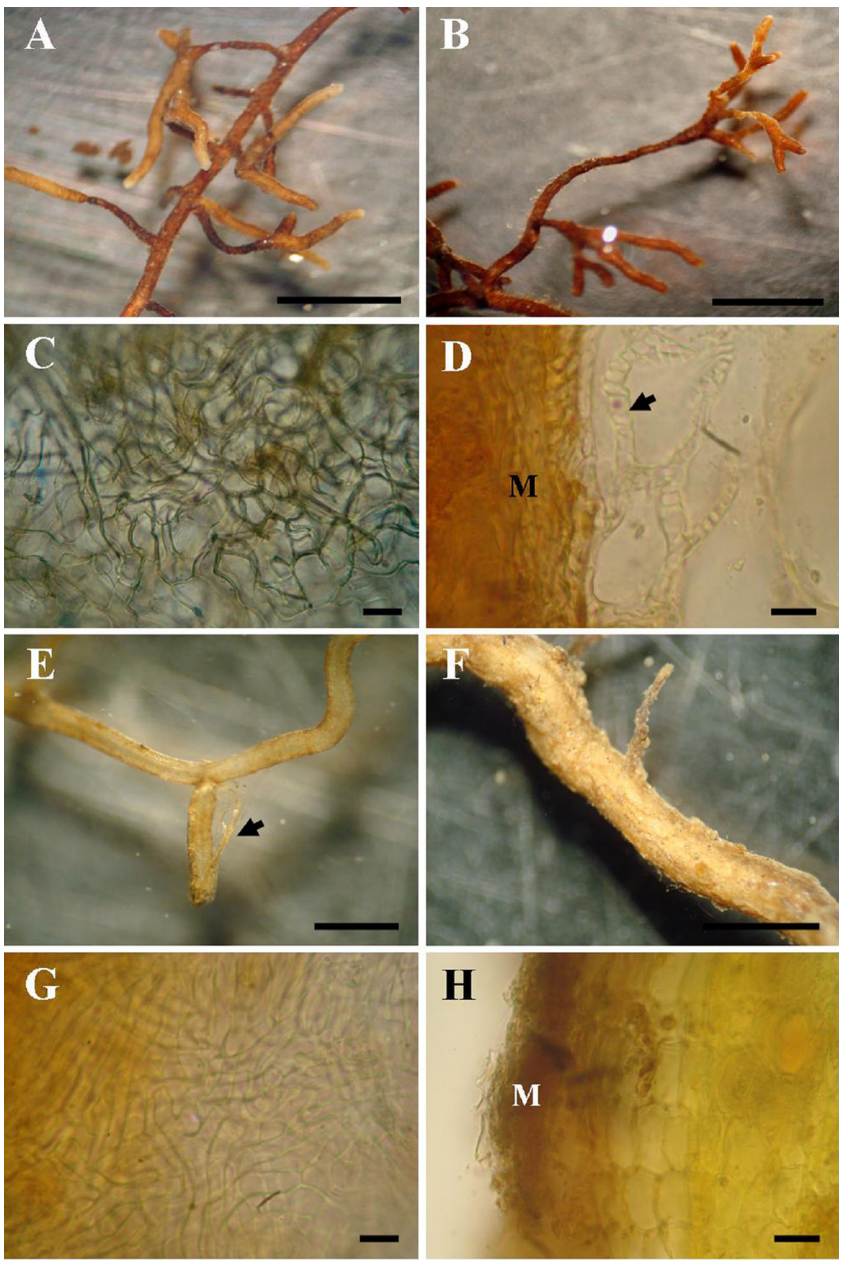


Fig. 1 Morphological characteristic of the colonized root of *Phlebopus portentosus* isolate CMU51-320-2 with *Pinus kesiya* (**a**–**d**) and *Elaeocarpus hygrophilus* (**e**–**h**). **a**, **b** Colonized root systems. **c** The outer mantle layer. **d** Cross section of colonized root showing mantle sheath (*M*) and Harting net (*arrow*). **e**, **f** Colonized root systems and rhizomorphs (*arrow*). **g** The outer mantle layer. **h** Cross section of colonized root showing mantle sheath (*M*). *Black bar*: **a**, **b**=5 mm, **c**, **d**=10 μm, **e**, **f**=1 mm, **g**, **h**=5 μm

varied with different development stages: pale yellow to yellow brown when young then becoming brown when older. The enveloping hyphae were hyaline, 2.0–3.0 μm in diameter and with clamp connections. Cystidia were absent. Outer and inner mantle layers were plectenchymatous consisting of hyphae 2.5–5.0 μm in diameter, arranged net-like, repeatedly and squarrosely branched, and therefore classified as E type (Fig. 1g). A cross section of colonized roots showed a 10–15-μm-thick mantle arranged in two to four cell layers, a Hartig net was not observed (Fig. 1h), and thus not all of the morphological features of ECM associations were present.

A mantle and Hartig net were not observed in *Castanopsis tribuloides*, *D. longan*, *Mangifera indica*, and *Syzygium cumini* inoculated with of strain CMU51-320-2 after 3 years. However, fungal hyphae with clamp connections were found on the root surface of each plant.

Molecular analysis confirmed the presence of *Phlebopus portentosus* in colonized roots and in roots presented with fungal mycelia; these fungi produced 550-bp PCR products with specific primers; PCR products were also 550 bp in the positive control (the sporocarp collected from the field and pure culture of strain CMU51-320-2) (Fig. 2). Therefore, this experiment confirmed that strain CMU51-320-2 was able to colonize *Pinus kesiya*. The association was limited to superficial growth over the root surface for the other plant species in this study.

Evaluation of ECM status of *Phlebopus portentosus* by isotopic analysis

The stable carbon and nitrogen isotopic values of samples are shown in Tables 1 and 2. The $\delta^{13}C$ values of ECM fungi ranged from −27.7 to −23.2‰ and the $\delta^{15}N$ values ranged from 4.2 to 11.0‰. The $\delta^{13}C$ values of saprotrophic fungi ranged from −24.8 to −20.2‰ and the $\delta^{15}N$ values of ranged from −0.5 to 2.6‰. The $\delta^{13}C$ values of *Phlebopus portentosus* collected from natural habitat ranged from −26.2 to −23.4‰ and the $\delta^{15}N$ values of ranged from 3.8 to 7.9‰. The average $\delta^{13}C$ of ECM fungi (−25.3±1.2‰) and *Phlebopus portentosus* (−24.9±1.0‰) was lower than that of saprotrophic fungi (−23.5±1.2‰, Table 3). The average $\delta^{15}N$ of ECM fungi (8.4±2.3‰) was higher than that of *Phlebopus portentosus* (5.5±1.4‰), whereas both were higher than that of saprotrophic fungi (0.4±1.1 %). The mean value of stable carbon and nitrogen isotopes for all material groups are plotted and shown in Fig. 3. The stable carbon and nitrogen isotope compositions of cultured *Phlebopus portentosus* were 3.0 and 1.3‰ higher in $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$, respectively, relative to its cultured substrate (sorghum grain supplemented with FH solution; Kumla et al. 2012) (Table 3).

Discussion

In prior field investigations of the association between *Phlebopus* species and plants, a mantle was present but the Hartig net was absent; therefore, it is not certain that *Phlebopus* is ECM (Watling 2006; Ji et al. 2009; Tedersoo et al. 2010). The association of *Phlebopus beniensis* with *Hymenaea courbaril* and *Phlebopus marginatus* with *Eucalyptus* spp. was recorded as ECM without any definitive evidence (Burgess et al. 1994; Miller et al. 2000). In contrast, *Phlebopus* species have successfully formed ECM with exotic plants in vitro and in greenhouse trials. Recently, Pham et al. (2012) investigated citrus (*Citrus maxima*) roots colonized by *Phlebopus spongiosus* in the field and found a mantle and Hartig net, although the Hartig net was very rare. Thoen and Ducouso (1989) reported that *Phlebopus sudanicus* formed ECM with *Acacia* spp. in vitro that included both a mantle and well-developed Hartig net. In our study, *Phlebopus*

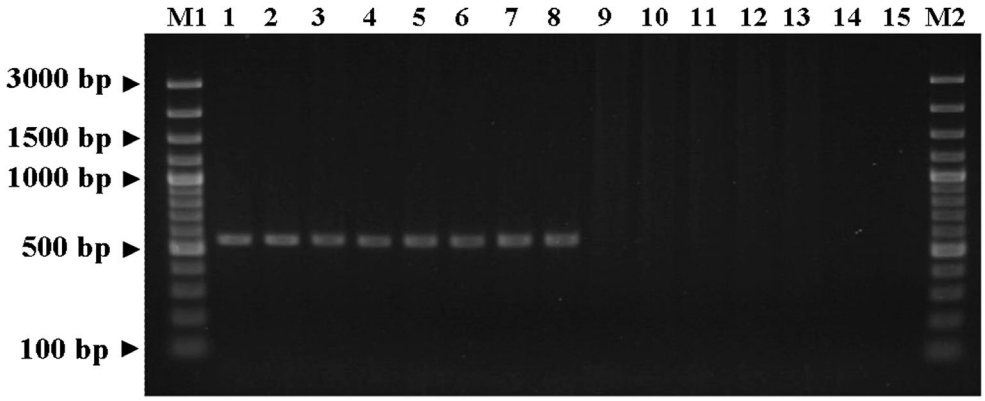


Fig. 2 PCR amplification using ITS1F and HAR2A primers of colonized root and root presented with fungal mycelia of *Phlebopus portentosus* CMU51-320-2. *Lane 1*: Sporocarp collected from field. *Lane 2*: Pure culture. *Lane 3*: Colonized root of *Pinus kesiya*. *Lane 4*: Colonized root of *Elaeocarpus hygrophilus*. *Lanes 5–8*: Root in the inoculation trial of *Castanopsis tribuloides*, *Dimocarpus longan*, and *Mangifera indica*, and *Syzygium cumini*, respectively. *Lanes 9–14*: Root in the uninoculated trial of *Pinus kesiya*, *Elaeocarpus hygrophilus*, *Castanopsis tribuloides*, *Dimocarpus longan*, *Mangifera indica*, and *Syzygium cumini*, respectively. *Lane 15*: Negative control. Lanes M1 and M2: DNA ladder

Table 3 Means and standard deviations of carbon and nitrogen concentrations and isotopic measurements

Group (*n*)	δ^{15}N (‰)	%N	δ^{13}C (‰)	%C	C/N
Litter (*n*=3)	−0.9±0.3	1.0±0.3	−30.3±1.9	47.0±1.4	47.0±9.4
Plant foliage (*n*=3)	0.8±0.9	2.0±0.2	−31.6±2.0	50.1±1.7	24.5±2.0
Soil (*n*=3)	4.2±0.9	0.2±0.0	−24.7±2.4	3.2±0.2	15.3±0.7
Cultured substrate of *Phlebopus portentosus* (*n*=3)	5.2±0.2	1.2±0.1	−12.1±0.3	45.0±0.3	36.6±1.6
Cultured sporocarp of *Phlebopus portentosus* (*n*=5)	6.5±0.5	4.1±0.3	−9.1±0.2	42.0±1.0	10.3±1.1
Fungi in natural habitat					
Ectomycorrhizal fungi (*n*=20)	8.4±2.3	5.0±1.4	−25.3±1.2	42.5±1.9	9.6±3.2
Phlebopus portentosus (*n*=12)	5.5±1.4	4.8±1.3	−24.9±1.0	40.8±1.6	9.1±2.6
Saprotrophic fungi (*n*=12)	0.4±1.1	5.2±1.6	−23.5±1.2	42.5±2.0	9.2±3.4

portentosus strain CMU51-320-2 2 formed ECM-like structures on root of *Pinus kesiya* and *Elaeocarpus hygrophilus* after inoculation with fungal mycelia under greenhouse conditions. However, ECM-like structures did not form in *Castanopsis tribuloides*, *D. longan*, *Elaeocarpus hygrophilus*, *Mangifera indica*, and *Syzygium cumini*, although mycelium of *Phlebopus portentosus* did grow along the root surface. This result agrees with Sanmee et al. (2010) who reported that *Phlebopus portentosus* strain WPPH2 could form ECM-like structures with *Pinus kesiya*. Moreover, previous studies reported that mycelia of *Phlebopus portentosus* strain CMU2210 could grow on the root surface of *Elaeocarpus hygrophilus* (Thongklang et al. 2010) and that *Phlebopus portentosus* strain H-01-31 could grow on the root surfaces of *Artocarpus heterophyllus*, *Coffea arabica*, *Citrus grandis*, *Mangifera indica*, and *Pinus kesiya* var. *langbianensis* in greenhouse trials, but ectomycorrhizae did not form (Ji et al. 2009, 2011; Zhang et al. 2015). However, *Phlebopus portentosus* has never been reported in natural vegetation and plantations of *Pinus kesiya*. This contrast between field observations and inoculation experiments may result from ecological specificity. The interactions of fungus and plant may be less constrained under culture conditions than in natural conditions because culture conditions could limit competition from indigenous fungi (Harley and Smith 1983; Molina et al. 1992; Yamanaka et al. 2014). Moreover, ECM formation is also affected by other biotic and abiotic factors, including interactions among plants, between plants and fungi, among closely related ECM fungal strains, and between ECM fungi and rhizosphere microorganisms (Brundrett et al. 1996; Repác 2007; Pruett et al. 2009; Bahram et al. 2011; Pereira et al. 2014). The understanding of biotic and abiotic factors that involve the ECM association of *Phlebopus portentosus* in the field may be useful for successful mycorrhization in this study.

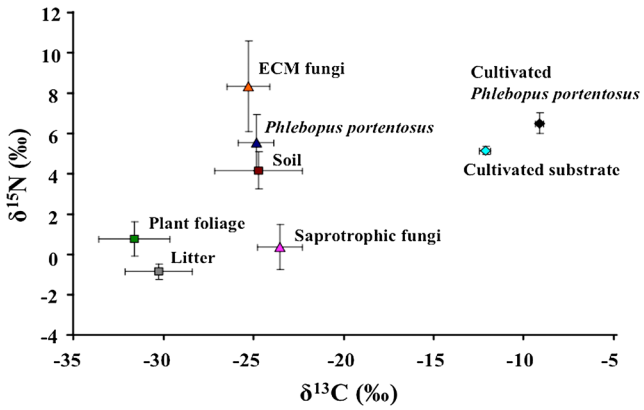


Fig. 3 Pattern of δ^{13}C and δ^{15}N in the material of this study. The mean values for each material are plotted and *error bars* indicate the standard deviations of each point

In this study, mycelia of *Phlebopus portentosus* enveloped the root surfaces on *Elaeocarpus hygrophilus* and formed a mantle but not a Hartig net. It was presumably as a presymbiosis stage in the development of the ECM association that fungal hyphae proliferated on the root surface and differentiated to form the mantle before intercellular penetration (Brundrett et al. 1996, 2004; Brundrett and Kendrick 1987; Peterson et al. 2004). Similar hyphal sheaths were formed by *Phlebopus spongiosus* on roots of *Citrus maxima* (Pham et al. 2012), by some *Paxillus involutus* strains with birch hosts (*Betula pendula*) (Feugey et al. 1999), and by *Pisolithus* strains with eucalyptus hosts (*Eucalyptus grandis*) (Burgess et al. 1994). The previous studies suggested that the limited Hartig net development in the field and in culture might be influenced by nutrients, compatibility of fungi and plants, mycorrhizal synthesis conditions, and period of time in the presymbiosis stage. Such explanations have been suggested in the in vitro ECM synthesis of *Casuarinaceae* tree species (Theodorou and Reddell 1991), aspen trees (*Populus tremula*) (Langer et al. 2008), and eucalyptus (Pereira et al. 2014).

Overall, the isotopic results from this study were similar to those from numerous prior studies in that the average δ^{13}C value of ECM fungi was lower than that of saprotrophic fungi and the average δ^{15}N value of ECM fungi was higher than that of saprotrophic fungi (Kohzu et al. 1999; Hobbie et al. 2001; Taylor et al. 2003; Hart et al. 2006; Zeller et al. 2007; Mayor

et al. 2009; Hasselquist et al. 2011; Hou et al. 2012). However, Gebauer and Taylor (1999) and Hobbie et al. (2001) found that some ECM and saprotrophic fungi overlapped in isotopic values. This study found that the $\delta^{15}N$ values varied among individual ECM species and field-collected *Phlebopus portentosus*. This result is supported by previous reports showing that $\delta^{15}N$ values of fungi may differ depending on whether the fungi prefer to take up mineral nitrogen or organic nitrogen in the environment (Gebauer and Taylor 1999; Hobbie et al. 2001; Taylor et al. 2003; Lindahl et al. 2007), the proteolytic capabilities (Lilleskov et al. 2011), the soil depth of fungal exploration (Hobbie et al. 2014), and the extent of hyphal exploration of soil (exploration type; Hobbie and Agerer 2010). Similar $\delta^{13}C$ values were observed in some ECM fungi, field-collected *Phlebopus portentosus*, and saprotrophic fungi. The previous studies suggested that $\delta^{13}C$ values may be caused by site-specific environmental factors (soil chemistry, humidity, and available sunlight) and nutritional strategy of fungi (Gleixner et al. 1993; Gebauer and Taylor 1999; Hobbie et al. 2001; Mayor et al. 2009; Seitzman et al. 2011). In this study, both $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ signatures in field-collected *Phlebopus portentosus* were more like ECM fungi than saprotrophic fungi. Cultured *Phlebopus portentosus* were higher in $\delta^{15}N$ and $\delta^{13}C$ than natural *Phlebopus portentosus*, presumably because the carbon (C4) used in the cultivated substrate had a higher $\delta^{13}C$ value than the C3 trees of the forest and the culture substrate was also somewhat higher in $\delta^{15}N$ than the soil and litter near field-collected sporocarps.

Phlebopus portentosus produced mature sporocarps in the absence of a host plant and could form ECM-like structures with *Pinus kesiya* (Lumyong et al. 2007; Sanmee et al. 2010; Ji et al. 2011, Kumla et al. 2012, 2015). This result is similar to that of prior studies that some taxa of ECM fungi such as *Boletus reticulatus* (Yamanaka et al. 2000). *Boletus* sp. (Ohta and Fujiwara 2003). *Hebeloma radicosum* (Ohta 1998). *Lyophyllum shimeji* (Ohta 1994a, b). and *Tylopilus castaneiceps* (Kikuchi et al. 2009) can culture and produce mature sporocarps under controlled conditions with or without host plants. Moreover, the production of ECM sporocarps in the absence of host plants required large amounts of carbohydrates, nutrients, and appropriate culture conditions (temperature, moisture and light), which varied among ECM taxa (Ohta 1994a; Ohta and Fujiwara 2003; Taylor and Alexander 2005; Kikuchi et al. 2009; Sanmee et al. 2010).

In conclusion, we consider *Phlebopus portentosus* to be an ECM fungus based on the combination of stable isotope evidence and ECM-like structure formation in greenhouse experiments. Further study is required to clarify the exchange of materials that takes place in ECM associations of this fungus.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Thailand Research Fund for The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0309/2550) and Research Team Association Grant RTA5580007, and Chiang Mai University, Thailand, and grant IOS-0843366 to Erik Hobbie from the US National Science Foundation. We thank Andrew Wilson and Jesse Sadowsky for very useful comments on the manuscript.

References

Agerer R (1991) Characterization of ectomycorrhiza. In: Norris JR, Read DJ, Varma AK (eds) Methods in microbiology: techniques for the study of mycorrhiza. Academic, San Diego, pp 25–73

Agerer R (2006) Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. Mycol Prog 5:67–107. doi:10.1007/s11557-006-0505-x

Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Tedersoo L (2011) A single European aspen (*Populus tremula*) tree individual may potentially harbour dozens of *Cenococcum geophilum* ITS genotypes and hundreds of species of ectomycorrhizal fungi. FEMS Microbiol Ecol 75:313–320. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01000.x

Binder M, Hibbett DS (2006) Molecular systematics and biological diversification of Boletales. Mycologia 98:971–981. doi:10.3852/mycologia.98.6.971

Brundrett M (2004) Diversity and classification of mycorrhizal associations. Biol Rev 79:479–495. doi:10.1017/S1464793103006316

Brundrett MC, Kendrick B (1987) The relationship between the ash bolete (*Boletinellus merulioides*) and an aphid parasite on ash tree roots. Symbiosis 3:315–319

Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph, Canbera

Burgess T, Dell B, Malajczuk N (1994) Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated onto *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. New Phytol 127:731–739. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb02977.x

Chung HC, Kim DH, Lee SS (2002) Mycorrhizal formations and seedling growth of *Pinus densiflora* by *in vitro* synthesis with the inoculation of ectomycorrhizal fungi. Mycobiology 30:70–75

Dell B (2002) Role of mycorrhizal fungi in ecosystems. CMU J Nat Sci 1:47–60

Den BHC, Gravendeel B, Kuyper TW (2004) An ITS phylogeny of *Leccinum* and an analysis of the evolution of minisatellite-like sequences within ITS1. Mycologia 96:102–118. doi:10.2307/3761992

Felsenstein J (1985) Confidence intervals on phylogenetics: an approach using bootstrap. Evolution 39:783–791

Feugey L, Strullu DG, Poupard P, Simoneau P (1999) Induced defence responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. New Phytol 144:541–547. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00538.x

Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol 2:113–118. doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x

Gebauer G, Taylor AFS (1999) ^{15}N natural abundance in fruit bodies of different functional groups of fungi in relation to substrate utilization. New Phytol 142:93–101

Gleixner G, Danier HJ, Werner RA, Schmidt HL (1993) Correlations between the ^{13}C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. Plant Physiol 102:1287–1290

Harley JL, Smith SE (1983) Mycorrhizal symbiosis. Academic, London

Hart SC, Gehring CA, Selmants PC, Deckert RJ (2006) Carbon and nitrogen elemental and isotopic pattern in macrofungal sporocarps and trees in semiarid forests of the south-western USA. Funct Ecol 20:42–51. doi:10.1111/j.1365-2435.2005.01058.x

Hasselquist NJ, Douhan GW, Allen MF (2011) First report of ectomycorrhizal status of boletes on Northern Yucatan Peninsula, Mexico determined using isotopic method. Mycorrhiza 21:456–471. doi:10.1007/s00572-010-0355-x

Heinemann P, Rammeloo J (1982) Observations sur le genre *Phlebopus* (*Boletineae*). Mycotaxon 15:384–404

Henn MR, Chapela IH (2001) Ecophysiology of ^{13}C and ^{15}N isotope fractionation in forest fungi and the roots of the saprotrophic mycorrhizal divide. Oecologia 128:480–487

Hobbie EA (2005) Using isotopic tracers to follow carbon and nitrogen cycling of fungi. In: Dighton J, Oudemans P, White J (eds) The fungal community: its organization and role in the ecosystem. Marcel Dekker, pp 361–381

Hobbie EA, Agerer R (2010) Nitrogen isotopes in ectomycorrhizal sporocarps correspond to belowground exploration types. Plant Soil 327:71–83. doi:10.1007/s11104-009-0032-z

Hobbie EA, Diepen LT, Lilleskov EA, Ouimette AP, Finzi AC, Hofmockel KS (2014) Fungal functioning in a pine forest: evidence from a ^{15}N-labeled global change experiment. New Phytol 201:1431–1439

Hobbie EA, Jumpponen A, Trappe J (2005) Foliar and fungal ^{15}N:^{14}N ratios reflect development of mycorrhizae and nitrogen supply during primary succession: testing analytical models. Oecologia 146:258–268. doi:10.1007/s00442-005-0208-z

Hobbie EA, Macko SA, Shugart HH (1999) Insights into nitrogen and carbon dynamics of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi from isotopic evidence. Oecologia 118:353–360

Hobbie EA, Wallander H (2006) Integrating ectomycorrhizal fungi into quantitative frameworks of forest carbon and nitrogen cycling. In: Gadd GM (ed) Fungi in biogeochemical cycles. Cambridge University Press, New York, pp 98–128

Hobbie EA, Weber NS, Trappe JM (2001) Mycorrhizal vs. saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. New Phytol 150:601–610. doi:10.1046/j.1469-8137.2001.00134.x

Hou W, Lian B, Dong H, Jiang H, Wu X (2012) Distinguishing ectomycorrhizal and saprophytic fungi using carbon and nitrogen isotopic compositions. Geosci Front 3:351–356. doi:10.1016/j.gsf.2011.12.005

Ji KP, Cao Y, Zhang CX, He MX, Liu J, Wang WB, Wang Y (2011) Cultivation of *Phlebopus portentosus* in southern China. Mycol Prog 10:293–300. doi:10.1007/s11557-010-0700-7

Ji KP, He MX, Zhang CX, Liu J, Wang WB, Hou JY (2009) Semi-artificial simulate cultivation of *Phlebopus portentosus* and the durability of hyphae on host roots. Microbiology 36:377–382

Kikuchi K, Matsushita N, Suzuki K (2009) Fruit body formation of *Tylopilus castaneiceps* in pure culture. Mycoscience 50:313–316. doi:10.1007/s10267-009-0481-5

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) Dictionary of the fungi, 10th edn. CABI Europe, Wallingford

Kohzu A, Yoshioka T, Ando T, Takahashi M, Koba K, Wada E (1999) Natural ^{13}C and ^{15}N abundance of field-collected fungi and their ecological implications. New Phytol 144:323–330. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00508.x

Kumla J, Bussaban B, Suwannarach N, Lumyong S, Danell E (2012) Basidiome formation of an edible wild, putatively ectomycorrhizal fungus, *Phlebopus portentosus* without host plant. Mycologia 104:597–603. doi:10.3852/11-074

Kumla J, Danell E, Lumyong S (2015) Improvement of yield for a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, cultivation in northern Thailand. Mycoscience 56:114–117. doi:10.1016/j.myc.2014.04.005

Langer I, Krpata D, Peintner U, Wenzel WW, Schweiger P (2008) Media formulation influences *in vitro* ectomycrrhizal synthesis on the European aspen *Populus tremula* L. Mycorrhiza 18:297–307. doi:10.1007/s00572-008-0182-5

Lei QY, Zhou JJ, Wang QB (2009) Notes on three bolete species from China. Mycosystema 28:56–59

Lilleskov E, Hobbie E, Horton T (2011) Conservation of ectomycorrhizal fungi: exploring the linkages between functional and taxonomic responses to anthropogenic N deposition. Fungal Ecol 4:174–183. doi:10.1016/j.funeco.2010.09.008

Lindahl BD, Ihrmark K, Boberg J, Trumbore SE, Högberg P, Stenlid J, Finlay RD (2007) Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. New Phytol 173:611–620. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01936.x

Lumyong S, Sanmee R, Lumyong P (2007) Is large scale cultivation of boletes possible? Opera Mycol 1:34–37

Mayor JR, Schuur EAG, Henkel TW (2009) Elucidating the nutritional dynamics of fungi using stable isotopes. Ecol Lett 12:171–183. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01265.x

McKenzie EHC, Buchanan PK, Johnston PR (2000) Checklist of fungi on *Nothofagus* species in New Zealand. NZ J Bot 38:635–720

Miller OK Jr, Lodge DJ, Baroni TJ (2000) New and interesting ectomycorrhizal fungi from Puerto Rico, Mona, and Guana Islands. Mycologia 92:558–570. doi:10.2307/3761516

Molina R, Massicotte H, Trappe JM (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community ecological consequences and practical implications. In: Allen MF (ed) Mycorrhizal functioning: an integrated plant-fungal process. Chapman & Hall, New York, pp 357–423

Mortimer PE, Karunarathna SC, Li Q, Gui H, Yang X, Yang X, He J, Ye L, Guo J, Li H, Sysouphanthong P, Zhou D, Xu J, Hyde KD (2012) Prized edible Asian mushrooms: ecology, conservation and sustainability. Fungal Divers 56:31–47. doi:10.1007/s13225-012-0196-3

Nouhra E, Urcelay C, Becerra A, Dominguez L (2008) Mycorrhizal status of *Phlebopus bruchii* (Boletaceae): does it form ectomycorrhizas with *Fagara coco* (Rutaceae)? Symbiosis 46:113–120

Ohta A (1994a) Production of fruit-bodies of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*, in pure culture. Mycoscience 35:147–151. doi:10.1007/BF02318492

Ohta A (1994b) Some cultural characteristics of mycelia of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*. Mycoscience 35:83–87. doi:10.1007/BF02268533

Ohta A (1998) Fruit-body production of two ectomycorrhizal fungi in the genus *Hebeloma* in pure culture. Mycoscience 39:15–19. doi:10.1007/BF02461573

Ohta A, Fujiwara N (2003) Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture. Mycoscience 44:295–300. doi:10.1007/s10267-003-0120-5

Paolocci F, Rubini A, Granetti B, Arcioni S (1999) Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. FEMS Microbiol Ecol 28:23–30. doi:10.1016/S0168-6496(98)00088-9

Pereira MF, Betancourth BML, Teixeira JA, Zubieta MP, Queiroz MV, Kauya MCM, Costa MD, Araújo EF (2014) *In vitro Scleroderma laeve* and *Eucalyptus grandis* mycorrhization and analysis of atp6, 17S rDNA, and ras gene expression during ectomycorrhizal formation. J Basic Microbiol 54:1358–1366. doi:10.1002/jobm.201400253

Peterson RL, Massicotte HB, Melville LH (2004) Mycorrhizas: anatomy and cell biology. National Research Council Research Press, Ottawa

Pham NDH, Yamada A, Shimizu K, Noda K, Dang LAT, Suzuki A (2012) A sheathing mycorrhiza between the tropical bolete *Phlebopus spongiosus* and *Citrus maxima*. Mycoscience 53:347–353. doi:10.1007/s10267-011-0177-5

Pruett GE, Bruhn JN, Mihail JD (2009) Greenhouse production of burgundy truffle mycorrhizae on oak roots. New For 37:43–52. doi:10.1007/s11056-008-9108-5

Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW (2008) Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. Fungal Divers 33:1–45

Repác I (2007) Ectomycorrhiza formation and growth of *Picea abies* seedlings inoculated with alginate-bead fungal inoculum in peat and bark compost substrates. Forestry 5:517–530. doi:10.1093/forestry/cpm036

Sanmee R, Dell B, Lumyong P, Izumori K, Lumyong S (2003) Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand. Food Chem 82:527–532. doi:10.1016/S0308-8146(02)00595-2

Sanmee R, Lumyong R, Dell B, Lumyong S (2010) *In vitro* cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edibl ectomycorrhizal fungus in Thailand. Mycoscience 51:15–22. doi:10.1007/s10267-009-0010-6

Singer R (1986) The Agaricales in modern taxonomy, 4th edn. Koeltz Scientific Books, Königstein

Singer R, Araujo I, Ivory MH (1983) The ectotrophically mycorrhizal fungi of the neotropical lowlands, especially central Amazonia. Beih. Nova Hedwigia 77:1–352

Stone GN, Schönrogge K (2003) The adaptive significance of insect gall morphology. Trends Ecol Evol 18:512–522. doi:10.1016/S0169-5347(03)00247-7

Seitzman BH, Ouimette A, Mixon RL, Hobbie EA, Hibbett DS (2011) Conservation of biotrophy in Hygrophoraceae inferred from combined satble isotope and phylogenetic analyses. Mycologia 103: 280–290. doi:10.3852/10-195

Swofford DL (2002) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), beta version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland

Taylor AFS, Alexander I (2005) The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. Mycologist 19:102–112. doi:10.1017/S0269915X05003034

Taylor AFS, Fransson PM, Högberg P, Högberg MN, Plamboeck AH (2003) Species level patterns in ^{13}C and ^{15}N abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. New Phytol 159:757–774. doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00838.x

Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. Mycorrhiza 20:217–263. doi:10.1007/s00572-009-0274-x

Theodorou C, Reddell P (1991) *In vitro* synthesis of ectomycorrhizas on Casuarinaceae with a range of mycorrhizal fungi. New Phytol 118: 279–288. doi:10.1111/j.1469-8137.1991.tb00978.x

Thoen D, Ducouso M (1989) Mycorrhizal habit and sclerogenesis of *Phlebopus sudanicus* (Gyrodontaceae) in Senegal. Agric Ecosyst Environ 28:519–523. doi:10.1016/0167-8809(90)90091-Q

Thomson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies formultiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25:4876–4882

Thongklang N, Hyde KD, Bussaban B, Lumyong S (2010) Culture condition, inoculum production and host response of a wild mushroom, *Phlebopus portentosus* strain CMUHH121-005. Maejo Int J Sci Technol 5:413–425

Vaario LM, Gill WM, Lapeyrie F, Matsushita N, Suzuki K (2000) Aseptic ectomycorrhizal synthesis between *Abies firma* and *Cenococcum geophilum* in artificial cuture. Mycoscience 41:395–399. doi:10.1007/BF02463953

Watling R (2001) The relationships and possible distributional patterns of boletes in south-east Asia. Mycol Res 105:1440–1448. doi:10.1017/S0953756201004877

Watling R (2006) The sclerodermatoid fungi. Mycoscience 47:18–24. doi:10.1007/s10267-005-0267-3

White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylaor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego, pp 315–322

Williams DJ (2004) Mealybugs of southern asia. The Natural History Museum, London, and Southdene SDN, BHD, Kuala Lumpur

Wilson AW, Binder M, Hibbett DS (2011) Effects of gasteroid fruiting body morphology on diversification rates in three independent clades of fungi estimated using binary state speciation and extinction analysis. Evolution 65:1305–1322. doi:10.1111/j.1558-5646.2010.01214.x

Wilson AW, Hobbie EA, Hibbett DS (2007) The ectomycorrhizal status of *Calostoma cinnabarinum* determined using isotopic, molecular, and morphological method. Can J Bot 85:385–393. doi:10.1139/B07-026

Yamanaka K, Namba K, Tajiri A (2000) Fruit body formation of *Boletus reticulatus* in pure culture. Mycoscience 41:189–191. doi:10.1007/BF02464330

Yamanaka T, Ota Y, Konno M, Kawai M, Ohta A, Neda H, Terashima Y, Yamada A (2014) The host range of conifer-associatied *Tricholoma matsutake*, Fagaceae-assoviated *T. bakamatsutake* and *T. fulvocastaneum* are wider *in vitro* than in nature. Mycologia 106: 397–406. doi:10.3852/13-197

Zeller B, Brechet C, Maurice J-P, Le Tacon F (2007) ^{13}C and ^{15}N isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway spruce plantation. Ann For Sci 64:419–429. doi:10.1051/forest:2007019

Zhang CX, He MX, Cao Y, Liu J, Gao F, Wang WB, Ji KP, Shao SC, Wang Y (2015) Fungus-insect gall of *Phlebopus portentosus*. Mycologia 107:12–20. doi:10.3852/13-267

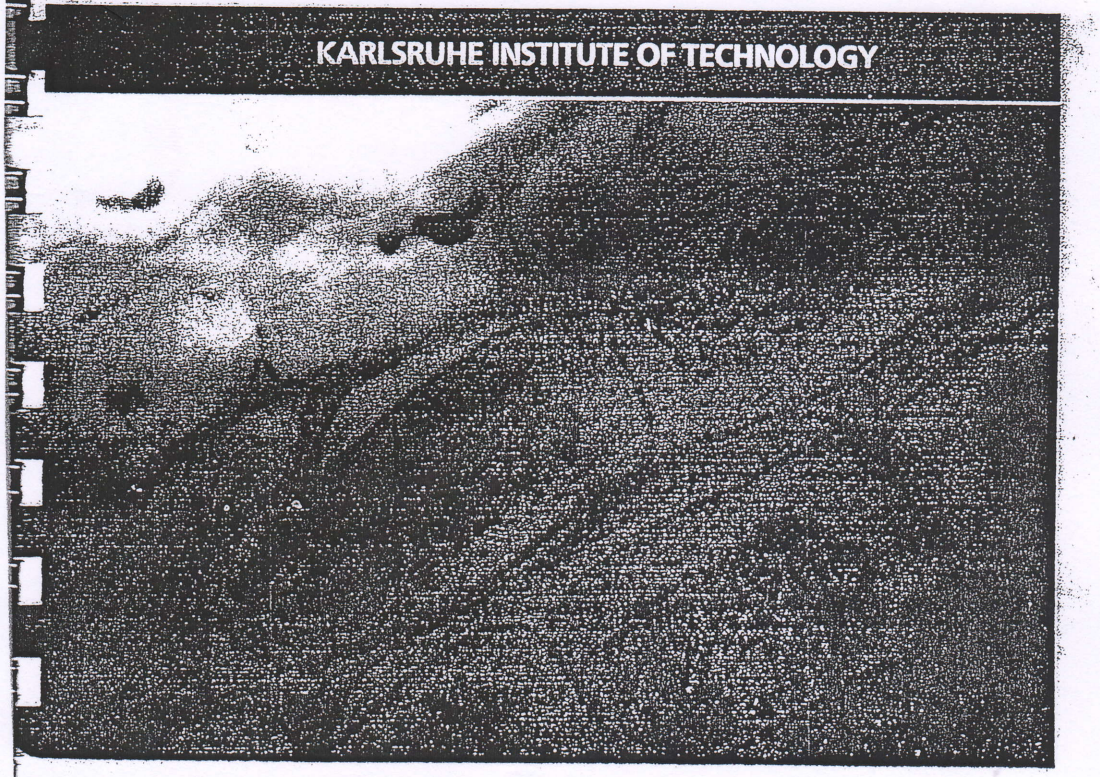
Zhang CX, Ji KP, He MX, Cao Y, Liu J, Wang WB (2010) Analysis on nutrient components of *Phlebopus portentosus* fruit bodies. J Yunnan Univ 32:702–704

Karlsruhe Institute of Technology

Sutaman Lumyong
Thailand

XI International Fungal Biology Conference

Karlsruhe, Germany
29th September – 3rd October 2013



KIT – University of the State of Baden-Wuerttemberg and
National Research Center of the Helmholtz Association

Endophytic fungi from some medicinal plants in Northern Thailand: Biodiversity, secondary metabolites and application

Saisamorn Lumyong* and Nakarin Suwannarach

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand. Contact: scboi009@gmail.com

Endophytic fungi have been recognized to be valuable sources of secondary metabolites. The bioactive compounds from endophytes may original produce by plants or endophytic microbes activate plant to produce novel bioactive compound usually derive from novel endophytic microorganisms. In this study, diversity of endophytic fungi from some medicinal plant and their potential to produce antimicrobial compounds were investigated. A total of 3,261 culturable endophytic fungi were isolated from 2,625 samples taken from healthy leaves (vein and intervein) and stems of *Cinnamomum bejolghota* and *Lagerstroemia loudoni* collected from mature plants in northern Thailand. *Colletotrichum gloeosporioides*, Phomopsis spp. and Xylariaceous were the most frequency isolated endophytic fungi. The endophytes were classified into 12 ascomycetes, 1 basidiomycete and 31 mitosporic fungi (12 coelomycetes and 19 hyphomycetes) using traditional morphological methods. Volatile and non-volatile metabolites were evaluated from 202 endophytic fungi by dual culture volatile assay and agar well diffusion assay, respectively. The result showed that non-volatile metabolites from *Mycoleptodiscus terrestris* CMU-Cib179 culture showed the highest inhibition activity against tested organisms. Interestingly, we found three volatile-producing endophytic fungi belong to *Muscodor cinnamomi* CMU-Cib461 and *Nodulisporium* sp. CMU-Cib1018 and CMU-UPE34. The volatile compounds were identified by gas chromatograph and mass spectrometer. *Muscodor cinnamomi* and *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34 and CMU-Cib1018 produced 2-methylpropanoic acid, eucalyptol and 1,3,2, dioxannorolan,4,4-dimethyl-5-oxo-2-ethyl as the major, respectively. Fumigation to control microorganisms was confirmed *in vitro* and *in vivo*. The results showed that volatile producing fungi have high potential to control wide range of plant pathogens and has no harmful residue.

The 39th Congress on Science and Technology of Thailand

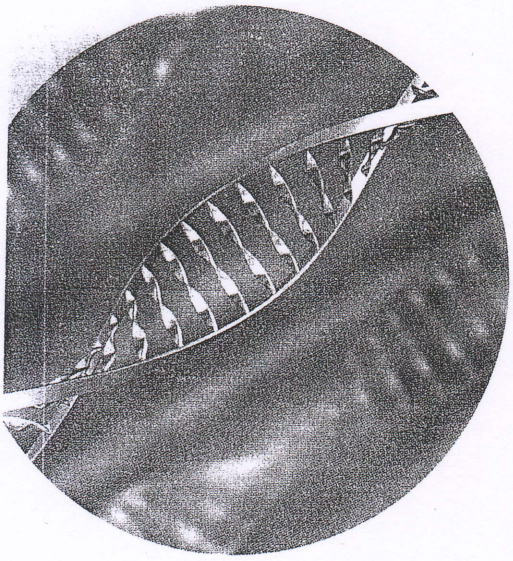
การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

วทท STT39

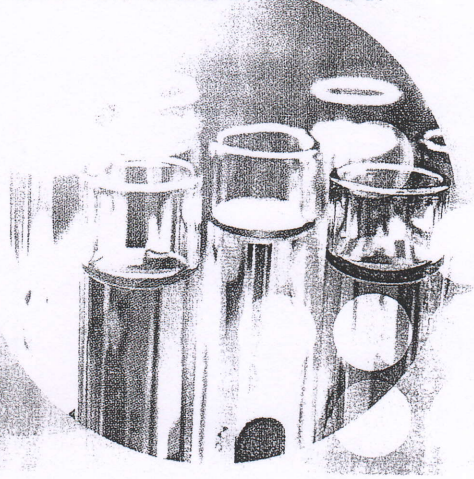
Abstracts

ครั้งที่ 39

October 21–23, 2013
Bangkok International Trade
& Exhibition Centre (BITEC)
Bangna, Bangkok, Thailand



Innovative Science *for a Better Life*
นวัตกรรมวิทยาศาสตร์เพื่อชีวิตที่ดีขึ้น



FSCI คณะวิทยาศาสตร์ KMUTT มจธ.

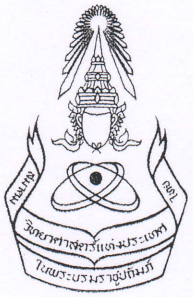
การประชุมวิชาการ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 39

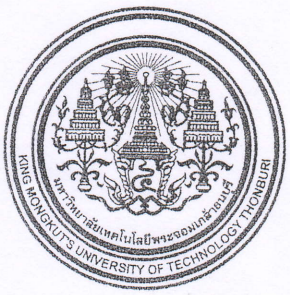
ABSTRACTS

39th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 39)

Innovative Science for a Better Life

October 21 - 23, 2013
Venue: Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Bangkok, Thailand





Organized by:
The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King
in Association with Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi

Kuldanai Pathompitaknukul,[1,2] Amornrat Kidjaideaw,[3] Rungsi Charaensatapon,[3] Chuenchit Boonchird,[1] Jarunya Narangajavana,[1] Thipa Asvarak[1,2,*]
[1]Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6th Road, Bangkok 10400, Thailand
[2]Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand
[3]Field Crops Research Institute, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
*email: thipa.asv@mahidol.ac.th
Abstract: *Colletotrichum gloeosporioides*, which causes anthracnose disease in several plants, is one of the most widespread plant pathogenic fungi. In Thailand, this fungus causes a severe problem to agricultural products, including economically important crop like cassava (*Manihot esculenta.* Crantz.). Many chemical agents are used to control this pathogen. However, chemical strategy can lead to contamination of chemicals in environment and pollution. Biological control is, therefore, one of an alternative ways to reduce risk of human health and environmental effect. In this study, we aim to evaluate the potential of fungal endophytes and rhizosphere fungi of cassava in order to control this pathogen. Fifty fungal isolates were obtained from plant tissues and soil around storage and fibrous roots of three cassava varieties. Sixteen isolates showed ability to inhibit growth of *C. gloeosporioides* in plate assays by dual culture methods. Culture filtrate of two fungal isolates, C5 and C16, showed ability to inhibit growth of *C. gloeosporioides* in plate assay. Colony of *C. gloeosporioides* culturing on media containing culture filtrates of C5 and C16 showed 63% and 13% growth reduction. Based on nucleotide sequences of rDNA region, the two fungal isolates C5 and C16 were showed highest similarity to *Trichoderma* sp. and *Aspergillus* sp., respectively. Result from this study suggested the potential use of endophytic and rhizosphere fungi of cassava for biocontrol of cassava anthracnose disease. (full paper available on CD)

H_H0012: COLONIZATION OF ENDOPHYTIC DIAZOTROPIC STRAIN OF *Klebsiella* sp. SS2 ON NON-HOST PLANTS

Chureeporn Phongsida, Chakrapong Rangjaroen, Saisamorn Lumyong*
Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
*e-mail: scboi009@gmail.com
Abstract: *Klebsiella* sp. SS2 is a plant growth promoting bacterium that was isolated from rice landraces. It was marked with the *gusA* gene. Host plant (rice) and non-host plants (corn, sorghum, soybean and sesame) seeding were inoculated with the GUS-marked *Klebsiella* sp. SS2, and then grown in gnotobiotic condition. Under microscope observation, it was showed that the GUS-marked bacterial cells were entry into rice and corn seeding with a high concentrated was found in radicle, hypocotyl, epicotyl and coleoptile. The bacterial cells spread further through the plant tissue and migrated to the roots and the first leaves. In the inoculation sorghum seed, the bacterial were mainly located in the epicotyl and coleoptiles. Higher bacterial populations were observed in cotyledon of sesame and the radical of soybean. Plant growth promoting *Klebsiella* sp. SS2 colonized in all plant tissue that could be applied into economic crops. (full paper available on CD)

H_H0013: MICROPROPAGATION OF *Croton stellatopilosus* Ohba FROM LATERAL BUDS AND LEAF SEGMENTS

Nipawan Jitsopakul,[1,*] Supawadee Tangteerawattana,[2] Kanchit Thammasiri,[3] Pennapa Sirimuang[1]
[1]Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan, Surin Campus, Surin 32000, Thailand
[2]Department of Plant Science, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan, Surin Campus, Surin 32000, Thailand

Program Book

IMC10 2014 Bangkok THAILAND

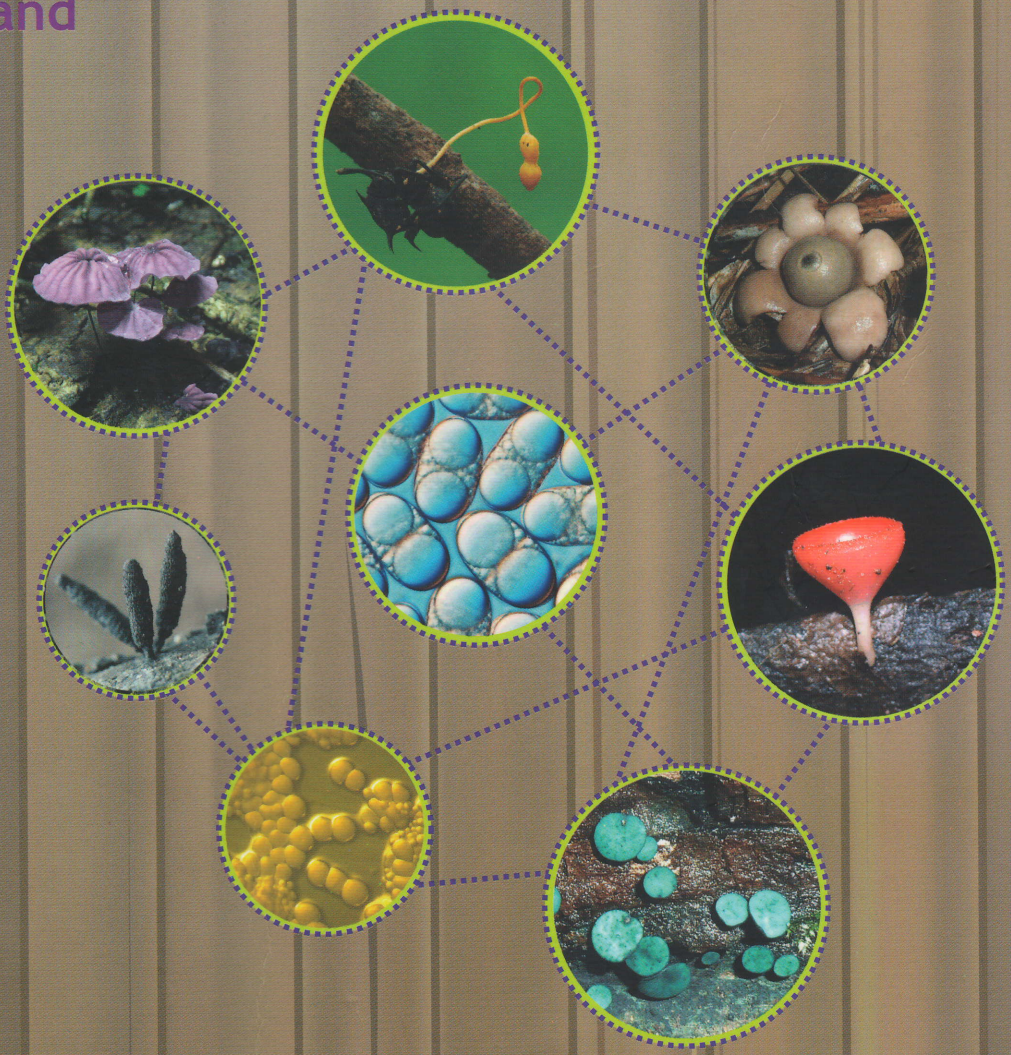
IMC10

The 10th International Mycological Congress

4 - 8 August 2014

Queen Sirikit National Convention Center (QSNCC)

Bangkok, Thailand



Organized by

Supported by

Sponsored by

Announcement

IMC10 2014 Bangkok THAILAND

The 10th International Mycological Congress 2014

IMC10

3 - 8 August 2014
Queen Sirikit National Convention Center (QSNCC), Bangkok, Thailand

Organized by

Supported by

TCEB THAILAND CONVENTION & EXHIBITION BUREAU

Indole-3-acetic and metal chelating compounds production by some sclerodermatiod fungi

Saisamorn Lumyong and Jaturong Kumla

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University
Email: saisamorn.l@cmu.ac.th

Abstract

The sclerodermatoid fungal group is one of ectomycorrhizal fungi aggregated based on phylogenetic analysis. In this study, sclerodermatoid fungi basidiomes were collected from northern Thailand and pure cultures were isolated. The morphology and molecular characteristics identified them as *Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense*. The *in vitro* ability of selected fungi to produce indole-3-acetic acid (IAA) and metal chelating compounds were investigated. The results indicated that all fungi are able to produce IAA in liquid medium. The biological activity tests of fungal IAA showed that it can simulate coleoptile elongation, and increase seed germination and root length of tested plants. Moreover, all tested fungi showed a positive Chrome Azurol S reaction for the metal-chelating compound production and produced catecholates and hydroxamate type of siderophore as well as citric, malic, oxalic and succinic acid in liquid medium. In addition, the solubilization ability of different toxic metal (Co, Cd, Cu, Pb, Zn)-containing minerals was determined. The results indicated all tested fungi were able to solubilize different metal and the solubilizing activities varied for different minerals and fungal species. The presence of metal minerals affected fungal growth, and cobalt carbonate showed the highest toxicity.

Keywords: Ectomycorrhizal fungi; Phytohormone; Metal chelating compounds; Pure culture

Association of Applied Biologists

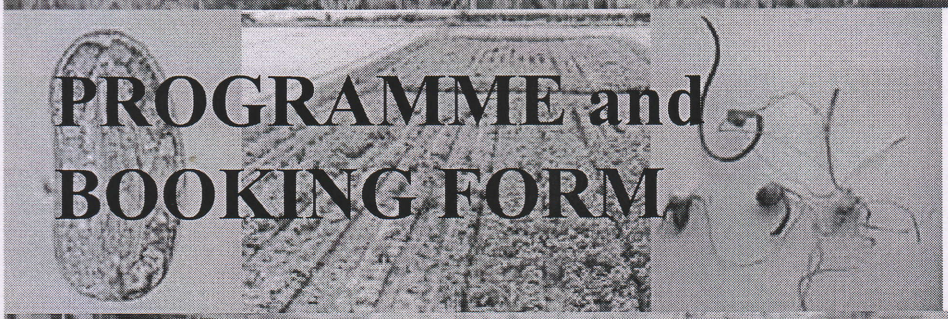
***President*: Professor Peter Shewry BA, BSc, PhD, DSc**

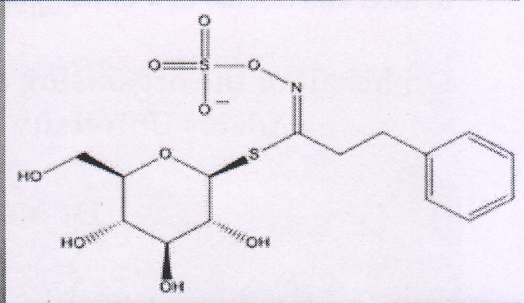
A four day conference

5th International Symposium of Biofumigation

at Harper Adams University

on 9-12 September 2014





PROGRAMME and BOOKING FORM

Agrium® Italia

5th International Symposium of Biofumigation

TOZER SEEDS

JOORDENS ZADEN

HIGH PERFORMANCE SEEDS, INC.

Photographs reproduced by kind permission of Harper Adams University

AAB Office
The Warwick Enterprise Park
Wellesbourne,
Warwick
CV35 9EF
Tel: +44 (0)1789 472020
Fax: +44 (0)1789 470234
http://www.aab.org.uk

15 July 2014

Prof Saisamorn Lumyong
Chiang Mai University
Department of Biology
Faculty of Science
Chiang Mai University
CHANG MAI 50200
Thailand

5th International Symposium of Biofumigation
Harper Adams University, Edgmond, Newport Shropshire TF10 8NB. UK
9-12 September 2014.

Dear Saisamorn,

The Association of Applied Biologists has pleasure in inviting you to attend the AAB conference entitled 5th International Symposium of Biofumigation that we are organising from 9-12 September 2014 at Harper Adams University, Edgmond, Newport Shropshire TF10 8NB, UK to present your platform presentation: 'Biofumigation from Thai Endophytic Fungi' on Wednesday 10 September 2014.

Please note that the Association is not able to provide any funding towards your attendance at this conference. I look forward to meeting you in September.

Kind regards,

Carol Millman

Mrs C A Millman
Executive Officer
Association of Applied Biologists

E-mail: carol@aab.org.uk (Executive Officer, Conference Organisation & Planning, *Annals* & Advertising)
russell@aab.org.uk (*Food and Energy Security*, Newsletter, *Aspects* Sales);
bernadette@aab.org.uk (Membership, DPV Sales, Accounts, Conference Bookings);
john@aab.org.uk (Conference Administration, *Aspects* editorial queries)

Registered Charity No. 275655

10:15 **Biofumigation from Thai Endophytic Fungi**
SAISAMORN LUMYONG & NAKARIN SUWANNARACH (Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand)

10:35 **The Role of Cover Crops with Biofumigation Potential for the Suppression of Plant-Parasitic Nematodes in Vineyards**
D H M KRUGER (Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa), J C FOURIEARC (Infruitec-Nietvoorbij1, Stellenbosch, South Africa) & A P MALAN (Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa)

10:55 **SUMMARY**

11:00 **COFFEE**

Session 2: Biofumigation - New technologies and developments surrounding the biofumigation technique (continued)
Chair: LUCA LAZZERI (CRA-CIN, Bologna, Italy)

11:30 ***Plenary*; *Recorded Presentation***
Use of brassica seed meals for crop improvement
MATTHEW MORRA (University of Idaho, Idaho, USA)

12:15 **Combination of biofumigation and reductive soil disinfestaion in Japan**
TOSHIAKI TAKEHARA (NARO Western Region Agricultural Research Center, Hiroshima, Japan)

12:35 **Preliminary efforts for introducing *B. juncea* biocidal green manuring to Turkey**
FATMA ERSLAN (FARMI Tarimsal Company, Turkey)

12:55 **Experiences, study cases and results about biofumigation in Po Valley, Italy**
F MOSSO, I SCOVAZZI, M SCOVAZZI (Agristore Srl - Carmagnola, Torino, Italy), D ROLVALDO (Agronomist) & G PATALANO (Agrium Italia, Livorno, Italy)

13:15 **SUMMARY**

13:20 **LUNCH**

Session 3: Biofumigation in crop protection – management of plant diseases
Chair: JOHN CLARKSON (Warwick Crop Centre, Warwick, UK)

14:15 ***Plenary***
Ten years of biofumigation research in Switzerland
VINCENT MICHEL (Wädenswil Research Station, Wädenswil, Switzerland)

15:00 **QUESTIONS**

15:05 **Biofumigation to control sclerotinia disease in vegetable crops**
RACHEL WARMINGTON (Warwick Crop Centre, Warwick, UK)

15:25 **Effectiveness of *Brassica carinata* defatted seed meals against selected soil-borne pathogens of vegetable crops under inoculation conditions**
G GILARDI, M L GULLINO & A GARIBALDI (Agroinnova – University of Torino, Torino, Italy)

Abstract

Biofumigation from Thai Endophytic Fungi

Saisamorn Lumyong* and Nakarin Suwannarach

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Among 2,625 endophytic fungi isolated from some medicinal plants. Volatile compound producer were screened. Five new species of *Muscodor* and two *Nodulisporium* spp. were discovered, They are produced several volatile metabolite compounds that proved to be effective against wide range of plant pathogenic fungi and bacteria. The 2-methylpropanoic acid, eucalypton and 1,3,2, dioxanorolan,4,4-dimethyl-5-oxo-2-ethyl was a major volatile compound produced from *M. cinnamomi* CMU-Cib461, *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34 and *Nodulisporium* sp. CMU-Cib1018, respectively. Fumigation was tested both *in vitro* and *in vivo*. The evidence showed that three selected fungal strains have high potential to use as biofumigator for control of plant pathogen.

ASSOCIATION OF APPLIED BIOLOGISTS

Apsects of Applied Biology 126

Biofumigation from Thai Endophytic Fungi

Saisamorn Lumyong and Nakarin Suwannarach

Saisamorn Lumyong Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
Email: saisamorn.l@cmu.ac.th

Nakarin Suwannarach Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
Email: suwan_461@hotmail.com

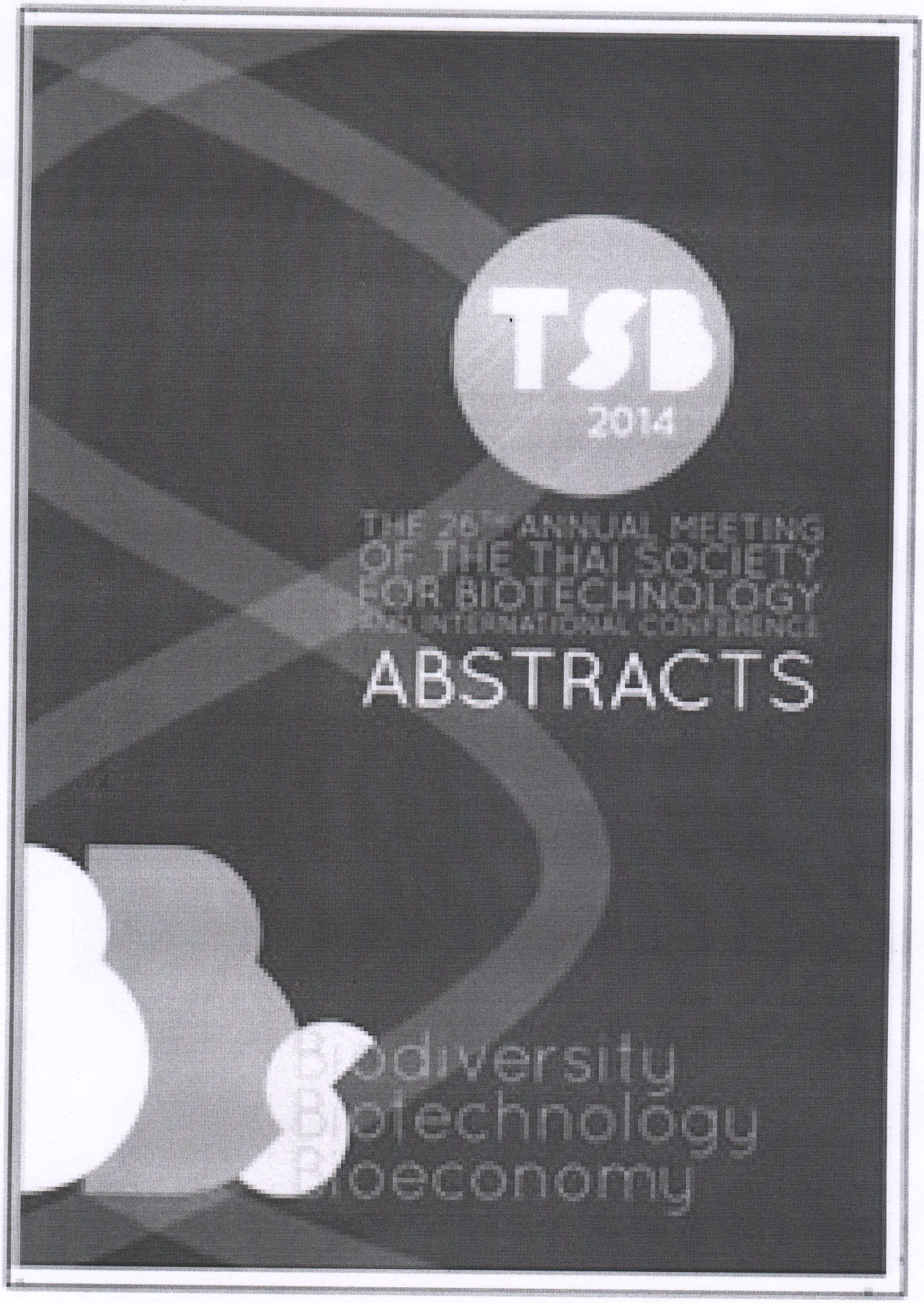
Summary

Among 2,625 endophytic fungi isolated from some medicinal plants. Volatile compound producer were screened. Five new species of *Muscodor* and *Nodulisporium* sp. were discovered. They are produced several volatile metabolite compounds that proved to be effective against wide range of plant pathogenic fungi and bacteria. The 2-methylpropanoic acid and eucalyptol was a major volatile compound produced from *M. cinnamomi* CMU-Cib461 and *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34, respectively. Fumigation was tested both *in vitro* and *in vivo*. The evidence showed that three selected fungal strains have high potential to use as biofumigator for control of plant pathogens.

Key words: Endophytic fungi, medicinal plant, volatile organic compound, biocontrol

Introduction

Thailand is located in tropical zone that has diverse biodiversity of microorganisms including endophytes that they have been recognized to be a valuable source of secondary metabolites. Endophytic fungi are a group of fungi that occur within asymptomatic photosynthetic tissues of plants and occur in all major lineages of land plants ranging from the arctic to the tropical regions (Arnold & Lutzoni, 2007; Rosa *et al.* 2012). Studies on endophytic fungi are important for increasing our knowledge of fungal diversity, because they may have an effect on plant structure and community, and as a source of new bioactive compounds (Hyde & Soytong, 2008; Rivera-Orduña *et al.* 2011; Rosa *et al.* 2012). The several fungal endophytes are capable of producing volatile organic compounds (VOCs), that they are active against many plant pathogenic fungi, Gram-positive and Gram-negative bacteria, and the genus is thus potentially important for biocontrol (Strobel & Daisy, 2003; Macías-Rubalcava *et al.* 2010). The term "mycofumigation" referred to the control of other organisms using the antimicrobial volatiles produced by fungi (Stinson *et al.* 2003). Moreover, several endophytic volatile-producing fungi, *Hypoxylon* sp., *Muscodor* sp., *Nodulisporium* sp., *Oxyporus latemarginatus*, *Phoma* sp. and *Phomopsis* sp. were also used to control fruit decay (Lee *et al.* 2009; Park *et al.* 2010; Tomsheck *et al.* 2010; Singh *et al.* 2011; Strobel *et al.* 2011). Recently, medicinal plants have been found to harbor endophytic fungi that are believed to be associated with the production of pharmaceutical products (Qadri *et al.* 2013; Panaccione *et al.* 2014). The present


TSB
2014
THE 28TH ANNUAL MEETING
OF THE THAI SOCIETY
FOR BIOTECHNOLOGY
AND INTERNATIONAL CONFERENCE
ABSTRACTS
Biodiversity
Biotechnology
Bioeconomy

Day 3 Friday 28th Nov 2014 Program Schedule

Time:	Location:	Program:				
08:00-08:40	Floor 3	Registration				
08:40-09:20	C5 302	**PL-5:** Assoc. Prof. Dr. Kevin Hyde "Why taxonomy matters in biotechnological research"				
09:20-10:00	C5 302	**PL-6:** Prof. Saisamorn Lumyong "Potential of endophytic fungi to promote plant growth"				
10:00-10:20		Coffee break				
10:20-12:00	**Room:**	**Oral communication**				
		C5 302	**A**	**B**	**C**	**D**
		Session OC-1-2	Session OC-2-2	Session OC-3-2	Session OC-4-2	Session OC-5-2
12:00-13:00	Floor 3	Lunch				
13:00-13:40	C5 302	**PL-7:** Mr. Kongkiat Kespetchara, MD. "The new possibility to have longevity with good health"				
13:40-14:40	**Room:**	**Oral communication**				
		C5 302	**A**	**B**	**C**	**D**
		Session OC-1-3	Session OC-2-3	Session OC-3-3	Session OC-4-3	Session OC-5-3
14:40-15:00	Floor 3	Coffee break				
15:00-16:00	C5 301	Poster Session Day 2				
16:00-16:30	C5 301	Award Ceremony				

Potential of endophytic fungi to promote plant growth

Saisamorn Lumyong and Nakarin Suwannarach

Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources and Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Abstract

Endophytic fungi are known to produce a wide range of structurally diverse and pharmaceutically important secondary metabolites. Some of them can promote plant growth in various ways by acting as phytohormones, inhibiting growth of plant pathogens or by capturing metal (siderophore). New species of *Muscodor* were discovered as endophytes in medicinal plants and para rubber in Thailand. All of them can produce both volatile and non-volatile metabolites. *Muscodor cinnamomi* was selected and investigated for its *in vitro* ability to produce siderophores, phenazine, indole-3-acetic acid (IAA), to solubilize different toxic metal (Ca, Co, Cd, Cu, Pb, Zn)-containing insoluble minerals and for its metal tolerance. Moreover, the capacity of the fungal IAA to stimulate coleoptile elongation, seed germination, and root growth was tested. Finally, *M. cinnamomi* was evaluated as a potential biological agent to control damping off disease caused by *Rhizoctonia solani* AG-2 in different crops (bird pepper, bush bean, garden bean, tomato), as well as to control postharvest pathogens.

Keywords: endophytes, medicinal plant, secondary metabolites, plant growth promoting compound

ABSTRACTS

THE 1st JOINT SEMINAR

New Core to Core Program A. Advanced Research Networks

on

"Establishment of an International Research Core for New Bio-Research Fields with Microbes from Tropical Areas

(World-Class Research Hub of Tropical Microbial Resources and Their Utilization)"

August 10th-11th, 2014

Venue:

Centara Grand and Bangkok Convention Centre,

Central World, Thailand

PIV-2

Microbes in northern Thailand: biodiversity, volatile, non-volatile compounds producer, and application

Saisamorn Lumyong[1], Nakarin Suwannarach[1], Jaturong Kumla[1], Pattana Kakumyan[2], Nyambura Cynthia Mugo[3], and Kenji Matsui[3]
[1]*Research Laboratory for Excellence in Sustainable Development of Biological Resources, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand,*
[2]*School of Science, Mae Fah Lung University, Chiang Rai 57100, Thailand,*
[3]*Graduate School of Medicine (Agriculture), Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan*

Microorganisms have been recognized to be a valuable source of secondary metabolites (volatile and non-volatile). Some of them can promote plant growth in various ways by acting as phytohormones, inhibiting growth of pathogens or by capturing metal (siderophore). For example, fungal endophyte communities were studied in some medicinal plants in northern Thailand (Suwannarach et al., 2012). Interestingly, volatile producing fungus genus *Muscodor* and *Nodulisporium* were found and their volatile compounds had a potential as biological control agent. The volatile analysis showed that *Muscodor cinnamomi* and *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34 and CMU- Cib1080 produce 2-methylpropanoic acid, eucalyptol and 1,2,3 dioxanborolan, 4,4-dimethyl-5-oxo-2-ethyl as major compounds, respectively (Suwannarach et al., 2010; 2013a; 2013b). Moreover, the mushroom communities (saprobic and ectomycorrhiza) in northern Thailand were collected. Some of them such as *Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense* able to produced indole-3-acetic acid (IAA) and it can stimulate coleoptile elongation, and increase seed germination and root length of tested plants (Kumla et al., 2014). Therefore, microbe in northern Thailand was a new source of bioactive compounds. In this project, the isolated endophytes and mushrooms will be discovered for plant growth promoting and pathogen growth inhibition substances and their biosynthetic pathway. The project will be collaborated among Yamaguchi University, Mae Fah Luang University and Chiang Mai University.

Suwannarach et al. (2010) Mycotaxon 114, 15-23. Suwannarach et al. (2012) Chiang Mai j. Sci. 39, 389-398. Suwannrach et al. (2013a) Ann. Microbiol. 63, 1341-1351. Suwannarach et al. (2013b) Crop Prot. 45, 63-70. Kumla et al. (2014) Ann Microbiol. 64, 707-720.

The 10 th Young Scientist Seminar

Establishment of International Research Network for Tropical Bioresources and Their Utilization

NOVEMBER 16 th-17 th , 2014
SEMINAR PARK, YAMAGUCHI, JAPAN

SUPPORTED BY
YAMAGUCHI UNIVERSITY

Screening of Indole-3-acetic acid production activity of endophytic fungi isolated from coffee plants in northern Thailand

Tosapon Numponsak[1], **Kenji Mutsui**[2] **and Saisamorn Lumyong**[1]
[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*
[2]*Graduate School of Medicine (Agriculture) and Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan*

Coffee is an economically important plant that makes the large export commodity in the world. Thailand is the third largest coffee exporting in Southeast Asia. Endophytic fungi are group of fungi that occur within asymptomatic tissue of plants. Endophytic fungi are known to produce important secondary metabolites especially phytohormones. Indole-3-acetic acid (IAA) is the most active auxin and an important plant hormone which can stimulate responses to cell elongation, cell division, cell differentiation and root initiation in plants. Therefore, using of endophytic fungi to promote plant growth in economic plant is an alternative addition to use plant hormone product.

In this study, endophytic fungi were isolated from *Coffea arabica* and *Coffea canephora* in Chiang Mai Province, northern Thailand. The *in vitro* ability of isolated fungi to produce indole-3-acetic acid (IAA) was investigated. Total 115 endophytic fungi were recovered and 94 isolates could produce IAA which tested with Salkowski's reagent indicated by the formation of red-pink color. Moreover, a thin layer chromatogram of fungal IAA and standard IAA showed the same R_f value (0.52). The highest IAA yield (737.69±0.01 $\mu g\ ml^{-1}$) was obtained from fungal isolate A109 and this isolate belong to genus *Colletotrichum* based on morphological characterization.

The 10 th Young Scientist Seminar

Establishment of International Research Network for Tropical Bioresources and Their Utilization

NOVEMBER 16 th-17 th , 2014
SEMINAR PARK, YAMAGUCHI, JAPAN

SUPPORTED BY
YAMAGUCHI UNIVERSITY

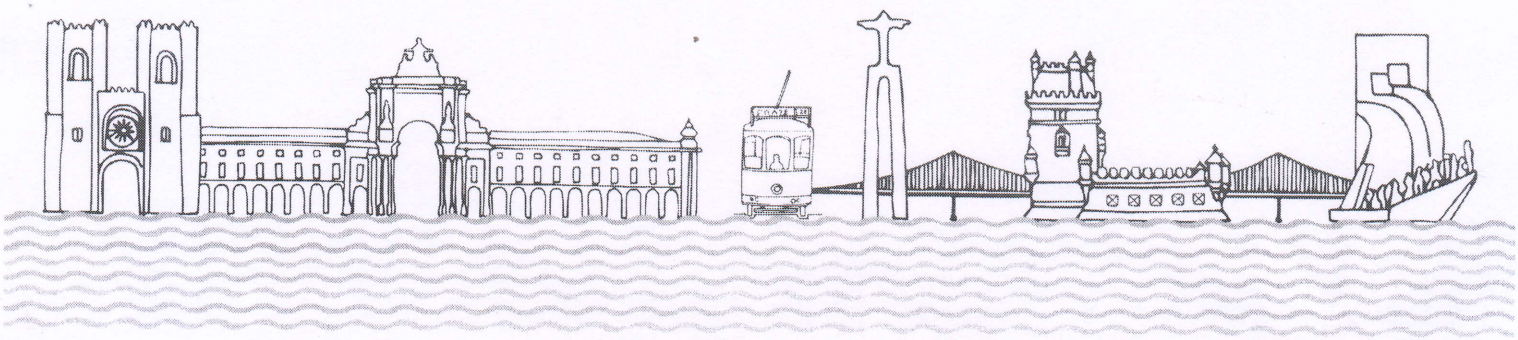
Indole-3-acetic acid production and solubilization of insoluble metal minerals of some ectomycorrhizal fungi collected from northern Thailand

Jaturong Kumla[1], **Kenji Matsui**[2], **and Saisamorn lumyong**[1]
[1] *Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*
[2] *Graduate School of Medicine and Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan*

Ectomycorrhizal (ECM) fungi form a mutaulistic relationship with fungi and plant roots for which the fungi can enhance nutrient and water uptake, increase tolerance to environmental stresses, promote plant growth by producing phytohormone and protect against pathogens. A final estimate of ECM fungal species richness would likely be between 20,000 and 25,000, and about 2,500 recorded species are defined as edible. In this study, some ECM fungi fruiting-bodies were collected from northern Thailand and pure cultures were isolated. The morphology and molecular characteristics identified them as *Astraeus odoratus*, *Phlebopus portentosus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense*. The *in vitro* ability of selected ECM fungi to produce indole-3-acetic acid (IAA) and to solubilize different toxic metal (Co, Cd, Cu, Pb, Zn)-containing minerals were investigated. The results indicated that all fungi are able to produce IAA in liquid medium. The optimum temperature for IAA production of all fungi was 30°C, and the optimum concentration of L-tryptophan of *Astraeus odoratus*, *Pisolithus albus* and *Scleroderma sinnamariense* was 2 mg ml^{-1}. The highest IAA yield (65.29 ±1.17 μg ml^{-1}) was obtained from *Phlebopus portentosus* after 40 days of cultivation in culture medium supplemented with 4 mg ml^{-1} of L-tryptophan. The biological activity tests of fungal IAA showed that it can simulate coleoptile elongation, and increase seed germination and root length of tested plants. In addition, the presence of metal minerals affected fungal growth and the metal solubilizing activities varied for different minerals and fungal species. The solubilization activity of the tested fungi was reported in terms of a solubilization index (SI). The result indicated that SI value decreased when the concentration of metal minerals increased.

Book of Abstracts
8th Congress of the International Symbiosis Society

{Symbiotic Lifestyle}



Venue & Date: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; Lisbon, Portugal; 12-18 July, 2015
Editors: Silvana Munzi, Florian Ulm
Organizing Committee: Silvana Munzi, Cristina Cruz, Rusty Rodriguez, Irene Newton

Session: Interdisciplinary approach to mycorrhizal symbiosis
Presentation type: Poster
Name, Contact: Chaiyasen, Amornrat, amornrat057@gmail.com

P

Arbuscular mycorrhizal communities analysis and their effect on growth of Aquilaria crassna and Tectona grandis

AMORNRAT CHAIYASEN[1], J PETER W YOUNG[2], NEUNG TEAUMROONG[3], PAIBOOLYA GAVINLERTVATANA[4], SAISAMORN LUMYONG[1]

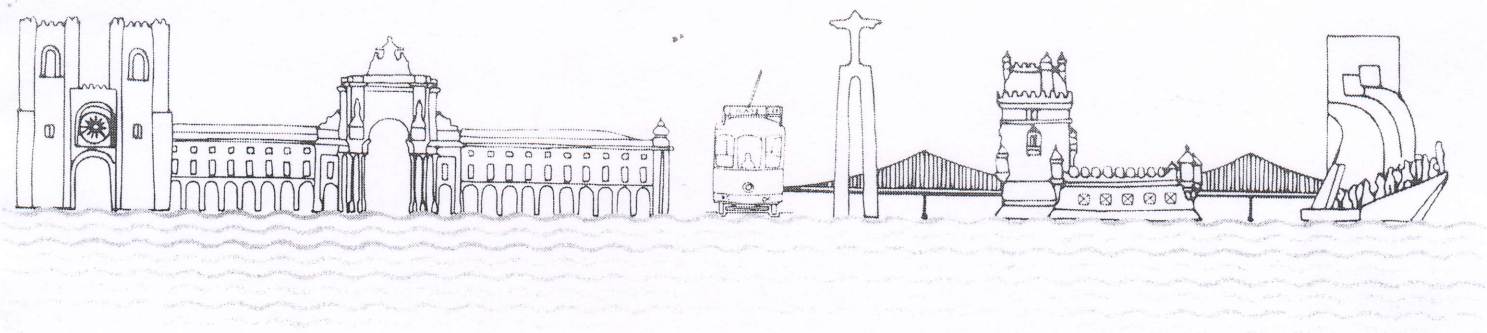
[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand*
[2]*Department of Biology, University of York, York, UK*
[3]*Schoool of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratch*

Aquilaria crassna Pierre ex Lec. and *Tectona grandis* Linn.f. are sources of resin-suffused agarwood and teak timber, respectively. This study investigated arbuscular mycorrhizal (AM) fungus community structure in roots and rhizosphere soils of both plants from plantations in Thailand to understand whether AM fungal communities present in roots and rhizosphere soils vary with host plant species and study sites. Terminal restriction fragment length polymorphism complemented with clone libraries 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 estimated average minimum numbers of AM fungal taxa per sample in roots and soils of *T. grandis* were at least 1.89 vs. 2.55, respectively, and those of *A. crassna* were 2.85 vs. 2.33 respectively. The TRFs were attributed to Claroideoglomeraceae, Diversisporaceae, *Gigasporaceae* and Glomeraceae. Specific AM taxa in roots and soils of *T. grandis* and *A. crassna* were not affected by host plant species and sample source (root vs. soil) but affected by collecting site. Moreover, AM fungal inoculum production from trap culture and utilization to enhance growth of both plants were performed. The *in vitro* inoculation resulted in the regrowth of AM fungal hyphae from initial inoculating root organ culture of *G. intraradices* and *F. mosseae* RYA08, and spore germination of *C. etunicatum* NNT10 and *C. etunicatum* PBT03. *Tectona grandis* plantlets inoculated with *F. 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.

Back to Index

Book of Abstracts
8th Congress of the International Symbiosis Society

{Symbiotic Lifestyle}



Venue & Date: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; Lisbon, Portugal; 12-18 July, 2015
Editors: Silvana Munzi, Florian Ulm
Organizing Committee: Silvana Munzi, Cristina Cruz, Rusty Rodriguez, Irene Newton

P

Cultural characterization of *Pisolithus* species collected from northern Thailand and their *in vitro* mycorrhization with *Eucalyptus camaldulensis* seedling

SAISAMORN LUMYONG, JATURONG KUMLA

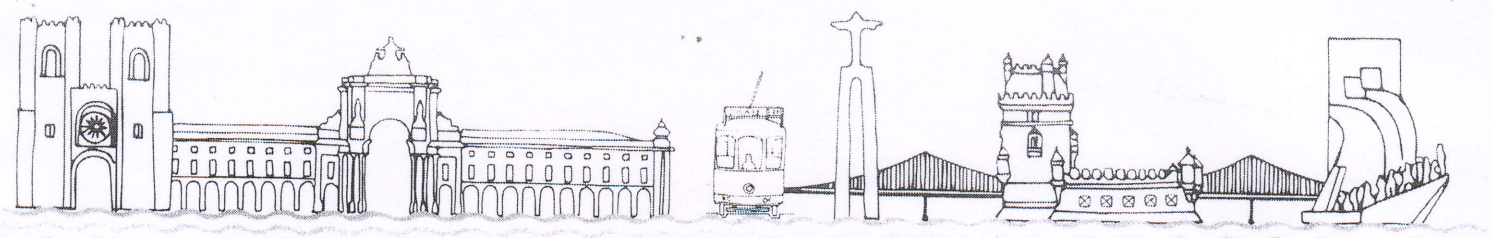
Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

Pisolithus species are the well-known ectomycorrhizal fungi and wide spread in temperate and tropical regions. Basidiomes of *Pisolithus* species were collected from northern Thailand and identified based on morphological and molecular characteristics. The morphological characteristics, spore ornamentation and spore print, distinguished two groups. One group with sharp tipped, erect and crowded spines, and an olive green spore print was identified as *P. albus* and the other with long curved spines, connate narrow cones, blunted, and a brown to dark brown spore print as *P. orientalis* which supported by molecular characteristics. *Pisolithus albus* basidiomes were only collected from *Eucalyptus camaldulensis* plantations, whereas *P. orientalis* basidiomes were collected from *Pinus kesiya*. Pure cultures were isolated from each basidiome and mycelial growth conditions were investigated. The result indicated that both fungal mycelia grew well on modified Melin-Norkans (MMN) agar at 30°C. Fungal mycelium grew on vermiculite/peat supplemented with MMN liquid medium was used as inoculum of the *in vitro* ectomycorrhizal formation between fungi and *E. camaldulensis*. The mycorrhization of *P. albus* and *P. orientalis* were first observed on eucalyptus seedling at three and four months after inoculation, respectively. These results can help select suitable conditions to support mycelial inoculum production for application and management in plant inoculation programs, especially in the inoculation programs of eucalyptus in Thailand.

Back to Index

Book of Abstracts
8th Congress of the International Symbiosis Society

{Symbiotic Lifestyle}



Venue & Date: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; Lisbon, Portugal; 12-18 July, 2015
Editors: Silvana Munzi, Florian Ulm
Organizing Committee: Silvana Munzi, Cristina Cruz, Rusty Rodriguez, Irene Newton

P

The ectomycorrhizal status determination of *Phlebopus portentosus* using isotopic analysis

JATURONG KUMLA[1], ERIK A. HOBBIE[2], NAKARIN SUWANNARACH[1], SAISAMORN LUMYONG[1]

[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand*
[2]*Earth Systems Research Center, Morse Hall, University of New Hampshire, Durham, NH 03824, USA*

Phlebopus portentosus is one of the most popular wild edible mushrooms in northern Thailand. It can produce sporocarps in the absence of host plant conditions. However, it is still unclear whether *P. portentosus* is a saprotrophic or ectomycorrhizal fungus. *Phlebopus portentosus* spocarps were collected from natural habitat in northern Thailand and identified based on morphological and molecular characteristics. This study aimed to determine the status of this fungus using the stable isotopic analysis and to compare the stable carbon ($\delta^{13}C$) and nitrogen ($\delta^{15}N$) isotope compositions of *P. portentosus* sporocarps against sporocarps of known saprotrophic and ectomycorrhizal fungi. The result indicated that the average $\delta^{13}C$ of ectomycorrhizal fungi and *P. portentosus* were significantly lower than saprotropic fungi. The average $\delta^{15}N$ of ectomycorrhizal fungi was significantly higher than *P. portentosus,* whereas both were significantly higher than saprotropic fungi. Moreover, the $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ of *P. portentosus* samples clustered with ectomycorrhizal fungi and were clearly separated from saprotrophic fungi. Therefore, both stable isotope comparisons indicated that *P. portentosus* in natural habitat is an ectomycorrhizal fungus.

Back to Index