# รายงานการวิจัย

## การสำรวจการกระจายของราที่เจริญในต้นพืชป่าบริเวณดอยสุเทพ-ปุย

## Distribution of Endophytic Fungi Among Indigenous Plant Species in Doi Suthep-Pui Area


สายสมร ลำยอง

พิภพ ลำยอง

นิตยา บุญทิม

Kevin D. Hyde


พ.ศ. 2541


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานสนับสนุนการวิจัย

ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา

BB/17/2539

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอย่างยิ่งต่อสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้มอบทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทโครงการพื้นฐานเพื่อการพัฒนา ประจำปี 2540 ตามสัญญา BRG 17/2539 ลงวันที่ 30 กันยายน 2539 ซึ่งนับเป็นโอกาศอันดีที่หายากยิ่งสำหรับงานวิจัยทางด้านพื้นฐานที่จะได้รับการสนับสนุน ขอขอบคุณผู้ร่วมงานทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานนี้สำเร็จลงด้วยดี

สายสมร ลำยองและคณะ

ธันวาคม 2541

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**Project : Distribution of Endophytic Fungi Among Indigenous Plant Species in Doi Suthep-Pui Area**

Thirty nine indiginous dicotyledonous plant seedling species and two mature plants (*Shorea roxburgii* and *Mesua ferrea*) collected from Doi Suthep-Pui National Park area were examined for endophytic fungi. The first set of experiment was done with 32 seedling species by random sampling from plant tissue. Isolation was achieved by a standard triple sterilization technique, using surface sterilized leaves disc , stem or branch segments plated onto water agar or 2% malt extract agar with 30 mg/l of rose bengal and 50 mg/l streptomycin sulfate or chloramphenicol and incubated at 30 °C up to 60 days. Advancing region ,14 days old, of mycelia growing from the tissue were transferred to PDA or corn meal agar slant and incubated at 30° C to promote sporulation.

Four hundred fungal isolates were obtained and these were sorted into strains. An average of 5 endophytic species occurred on each seedling species while 6-14 fungal species were obtained from mature plant species tested. Although as many as 30% of those were mycelia sterilia, many of the fungi isolated belonged to the typical endophytic genera, eg. *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp. and *Curvularia* sp. Several of the isolates are sterile Xylariaceous fungi. Less common species included *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Cladosporium* sp. and *Penicillium* sp. Rare species were *Apiosordaria striatispora* and *Guignardia* sp.which found in many seedling species. Malt extract rose bengal agar is better than water agar for isolation of endophytic fungi.

To evaluate the colonization rate and frequency of endophytic fungal species the second experiment was carried out by isolated endophytes from 7 seedlings and 2 mature plant species. A total of 14 fungal species were recovered from 700 samples of leaves , stems or twigs taken from 5 individual plants. *Shorea roxbougii* showed the highest diversity of endophytes, whereas *Manglietia garrettii* showed the lowest (9 species).The most frequently isolated fungi were *Gloeosporium* sp., *Glomellera* sp., mycelia sterilia, *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Cladosporium* sp UK2, *Phomopsis* sp, *Guignardia* sp.MK3 and Xylariaceous fungi . Other species of not more than 30 isolates were *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Didymella* sp. The less frequent isolates were *Sporomella* sp., *Corynespora* sp., UK 3, *Seimatosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Selenophoma* sp. Seven rare species were obtained. The higher colonization rate and diversity of taxa were obtained from older segments than younger tissue segments.

Preservation of culture under sterile water at 4°C was the most convenient way to keep for at least one year. Culture kept on slant with silicone stopper or screw cap at room temperature or at 4 °C was another easy way but subculture was need every 6 months.

Xylariaceous fungi could roughly grouped by different culture morphology. Twenty four groups were differentiated by colony characteristic on oat meal agar and corn meal agar. The molecular technique using RAPD-PCR is possible to identify endophytic fungi into intra species level. By using 18S rDNA sequencing teachnique for phylogenic study, *Guignardia* sp and *Selenophoma* sp. was very close to *Botryosphaeria ribis* and *Lasioderma serricorne* repectively. This method has high potential to be used for the identification of the myceria sterilia group and also for xylariaceous fungi.

**Key words**: biodiversity, fungal diversity, endophytic fungi, Doi Suthep-Pui

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**เรื่อง การสำรวจการกระจายของราที่เจริญในต้นพืชป่าบริเวณดอยสุเทพ-ปุย**

ได้ทำการแยกเชื้อราที่อาศัยในต้นพืชจากพืชป่าที่เป็นต้นกล้า 39 ชนิด พืชต้นแก่ 2 ชนิด (พะยอม : *Shorea roxburgii* และบุนนาค: *Mesua ferrea*) การทดลองชุดแรกจะศึกษาจากกล้าพืช 32 ชนิด โดยสุ่มแยกจากเนื้อเยื่อพืช วิธีการแยกจะทำการฆ่าเชื้อที่ผิว 3 ขั้นตอน, จากนั้นนำส่วนของใบ ลำต้น หรือกิ่งที่ตัดเป็นชิ้นๆ ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะในอาหาร water agar หรือ 2% malt extract agar ที่ผสม rose bengal (30มก./ลิตร ) และ สเตร็ปโตมายซีน ซัลเฟต หรือคลอแรมฟินิคลอ (50 มก./ ลิตร ) บ่มที่ 30 °C นาน 60 วัน ทำการย้ายเส้นใยที่เจริญจากเนื้อเยื่ออายุ 14 วัน ไปเลี้ยงในหลอดอาหารวุ้นเอียง PDA หรือ corn meal agar บ่มที่ 30 °C เพื่อให้เกิดการสร้างสปอร์

แยกได้เชื้อรา 400 isolate ซึ่งเมื่อนำไปบ่งบอกชนิดพบว่า โดยเฉลี่ยแล้วจะพบเชื้อรา endophyte 5 species ต่อต้นกล้า 1 ชนิด แต่พบถึง 6-14 species ในพืชต้นแก่พยอม 30% ของเชื้อราที่แยกได้จะเป็นกลุ่ม Mycelia sterilia (ที่ไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์) ราหลายชนิดเป็นจีนัสที่พบเสมอว่าเป็น endophytes ได้แก่ *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp. และ *Curvularia* sp. หลาย isolates จะเป็นรากลุ่ม Xylaria พบราที่ไม่ค่อยพบว่าเป็น endophyte รวมทั้ง *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Cladosporium* sp. และ *Penicillium* sp., species ที่พบยาก คือ *Apiosordaria striatispora* และ *Guignardia* sp. ซึ่งพบในกล้าพืชหลายชนิด อาหาร malt extract ผสม rose bengal จะใช้ได้ดีกว่า water agar

การทดลองชุดที่ 2 จะเป็นการหาอัตราการมาอาศัยอยู่ และความถี่ของราชนิดต่าง ๆ ในต้นกล้าพืช 7 ชนิด เปรียบเทียบกับพืชต้นแก่ 2 ชนิด (พะยอม และบุนนาค) พบรา 14 ชนิด จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ 700 ตัวอย่างจากใบ, ลำต้น หรือกิ่ง ซึ่งก็ยังคงพบ 5 species ต่อต้นกล้า 1 ชนิด เช่นเดียวกัน พยอมจะพบราหลากหลายที่สุดส่วนในบุนนาคอยจะพบน้อยชนิด (9 species) ราที่พบบ่อยในกล้าที่แยกทั้ง 7 ชนิดคือ *Gloeosporium* sp.,*Glomellera* sp., Mycelia sterilia, *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Cladosporium* sp., UK2, *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp. MK3 และรากลุ่ม *Xylaria* ราที่พบไม่เกิน 30 isolates คือ *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Didymella* sp. ราที่พบไม่มากคือ *Sporomella* sp., *Corynespora* sp., UK3, *Seinalosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. และ *Selenophoma* sp. พบรา 7 ชนิดที่เป็น rare species เนื้อเยื่อของพืชที่แก่จะพบราหลากหลายมากกว่าเนื้อเยื่อที่อ่อน

การเก็บรักษา culture ของ endophytes ที่แยกได้ วิธีที่สะดวกที่สุดคือ การเก็บในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่ 4 °C จะเก็บเชื้อได้นานอย่างน้อย 1 ปี ส่วนการเก็บเชื้อในหลอดอาหารที่มีจุกยางหรือจุกเกลียวและเก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือ ที่ 4 °C ก็เป็นอีกวิธีที่ดี แต่ต้องถ่ายเชื้อทุก 6 เดือน

รากลุ่ม *Xylaria* นั้นสามารถแยกความแตกต่างคร่าว ๆ โดยดูลักษณะการเจริญในอาหาร จัดกลุ่มจากราที่แยกได้เป็น 24 กลุ่ม เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร oat meal agar และ corn meal agar การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ก็สามารถที่จะบ่งบอกชนิดของ endophytes ถึงระดับ species หรือ strain ได้ การใช้เทคนิค 18S rDNA sequencing เพื่อศึกษา phylogenetic นั้นได้ทำการศึกษากับ *Guignardia* sp. และ *Selenophoma* sp. พบว่ามีวิวัฒนาการมาใกล้เคียงกับ *Botryosphaeria ribis* และ *Lasioderma serricorne* ตามลำดับ วิธีการนี้มีแนวโน้มสูงที่จะใช้ได้ดีในการบ่งบอกของรากลุ่ม Mycelia sterilia และ Xylaria

คำหลัก: ความหลากหลายทางชีวภาพ, ความหลากหลายของเชื้อรา, เอนโดไฟต์, ดอยสุเทพ-ปุย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญเรื่อง


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | 1 |
| บทคัดย่อ ภาษาไทย | 2 |
| ภาษาอังกฤษ | 3 |
| บทนำ | 5 |
| การตรวจเอกสาร | 6 |
| บทที่ 1 การสำรวจรา endophytes จากพืช 32 species | 15 |
| บทที่ 2 การสำรวจรา endophytes จากพืช 9 species | 26 |
| บทที่ 3 ลักษณะ culture ของ endophytic Xylariaceae | 61 |
| บทที่ 4 การจัดจำแนกเชื้อราโดยวิธี Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) | 91 |
| บทที่ 5 การบ่งบอกชนิดของราที่เป็น unknown โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล | 97 |
| สรุป | 99 |
| Out Put | |
| สิ่งตีพิมพ์ | 100 |
| ส่งส่งพิมพ์ | 103 |
| รายงานการเงิน | 109 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# บทนำ

ปัจจุบันเรื่องของความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) กำลังเป็นที่สนใจและเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ทั่วโลกจะต้องมีความร่วมมือกันที่จะรักษาและใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนร่วมกัน ทั้งนี้ในปัจจุบันความหลากหลายดังกล่าวในธรรมชาติกำลังลดน้อยลงมาก เนื่องมาจากการรบกวนของมนุษย์และการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างฟุ่มเฟือย ในประเทศไทยก็ได้มีการจัดการประชุมหลายครั้งจากกลุ่มนักวิทยาศาสตร์แต่ก็ยังไม่มีการดำเนินงานที่เป็นรูปธรรม ป่าไม้นับเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากที่สุด แต่จากการตัดไม้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ ทำให้ความหลากหลายลดลง การเพิ่มพื้นที่ป่าเพื่อฟื้นฟูแหล่งของความหลากหลายก็กำลังดำเนินอยู่ ขณะเดียวกันเราก็ยังขาดข้อมูลของสิ่งมีชีวิตที่ยังคงเหลืออยู่ในแหล่งธรรมชาติ พืชป่าหลายชนิดกำลังจะสูญพันธุ์ พืชป่าเหล่านี้มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพป่าดั้งเดิมได้ดี จึงมีคุณค่าในการที่จะนำมาปลูกเพื่อเพิ่มพื้นที่ป่า พืชป่ามักมีคุณสมบัติที่ทนโรค ทนแล้ง ทนต่อการเบียดเบียนของแมลงและสัตว์ มีการเจริญที่แข็งขันได้ดี ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวมีรายงานจากการวิจัยในต่างประเทศที่เชื่อถือได้ว่าเนื่องจากพืชเหล่านี้มีราที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืช ดังพบว่ามีการกระจายทั่วทั้งต้นโดยไม่ทำอันตรายกับพืชอาศัย เป็นราที่เรียกว่า endophytic fungi ความสัมพันธุ์นี้มีการศึกษากันมากในหญ้าเลี้ยงสัตว์ ในพืชใบเลี้ยงคู่ซึ่งจะรายงานกับพืชในเขตอบอุ่น นอกจากนี้ราที่อาศัยในต้นพืชเหล่านี้ยังสามารถสร้างสารออกฤทธิ์เช่นเดียวกับพืชอาศัย ( Maurizio, *et. al.*, 1996 ) และยังเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่หลายชนิดที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นอุตสาหกรรมทางการแพทย์และเภสัชกรรมได้ การศึกษาในเรื่อง endophytifc fungi ในประเทศไทยยังมีน้อยมาก ยังไม่มีข้อมูลที่จะใช้อ้างอิงเกี่ยวกับเรื่องนี้ได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ที่จะต้องมีการสำรวจหาข้อมูลการกระจายของ endophytic fungi ดังกล่าวในพืชป่าที่มีความหลากหลายมาก ด้วยมีข้อมูลที่สนับสนุนว่าจะพบความหลากหลายของ endophytic fungi มากเป็น 5 เท่าโดยเฉลี่ยตามความหลากหลายของพืช( Rodrigues and Petrini, 1997 ) ทั้งนี้ผลจากการสำรวจก็จะทำให้ได้ข้อมูลการกระจายของเชื้อราและเพื่อการเก็บรวบรวมเพื่อการใช้ประโยชน์ทั้งในการปลูกป่าและการนำไปใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืนจากตัวเชื้อราในภายหลัง ทั้งนี้จะทำให้เรามีแหล่งพันธุกรรมใหม่ ที่สามารถจะนำไปจดลิขสิทธิ์ผลผลิตใหม่ๆ หรือการทำโคลนจากสายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นจากแหล่านี้ ทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางอื่นต่อไปโดยไม่ต้องตกเป็นลิขสิทธิ์ของต่างชาติเหมือนที่เคยเป็นหรือกำลังจะเป็น

งานวิจัยนี้จึงเป็นพื้นฐานสำคัญยิ่งของงานทางด้านอนุกรมวิธารของเชื้อรา นิเวศวิทยาของเชื้อราและการเก็บรวบรวมเชื้อราที่มีชีวิตเพื่อนำไปพัฒนาใช้ทางด้านต่างๆต่อไป ซึ่งผลประโยชน์ที่จะได้รับคือข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ในการอ้างอิงและศึกษาต่อ อันจะทำให้เข้าใจลักษณะของ biodiversity และความสัมพันธ์ในระบบนิเวศของ endophytic fungi กับชนิดของพืชในบริเวณป่าเขตอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย ที่เป็นแหล่งต้นน้ำและทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญของภาคเหนือ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม เราก็จะสามารถประเมินความเสี่ยงที่จะมีผลตามมาในแง่ต่างๆได้ เช่นความเสี่ยงของการเกิดโรคจากเชื้อราที่อยู่ในระยะพักตัวในต้นไม้ที่สำคัญ หรือการสูญเสียแหล่งพันธุกรรมของเชื้อราเนื่องจากต้นไม้ถูกทำลายหรือกำลังจะสูญพันธุ์เป็นต้น นอกจากนี้ยังจะเป็นการค้นพบเชื้อราชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งทำให้เราสามารถนำไปค้นคว้าหาประโยชน์จากการผลิตสารที่มีประโยชน์หรือลักษณะพิเศษต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# การตรวจเอกสาร

Endophytes หมายถึงสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในเนื้อเยื่อพืช (1) โดยพื้นฐานแล้ว endophytesของหญ้าคือ *Clavicep* มีรายงานว่าอาศัยแบบ mutualism กับโฮสท์ นอกจากนี้ยังสามารถแยกได้ endophytes ของไม้ยืนต้น ไม้พุ่มและไม้ล้มลุก (รวม endophytes กลุ่มที่ไม่ใช่ *Clavicep* ในหญ้าด้วย) จากหลักฐานในแง่บวกกับพืช ศัพท์ endophyte นี้จึงเกือบเหมือนกับ mutualism (2, 3, 4) แต่ก็มีเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคพืชแต่บางช่วงชีวิตจะพักตัวในเนื้อเยื่อของโฮสท์โดยไม่ทำอันตรายต่อโฮสท์ (5)

Petrini (1) ก็เลยขยายคำจำกัดความของ endophyte ว่าหมายถึง จุลินทรีย์ทั้งหมดที่ในช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตจะสั้นหรือยาวก็แล้วแต่ มาอาศัยอยู่ภายใน โฮสท์ รวมทั้งที่เป็น mutulism, neutral symbiont และ pathogen ด้วยแต่อยู่แบบพักในพืชที่เป็นโฮสท์ มีข้อมูลที่น่าเชื่อถือได้เกี่ยวกับ endophytes ที่เป็นสาเหตุ ของโรคพืชและ endophyte ที่อยู่กับราก แต่ยังมีข้อมูลจำนวนน้อยสำหรับ endophyte ที่ไม่ทำให้เกิดอาการผิดปกติ ซึ่งอยู่แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันของโครงสร้างของพืชที่อยู่เหนือดิน

Endophytic fungi เป็นกลุ่มราที่อาศัยอยู่กับต้นพืช โดยเฉพาะส่วนเหนือดิน โดยกระจายทั่วทั้งต้น Bacon (6) จัด endophyte เป็นกลุ่มราที่มีความแตกต่างกันทั้ง ชนิดและนิเวศวิทยา ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่ม Ascomycotina และ Deuteromycotina วิธีการแยกเชื้อจะมีผลต่อชนิดของ endophytic fungi ที่มีในโฮสท์ จำนวนกลุ่มที่แยกจากโฮสท์แต่ละชนิดมักจะมาก แต่มีน้อยที่จะจำเพาะต่อชนิดของโฮสท์ ซึ่งมักจะเป็น dominant ในพืช endophytes จะจำเพาะในระดับ species ของโฮสท์ แต่ส่วนประกอบและความถี่จะเปลี่ยนแปลงโดยสภาวะจำเพาะของถิ่นที่อยู่ (habitat) ซึ่งจะ พบประมาณ 40 ชนิดต่อ 34-40 หน่วยของโครงสร้างแต่ละส่วนของต้นพืช แต่ละ individual จะพอเพียงที่จะตรวจพบถึง 80% ของ texa ที่พบในโฮสท์ในที่หนึ่งๆ พบว่า endophyte มักจะมีการสร้างเอนไซม์ที่จำเป็นในการรวมกลุ่มในเนื้อเยื่อพืช จากการศึกษาการใช้สับสเตรทและการวิเคราะห์ ด้วย isozyme พบว่า endophytes ส่วนใหญ่จะสามารถใช้ส่วนประกอบของเซลล์พืชได้ มีการสร้าง factors ที่ช่วยเร่งการ เจริญเติบโตของพืช และสร้างสารที่มีประโยชน์ในทางเภสัชกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร (7)

Dickinson รายงานถึง endophytic fungi: *Fusarium moniliforme* ใน ข้าวโพดและมีการศึกษากันมากจะเป็น endophyte ของพืชตระกูลหญ้าที่ใช้เลี้ยงสัตว์ tall fescue, *Festuca arundinacea* (8) ซึ่งพบว่าหญ้าที่มี endophyte จะทนต่อการ ทำลายของแมลง ( 9,10,11,12 ) นอกจากนี้ยังทนต่อความแห้งแล้ง แข่งขันกับพืช อื่นได้ดี และมีการเจริญเติบโตดี โดยจะให้น้ำหนักแห้งมากกว่าหญ้าที่ไม่มี endophyte (13,14,15,16,17)

Bacon (6) ได้รวบรวมรายงานถึงธรรมชาติและแนวทางที่จะใช้ endophyte ในการปรับปรุงคุณภาพของหญ้า ในแง่การใช้เป็นตัวควบคุมโรคและแมลงทางชีวภาพ เป็นแบบในการศึกษา กลไกในการทน stress เช่นทนแล้ง ทนร้อนหรือทนต่อการเข้าทำลายของโรค ราที่เป็น endophyte เช่น *Acremonium coenophilium* กับพืช tall fescue ทำให้พืชนี้ทนต่อการกัดกินของแมลงและสัตว์ รา endophyte ที่สร้างสารที่มีผล ทางเภสัชกรรมกลุ่ม ergot alka;oid เช่น *Balansia cyperi* อยู่กับพืชพวก *Cyperus sp.* ราที่ทำให้พืชมีการเติบโตดี ทรงพุ่มแน่นและเขียวเช่น เชื้อ*Acremonium lolii* กับพืชล้มลุก ryegrass ราที่ทำให้พืชทนแล้งและร้อนเช่น *Acremonium lolii* กับหญ้าเป็นต้น แต่พบว่าในกรณีของ tall fescue นั้นจะมีผลร้ายต่อสัตว์ที่กินหญ้า เนื่อง จากมี feacue toxicosis ต้องมีการศึกษาหาสายพันธุ์ที่ไม่มี endophytes

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Guy (18) รายงานว่า endophytic fungi : *Acremonium lolii* พบใน ryegrass ทุกตัวอย่างจากทุ่งเลี้ยงสัตว์ในทรัสมาเนีย ไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์ Ellett, Martlet, Tasdale, Tasmania No1 และ Victoria จำนวนที่ปรากฏ 4-94 % (เฉลี่ย 66%) หญ้าที่มีอายุ 4 ปี จะทำให้สัตว์มีอาการที่เรียกว่า perennial ryegrass syndrom ซึ่งจะพบราในหญ้านี้ 79-94% จากการสำรวจ ไม่พบผลความสัมพันธ์ระหว่าง การเกิดโรค barey yellow dwarf จาก yellow dwarf virus กับจำนวนรา *A. lolii* ในหญ้าที่พบ ผลจากการตรวจด้วยกล้องจุลทัศน์จากเซลล์เยื่อผิวของก้านและ ELISA จะจำเพาะสำหรับ *A. lolii* และไม่สามารถตรวจหา รา endophyte *Acremonium coenophialum* ของ tall fescue ได้ Gwinn, *et al.*(19) ได้ใช้เทคนิค Tissue Print Immunobolt (TPIB) ตรวจหาการกระจายของ endophyte *A. coenophilum* ในเนื้อเยื่อของ tall fescue ซึ่งความแม่นยำของวิธีนี้เมื่อใช้ตรวจการกระจายของ endophytes ในทุ่งหญ้า และเมล็ด เทียบเท่ากับวิธีอื่นๆ ที่ใช้ในการตรวจหาการกระจายของ endophytes ได้แก่ วิธี protein sanwich ELISA

Frohlick and Hyde (20) รายงานการพบราชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการให้ description หลายชนิด เช่น *Oxydothis* ชนิดใหม่ที่พบในปาล์ม

**ความจำเพาะต่อโฮสท์ของ endophytes**

Petrini and Fisher (21) ได้ศึกษาเกี่ยวกับ endophytic fungi ของ ไซเลมและเปลือกของต้น *Quercus robur* และ *Salix fragilis* โดยเปรียบเทียบดูความจำเพาะของเชื้อรากับชนิดของพืชและตำแหน่งเนื้อเยื่อในแต่ละ communities พบว่า ราที่พบใน *Salix* ส่วนใหญ่เกือบทั้งหมดจะเป็น endophytes ที่พบทั่วๆ ไปในพืชอื่น ยกเว้นเชื้อ *Phomopsis salicira* จากต้น *Quercus* ที่มีความจำเพาะต่อโฮสท์มากกว่า เชื้อราที่พบจะมีการกระจายสม่ำเสมอ (homologus) ในตัวอย่างที่นำมาศึกษา กลุ่มของ ราในกิ่งของ *Quercus* และ *S. fragilis* ชนิดที่เด่นมีน้อย มักจะพบทั้ง 2 พืช ผลการ วิเคราะห์กลุ่มแสดงให้เห็นว่า ในกิ่งที่แตกออกไปนั้นมีกลุ่มของ endophytes ต่างชนิดกัน แขนงของต้น *Q. robur* ที่เก็บจากตำแหน่งที่ออกในทิศตรงกันข้ามกันจะมี endophytes ที่เหมือนกัน Endophytic fungi มีความจำเพาะต่ออวัยวะของโฮสท์ ขึ้นกับการปรับตัวของ endophyte เอง ต่อ microecology และสภาวะทางสรีระวิทยาบางอย่างของอวัยวะนั้น มีรายงานการศึกษามาก

Carrol *et al* (22) ได้เสนอว่า endophytes จะจำเพาะต่อเนื้อเยื่อบางชนิด เนื่องจากฟังไจที่แยกได้หลายชนิด จากก้านใบของ สนยุโรป (Euopean conifer) ที่มักจะ พบเสมอในส่วนนี้ ซึ่งในส่วนของใบจะไม่ค่อยพบเลย จากการวิเคราะห์สังคมของโฮสท์และฟังไจ ได้แสดงให้เห็นว่า endophyte มัก จะจำเพาะที่ระดับ species ในการศึกษา endophyte ของกิ่งสน *Pinus sylvestris* และ *Fagus sylvatica*

Petrini and Fisher (23) รายงานว่า ราที่เจริญในโฮสท์ทั้งสองชนิดนี้ จะ ต่างกัน เช่นเดียวกับหลักฐานที่ได้จากการศึกษาในพืช species อื่นๆ (24,25,26,27) และให้หลักฐานเพิ่มในการพัฒนาของ endophyte ที่มีความจำเพาะสูงกับโฮสท์ ในโฮสท์หนึ่งแยกได้ endophytes หลาย species แต่มีไม่กี่ species ที่พบจำนวนมากพอ (จากจำนวนที่ taxa ทั้งหมดที่พบได้จากแบคทีเรีย กับจำนวน species ของฟังไจ 50%) ไม่พบรูปแบบที่แสดงว่าชนิดของเนื้อเยื่อหรือตำแหน่งที่แยกเชื้อราจะคงที่ (consistent) ประมาณ 10% ของ taxa จะเป็นชนิดที่พบเสมอ (dominant)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ความจำเพาะของ endophytes ในแง่การสร้างเอนไซม์**

Endophytes จะผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์ที่สลายคิวติเคลและอิพิเดอร์มิสเนื่องจากต้องอาศัยวิธีการเดียวกันกับเชื้อสาเหตุในการแทรกเข้าไปในพืชที่เป็น โฮสท์ (24,25) นอกจากนี้ยังพบว่า *Melanconium spp* (26 ) มีเอนไซม์ที่จำเพาะสูง ซึ่งทำให้เป็นที่สนใจในแง่การนำไปผลิตพวก non-specific $C_4$ esterase และ $C_8$ esterase lipase ทั้งนี้จะพบใน *Melanconium* มากกว่า 88% และใน *Apiognomonia errabunda* ทุกไอโซเลต

รายงานจากการศึกษา endophytes ส่วนใหญ่พบว่า รากลุ่มนี้จะสร้าง pectinase, xylanase, lipolytic enzyme, non-specific peroxidase และ laccases นอกจากนี้ยังพบว่าสร้างเอนไซม์ cellulase, hemicellulase ทั้งนี้จะจำเพาะกับโฮสท์บางชนิดหรือเฉพาะเนื้อเยื่อ การใช้แป้งจะจำกัดในไม่กี่ชนิด (27,28) *Atkinsonella hypoxylan* และ *Balansia epichloe* สามารถเจริญ ในหยดขี้ผึ้งได้และมีการทำงานของ protenase (29) มีการศึกษาชีววิทยาของ *Apiognomonia errabunda* และ *Melanconium sp* ที่คัดเลือก (26) แสดงหลักฐานว่า endophytic fungi นั้นมีความจำเพาะสูงต่อการทำงานของเอนไซม์

นอกจากนี้ยังพบว่า endophyte ที่แยกได้จากโฮสท์เดียวกันจะมีการทำงานของ เอนไซม์เหมือนกัน (30) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยัน ว่าในฟังไจชนิดเดียวกันจะมีสายพันธุ์ ที่จำเพาะต่อโฮสท์

ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับ endophytic fungi ตามคำจำกัดความข้างต้นยังตรวจไม่พบรายงาน

**ประโยชน์ที่พืชได้รับจาก endophytes**

1. ทนการทำลายจากแมลงและสังเคราะห์แสงได้มาก จากการประชุมของสถาบันวิจัย USDA ใน Atlanta เมื่อปี 1994สรุปว่า หญ้าเลี้ยงสัตว์ fescue ที่ไม่มี endophyte นั้นจะเสี่ยงต่อการทำลายของแมลง ไม่คงทนต่อความแห้งแล้งและการและเล็มของสัตว์ นอกจากนี้นักวิจัยจาก Winthrop College ใน Sounth Caralina ได้ทำการวิจัยและรายงานว่า fescue ที่มี endophyte จะยังคงมีการสังเคราะห์แสงได้มากที่อุณหภูมิสูงเมื่อเปรียบเทียบกับหญ้าที่ไม่มี endophyte (Internet com.munification)

2. ไม่ทำให้เกิดโรค Harvey(31) รายงานถึงการสำรวจ endophytic fungi ในใบยาสูบที่สมบูรณ์ โดยการฆ่าเชื้อที่ผิวใบซึ่งตัดให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มม. ด้วย sodium hypochlorite (NaClO) เป็นเวลา 30-60 วินาที หลังจากนั้นล้างน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้งก่อนที่จะนำไปวางลงบนจานอาหาร Czapek's solution agar ที่มี 6% NaCl พบ endophyte หลายชนิด ซึ่งจำนวนจะเพิ่มขึ้น เมื่อใบเจริญเติบโต บางชนิดจำเพาะต่อโฮสท์ เช่น *Alternaria sp.* พบในยาสูบทุกชนิด รองลงมา คือ *Penicillium, Aspergillus* และ *Cladosporium* spp ตามลำดับ *Alternaria* ไม่สามารถทำให้เกิดอาการโรคจุดสีน้ำตาล และยังพบว่าในกล้าของยาสูบที่เพาะในเรือนเพาะชำจะไม่พบ endophyte แต่เมื่อนำไปปลูกในไร่จะ พบ endophytes ในใบ และในใบจากทุกตำแหน่งของก้านจะมี endophytic fungi ที่ความถี่เหมือนกัน

3. ลดการเกิดเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยว Jeffers (32) ศึกษาการเกิดเชื้อราในแต่ละฤดูในใบและผลของแคนเบอรี่ที่ไม่มีอาการของโรคและที่ พ่นยาฆ่ารา: captofol,chlorothalonil และ mancozeb 3 ครั้งในช่วงห่าง 14 วันเพื่อป้องกันโรคเน่าหลังเก็บเกี่ยว สามารถแยกได้ราจากส่วนของใบและผลที่เก็บตัวอย่างตลอดปี ที่หลังจากทำการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว พบมีเพียง 7 ชนิดที่เป็นสาเหตุของโรค ได้แก่ *Apostrasseria lunata, Botryoshaeria vaccinii, Glomerella cinglulata, Godronia cassandrae,Physalospora vaccinii* ที่มีสัณฐานต่างกัน 2 ชนิด, *Phythoptora sp.* และ *Pyrenobotrys campacta* และอีก 3 ชนิด ที่มีความเป็นไปได้ที่จะทำให้เกิดโรค เชื้อ *B. vaccinii* และ *P. vaccinii* พบในความถี่สูงและพบเสมอ สัดส่วนของใบและผลที่แยกได้นั้นจะสูงขึ้นตามเวลาที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฤดูกาล ผ่านไป ในตัวอย่างที่ใช้ยาฆ่ารา ก็ไม่พบความแตกต่างของรา endophytes ในช่วง ของฤดูกาลที่ศึกษาทั้งใบและผล การใช้ยาฆ่าราซ้ำไป 2-6 สัปดาห์ จะเพิ่มจำนวนราในใบและผล การให้ยาในช่วงเกือบสิ้นสุดของฤดูกาลจะลดจำนวนโคโลนีของราทั้ง endophyte, ราสาเหตุโรคพืชและ *B. vaccinii* ในใบและผล แต่ราอื่นไม่มีผล สรุปว่าการใช้ยาฆ่าราในช่วง 10 สัปดาห์หลังตาดอกแตก ควรจะลดการเกิดเชื้อรา ในใบและผลของแคนเบอร์รี่ได้ดีกว่าให้ในระยะก่อนนี้

4. สร้างสารที่เป็นพิษในพืชเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของแมลง Larry *et al.*(33)รายงานถึงการสร้างสารที่เป็นพิษต่อ spruce budworm จากเชื้อรา endophytes 3 สายพันธุ์ของต้น balsom ซึ่งสารนี้จะลดอัตราการเจริญและการรอดชีวิตของหนอนลง รานี้คือ *Phylostricta sp.* strain 76 ซึ่งจะสร้าง (1) heptetidic acid, 1,5a, 6,7,8,9a-hexahydro-6(1-methyllethyl)-1-oxo-spiro [2-benzohexepin-9(3H),2 oxirarel]-4carboxylic acid (2) heptelidic acid chlorohydrin (3) hydroheptelidic acid

ส่วนรา *Hormonema dematiodes* strain 53 และ 143 จะสร้างสารที่ วินิจฉัยว่าเป็น(+) rugulosin ซึ่งเป็น anthraquinone ที่มีรายงานมาก่อนว่ามีผลทางชีวภาพกว้าง รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่บ่งถึงการวินิจฉัยสารที่ endophytes ของพืชไม้เนื้อแข็งสร้างขึ้น

5. ช่วยยับยั้งการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย Arkansas (34) รายงานการ ทดลองที่พบว่า endophytes สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย และทำให้พืชสามารถเจริญได้ในระยะที่นานกว่าและไม่ต้องใช้ปุ๋ยมาก

6. การสร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต เช่น indo-3-acetic acid (IAA) และ indole-3-acetonitrile พบใน *Aureobasidium pullulan, Epicoccum purpurascens* (35,36) cytokinin ผลิตโดย *Hypoxylon serpens* ที่แยกจากยาสูบ ซึ่งเร่งกระบวนการออกดอกของโฮสท์ สายพันธุ์อื่นจะชักนำให้เกิดการเหี่ยวและยับยั้งการเจริญของกล้ายาสูบ (37)

7. การสร้างสารปฏิชีวนะ endophytes fungi หลายชนิดสร้างสารปฏิชีวนะ ในขณะเพาะเลี้ยง ซึ่งมีผลต่อต้านแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคคนและพืช Fisher *et al.* (38) รายงานการทดสอบพบว่า endophytes มากกว่า 30% ของทั้งหมด ที่ทำการคัดเลือก สร้างสารต้านเชื้อราและแบคทีเรีย Fisher *et al.* (39) ได้ อธิบายถึงสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์กว้างของ *Cryptosporiopsis sp.* ซึ่งเป็น endophyte ที่แยกได้จาก *Vaccinium myrtillus* จากการศึกษาต่อของ Fisher *et al.* (40) พบว่า *Coniothyrium sp* และ *Microsphaeropsis* sp เกือบทุกชนิดจะสร้างสารปฏิชีวนะ จำนวนมาก Dreyfuss (41) อธิบายถึงการสร้างพินิซิลิน เอน ใน endophyte ที่ แยกได้จาก *Pleurophomopsis* และสร้าง sporiofungens A, B, และ C ใน endophyte: *Cardamine heptaphylla* เช่นเดียวกับ endophytes พวกที่ไม่สร้าง สปอร์แยกจาก *Abies alba* รา endophyte กลุ่ม *Xylaria spp.*สร้างสารเมตาโบไลท์ที่นำไปใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรมและการเกษตร พบแฟมมิลีใหม่ของ cytochalasines จาก *Xylaria spp.*(41)เร็วๆ นี้ Brunner and Petrini (42) คัดจากสปอร์เดี่ยวๆและ endophyte กลุ่ม *Xylaria* พบว่ามากกว่า 75% จะ active ใน biological assay หลายชนิด และ 79% ของ endophytes ที่แยกได้จะเป็นแหล่งที่ active ที่สุดในการสร้างสาร ดังกล่าว

**วิธีการแยก endophytic fungi**

1. การแยกจากเนื้อเยื่อพืช การเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างที่มีลักษณะการเจริญปกติ สมบูรณ์ไม่มีอาการของโรคเมื่อเก็บตัวอย่างที่เป็นไม้เนื้อแข็งโดยการตัด ต้องทำการแยกภายใน 24 ชม. วิธีการแยก หลักการสำคัญที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จะบ่งชี้ว่าเป็นการแยก endophyte ที่แท้จริง ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีวิธีการที่ทำได้โดยตรง วิธีการที่ใช้ในปัจจุบันซึ่งมีในรายงานต่างๆ ที่ ใช้ศึกษาendophytes ก็คือการทำให้ปราศจากเชื้อที่ผิวของโฮสท์ที่นำมาใช้แยก วิธีการ ทำให้ปราศจากเชื้อที่ผิว หลายวิธีได้มีการพัฒนาขึ้นใช้ในการแยก endophyte จากเนื้อเยื่อของพืชอาศัย (1,2, 21, 43) เลือกชิ้นส่วนของพืชจากต้นที่สมบูรณ์ นำมาล้างผ่าน น้ำไหล แล้วฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการแช่ในเอทธานอลและโซเดียมไฮโปคลอไรด์เจือจาง จากนั้นนำไปวางในจานอาหารแข็งที่เติมสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Bill and Polyshook (43) แสดงให้เห็นว่าการใช้อาหารหลายชนิดใน การแยกเชื้อ จะทำให้แยกได้ endophyte หลาย species มากกว่า ซึ่งการใช้อาหาร selective จะเพิ่มการแยกความหลากหลายของ endophytes จากใบหรือกิ่งของพืช Chapela (44) ทำการแยกเชื้อจากใบและกิ่งของ American beech ที่นำไปทำให้แห้งก่อน สามารถแยกได้รากลุ่ม Xylariaceae ซึ่งแยกเป็น endophyte จำนวนน้อย คือแยกได้ 32% และ 41% จาก endophytes ทั้งหมดที่แยกจาก aspen และ beech ตามลำดับ ซึ่งการบ่มชิ้นส่วนของพืชไว้ที่ drying regimes ต่างๆ ก่อน ทำการแยก จะทำให้แยกได้ endophyte ที่ต่างกัน Baddy and Criffith (45) เสนอว่าส่วนประกอบของน้ำ จะเป็นตัวกำหนดการเพิ่มของ endophyte ใน sapwood ของ beech (*Fagus sylvatica*) เมื่อฆ่าเชื้อที่ผิวของไม้ที่เก็บมาใหม่ๆ จะแยกได้ endophyte หลาย species จากส่วนเนื้อไม้ของโฮสท์ ซึ่งต่างจากกลุ่มที่พบในโซนเดียวกับในสภาวะธรรมชาติ

การจุ่มตัวอย่างที่เป็นกิ่ง เปลือก หรือใบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-1.5 มม. ในอัลกอฮอล์ 95% นาน 60 วินาที ก่อนที่จะทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการแช่ใน sodium-hypochlorite 5 นาที แล้วล้างใน อัลกอฮอล์ 95% นาน 30 วินาที จาก นั้นนำไปเพาะใน 2% (w/v) malt extract agar ที่มี 8 mg/L NOVO-teramycin เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย บ่มเนื้อเยื่อไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 20°C นาน 2-8 สัปดาห์ แยกเชื้อราที่งอกขึ้นมาไปเพาะเป็นเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร 1% malt extract agar, ที่ 20°C จนมีการสร้างโครงสร้างในการสืบพันธุ์ ก็นำไปบ่งบอกชนิดมักจะแยกได้แค่ระดับ genera ราที่ไม่สร้างสปอร์จะอธิบายลักษณะสั้นๆ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงใน 20 ml 1% malt extract บ่มที่ 20°C การเจริญจากจุดศูนย์กลางจานอาหาร (radial growth) วัดเส้นผ่าศูนย์กลางหลังจากทิ้งให้เจริญ 10 วันในที่มืด บ่มที่ 20°C (46) หรืออาจนำเนื้อเยื่อที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วเพาะในอาหารเหลว $M_{102}$ บ่มไว้ เชื้อราจะเจริญ ออกมาได้ดีและเร็วกว่าในอาหารแข็ง (47)

2.ใช้วิธีให้มีการปล่อย ascospore หรือ conidiomata จากเนื้อเยื่อพืช โดยทำการล้างผิวนอกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ใช้เทปใสแปะเนื้อเยื่อติดกับฝาจานอาหารเหนือ อาหาร CMM รอจนมีการปล่อย spores ตกลงมาและงอกในอาหาร ซึ่งในอาหารอาจ เติม streptomycin sulfate ลงไปด้วยเพื่อยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อน (9)

3. การแยกรา endophytes จากกล้าพืชหรือเมล็ด (18)เพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยแช่เมล็ดใน 50% $H_2SO_4$ 20 นาที จากนั้นแช่ใน NaClO ล้างน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีกครั้ง แล้วเพาะในที่ชื้น 3-9 สัปดาห์

**การเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ**

การเพาะเลี้ยง endophyes ในห้องปฏิบัติการ สามารถทำได้เหมือนกับเชื้อราทั่วๆไป วิธีการที่ใช้แยก endophytes เป็นเชื้อบริสุทธิ์จะใช้อาหารที่ซับซ้อนน้อยกว่า อาหารที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 20-26 องศาเซลเซียส(48,49) pH ที่เหมาะสมยังไม่ทราบรายละเอียดแต่มีรายงานว่า *A. coenophialum* ทน pH ได้ในช่วงกว้างคือ 5.5-7.25 (50)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**การเก็บรักษา**

เชื้อ endophytes ที่แยกได้จากพืชที่เป็นพืชยืนต้นยังไม่มีรายงานมากนัก ที่กล่าวถึงส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อสาเหตุโรคพืช กรณีรา endophytes เชื้อ Balansia sp. เชื้อ Acremonium sp. ทำการ subculture เพียงครั้งเดียวก็พอแต่ *E. typhine* ต้องทำการต่อเชื้อบ่อย 3-4 ครั้งต่อปีทั้งนี้ ขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ โดยทั่วไปเก็บที่อุณหภูมิห้องดีที่สุด (9)

**การบ่งบอกชนิดและหรือกลุ่ม**

การบ่งบอกชนิดของ endophytic fungi นั้นถ้ามีการสร้างสปอร์ก็ใช้ลักษณะของสัณฐานวิทยาและลักษณะของการเจริญตรวจสอบกับ key โดยดูลักษณะของ การสร้างรงควัตถุ การเกิด sclerotium และการกระจายของเส้นใย แต่ถ้าเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างสปอร์อาจใช้ PCR หรือ restriction fragment analysis เพื่อบ่งบอกว่าเป็น intra- และ inter-group genetic variability โดยเทียบกับ known endophytes ที่บ่งบอกชนิดแล้ว (51)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# เอกสารอ้างอิง


1. Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In Microbiology of the Phylosphere Fokkema (ed. NJ, Van den Heuvel) pp . 175-187. Cambridge University Press, . Cambridge.

2. Carroll, G.C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutulistic symbiont. *Ecology* 69:2-9.

3. Clay, K. 1988a. Clavicepitaceous fungal endophytes of grasses: Coevolution and the change from parasitism to mutulism. In Coevolution of Fungi with Plants and Animals (eds. K.A. Pirozynsk and D.L. Hawksworth) pp.79-105, Acadamic Press, London.

4. Clay, K. 1988b. Fungal endophytes of grasses: A defensive mutulism between plantss and fungi. *Ecology* 69, 10-16.

5. Sinclair, J.B. 1991. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Disease* 75, 220-224.

6. Bacon, C.W. 1988. Procedure of isolating the endophyte from tall fescue and screening of it for ergot alkaloid. *Appl. Environ. Microbiol,* 54, 2615-2618.

7. Petrini, O., TN. Sieber, L. Toti, and O. Viret.1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* 1,185-196.

8. Bacon,C.W., J.K. Porter, J.D. Robbins and E.S. Luttrell. 1977. *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *Appl. Environ. Microbiol.*34,576-581.

9 Funk, C.R., P.M. Halisky, M.C. Johnson, M.R. Siegal, and A.V. Stewart. 1983. An endophytic fungus and resistance of sod webworms: association in *Lolium perenne* L. *Bio/Technol.*1,189-191.

10. Johnson, M.C., D.L. Dahlman, M.R. Siegel, L.P. Bush, G.C. Latch, D.A. Potter and D.R. Varney. 1985. Insect feeding deterents in endophyte-infected tall fescue. *Appl. Environ. Microbiol.*49, 568-571.

11. Clay, K., T.N. Hardy, and A.M. Jr. Hammond.1985*a*. Fungel endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. *Oecologia* 66, 1-6.

12. Latch, G.C.M., M.J. Chirstensen, and D.L. Gaynor. 1985*a*. Aphid detection of endophyte infection in tall fescue. *N.Z.J.Agric. Res.*28, 129-132.

13. Clay, K., 1984. The effect of the fungus *Atkinsonella hypoxylon* (Clavicipitaceae) on the reproductive system and demography of the grass *Danthonia spicata.New Phytol.* 98, 165-175.

14. Latch, G.C.M., W.F. Hunt, and D.R. Musgrave. 1985*b*. Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *N.Z.J.Agric.Res.* 28, 165-168.

15. Read, J.C. and B.J. Camp. 1986. The effect of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in tall fescue on animal performance, toxicity, and stand maintenance. *Agron. J.* 78, 848-850.

16. Clay, K. 1987. Effect of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *lolium perenne* and *Festuca arundinacea. Oecologi,* 73, 358-362.

Arechavaleta, M., C.W. Bacon, C.S. Hoveland, and D.E. Radcliffe. 1988. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agron.J.* 56, 257-260.


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

18 Guy, P.L. 1992. Incidence of *Acr4monium lolii* and lack of correlation with barley yellow dwarf viruse in Tasmanian perannial raygrass pastures. *Plant Pathology.* 41, 29-34.

19. Gwinn, K.D., M.H. Collinesshepard and B.B. Reddick. 1991. Tissue print-immunoblot an accurate method for the detection of *Acoemonium coenophialium* in tall fescue. *Phytopathology.* 81, 747-748.

20. Frohlich, J. and K.D. Hyde. 1994. New *Oxydothis* species associated with palm leaf spots in north Queensland, Aurtralia. *Mycol. Res,* 98, 213-218.

21. Petrini, O. and P.J. Fisher. 1990. Occurance of fungal endophytesin twigs of *Salix fragilis* and *Quer robur. Mycol. Res.* 94, 1077-1080.

22. Carroll, F.E.,E. Muller, B.C. Sutton. 1977. Preliminary studies on the incidence of needleendophytes in some European conifers. *Sydowia* 29, 87-103.

23. Petrini, O., P.J. Fisher. 1988. A comparative study of fungi endophytes in xylem and whole stems of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica. Trans Br. Mycol. Soc.* 91, 233-238.

24. Kolattukudy, P. 1985. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 233-250.

25. Howard, R.J., M.A. Ferrari, D.H. Roach and N.P. Money. 1991. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11281-11284.

26. Sieber, T.N., F. Sieber-Canavesi, O. Petrini, A.K.M. Ekramoddoullah and C.E. Dorworth. 1991. Characterization of Cannadian and European *Melanconium* from some *Alnus* species by morphological, cultural and Biochemical studies. *Can. J. Bot.* 69, 2170-2176.

27. Sieber, T.N. 1989. Substratabbauvermogen endophytischer Pilze von Weizenkornern. *Z. Pflanzenkrank Pflanzenschutz* 96, 627-632.

28. Petrini, L.E., O. Petrini, A. Leuchmann and G.C. Carroll. 1991. Conifer inhabiting species of *Phillosticta. Sydowia* 42, 148-169.

29. White, J.F., J.P. Breen, G. Morgan-Jones. 1991. Substrate utilization in selected *Acremonium, Atkinsonella* and *Balansia* species. *Mycologia* 83, 601-610.

30. Leuchtmann, A., O. Petrini, L.E. Petrini and G.C. 1992. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. *Mycol. Res.* 96, 287-294.

31. Harvey,C.N. 1975. Distribution of endophytes in tobacco leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* 14, 168-173.

32. Jeffers, S.N. 1991. Seasonal incidence of fungi in symptomless cranberry leaves and fruit treated with fungicides during bloom. *Phytopathology* 81, 636-644.

33. Larry, A.C., J.A. Findlay,, D. Miller and N. J. Whitney. 1992. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. *Mycol. Res.* 94, 281-286.

34. Arkansas, T. 1994. Internet Communication.

35. Pugh, G.J.F. 1972. Saprophytic fungi and seeds. In Seed Ecology (ed. W. Heydecker) pp 337-345. Butterworth , London.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

36. Bacon, C.W., J. De Battista. 1991. Endophytic fungi of grasses. In. Handbook of Applied Mycology Vol 1. (eds D.K. Arora, B. Rai and K.G. Mukerji), pp 231-256.

37. Bergamin-Strotz, L.M. 1988. Florische und okophysiologische Aspekte im Zusammenleben von Tabak pflanzen (*Nicotina tabacum* L. var.SR1) und endophytischen Pilzen. Zurich, Switzerland. Disseeeertation ETH No. 8520 Swiss Federal Institute of Technology.

38. Fisher, P.J., A.E. Anson, O. Petrini. 1984. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. *Bot. Helv.* 94, 249-253.

39. Fisher, P.J., A.E. Anson, O. Petrini. 1984. Novvel antibiotic activity of an endophyte *Crytosporiopsis sp.* isolated from *Vacciniu myrtillus. Trans. Br. Mycol. Soc.*83, 145-148.

40. Fisher, P.J., A.E. Anson, O. Petrini. 1986. Fungal endophytes in *Ulex europaaaeus* and *Ulex gallii.* Trans. *Br. Mycol. Soc.* 86, 153-156.

41. Dreyyfuss, M.M. 1986. Neue Erkenntnisse aus einem pharmakologischen Pilzscreening. *Sydowia* 39,22-36.

42. Brunner, F., O. Petrini. 1992. Taxonomy of some *Xylaria* spp. and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis. *Mycol. Res.* 96, 723-733.

43. Bills, G.F., J.D. Polyshook. 1992. Recovery of endophytic fungi from *Chamaecyparis thyoides. Sydowia* 44, 1-12.

44. Chapela I.H. 1989. Fungi in healthy stems and branches of American beech and aspen: A comparative study. *New Phytol.* 113, 65-75.

45. Boddy, L., G.S. Griffith. 1989. Role of endophytes and latent invasion inthe development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. *Sydowia* 41, 41-73.

46. Sieber, T.N., F. Sieber-Canavest and C.E. Dorworth. 1990. Endophytic Fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. *Can.J.Bot.*, 69, 407-411.

47. Latch, G.C.M.M.J. Christensen and G.J. Samuels. 1984. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. *Mycotaxon* 20, 535-550.

48. Bacon, C.W., J.K. Porter and J.D. Robbins. 1979. Laboratory production of ergot alkaloids by species of *Balansia. J. Gen. Microbiol.* 113, 119-126.

49. Davis, N.D., E.M. Clark, K.A. Schrey and U.L. Diener. 1986a. In vitro growth of *Acremonium coenophialum,* an endophyte of toxic tall fescue grass. *Appl. Environ. microbiol.* 52, 888-891.

50. Davis, N.D., R.J. Cole, J.W. Dorner, J.D. Weete and P.A. Backman. 1986. Steroid metabolites of *Acremonium coenophialum,* an endophyte of toxic tall fescue. *J. Agric. Food Chem.* 34, 105-108.

51. Stoyke, G., K.N. Egger, R.S. Currah. 1992. Characterization of sterile endophytic fungi from the mycorrhizae of subalpine plants. *Can. J. Bot.* 70, 2009-2016.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# บทที่ 1

## การกระจายของราที่เจริญในต้นกล้าพืชป่าบนดอยสุเทพ-ปุย 32 ชนิด

ปัจจุบันการศึกษาราเอนโดไฟท์ในพืชมีการศึกษากันมากในเขตอบอุ่น ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลเฉพาะในพืชที่ขึ้นในเขตอบอุ่น แต่จากรายงานก็พบราหลากหลายทั้งชนิดและจำนวนมีรากลุ่มทั้งที่พบทั่วไป ราที่เป็นสาเหตุโรคพืชและราชนิดใหม่ กลุ่มราที่สำคัญบางครั้งก็จำเพาะต่อชนิดของพืช บางชนิดจำเพาะต่อเนื้อเยื่อของพืช นอกจากนี้ยังพบการสร้างสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่จากราที่เป็นเอนโดไฟท์โดยเฉพาะ Xylaria spp. มีรายงานการศึกษาค่อนข้างมาก (Whalley, 1997)

รา endophyte จะอยู่กับพืชโดยไม่ทำให้พืชผิดปกติ ซึ่งรากลุ่มนี้มีหลักฐานว่าเป็นแหล่งของ secondary metabolites ที่จะใช้ในทางการแพทย์ได้ (Lingham *et al*, 1993 ; Dreyfuss & Chapela, 1994 ; Bills *et al*., 1994) รากลุ่มนี้มีความหลากหลายมาก ซึ่ง Dreyfuss (1987) เน้นว่า endophytes fungi เป็นแหล่งใหญ่ที่สุดของ fungal speies ชนิดจะมีราเอนโดไฟต์ 6-5 species เนื่องจากเหตุผล 2 ประการ คือ 1) พบ endophytic species unique กับชนิดพืช 2-4 species เสมอ 2) พบรามากมายในพืชที่มีท่อลำเลียง ราหลายชนิดจะจำเพาะต่อโฮสท์ (Petrini, 1991) พืชป่าบนดอยสุเทพ มีความหลากหลายโดยจะกระจายขึ้นอยู่กับของป่า ซึ่งแบ่งได้เป็น 5 ประเภทคือ

1. ป่าดงดิบชื้น เป็นป่าที่ขึ้นอยู่ในพื้นที่ตั้งแต่ระดับความสูงประมาณ 600 เมตร จากระดับน้ำทะเล อยู่บริเวณใกล้หุบเขาที่มีความชื้นสูง ต้นไม้จะเป็นไม้ในวงศ์ก่อ (Fagaceae) ผสมอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น ก่อแป้น ก่อเดือย ก่อตลับ ก่อหม่น และก่อด่าง เป็นต้น ไม้สกุล Podocarpus ผสมไม้ขนาดใหญ่ ประกอบด้วย ยางปาย จำปีป่า มณฑาดอย สารภีดอย ทะโล้ และมะหวด เป็นต้น ไม้ที่หายากเช่น ไม้หอม กำยาน อบเชย และพญาไม้ พวกที่ชอบขึ้นตามลำห้วย ได้แก่ ตองลาดบ่อเต้า เพียน้ำ และกล้วยป่า พวกยึดเกาะได้แก่ เฟิร์นต่างๆ และเห็ด
2. ป่าดิบเขา (Hill forest) จัดว่าเป็นป่าใหญ่ ที่เหลืออยู่ในเขตอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย มีพื้นที่รวมกับป่าดิบชื้นประมาณ 50 ตารางกิโลเมตร หรือ 20% ของพื้นที่ทั้งหมด อยู่ในระดับความสูง 1,000 เมตรขึ้นไป พันธุ์ไม้ที่สำคัญและมีมาก คือไม้วงศ์ก่อ เช่น กำลังเสือโคร่ง ไก๋แดง สลีนก พิกุลป่า มะขามป้อม กำยาน และอบเชย เป็นต้น ไม้ชั้นล่างเป็นไม้ขนาดเล็ก พวกมอส เฟิร์น กุหลาบป่า เข็มขาว กล้วยไม้ป่า และไลเคนส์
3. ป่าสนเขา (Montane Pine Forest) ป่าสนเขาที่อยู่ในเขตอุทยานแห่งชาติมีเป็นหย่อมๆตามบริเวณที่สูง และสันเขา ชนิดป่าสนมีทั้งสนสามใบและสนสองใบ นอกจากนี้ยังปะปนกับป่าดิบเขาประปราย คิดเป็นพื้นที่ของป่าสนเขาไม่เกิน 2% ของพื้นที่ทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ป่าเต็งรัง (Dry Dipterocarp Forest) ป่าเต็งรังหรือป่าแพะขึ้นในพื้นที่ต่ำกว่าระดับ 800 เมตร เหนือระดบน้ำทะเลลงมา พันธุ์ไม้ที่พบได้แก่ เต็ง รัง พลอง เหียง พยอม แข้งกวาว และไม้ก่อบางชนิด เช่น ก่อแพะ ก่อด่าง ก่อตาหมู เป็นต้น ป่าเต็งรังจะอยู่ในพื้นที่ส่วนที่เป็นดินเลว พวกดินลูกรัง และมักเกิดในป่าอยู่เสมอ พื้นที่ป่าประมาณ 50 ตารางกิโมเมตร (20%ของพื้นที่ทั้งหมด)
5. ป่าเบญจพรรณ (Mixed Deciduous Forest) ป่าเบญจพรรณหรือป่าผลัดใบ ชอบขึ้นตามที่ราบเชิงเขา ความอุดมของดินมีมากกว่าป่าเต็งรัง พื้นที่อยู่ระดบต่ำกว่าป่าเต็งรัง แบ่งเป็นประเภทที่มีไม้เล็กปน และไม่มีไม้เล็กปน ที่มีไม้...จะอยู่ระดับต่ำ มีความชื้นมากกว่า มีการระบายน้ำดีกว่า พันธุ์ไม้ที่พบมากได้แก่ ไม้สัก ไม้แคม ประดู หรือบางชนิด นอกจากนี้ก็มีไผ่ พื้นที่ป่า 44 ตารางกิโลเมตร หรือร้อยละ 18 ของพื้นที่ทั้งหมด

การสำรวจการกระจายของเชื้อราในพืชป่านั้นจะทำกับต้นกล้าของพืชป่า ซึ่งเป็นกล้าที่เพาะจากเมล็ดพืชป่า ถูกเก็บจากต้นแม่นำมาศึกษาบ่งบอกชนิดและเพาะไว้ในโรงเรือน บริเวณสำนักงานอุทยานแห่งชาติ โดยหน่วยฟื้นฟูป่า ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ การเลือกกล้าพืชก็เนื่องจากพืชเป็นโฮสท์ได้ดีการบ่งบอกชนิดไว้แล้ว และยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน การวิจัยนี้จะรายงานการกระจายของเชื้อรา endophyte ในกล้าพืชป่า 32 species การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อที่ผิวใน sodium hypothlorite และการเก็บรักษาเชื้อ endophytic ที่พบ

**วิธีการทดลอง**

**1. การแยกเชื้อรา endophytes จากกล้าพืชไม้เนื้อแข็ง 32 species**

นำกล้าพืชป่า 32 ชนิด (ตารางที่ 1) และตัวอย่างจากพืชที่โตเต็มที่ 1 ชนิด คือพยอม (*Shorea roxburghii*) มาแยกเชื้อราแอนโดไฟท์ โดยแยก species ละ 2 ต้น นำส่วนของพืชมาล้างผ่านน้ำไหล 30 นาที จากนั้นก็ตัดเป็นชิ้นส่วน จากส่วนต่างๆ โดยต้นกล้าจะตัดส่วนใบ กิ่งและลำต้น ออกเป็นขนาดละ 1 ซม. ซึ่งตัวอย่างจากพืชต้นแก่จะแยกจากใบและกิ่ง ซึ่งไม่ได้กำหนดแน่นอนถึงตำแหน่งจากส่วนของใบ

ชิ้นส่วนที่ตัดเป็นส่วนๆ ความยาว 1 ซม. นั้น นำไปทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ผ่านอัลกอฮอล์ 75% 1 นาที แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 5.25% นาน 3 นาที สำหรับใบ และ 5 นาที สำหรับส่วนราก กิ่ง และลำต้น และ 95% 30 วินาที ซับให้แห้งบนกระดาษ tissue ที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นส่วนต่างๆไปวางบนจานอาหาร water agar และ 2% malt extract ที่มี 30 mg/l rose bengal และ 50 mg/l streptomycin sulfate โดยวางจานละ 4 ชิ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 14 วัน เมื่อมีการเจริญของเส้นใยจากส่วนของพืช ก็ทำการตัดส่วนปลายของเส้นใย ไปเพาะในอาหารวุ้นเอียง potato

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

dextrose agar (PDA) หรือ corn meal agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง จานอาหารเดิมจะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อดูความแตกต่างของโคโลนีนาน 60 วัน ก่อนจะทิ้ง

**2. การบ่งบอกชนิดของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้**

จาก culture ใน test tube ซึ่งเป็นอาหาร PDA และ corn meal agar ที่บ่มไว้จนถึง 3-5 สัปดาห์ ก็นำมาศึกษาจัดกลุ่มที่เรียกว่า morphological species โดยดูลักษณะของโคโลนี เส้นใย สีของโคโลนี ลักษณะโคโลนีใต้กล้อง sterio ตรวจลักษณะ fruiting body ลักษณะของสปอร์ การติดของสปอร์บน conidiophore ระยางค์ที่เกิดขึ้น วัดขนาดใต้กล้องจุลทรรศน์ commpound mouoscope เปรียบเทียบกับ key มาตรฐาน ที่ใช้ identify กลุ่ม Deuteremycetes เช่น Hgphomycetes Coelmomysetes, The Fungi vol.4 และ Ascomycetes บันทึกภาพตัวแทนของกลุ่มราที่พบ ศึกษาลักษณะสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) สำหรับเชื้อราที่น่าสนใจ

**3. การชักนำให้สร้างสปอร์**

3.1 ราที่ยังไม่พบการสร้างสปอร์ใน 2 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง จะจัดรวมไว้ในกลุ่ม mycelia steretia (MS) กลุ่มนี้จะนำมาเพาะในอาหาร 4 ชนิด คือ oat meal agar (OM), V8 agar, PDA, corn meal แล้วนำไปวางใต้แสง black light (near UV) ให้ขึ้นแสง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง เพื่อตรวจดูการสร้างสปอร์หลัง 14 วัน

3.2 รากลุ่ม Xylariaceous ช่วง anamorph นั้น เส้นใยแสดงลักษณะที่ unique ไม่สร้าง fruiting body ชักนำให้สร้าง fruiting body โดยนำไปเพาะเลี้ยงใน oat meal agar ในขวดที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและใส่ฟ่างข้าวที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องใกล้บริเวณที่มีแสง

**4. การเก็บรักษาเชื้อรา เลือกวิธีที่ทำได้ง่ายและสะดวก**

ทำการเพาะเชื้อราในจานอาหาร PDA เพาะที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน ใช้ cork boror ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 mm เพาะเส้นใยนำไปเก็บโดยวิธีต่างๆดังนี้

4.1 เก็บในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เติมน้ำกลั่น 8 มล. ในหลอดที่เป็นจุกเกลียว ขนาด 13x100 มม. steriled และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

4.2 เก็บใน silica gel นำเม็ด silica gel ไปอบที่ 110 °C นาน 2 ชั่วโมง จะได้ silica gel ที่เป็นสีน้ำเงิน นำมาใส่ในขวด universal ประมาณครึ่งขวด ซึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ชิ้นส่วนเส้นใย 20 ชิ้นต่อหลอด ปิดจุกให้สนิท แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเปลี่ยน slilica gel เมื่อเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4.3 เก็บในอาหารวุ้นเอียง 2% corn meal agar หรือ PDA ในหลอดจุกเกลียวหรือ silica stopper เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อราที่เก็บในหลอดต่างๆ นี้ นำมาตรวจความมีชีวิตหลังเว้นไว้ 3, 6 และ 12 เดือน โดยนำมาเพาะในอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

**ผลการทดลองและวิจารณ์**

1. **รายละเอียดของพืชต้นแม่ที่ทำการเก็บเมล็ดมาเพาะเป็นต้นกล้า**

จากความอนุเคราะห์ของกลุ่มนักวิจัยหน่วยฟื้นฟูป่า ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้ทำการเก็บเมล็ดนำมาเพาะในเรือนเพาะชำบริเวณที่ทำการอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย และบ่งบอกชนิดของพืช อายุของกล้าที่นำมาทำการแยกเชื้อประมาณ 8 เดือน – 1 ปี (รูป 1.1 ) รายละเอียดที่ได้ทำการศึกษาถึงต้นแม่ที่ทำการเก็บเมล็ดมาและข้อมูลทางนิเวศดัง ตาราง 1.1

2. **การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อที่ผิว**

การเอาเนื้อเยื่อของก่อแซะและอบเชยส่วนลำต้นที่มีความยาว 0.5-1 ซม แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite 5% นาน 0, 1,2,3,4,5,8 นาที พบว่าทุกช่วงเวลายังมีเส้นใยของรางอกออกมาได้อีก ดังนั้นเพื่อที่จะหาว่าจะต้องใช้เวลาและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเท่าไหร่ จึกสามารถกำจัดเชื้อให้หมดไปโดยสิ้นเชิงจึงปรับเปลี่ยนเวลาที่ใช้แช่เนื้อเยื่อของพืชให้นานขึ้นในพืชดีหมีเป็น 0-12 นาที พบมีการงอกของราเล็กน้อย จึงเพิ่มความเข้มข้นของ sodium hypochlorite เป็น 10% (ความเข้มข้นตามฉลากบนขวด) โดยยังคงเวลาในการแช่เท่าเดิมคือ 0-12 นาที พบว่าที่เวลา 9 นาทีและ 12 นาที สามารถกำจัดเชื้อราที่อยู่ในเนื้อเยื่อได้หมด

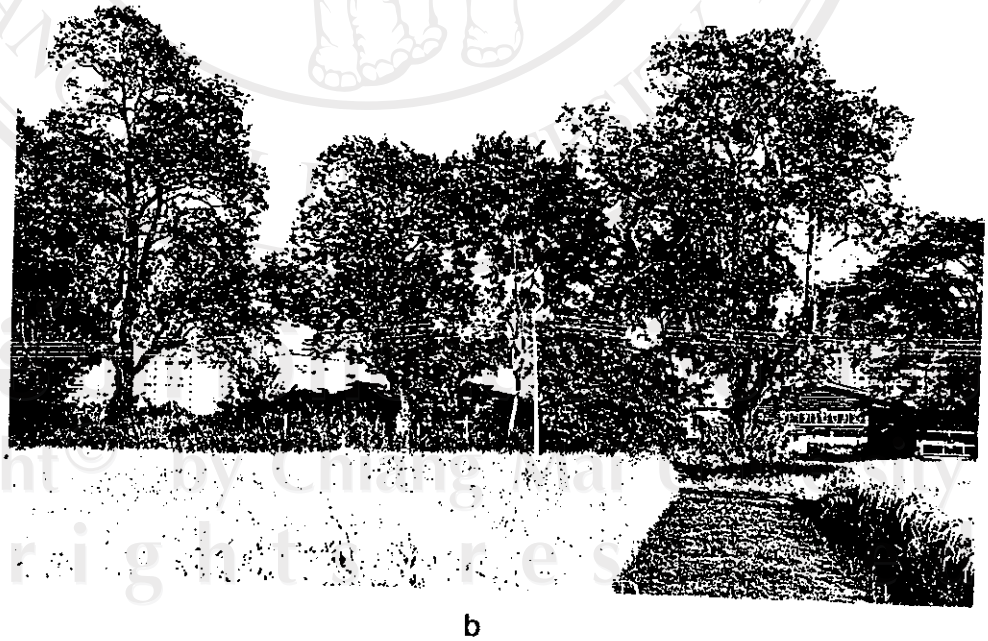
การแช่เนื้อเยื่อที่เป็น woody ใน sodiumhypochlorite เข้มข้น 5% นาน 3 นาที และ 5 นาที เหมาะสมสำหรับการฆ่าเชื้อที่ผิวของเนื้อเยื่อใบและกิ่งที่เหมาะสมที่สุดเพราะเป็นความเข้มข้นและระยะเวลาที่นานพอที่จะฆ่าเชื้อที่ผิวได้หมดหลังผ่านการแช่ในอัลกอฮอล 95% แล้ว และทำให้ได้จำนวน endophytic fungi ที่อยู่ในพืชมากที่สุด

3. **การกระจายของ endophytic fungi ในกล้าพืช 32 ชนิด**

จากจำนวนต้นกล้าทั้งหมด 32 species และพืชต้นแก่ พะยอม 1 ชนิด (รูป 1.2) พบว่าสามารถแยก endophytic fungi 5-11 species ต่อต้นกล้า 1 species ที่ตรวจสอบ โดยราที่แยกได้ 50% เป็น mycelia sterilia จำนวน species ของราจะแยกได้มากที่สุดจากพยอมซึ่งเป็นพืชต้นแก่ (15 species) เชื้อราที่พบในพืชเกือบทุก species ที่ใช้แยกคือ *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Gleosporium* sp., *Seimatosporium* และ *Curvularia* sp. ราหลายชนิดเป็นพวกที่ไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อยู่ในกลุ่ม Xylariceous fungi (*Xylaria* sp. *Hypoxylon* sp หรืออื่นๆ) รา species ที่ไม่ค่อยพบคือ *Diplodia* sp., *Cladosporium* sp., *Corynesporium* sp., *Nigrospora*., *Alternaria* sp., *Pestolotiopsis* sp และ *Penicillium* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

a



b

รูป 1.1 a. กล้าพืชป่าที่นำมาแยกเชื้อรา endophytes b. พยอมต้นแก่ที่นำมาแยกเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| S. No. | Botanical Name | สถานที่ของต้นแม่ | ลักษณะของต้นแม่ | | ความสูงจากระดับน้ำทะเล | ลักษณะ habitat | Thai name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | สูง (m) | เส้นรอบวง (cm) | ( m ) | | |
| S8 | *Elaeocarpus lanceifolius* | หมู่บ้านช่างเคี่ยน | 18 | 65 | 1,500 | primary evergreen (1°EG) | พีพ่าย (มุ่น) |
| S10 | *Pyrenaria garrettiana* | ถนนไปดอยปุย เหนือด่านดอยปุย | 6 | 57 | 1,600 | primary evergreen | เมี่ยงผี |
| S11 | *Catunaregam tomentosa* | จุดชมวิว ทางขึ้นดอยสุเทพ | 7 | 62 | 750 | -บริเวณป่าแบญจพรรณ ยาง-ก่อ<br>-มีไฟป่า | - |
| S12 | *Diospyros glandulosa* | บริเวณที่ทำการอุทยาน ร้านป้าอ้วน | 7 | 78 | 1,010 | primary evergreen | กล้วยฤาษี |
| S13 | *Sapindus rarak* | สถานีโทรทัศน์ วัดดอยสุเทพ | 20 | 80 | 1,050 | บางส่วนเป็นบริเวณร่ม , 1°EG<br>เป็นฤดูกาล ป่าไม้เนื้อแข็ง | มะคำดีควาย(มะซัก) |
| S18 | *Hovenia dulcis* | ถ้ำฤาษี | 22 | 140 | 1,145 | พื้นที่เปิด บริเวณข้างถนน | หมอนหิน |
| S23 | *Schima wallichii* | ที่ทำการอุทยาน กล้วยาอยู่ไม่ค่อยขึ้น | 15 | 100.6 | 1,020 | primary evergreen | มังตาล, ทะโล้ |
| S27 | *Terminalia sp.* | ร.ร ศรีสังวาร พื้นที่อุทยาน | 6 | 82 | 1,070 | บริเวณถูกรบกวน<br>primary evergreen | ปลากระเบน |
| S29 | *Ficus microcarpa var. microcarpa forma microcarpa* | ใกล้วัดดอยสุเทพ | 25 | 320 | 1,005 | บริเวณรบกวนใน 1°EGF | ไทรย้อยใบหู่ |
| S34 | *Albizia odoratissima* | หอดูดาว CMU | 16 | 94.3 | 820 | ถูกรบกวน ไฟป่ากระจาย<br>EG และป่าผลัดใบ | คางขี้มอด |
| S39 | *Ficus subulata var. subulata* | ทางใต้หมู่บ้านช่างเคี่ยน | 3 | 13 | 1,075 | บริเวณถูกรบกวน 1°EG | เดื่อ |
| S60 | *Aphanamixis polystachya* | - | | | | | |
| S65 | *Xylia xylocarpa var. kerrii* | วัดดอยสุเทพ | 16 | 131 | 1,000 | ผสม EG ป่าผลัดใบ รบกวน | แดง |
| S89 | *Micromelum hirsutum* | - | | | | | |
| S90 | *Gardenia obtusifolia* | ด้านตะวันออกของอุทยาน | 6 | - | 1,020 | ป่าผลัดใบ ป่ายาง-ก่อ มีไฟเผา | คำมอกน้อย |

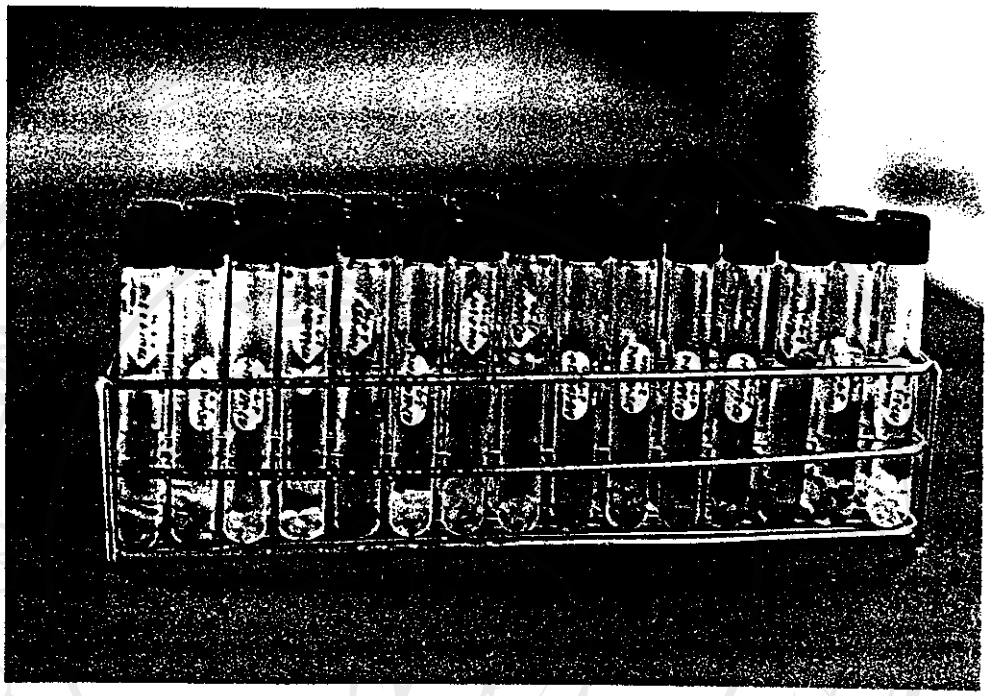
**ตาราง 1 สภาพนิเวศของพืชป่าต้นแม่ที่เก็บเมล็ดมาเพาะเพื่อแยกเชื้อรา**

| S. No. | Botanical Name | สถานที่ของต้นแม่ | ลักษณะของต้นแม่ | | ความสูงจากระดับน้ำทะเล | ลักษณะ habitat | Thai name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | สูง (m) | เส้นรอบวง (cm) | ( m ) | | |
| S102 | *Dillenia parviflora var. kerrii* | หมู่บ้านช่างเคี่ยน | 22 | 267 | 950 | 1°EG,มีไฟเผา ถูกรบกวน | มะสานแขวง |
| S105 | *Phoebe sp.* | อุทยานฯถ้ำอุด ด้านใต้หมู่บ้านช่างเคี่ยน | 24 | 106 | 1,010 | 1°EG,ป่าไม้เนื้อแข็ง | - |
| S109 | *Duabanga grandiflora* | ที่ทำการอุทยาน (ลำพูป่า) | 16 | 118 | 1,000 | ถูกรบกวน มีไฟ , EG | ลำพูป่า |
| S117 | *Streblus asper var. asper* | ภาควิชาชีววิทยา มช. | - | - | 350 | ป่าเก่าเชิงดอย | ข่อย |
| S121 | *Careya arborea* | CMU. | 10 | 125 | 350 | ป่าเก่าผ่านไฟเผา ป่าผลัดใบ | กระโดน |
| S130 | *Cleidion spiciflorum* | - | | | | เป็นการเจริญครั้งที่ 2 | |
| S144 | *Meliosma simplicifolia* | โรงเรียนศรีสังวาลย์ | 12 | 54 | 1,100 | 1°EGฤดูกาล ไม้เนื้อแข็ง บริเวณถูกรบกวน | เดื่อหูกวาง, เดื่อเหลวง |
| S151 | *Turpinia pomifera* | หมู่บ้านช่างเคี่ยน | 9 | 60 | 1,000 | ถูกรบกวน, 1°EG ฤดูกาล | มะดอกพราน |
| S157 | *Trichilla connaroides* | หมู่บ้านช่างเคี่ยน | 4 | 26 | 1,250 | ป่าเปิด, ถูกรบกวน | - |
| S162 | *Mesua ferrea* | อุทยาน | 13 | 102 | 1,050 | ถูกรบกวน, 1°EG ฤดูกาล ไม้เนื้อแข็ง | บุนนาค (สารภีดอย) |
| S167 | *Aleurites moluccana* | ที่ทำการอุทยาน | 12 | 745 | 1,050 | ถูกรบกวน, 1°EG ฤดูกาล ไม้เนื้อแข็ง | โพธิสัตว์, มะเยา |
| S187 | *Bridelia pubescens* | ถ้ำฤาษี | 7 | 60.5 | 1,100 | ถูกรบกวน,บริเวณร่มใน 1°EG | สิวาละที |
| S203 | *Beilschmiedia sp.* | ดอยปุยทางตะวันตก | 10 | 165 | 1,590 | ต่ำกว่าจุดสูงสุดของดอยปุย ถูกรบกวนมีไฟไหม้ | - |

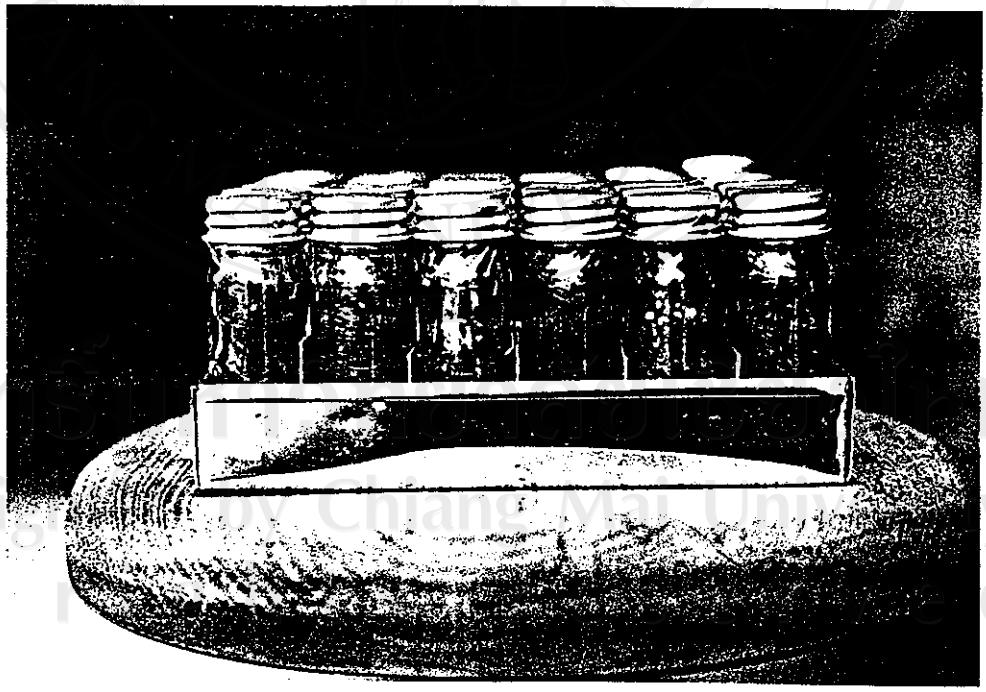
| S. No. | Botanical Name | สถานที่ของต้นแม่ | ลักษณะของต้นแม่ | | ความสูงจากระดับน้ำทะเล | ลักษณะ habitat | Thai name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | สูง (m) | เส้นรอบวง (cm) | ( m ) | | |
| S218 | *Cinnamo iners* | ที่ทำการอุทยาน | 7 | 72 | 1,050 | มีไฟไหม้ใน 1°EG,ฤดูกาล ไม้เนื้อแข็ง | เชียด, อบเชย |
| S233 | *Baccarea ramiflora* | ถนนหมู่บ้านช่างเคี่ยน ใกล้ถ้ำชุด | 7 | 38 | 1,030 | ถูกรบกวนในบริเวณ 1°EG | มะไฟ |
| S254 | *Aquilaria crassna* | ดอยหลวงด้านตะวันตก หมู่บ้าน แม่กำบัง | 20 | 170 | 1,050 | ที่เปิด, รบกวน, บริเวณปลูกป่า ใน 1°EG | กฤษณา |
| S258 | *Saurauia roxburghii* | ดอยปุย | 5 | 29 | 1,500 | บางส่วนเป็นที่ร่ม (shaded) บริเวณรบกวนใน 1°EG เป็นฤดูกาล | ส้านเห็บ |



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



a



b

รูป1.3 การเก็บเชื้อรา endophytes ที่แยกได้ a. เก็บในน้ำ b. เก็บใน silica gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ราที่จัดอยู่ในกลุ่ม Mycelia sterilia ซึ่งยังไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ใน อาหารที่เพาะเลี้ยง ในจำนวนนี้ได้ทำการชักนำให้สร้างสปอร์โดยเพาะในอาหารแล้วนำมารับแสง blue light 12 ชมต่อวันนอกจากนี้ยังเพาะในอาหารชนิดต่างๆ พบว่ายังไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์

พบราที่น่าสนใจที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่าเป็น endophyte ทั้งยังไม่มีรายงานการพบในพืชหรือธรรมชาติโดยทั่วไปจัดว่าเป็น rare species ที่อยู่ในกลุ่ม Ascomycetes ที่บ่งบอกว่าเป็น *Apiosordaria striatispora* รานี้มีรายงานว่าแยกได้จากตัวอย่างดินจากประเทศไทยและมาเลเซียโดยนักราวิทยาชาวญี่ปุ่นปี 1976 (Furuya and Udagawa, 1976)

4. การเก็บรักษาเชื้อรา endophytes ในสภาพมีชีวิต

จากการทดสอบการมีชีวิตของรา endophytes หลังการเก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆ 3 วิธีนั้น หลังการเก็บที่ 3 6 และ 11 เดือน พบว่าการเก็บในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วที่ 4°C (รูป 1.3 a) เชื้อรายังมีชีวิตรอดทุก isolates การเก็บใน silica gel (รูป 1.3b) ก็ให้ผลดีเช่นเดียวกันแต่วิธีนี้จะต้องเสียเวลามากในการเปลี่ยน silica ที่มีความชื้นเข้าไป และต้องใช้ silica gel เป็นจำนวนมาก

เชื้อราในอาหารวุ้นเอียง corn meal agar จะเก็บรักษาราและทำให้ราที่เก็บสร้างโครงสร้างในการสืบพันธุ์ได้ดีกว่าเชื้อราที่เก็บในอาหาร PDA ซึ่งการใช้ silicone stopper หรือจุกเกลียวจะเก็บ culture ได้นานกว่าจุกสำลีเนื่องจากอาหารไม่แห้ง ดังนั้นจึงทำการเก็บเชื้อรา enodophyte ที่เป็นตัวแทนของกลุ่มไว้ในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วและเก็บที่ 4 °C เพื่อเป็น stock culture และเก็บในอาหารวุ้นเอียงที่ใช้ silicone stopper และจุกเกลียวสำหรับการทดสอบอื่นๆ

## เอกสารอ้างอิง

Bills, C.F.,F. Pelaez, J.D. Polishook, M.T. Diez Matas, G.H. Harris, W.H. Dufresne, K.M. Byme, M. Nallin-Omstead, R.G. Jenkins, M. Mojena, L. Huang and J.D.Bergstrom. 1994. Distribution of zaragozic acid (squalestatins) among filamentous ascomycetes. *Mycol. Res.* 98, 733-739.

Dreyfuss, M.M. and Chapela, I. 1994. Potential of fungi in the discovery of novel, low molecular weight pharmaceuticals. In :The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential (ed. V.P. Gullo), pp. 49-80. Butterworth-Heinemann: Newton, Massachusetts, U.S.A.

Dreyfuss, M.M. 1987. Neue Erkenntnisse aus einen pharmakologischen Pilzscreening. *Sydowia* 39, 22-36.

Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial Ecology of leaves* (eds. J.H.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Andrew and S.S. Hirano), pp.179-197. Springer-Verlag: New York, U.S.A.

Furuya, K. and S. Udagawa. 1976. A new species of *Triangularia*. *J. Jpn. Bot.* 51, 406-409.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# บทที่ 2

## ราเอนโดไฟท์จากพืชป่า 9 ชนิด บริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย

ทำการแยกราเอนโดไฟท์จากพืช 9 ชนิด เป็นกล้าพืชป่า 7 ชนิด : ดีหมี (*Cleidion spiciflorum*), No. 215 (*Litsea salicifolia*), อบเชย (*Cinnamonium iners*) มณฑาดอย (*Magglietia garretii*) ชา (*Camellia sinensis* var. *areamica*), No. 157 (*Trichilla connarroides* และชะมวง (*Gciniaar cowa*) และพืชป่าขึนต้น 2 ชนิด พยอม (*Shorea roxburgii*) และบุนนาค (*Mesua ferrea*) กล้าพืชเพาะในเรือนเพาะชำที่ทำการอุทยานแห่งชาติ บุนนาคเป็นพืชต้นแก่ ขึ้นที่ทำการอุทยาน ซึ่งอยู่ที่ระดับความสูง 1000 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล อายุประมาณ 30 ปี พยอมเก็บจากต้นที่อยู่เชิงดอยสุเทพ อายุประมาณ 80 ปี ส่วนของกล้าจะใช้ส่วนใบ และลำต้นอายุ 8-12 เดือน พืชต้นแก่เก็บกิ่งจากต้นที่สมบูรณ์ที่ระดับความสูง 4-5 เมตร ทุกตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อราในอาหารแข็ง 2% malt extract ที่มี rose bengal และ streptomycin sulphate หรือ chloramphinecol (MERS agar) และ water agar

แยกได้ราทั้งหมด 1408 isolates จากใบ กิ่ง และลำต้นจากกล้าพืช 7 ชนิด ชนิดละ 5 ต้น รวม 35 ต้น พืชต้นแก่ 2 ชนิด ชนิดละ 3 ต้น แยกกลุ่มของราเป็น 20 กลุ่ม กลุ่มที่พบมากที่สุดคือ *Gleosporium* spp. (23%) และ *Glomerella spp.* (22%) รองลงมาคือ *Mycelia steritia* (21%), *Colletotrichum* spp. (11%), *Phoma* (7%), *Cladosporium* sp.U2 (6%), *Phomopsis* spp. (6%), *Guignardia* sp. MK (5%), *Xylaria* spp. (4%), *Nigrospora* spp. (2%), *Pestalotiopsis* spp. (1.5%), ราที่พบน้อย (1%) ได้แก่ *Apiosodaria striatispora*, *Sporomella* spp, *Corynespera* spp., *Seimatosporium* spp., *Helmenthosporium* spp., *Curvularia* spp., *Didymella* spp., *Fusarium* spp., *Selenophoma* spp. และ *Gelasinospora* spp.

อาหาร MERS agar แยกได้ราที่มีจำนวน species มากกว่าอาหาร WA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

### คำนำ

ราเอนโดไฟท์ซึ่งอาศัยพืชเป็นแหล่งที่มีคุณค่าของ bioactive secondary metabolites (Ligham, *et al.* 1993 ; Dreyfess & Chapela, 1994, Billsetal, 1994) ทำให้มีคน

สนใจศึกษากันมาก จากการสำรวจราเอนโดไฟท์ของกล้าพืช 32 ชนิด (บทที่ 1) โดยแยกจากตัวอย่างพืชแบบสุ่มจากส่วนของใบ และลำต้น โดยแยกจากพืชชนิดละ 2-3 ต้น นั้นเชื้อรามีการกระจายน้อย โดยดูจากจำนวน species ของราที่พบต่อชนิดของกล้าพืช มีประมาณ 5 species ในขณะที่ต้นพืชแก่มี 10-12 species จึงทำการแยกดูแต่ละส่วนของพืชและทำมากต้นต่อ species ของพืช เพื่อให้ทราบความถี่ที่ชัดเจนขึ้น และคาดหวังว่าจะพบเชื้อราชนิดใหม่ๆหรือหายาก (rare) species มากขึ้น ในการทดลองบทนี้ ก็จะได้รายงานเกี่ยวกับการกระจายและความถี่ของราเอนโดไฟท์ต่อชนิดของพืชและส่วนของเนื้อเยื่อพืช และราที่พบไม่บ่อยหรือไม่เคยมีรายงานว่าเป็น endophytes 7 ชนิด ที่แยกได้จากกล้าพืชป่า 7 ชนิด และพืชป่าต้นแก่ 2 ชนิด

**อุปกรณ์และวิธีการ**

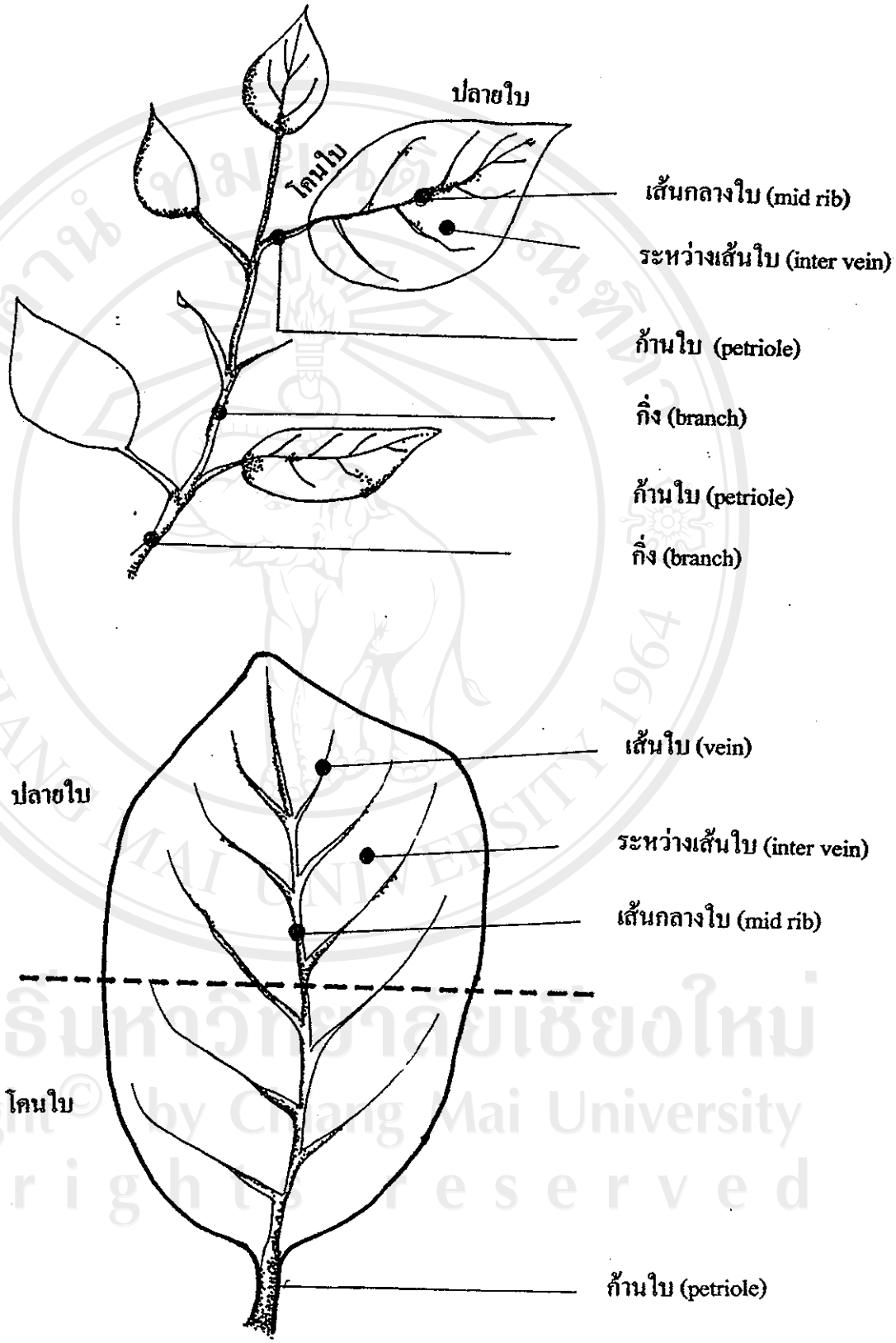
**การเก็บตัวอย่าง**

กล้าพืชป่าอายุ 8-12 เดือน เพาะไว้ที่เรือนเพาะชำ ที่ทำการอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย ที่ระดับความสูง 1000 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล เป็นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดพืชป่า ดินที่ทำการเพาะก็เป็นดินบนดอยสุเทพ พืชตัวอย่างทั้งหมดเป็นพืชป่าดั่งเดิม

ทำการเก็บพืชตัวอย่างในฤดูหนาว ช่วงตุลาคม 2539 มกราคม 2540 และฤดูร้อน พฤษภาคม และมิถุนายน 2540 ใช้กล้าพืช 5 ต้นต่อ 1 ชนิด พืชต้นแก่ พยอมและบุนนาค จะเลือกเก็บกิ่งที่สมบูรณ์ นำมาในห้องปฏิบัติการ กล้าพืชจะตัดเป็น 3 ส่วนคือ กิ่งหรือลำต้น ก้านใบและใบ ตัวใบจะแยกเป็นส่วนใบแก่และใบอ่อน แต่ละใบจะเจาะเนื้อเยื่อ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 มม.) ออกเป็นบริเวณต่างๆ 7 ตำแหน่ง คือปลายใบ, โคนใบ, เส้นกลางใบ, เส้นใบ และระหว่างเส้นใบ (รูป 2.1) รวมทั้งหมด 15 ชิ้นต่อต้น กิ่งอีก 5 ชิ้น รวม 20 ชิ้นต่อต้น ทำ 5 ต้น ต่อพืช 1 ชนิด ก็จะแยกเนื้อเยื่อได้ 100 ชิ้น ต่อพืช 1 ชนิด ตัวอย่างพืชทั้งหมดมี 7 ชนิด ก็จะได้ 700 ตัวอย่าง พืชต้นแก่เก็บซ้ำ 3 ครั้ง ตัดเนื้อเยื่อเช่นเดียวกัน ก็จะมีจำนวนเนื้อเยื่อพืชที่จะใช้แยกเชื้อ 60 ชิ้น ต่อพืชรวมทั้ง 2 พืช ก็จะได้ 120 ชิ้น จำนวนเนื้อเยื่อทั้งหมดของพืช 9 ชนิด จะเป็น 820 ชิ้น

**การแยกเชื้อรา endophytes**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




รูป 2.1 ตำแหน่งของเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการแยกเชื้อ endophytic fungi

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แยกเชื้อหลังจากทำการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) โดยวิธีดัดแปลงจาก (Pllado, *et al*., 1996) โดยแช่ใน 95% ethanol 1 นาที, sodium hypochlorite 5 นาที สำหรับกิ่งและใบ 3 นาที และแช่ใน 95% ethanol อีก 30 วินาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำมาเพาะในอาหาร 2% malt extract agar ที่มี rose bengal (50 mg/l) และ chloromphenicol (50 mg/l) หรือ streptomycin sulphate 50 mg/l) และอาหาร water agar ใส่ชิ้นส่วนพืชที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วลงไปจานละ 4 ชิ้น

นำจานอาหารไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) นาน 1-2 สัปดาห์ เชื้อราที่เจริญออกมาก็ทำการย้ายเส้นใยไปเพาะในอาหารวุ้นเอียง 2% corn meal (CM) agar จานอาหารเดิมก็บ่มต่อถึง 60 วัน เพื่อดูความแตกต่างของโคโลนีที่เจริญออกมา อาหารวุ้นเอียงจะบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 สัปดาห์ ทำการจัดกลุ่มโดยแยกตามความแตกต่างของโคโลนีที่ปรากฏ เป็นการแยก species ตามลักษณะโคโลนีอย่างหยาบตามหลักการที่อธิบายโดย Bilsl (1996) isolates ที่เป็นตัวแทนจะนำไปเพาะในจานอาหารวุ้น PDA, oat meal (OM) และ potato yeast extract dextrose (PYD) medium เพื่อดูลักษณะการเจริญการสร้างสปอร์เพื่อบ่งบอกชนิด ตัวแทนของ culture และ semipermanent lactophenol slides ของ species ที่ต่าง isolates จะเก็บรักษาไว้ใน culture collection ของหน่วยวิจัยความหลากหลายทางจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเก็บไว้ในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในตู้เย็น (4°C) และในอาหารวุ้นเอียง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**การบ่งบอกชนิดของฟังไจที่แยกได้**

ทำการตรวจสอบลักษณะสปอร์ fruiting body, conidia, conidiophore และ ascospore ใต้กล้องจุลทรรศน์ วัดขนาด บันทึกภาพและตรวจสอบลักษณะกับ key มาตรฐานที่ใช้กับกลุ่ม Ascomycetes และ Deuteromycetes ได้แก่

Illustrated genera of Ascomycetes (Hanlin, 1990)

The Genera of Fungi Sporulating in Pure culture ( Von Arx, 1981)

Genera of Hyphomycetes (Carmichael, *et. al*., 1980)

The Bitunicate Ascomycetes and their anamorph (Sivanesan, 1983)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

การเปรียบเทียบระหว่างเชื้อราที่แยกได้จากพืชต่างชนิด จะใช้การคำนวนหา Jaccard similarity coefficient ของพืชเป็นคู่โดยใช้สูตร Similarity coefficient = C/CA+B+C) เมื่อ A และ B คือจำนวนรวมของราชนิดต่างๆ จากพืช 2 ชนิด C คือจำนวนชนิดราที่พบในทั้ง 2 พืชที่เปรียบเทียบกัน (Sneath and Sokal, 1973)

**ผลการทดลองและวิจารณ์**

1. การกระจายของ endophytic fungi

จากการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อราระหว่างอาหาMERS agar และ water agar (WA) พบว่าในอาหาร MERS แยกได้รามีจำนวน species มากกว่าอาหาร WA นอกจากนี้การใช้อาหาร MERS ยังสะดวกในการแยกความแตกต่างของโคโลนีเชื้อราที่เจริญจากเนื้อเยื่อพืชที่ทำการเพาะเลี้ยง ทำให้สามารถเก็บตัวอย่างเชื้อราได้มาก species กว่า ในอาหาร WA โคโลนีของราจะมีการเจริญน้อยกว่าและเส้นใยที่เจริญจะบางมากไม่มีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์หรือรงควัตถุออกมา เส้นใยเป็นแบบเดียวกันทุกเชื้อคือใส

จากตัวอย่าง 900 ตัวอย่าง ที่นำมาจากแต่ละส่วนของพืช 20 ตำแหน่ง จากพืชป่า 9 ชนิด (กล้าพืช 7 ชนิด พืชต้นแก่ 2 ชนิด) พบเชื้อรา 13 กลุ่ม species กับอีก 1 กลุ่มใหญ่ของ mycelia sterelia พืชทุกต้นจะมี endophytes อย่างน้อย 5 species ยกเว้นบางต้นของกล้ามณฑาดอยและกล้า *Litsea solicifolia* พบมีเพียง 2-3 species คิดเฉลี่ยจากพืชแต่ละชนิด๖ 5 ต้น) ที่ทำการแยกจะพบราอยู่ระหว่าง 9-11 species แต่ทั้งนี้ยังไม่ได้แยกความแตกต่างระหว่างโคโลนีที่ต่างกันในกลุ่มของ mycelia sterelia ออกจากกันซึ่งถ้าแยกก็จะได้จำนวน species เพิ่มมากขึ้น

ตาราง2.1 แสดงค่าจำนวนของ species ราที่พบต่อพืชแต่ละชนิด ดูจากภาพรวมแล้ว ชนิดของราที่พบไม่ค่อยแตกต่างกันมากนัก จำนวน species ของราที่พบมากที่สุด จากต้นพยอม (14 species) ซึ่งเป็นพืชต้นแก่ โดยต้นที่เก็บจะอยู่บริเวณเชิงดอยสุเทพมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อายุประมาณ 80 ปี แสดงว่าราที่เข้าไปอาศัยอยู่ในต้นพืชมีโอกาสเข้า infect ได้มากกว่าต้นกล้า ส่วนบุนนาคที่อายุ 30 ปี จะพบเชื้อรา 11 species

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระดับ diversity ของ taxa ที่พบในการสำรวจกับพืช 9 ชนิดนี้ อยู่ในช่วงที่คล้ายกับที่มีรายงานกับพืชเขตอบอุ่น ซึ่งเป็นไม้เนื้ออ่อน (herbaceous plant) และไม้พุ่ม (shrub) ซึ่งรายงานเกี่ยวกับ endophytes จากกล้าพืชป่าและพืชป่ายืนต้นครั้งนี้ เป็นรายงานแรกของพืชในเขตร้อน วิธีการ ขนาดตัวอย่างที่ใช้จะต่างจากที่เคยมีรายงาน Anson and Petrini, 1986 ; Fisher, *et al.* 1992 ; Schalz, *et. al.*, 1993) กล้าพืชทั้ง 7 ชนิด พบเชื้อราน้อยกว่าพืชต้นแก่ และเป็นราชนิดที่คล้ายกันถึง 5 species ที่พบได้เสมอในพืชทุกชนิดที่ศึกษาคือ *Guignardia* spp., *Gloeosporium* spp., *Glomerella* spp., *Phoma* spp. และ *Colletorichum* spp. ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับ *Guignardia* sppว่าเป็น endophyte มาก่อน ปี 1997 Okane จึงได้รายงานการแยกได้ *Guinardia* sp. (anamorph : *Phylostricta*) ซึ่งเป็น dominant จากพืช ตระกูล Ericaceae คือ จีนัส Rhododendron (กุหลาบพันปี) ในประเทศญี่ปุ่น โดย colonization rate ของเชื้อนี้จะสูงสุดในใบแก่ใกล้ร่วง ( senescent leaves) ใบอ่อนมีน้อย และมีรายงานของ Shivas and Hyde (1997) พบ anamorph ของ *Guignardia* sp. คือ *Phylostricta celastrina* เป็น pathogen ทำให้เกิดโรค ใบจุดของ *Celastus paniculatus*

ตาราง 2.1 จำนวนของ fungal species ต่อพืช จากกล้าพืช 7 species และ tree 2 species เก็บในอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย กลุ่มที่เป็น sterile จัดเป็น 1 กลุ่ม แต่ไม่ได้บ่งความแตกต่างของลักษณะโคโลนี

| | species/plant | | Total |
|---|---|---|---|
| | Average | Range | |
| 1. มณฑาดอย (S7) | 6 | 3-7 | 9 |
| 2. S210 | 7 | 5-8 | 12 |
| 3. S130 | 6 | 4-10 | 11 |
| 4. S157 | 6 | 5-6 | 10 |
| 5. S169 | 8 | 6-9 | 11 |
| 6.S215 (*Litsea salicifolia*) | 7 | 2-10 | 12 |
| 7. อบเชย S218 | 9 | 8-10 | 10 |
| 8. บุนนาค S162 | 8 | 6-9 | 11 |
| 9. พยอม S214 | 10 | 7-12 | 14 |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

*Gleosporium* spp.(รูป 2.2a) และ Gloeosporium spp. (รูป 2.2b) ซึ่งเป็น conidia state ของ *Glomerella* spp.(รูป 2.3) มีรายงานว่าเป็น saprophyte และ parasite โดยเฉพาะ *Colletotrichum* spp ซึ่งมีรายงานมากมายว่าทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด โดยเฉพาะโรค anthracnose กับพืชเศรษฐกิจทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวทั่วโลก (Sutton, 1992) เช่น พริก, กล้วย, มะม่วง อัลมอลด์ และ ท้อเป็นต้น มีส่วนน้อยที่พบว่าเป็น endophytes (Petrini, 1986 ; Fisher and Petrini, 1992 ; Kowalki and Kehr 1996) กรณีของ *Glomerella* spp. ซึ่งเป็น sexual stage (telemeph) ของ *Colletotrichum* spp. มักจะพบ เป็นจำนวนมาก มากกว่า *Colletotrichum* แต่ระยะที่เป็น pathogen ไม่มีรายงาน

จากตาราง 2.2 (รูป 2.4 ) จะเห็นว่ารา endophytes ที่แยกได้บางชนิด ค่อนข้างจะจำเพาะกับชนิดพืช เช่น *Corynespora* spp. (รูป 2.5 a) พบจากชา บุนนาค และ S215, *Seimatosporium* spp. (รูป 2.5b) พบในพยอม *Helmenthosporium* spp. พบเฉพาะชา *Curvalaria* spp (รูป 2.6a )พบในมณฑาคอย *Didymella* spp. พบในชาและบุนนาค *Fusarium* spp.(รูป 2.6b) พบในพยอม ซึ่งจำนวนของราดังที่กล่าวมา ที่แยกได้เพียง 1 หรือไม่เกิน 4 isolates ในพืช แต่ก็ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่ามีความสัมพันธ์อย่างจำเพาะระหว่างรากับโฮสท์ หรือเพียงแค่เป็นผลจากการแยกเชื้อแบบสุ่ม เนื่องจากขนาดของตัวอย่างยังน้อยเกินไป คงต้องมีการศึกษาในพืชแต่ละชนิดในบริเวณกว้างขึ้น คือต้องแยกจากแหล่งที่ต่างไปเพิ่มเติม โดยเฉพาะจากพืชต้นแก่ชนิดเดียวกัน เนื่องจากมีรายงานที่ยืนยันว่า การ colonized ของราในต้นพืชจะขึ้นกับอายุ ถิ่นที่อยู่ และฤดูกาล (Rodrigue, 1994)

เชื้อราที่แยกได้จากพืชต่างชนิด เมื่อเปรียบเทียบโดยเฉลี่ยของการคำนวน Jaceard similarity indexes พบว่า indexes ต่ำมาก คือทุกคู่ประมาณ 0.01 (ข้อมูลไม่ได้แสดง) แสดงว่าฟังไจที่แยกจากกล้าพืชนั้นยังมีจำนวนที่ต่ำ และไม่ค่อยต่างกัน ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากกล้าพืชนั้นอายุยังไม่มาก จึงมีการ infeted ของราจากธรรมชาติในจำนวนที่ต่ำกว่าพืชที่มีอายุแก่

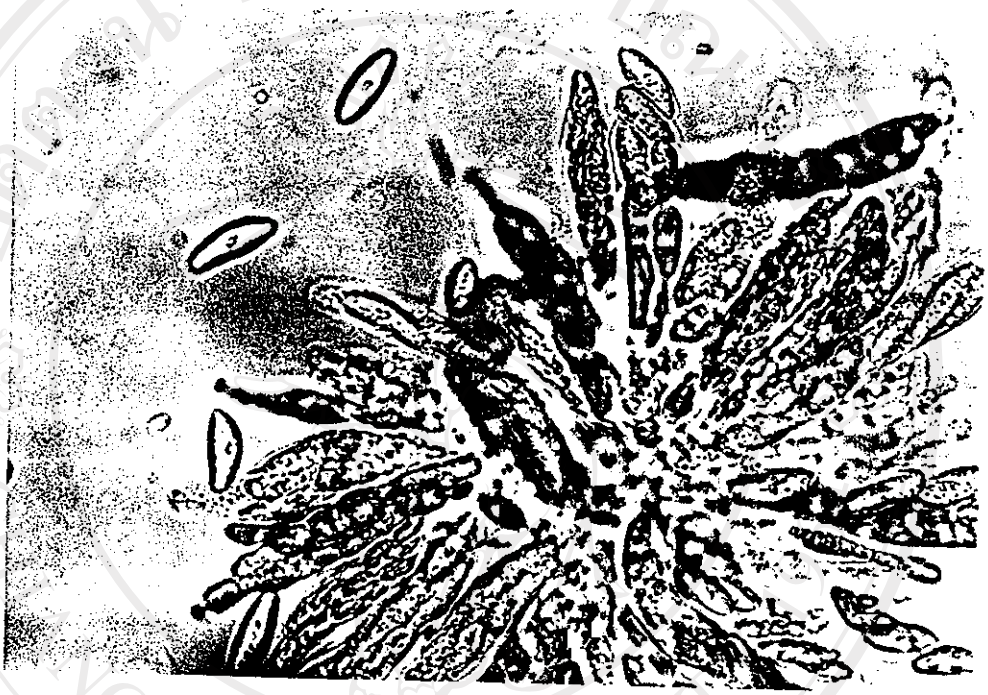
ประมาณ 25% ของราจำนวนทั้งหมดที่ได้จากการสำรวจอาจแยกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ดังนี้ (ตาราง 2.2) คือ

1. กลุ่ม Deuteromycetes :Coelomycetes คือ *Phomopsis* sp.(รูป 2.7a), *Phoma* (รูป 2.7b), *Selenophoma* sp.(รูป 2.7c), *Seimatosporium* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.2 Anamorph :(a) *Gleosporium* sp. (b) *Colletotrichum* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.3 *Glomerella* sp. ซึ่งเป็น teleomorph ของ *Gloeosporium* sp. และ *Colletotrichum* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตาราง 2.2 ความถี่ของรา endophytes จากพืชแต่ละ species**

| Plant species | | Endophytic fungi species | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| S120 | 1 | 4 | 7 | 44 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 18 |
| (Cha-muang) | 2 | 2 | 16 | 29 | - | 4 | - | - | 7 | - | - | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 |
| | 3 | 7 | 16 | 25 | - | 1 | - | - | 4 | - | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | 5 |
| | 4 | 2 | 18 | 35 | 10 | - | 2 | - | 4 | - | - | - | - | - | - | - | 3 | - | - | - | 6 |
| | 5 | - | 60 | 9 | - | 3 | - | - | 20 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| S157 | 1 | - | 1 | - | - | 15 | 1 | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 8 |
| | 2 | 1 | - | - | - | 6 | - | - | 2 | - | 2 | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 12 |
| | 3 | 1 | 6 | - | 1 | 16 | - | - | 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 18 |
| | 4 | 18 | 27 | 3 | - | 3 | - | - | - | - | - | 5 | - | - | - | - | - | - | - | - | 35 |
| S162 | 1 | 1 | - | - | 6 | 5 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 26 |
| (Boon-naak,Tree) | 2 | 5 | 3 | - | - | - | - | - | 2 | - | 3 | - | - | - | - | - | 5 | - | - | - | 8 |
| S7 , | 1 | - | 1 | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 |
| (Montha-dang) | 2 | 2 | 2 | 10 | - | - | - | - | 1 | - | - | 4 | - | - | - | 2 | - | - | - | - | 2 |
| | 3 | 2 | 12 | 14 | - | 2 | - | - | 12 | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 23 |
| | 4 | - | 55 | 19 | - | - | - | - | 22 | - | 2 | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 3 |
| | 5 | - | 43 | 12 | - | - | - | - | 30 | - | 3 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 3 |

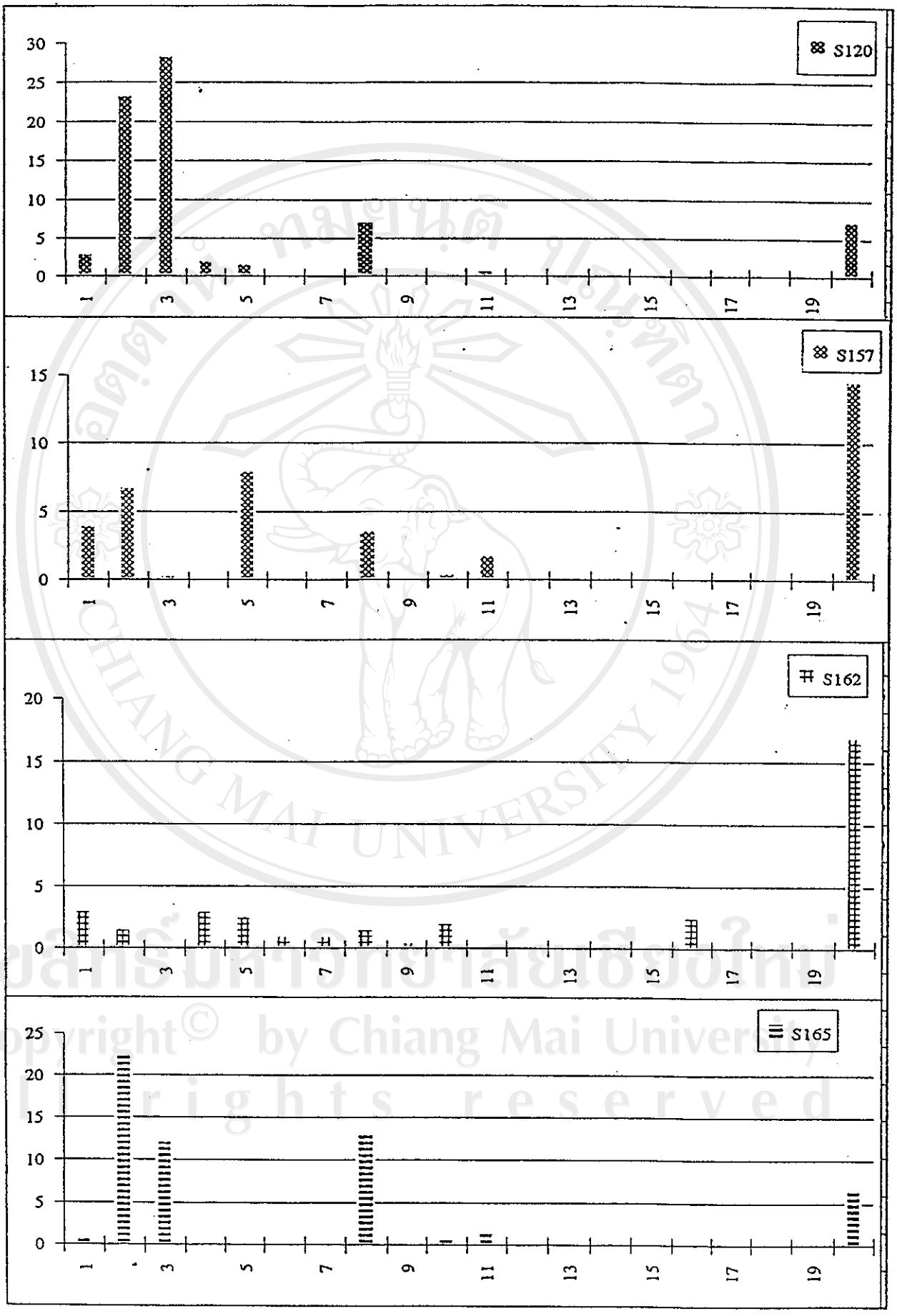
ตาราง 2.2 (ต่อ)

| Plant species | | Endophytic fungi species | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| S169 | 1 | 1 | 11 | 2 | - | - | 4 | 1 | 1 | - | - | 1 | 14 | - | - | - | - | - | - | - | 8 |
| | 2 | - | 2 | 3 | 7 | 5 | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 10 |
| S214 | 1 | 1 | 1 | 2 | 20 | 5 | 32 | - | 1 | - | 2 | - | 2 | 2 | - | - | - | - | - | 1 | 20 |
| (Phrayom) | 2 | - | 6 | - | - | 1 | - | - | 9 | - | 2 | - | 2 | - | - | - | - | 1 | 1 | - | - |
| S215 | 1 | 7 | 4 | 5 | 14 | 3 | 1 | - | 2 | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | 1 | 2 |
| | 2 | - | 2 | 3 | 7 | 1 | 9 | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 |
| | 3 | - | - | - | 10 | 4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 4 | 4 | - | - | 5 | 10 | - | 1 | 1 | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 5 | 2 | 5 | 17 | 6 | 10 | 1 | - | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 3 |
| S218 | 1 | 1 | 5 | 11 | 2 | 1 | - | - | 1 | - | 1 | 4 | 2 | - | - | - | - | - | - | - | 26 |
| (Obchaei) | 2 | 2 | 11 | 8 | - | 3 | - | - | 3 | - | 2 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 25 |
| | 3 | 2 | 10 | 16 | - | 3 | - | - | 3 | - | - | 2 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 19 |
| S130 | 1 | - | 2 | 6 | - | - | - | - | 2 | - | 2 | - | 28 | - | - | - | - | - | - | 1 | 2 |
| | 2 | 5 | - | 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | 12 | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| | 3 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 21 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 4 | 1 | 1 | 20 | 2 | 1 | 3 | - | 4 | - | - | - | 2 | - | 1 | - | - | - | - | - | 3 |

S 120 = *Garcinia cowa*, S157 = *Trichila connaroides*, S162 = *Mesua ferrea*,
S7 = *Manglietia garrettii*, S169 = *Camellia sinensis* var. *assamica*,
S214 = *Shorea roxburghii*, S215 = *Litsea salicifolia*, S218 = *Cinnamomum iners*,
S130 = *Cleidion spiciflorum*

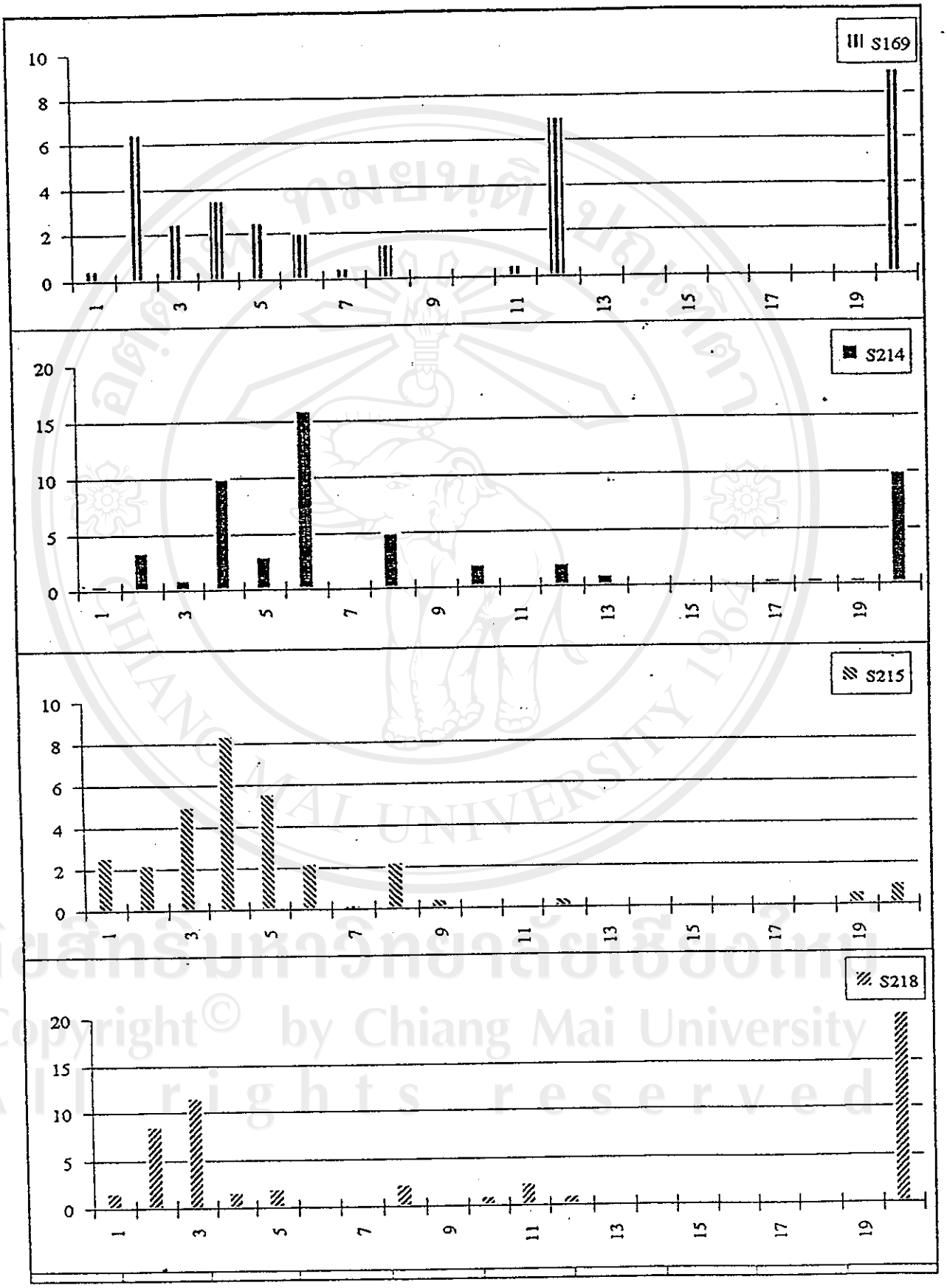
1. Unknown MK3, 2. *Gloeosporium* spp., 3. *Glomerella* spp., 4. *Phomopsis* spp.,
5. *Phoma* spp., 6. *Xylaria* spp., 7. *Sporomia* spp., 8. *Colletotrichum* spp., 9. *Corynespora* spp.
10. *Pestalotiopsis* spp., 11. *Nigrospora* spp., 12 Unknown UK2, 13. *Seimatosporium* spp.,
14. *Helmenthosporium* spp., 15. *Curvularia* spp., 16. *Didymella* spp., 17. *Fusarium* spp.,
18. Selenophoma spp., 19. Unknown UK3., 20. Mycelia sterillia

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

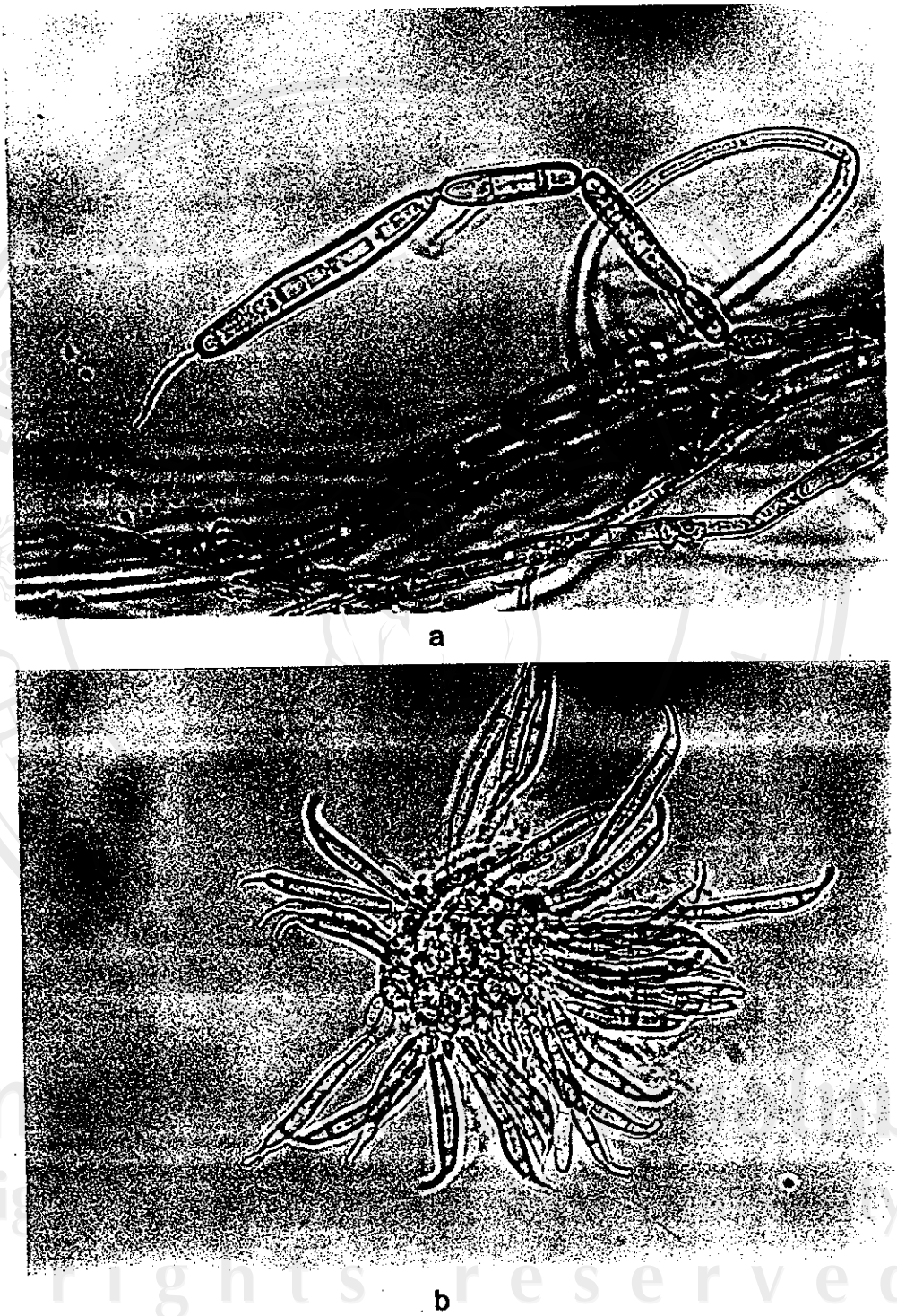



รูป 2.4 ความถี่ของรา endophytes ที่แยกได้จากพืชแต่ละ species

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

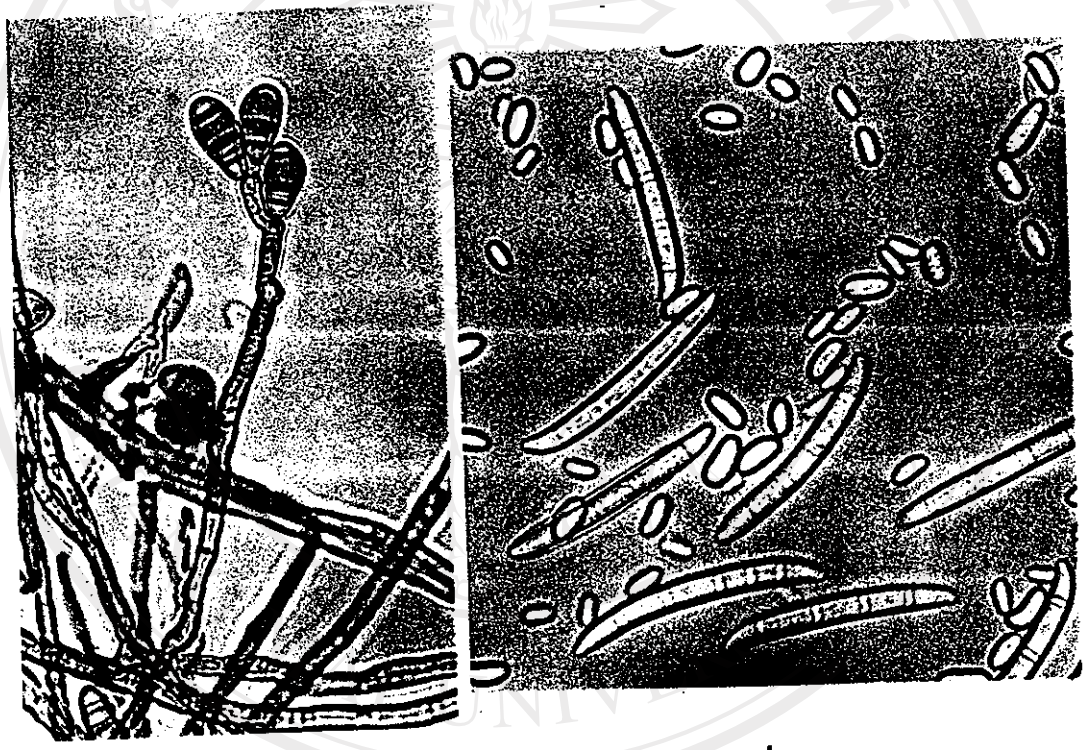



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




รูป 2.5 (a) *Corynespora* sp (b) *Seimatosporium* sp., conidia and conidiophore

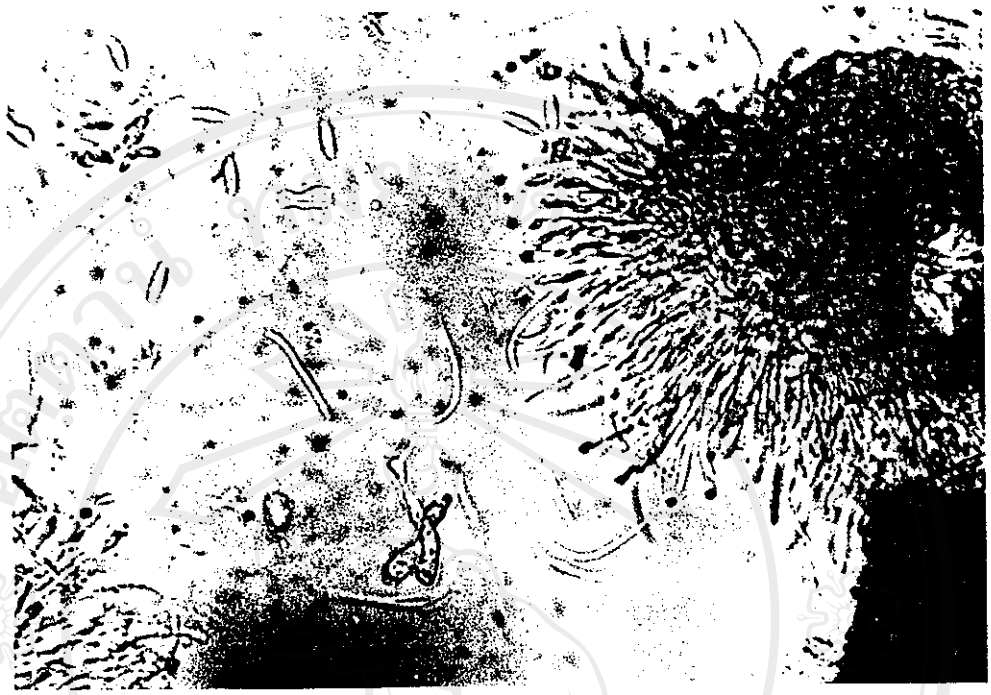
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by
All rights reserved



a b

รูป 2.6 (a) *Curvularia* ap. (b) *Fusarium* sp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



a

b

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.7 (a) *Phomopsis* sp. (b) *Phoma* sp.

2. กลุ่ม Deuteromycetes : Hyphomycetes คือ *Colletotrichum* sp., *Gloeosporium* sp., *Corynespora sp., Pestalotiopsi* sp.(รูป 2.8a),*Nigrospora* sp.(รูป 2.8b) *Cladosporium* sp. *U2* (รูป 2.8c), *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. 3. กลุ่ม Ascomycetes : *Glomerella* sp., *Xylaria* sp., Guignardia sp., Didymella sp., *Sporomilla* sp., *Gelasinospora* sp.

Xylariaceous fungi พบในรูป anarmorphs นั้น แยกได้บ้างในกล้าพืช แต่จะพบจำนวนมาก (species) ในพืชต้นแก่ เช่น พยอม *Xylaria* sp. กลุ่มนี้มีความหลากหลายมาก (ดูรายละเอียดในบทที่ 3) ไม่ค่อยพบจากตัวอย่างที่เป็นกล้า

17% ของราที่แยกได้เป็นกลุ่ม sterile mycelia ซึ่งมีความแตกต่างของโคโลนี ในบางรายงาน (Pelaez, *et. al.* 1998) จัดแยกเป็นแต่ละ species ตามลักษณะของโคโลนี

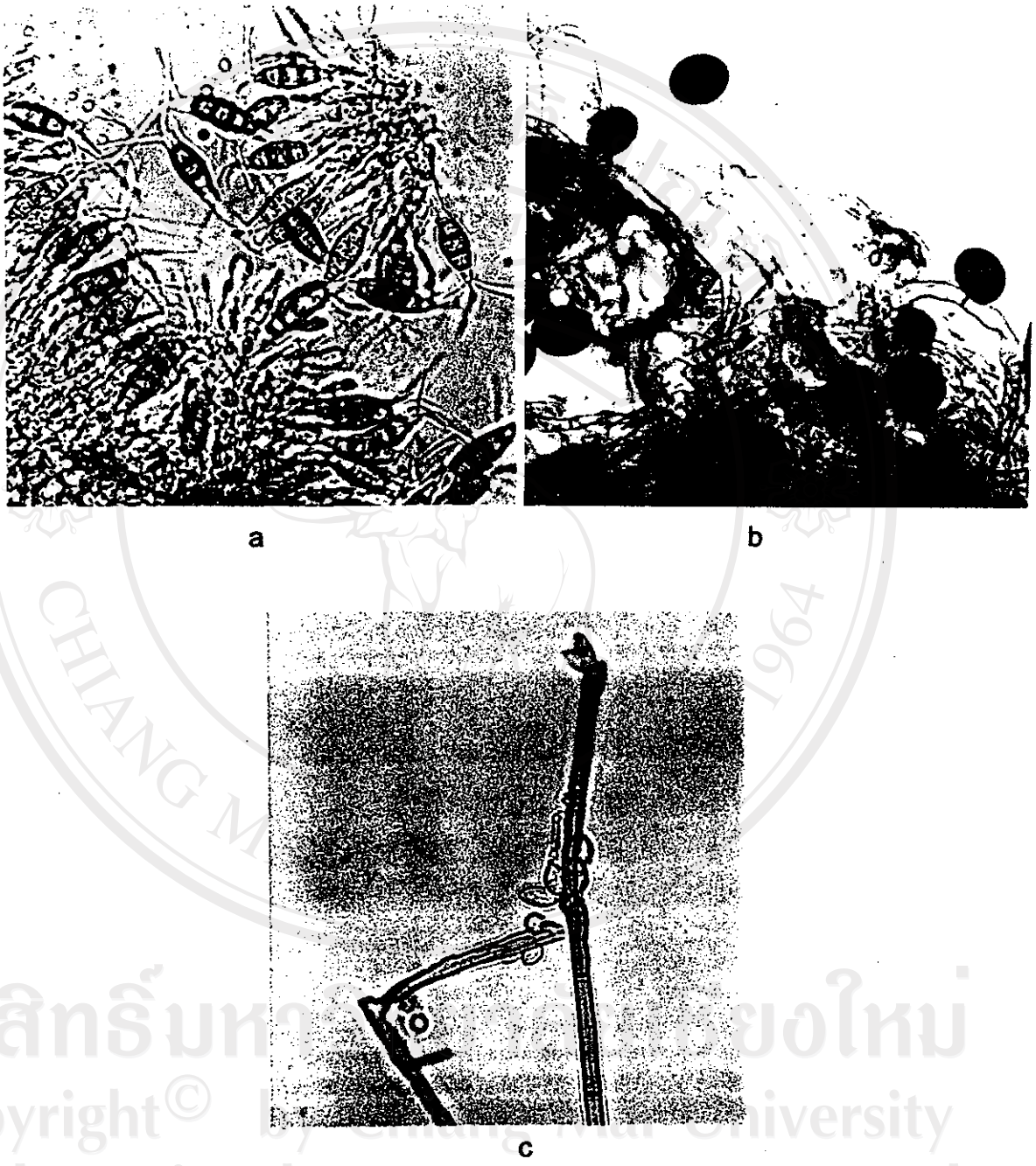
45% ของเชื้อราที่แยกได้ทั้งที่เป็น *Glomerella* sp. ซึ่งเป็นระยะ telemorph และ *Gleosporium* sp. ที่เป็นระยะ anamorph แสดงถึงปริมาณที่กระจายอยู่ตามพืช โดยเฉพาะกล้าพืชป่ามีเป็นจำนวนมากกว่าเชื้อรากลุ่มอื่นๆ

2.ความถี่ของเชื้อราที่พบที่ตำแหน่งต่างๆของพืช

ตาราง2.3 รูป 2.9 แสดงถึงจำนวนเชื้อราแต่ละ species ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของพืชตำแหน่งต่างๆ ซึ่งเนื้อเยื่อที่แยกได้เชื้อรามากที่สุดเรียงลำดับ (ที่ 1-15) ดังนี้ ลำต้น, ก้านใบแก่, เส้นกลางใบแก่, เส้นกลางใบด้านล่างที่แก่, ส่วนเส้นใบแก่ด้านล่างใบ, เส้นใบด้านบนใบแก่, ส่วนระหว่างเส้นใบด้านบนใบแก่, เส้นกลางใบด้านบนจากใบอ่อน, เส้นกลางใบด้านล่างใบอ่อน, ระหว่างเส้นใบด้านล่างใบแก่, เส้นใบด้านล่างใบอ่อน, เส้นใบด้านบนใบอ่อน, ระหว่างเส้นใบด้านล่างใบอ่อน, ระหว่างเส้นใบของใบอ่อน และก้านใบอ่อน

ข้อมูลของกล้าดีหมีไม่ได้แสดงไว้ แต่ข้อมูลแสดงไปในทิศทางเดียวกันกับกล้าพืชชนิดอื่นๆ รวมทั้งเนื้อเยื่อจากต้นพยอมและบุนนาค ส่วนของลำต้นจะเป็นส่วนที่พบเชื้อมากที่สุด และพบเชื้อราหลากหลายชนิดมากกว่าส่วนอื่นๆ ใบแก่ก็จะแยกเชื้อราได้มากกว่าใบอ่อนทั้งชนิดและจำนวน ผลการทดลองนี้ได้ผลสอดคล้องกับงานทดลองของนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน ที่ทดลองศึกษากับพืชในเขตอบอุ่นและเขตร้อนทางอเมซอน (Okane, 1996, Chapela, 1989; Sieber, et . al., 1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.8 (a) *Pestalotiopsis* sp. (b) *Nigrospora* sp. (c) *Cladosporium* sp.U2

ตาราง 2.3 ความถี่ของ endophytic fungal species จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืช

| Plant species | | Plant parts | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | OP | YP | S | OTMR | YTMR | OBV | YBV | OBMR | YBMR | OTIV | YTIV | OBIV | YBIV | OTV | YTV |
| S7 | 1 | - | - | - | 4 | - | 3 | - | 3 | - | - | - | 1 | - | - | - |
| (Mon thaa) | 2 | 4 | 1 | - | 2 | 3 | 4 | - | 1 | - | 3 | 1 | 2 | 1 | 3 | - |
| | 3 | 6 | 11 | 3 | 10 | 8 | 4 | 5 | 7 | 5 | 5 | 2 | 7 | 3 | 7 | 5 |
| | 4 | 6 | 7 | 9 | 9 | 9 | 7 | 6 | 8 | 7 | 7 | 9 | 7 | 6 | 7 | 9 |
| | 5 | 8 | 8 | 8 | 7 | 8 | 6 | 7 | 8 | 6 | 4 | 7 | 3 | 6 | 7 | 8 |
| S120 | 1 | 4 | 2 | 7 | 5 | 4 | 7 | 8 | 5 | 9 | 7 | 1 | 8 | 4 | 8 | 3 |
| | 2 | 1 | 1 | 15 | 11 | 4 | 9 | 3 | 6 | 2 | 7 | 3 | 6 | 1 | 8 | 3 |
| | 3 | 6 | - | 9 | 5 | 6 | 6 | 1 | 4 | 3 | 7 | 6 | 6 | 7 | 3 | 6 |
| | 4 | 5 | - | 6 | 6 | 5 | 7 | 6 | 3 | 6 | 5 | 5 | 6 | 8 | 5 | 4 |
| | 5 | 6 | 1 | 12 | 7 | 7 | 8 | 6 | 8 | 6 | 8 | 8 | 6 | 8 | 7 | 4 |
| S157 | 1 | 10 | - | 2 | 4 | - | - | - | 2 | 3 | - | - | - | - | 4 | - |
| | 2 | 10 | - | 14 | 3 | - | 1 | 1 | 7 | 1 | - | 1 | - | - | 6 | 1 |
| | 3 | 13 | - | 7 | 7 | 3 | - | - | 10 | - | 4 | - | 6 | - | 5 | - |
| | 4 | 12 | - | 14 | 12 | - | 11 | - | 11 | - | 13 | - | 10 | - | 13 | - |



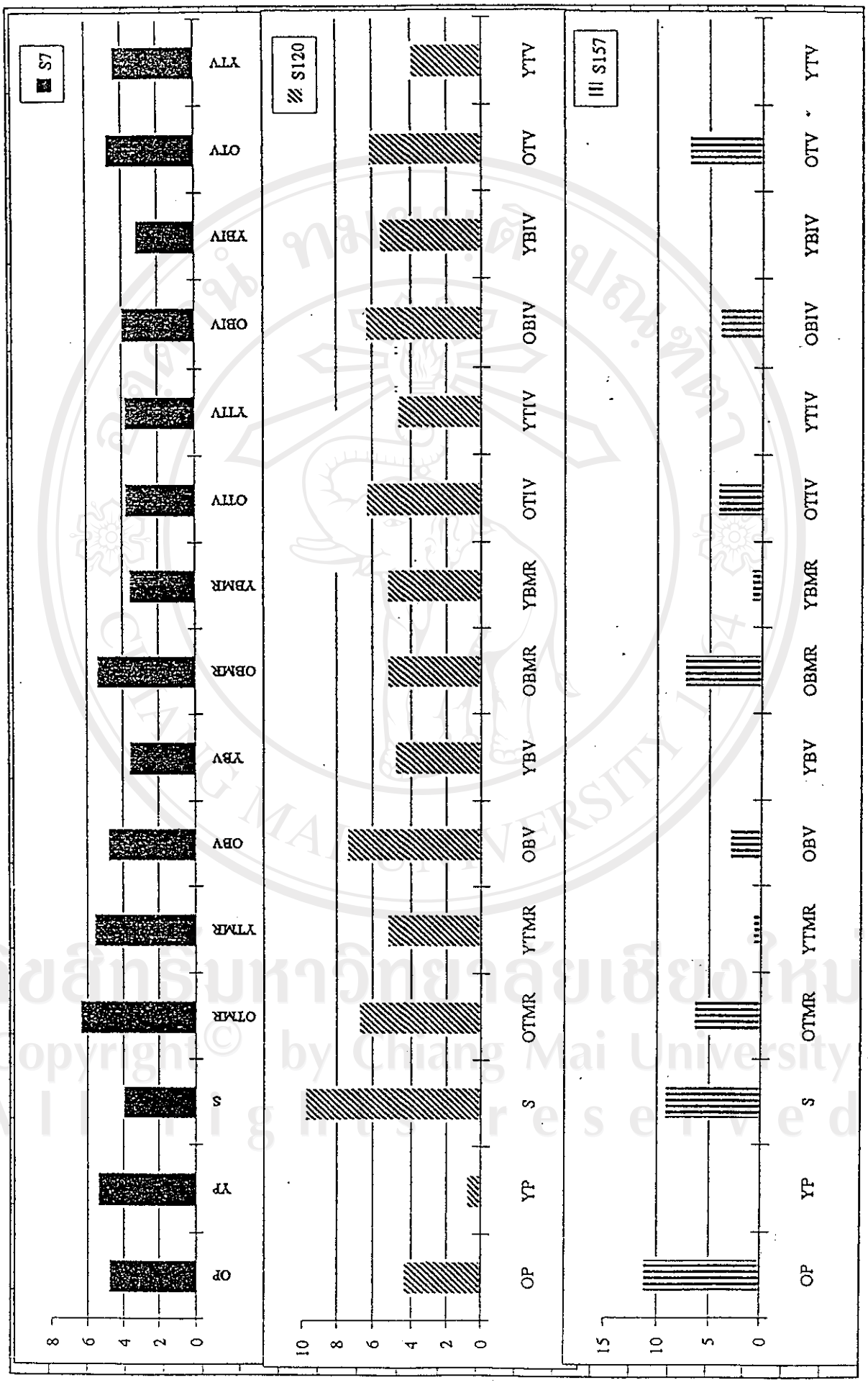
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2.3 (ต่อ)

| Plant species | | Plant parts | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | OP | YP | S | OTMR | YTMR | OBV | YBV | OBMR | YBMR | OTIV | YTIV | OBIV | YBIV | OTV | YTV |
| S169 | 1 | 9 | - | 5 | 4 | 2 | 3 | 1 | 9 | 2 | 1 | - | 2 | - | 3 | - |
| (Tea) | 2 | 8 | - | 11 | 2 | 1 | 4 | - | 3 | 2 | - | 1 | 4 | 1 | 2 | - |
| | 3 | - | - | 12 | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| S215 | 1 | 7 | - | 12 | 3 | - | 5 | - | 5 | - | 7 | - | 5 | - | 1 | - |
| | 2 | - | - | 10 | - | - | 5 | - | 2 | 3 | - | 4 | - | - | 1 | 3 |
| | 3 | - | - | 16 | - | - | 3 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| | 4 | 11 | - | 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | 4 |
| | 5 | 4 | - | 15 | 5 | - | 2 | - | 7 | - | 6 | - | 6 | - | 2 | - |
| S218 | 1 | 6 | 2 | 5 | 10 | 6 | 3 | 7 | 2 | 4 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 |
| (Cinnamon) | 2 | 7 | 5 | 7 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 1 | 2 | 1 | 7 | 1 |
| | 3 | 5 | 3 | 6 | 5 | 5 | 6 | 6 | 5 | 5 | 3 | 2 | 4 | 5 | 6 | 4 |

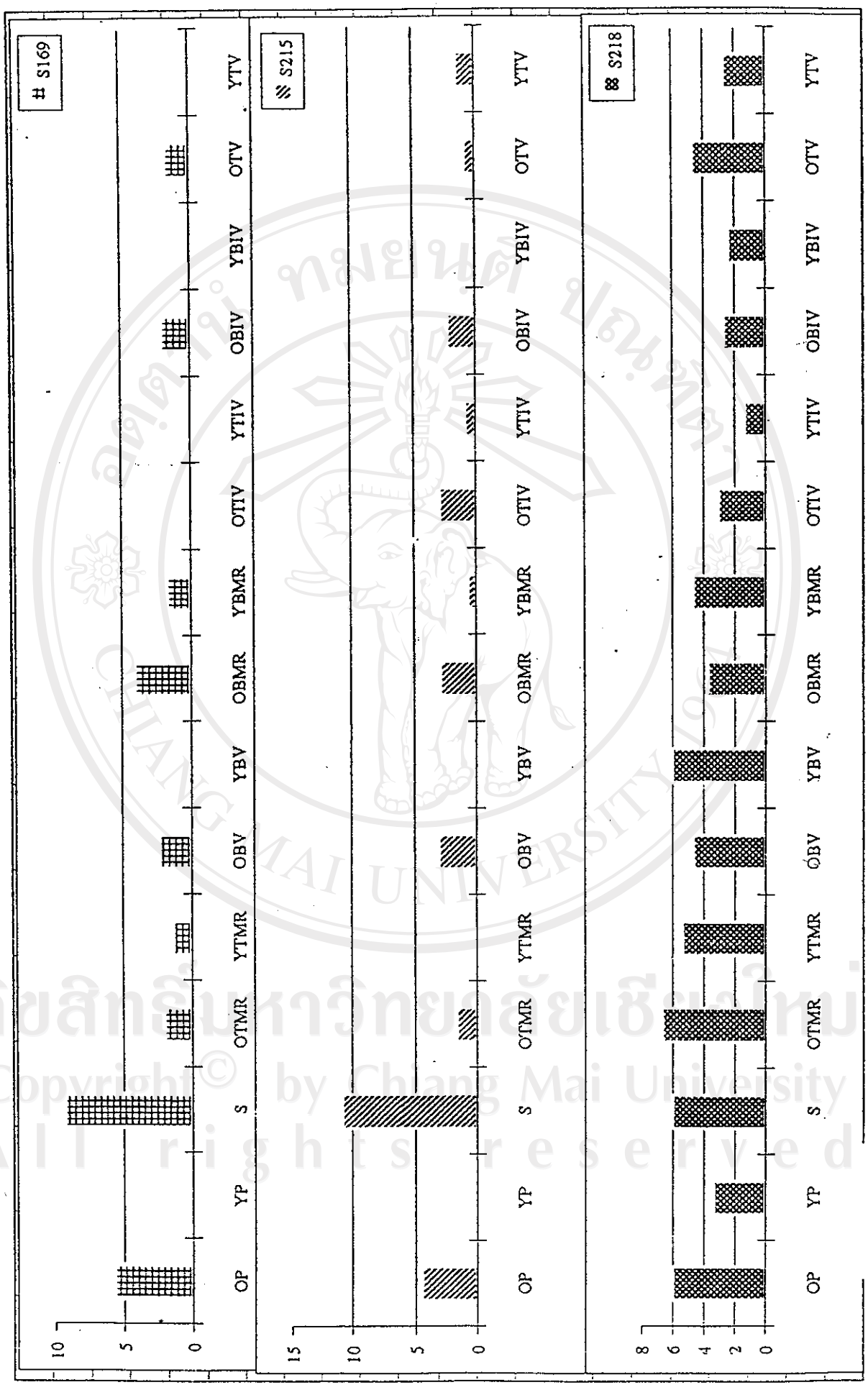
S7=*Manglietia garrettii*,S120 =*Garcinia cowa* ,S157 =*Trichilla connaroides* ,S169 =*Camellia sinensis* var. *assamica* S215 = *Litsea salicifolia* ,S218 =*Cinnamomum iners*

OP = old petiole
YP = young petiole
S = stem
OTMR = old top mid rib
YTMR = young top mid rib
OBV = old between vein
YBV = young between vein
OBMR = old bottom mid rib
YBMR = young bottom mid rib
OTIV = old top intervein
YTIV = young top intervein
OBIV = old between intervein
YBIV = young between intervein
OTV = old top vein
YTV = young vein




รูป 2.9 จำนวนเชื้อราแต่ละ species ที่พบในเนื้อเยื่อต่างๆ ของพืชแต่ละชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




รูป 2.9 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.เชื้อราที่พบไม่บ่อย (rare species) ในกลุ่ม endophytes ที่แยกได้จากพืชป่า 9 ชนิด

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี, สปอร์, โครงสร้างสืบพันธุ์, ทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ของเชื้อราที่เพาะใน corn meal agar slant นาน 2 เดือน จำนวน 2542 isolates ราบางชนิดก็สร้างทั้ง telemorph และ anamorph พบเชื้อราที่น่าสนใจที่พบได้ยากและไม่เคยมีรายงานว่าเป็น endophytes 7 isolates ดังนี้

1. เชื้อ *Apiosordaria striatispora* แยกจากต้นพยอม เป็นเชื้อราใน Class Ascomycetes มีรายงานว่าพบในประเทศไทยครั้งแรกจากตัวอย่างดินแยกโดยชาวญี่ปุ่น รายละเอียดของเชื้อนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสาร Mycosciece, 1997 เชื้อราชนิดนี้ไม่ใช่เชื้อใหม่ แต่เป็นรายงานแรกที่เสนอการพบเชื้อราชนิดนี้ที่เป็น endophytes ลักษณะที่พบในอาหารในห้องปฏิบัติการระยะ telemorph สร้าง perithecium, ascus และ ascospore (รูป 2.10)

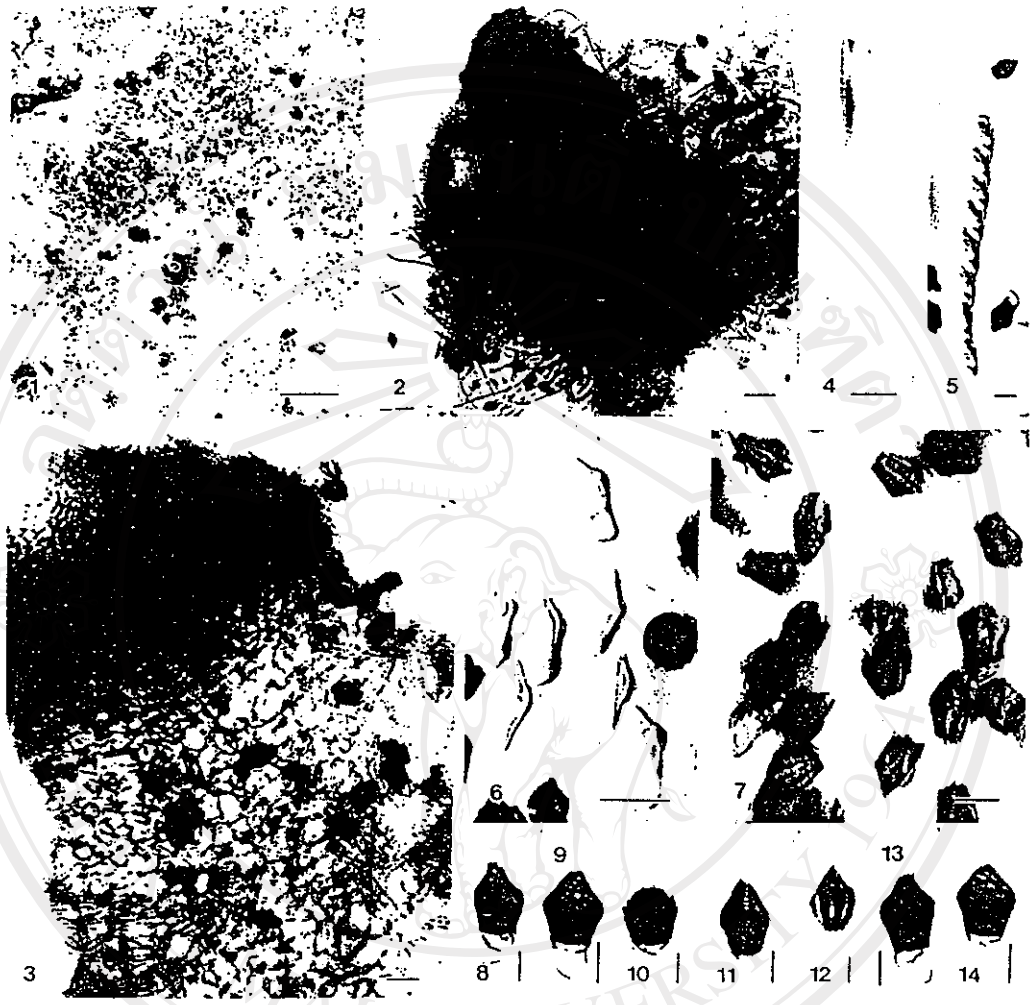
*2. Sporomiella minima* แยกจากกล้า *Litsea salicifelia* เชื้อนี้มีรายงานครั้งแรกว่าเป็นราที่พบจากมูลสัตว์ (Richardson and Watling, 1997; Bell, 1983) เรียก Common name ว่า dung fungi ยังไม่มีรายงานว่าเป็น endophytes อยู่ในกลุ่ม Tyrenonycetes ลักษณะโคโลนีบนอาหาร corn meal เส้นใยเรียบ เจริญในอาหารมีสีน้ำตาล asci มีขนาดกว้าง 13.8 µm ยาว 76.5 µm cylendrical bitunicate asci ลักษณะ ascospors ยาว (cylendrical) กว้าง 5.0-6.0 µm ยาว 26.0-32.0 µm สีดำ มี 8 เซลล์สร้าง perithicia ชนิดที่มี ostiote ขนาด 30.6,104.6, 32.6 (Richads and Watling, 1997) ซึ่งส่วนมากจะเป็น 4 เซลล์ ที่มักจะแยกเป็น 1 เซลล์ เมื่อแก่ ซึ่งแต่ละเซลล์จะงอกได้ (รูป 2.11 )

3. *Guignardia* sp.MK3 ตัวแทนแยกจากบุนนาค เป็นกลุ่ม bitunicate Loculoascomycetes (Sivanesan, 1984) เส้นใยสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ เมื่อเจริญในอาหาร corn meal agar เส้นใยจะเจริญลงไปในอาหาร เส้นใยบนผิวอาหารบางมาก สร้างทั้ง anamorph และ telemorph ในอาหาร corn meal agar ส่วน anamorph คือ *Phylostricta* sp. สร้าง conidia รูปร่างกลม ใส มีหาง บน conidiophore สั้นๆ ขนาดของ conidia 2.8x10 µm

Telemorph : คือ *Guignardia* sp. สร้าง ascocarp สีดำเข้ม รูปร่างค่อนข้างกลม asci bitunicate เรียงเป็นเส้นขนานใน ascocarp, ascospore มี 8 ascospore รูปร่างเป็น curve มีส่วนใสที่ปลายทั้ง 2 ด้าน ขนาดเฉลี่ย 6.0-8.0 x 16.0-20.0 µm (รูป 2.12)

ทว 579.5
เลขทะเบียน.....เลขหมู่.....ก 268ก
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




รูป 2.10 *Apiosordaria striatispora* 1. Ascomata on agar surface, 2. Ascoma, 3. Cell of peridium and neck, 4-5. Asci. Note the apical ring , 6. Immature ascospores, 7-14. Ascospores. Note the wall striations, hyaline basal cell, and apical germ pore. Bars: 1=500 µm, 8-14 = 5 µm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1

2

3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.11 *Sporomella minima* 1. Ascus and ascospores, 2. Ascoma-peridium

รูป 2.12 *Guignardia* sp. MK 1. Ascoma, 2. Bitunicate asci with ascospores, hyaline cell at bothe end 3. Anamorph: Phylostricta , 4. Colony morphology grow in potatoyeast extract agat (PYDA) and corn meal agar (CM)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. *Didymella* sp. แยกได้จากบุนนาค (BN2B8R1-2)และพยอม ลักษณะโคโลนีบนอาหาร corn meal agar เส้นใยบาง สร้างส่วนของ ascoma : perithecian เป็น unitunicate pseudothecium กระจาย (scaltered) ฝังในอาหาร สีน้ำตาลเข้ม กลม มีปาก (ostiolate) ผนังเป็น pseudoparenchymatous บางครั้งจะหนารอบๆส่วน ostiole เพื่อ form clypens ส่วนตรงกลางจะมี pseudoparaphyses

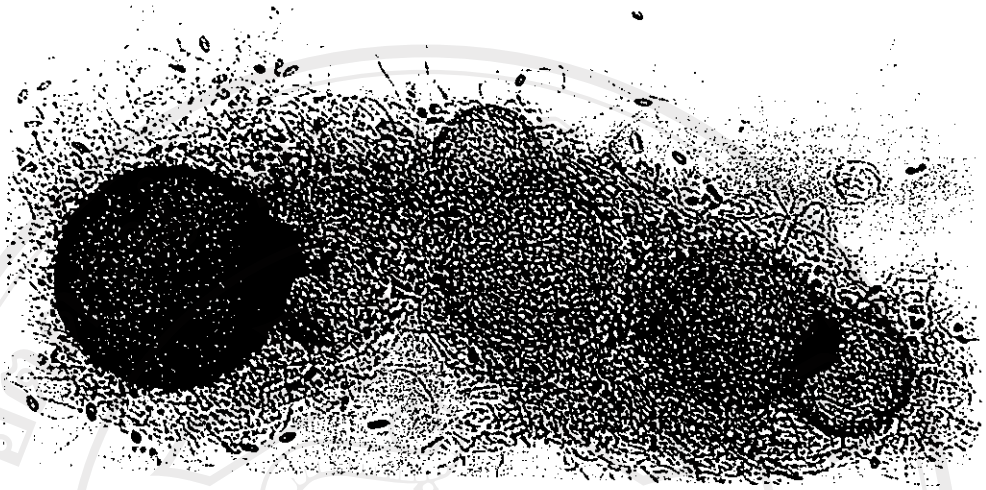
Asci เป็น bitunicate ทรงกระบอกเรียงขนานกัน มีก้านสั้น ascospore 8 spores ascospore : มี 2 เซลล์, มีผนังกั้นขวางตรงกลาง สีใส ขนาด 6.0-8.0 x15.0-18.0 µm (รูป 2.13) Anamorph เป็น *Phorna* แต่ไม่พบในอาหารที่เพาะเลี้ยงครั้งนี้

5. *Selenophoma* spp. สายพันธุ์ P2A12W1 type culture แยกจากพยอม ส่วนของใบในอาหาร water agar เจริญช้าในอาหาร PDA แต่ถ้าเป็น PDA+15% glucose จะเจริญดีมาก เต็มจานภายใน 3 วัน ลักษณะโคโลนีบนอาหาร corn meal agar จะมีเส้นใยบาง สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ระยะ anamoph โดยสร้าง pycnedium สีน้ำตาลเข้ม จัดอยู่ในกลุ่ม Caelomycetes conidia เป็นรูปเสี้ยวพระจันทร์ใส ขนาด 1.5-2.0 x 14.0-26.0 µm (รูป 2.14)

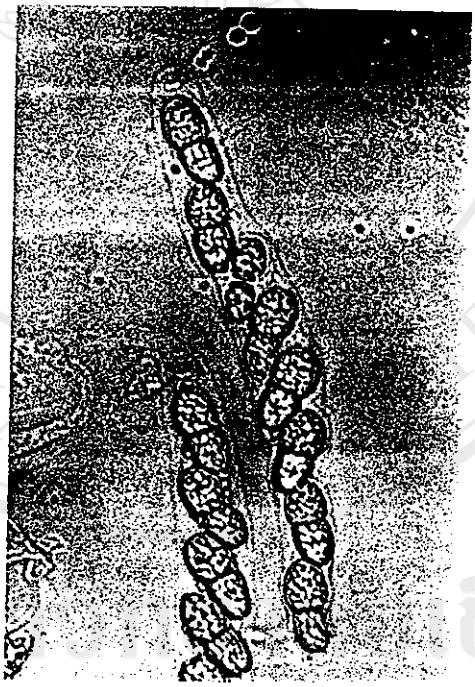
6. *Vollutella* sp. S157-3 แยกจากกล้า *Trichilla connarroides* ลักษณะconidia ขนาด 2-36 x 24-30 µm (รูป 2.15)

7. *Seimatosporium* sp. BN15W ตัวแทนแยกได้จากบุนนาค ในอาหาร corn meal agar เส้นใยใส เจริญทั้งด้านบนและด้านล่างของอาหาร conidia สร้างใน acervuloar ทั้งบนอาหารและฝังในอาหารเป็นกลุ่มกระจัดกระจาย conidiophore ทรงกระบอกใส เป็นfiliformม conidia ใสขนาด 4x9 µm (รูป 2.5b) มีรายงานว่า *S. azaleae* (sp. *nova*) เป็น anamorph ของรา endophytes ชนิดใหม่คือ *Discostroma tricellulare* ซึ่งแยกได้จากใบของ *Rhododendron indicum* เก็บที่ Tsukuba ญี่ปุ่นในปี 1993 และ *R. macrosepalum* และ *R. obtusum* ที่เก็บจากเกียวโตปี 1994 จากการศึกษาความสัมพันธ์จากระยะ anamorph และ teleomorph ทำโดยการเพาะ 1 ascospore หรือ1 conidium ลงบนใบ Rhododendron ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (Okane, 1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



1



2

รูป 2.13 *Didymella* sp. BN2B8R 1. Ascomata- perithecian with ostiolate with pseudoparenchymatous wall, 2. Asci and ascospores

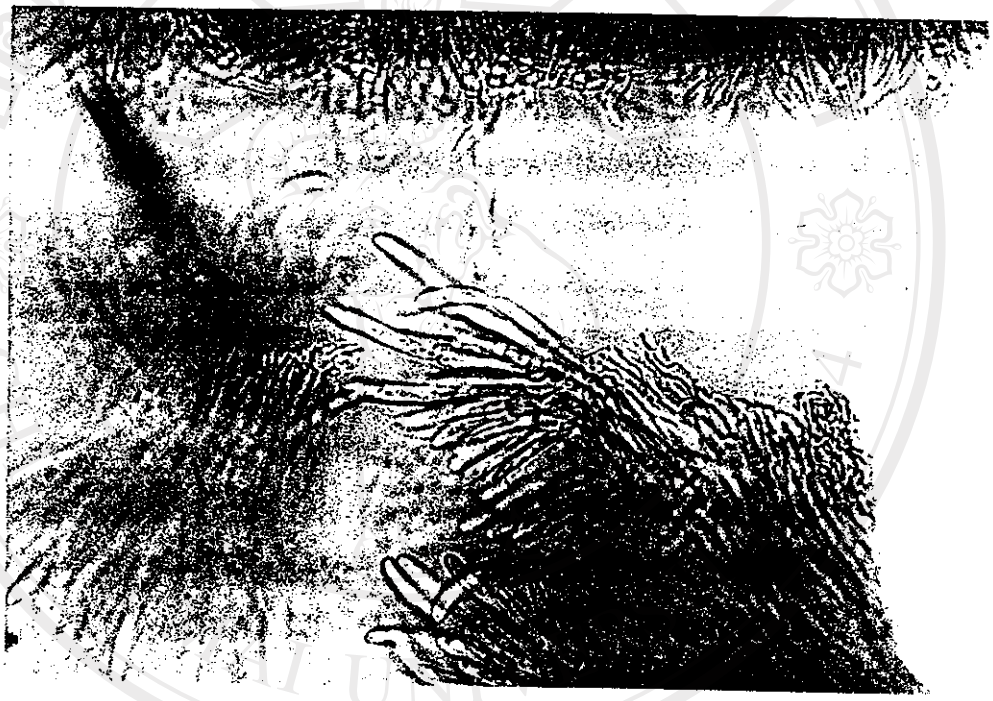
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1

2

รูป 2.14 *Selenophoma* sp. P2AW 1. Pycnedium, 2. Conidia

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.15 *Volutella* sp. S157-3 conidia

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## เอกสารอ้างอิง

Bell, A. 1983. Dung Fungi an illustrated guide to coprophilous fungi in New Zealand. Victoria University Press.

Bills, G.F. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In *Endophytic fungi in grasses and woody plants (*ed. S.C. Redlin & L.M. Carris) pp. 31-65. APS Press:St. Paul, Minnisota.

Carmichael, J.W., W.B. Kendrick, I.L. Conners and L. Sigler. 1980. Genera of Hyphomycetes

Chapela. I.H. 1989. Fungi in healthy stem and branches of American beech and aspen: A comparative study. *New Phytol.*113, 65-75.

Dreyfuss, C.H. and I. Chapela. 1994. Petential of fungi in the discovery of novel, low molecular weight pharmaceuticals. In *Discovery of natural products with Terapeutic Petential* (ed. V.P. Gullo),pp. 49-80. Butterworth-Heinemann:Newton, Massachusetts.

Fisher, P.J., O. Petrini, L.E. Petrini and B.C. Sutton. 1994. Fungal endophytes from leaves and twig of *Quercus ilex* L. from England, Majaorco and Switzerland. *New Phytolo.*127, 133-137.

Fisher, P.J., O. Petrini and M.M. Amezquita. 1992. Endophytic fungi from Alpine and Mediteranean species of *Thymus*. *Nova Heduigia* 55 : 473-477.

Hanlin, R.T. 1990. *Illustrated Gnera of Ascomycetes*. ASP Press, St. Paul, Minnisota.

Kowalski, T. and R.D. Kehr. 1996. Fungal endophyte of living branch bases in several European tree species. In *Endophytic fungi in grass and woody plant* (ed. S.C. Redlin and L.M. Carris) pp. 67-86. APS Press : St Paul, Minisota.

Lingham, R.B., K.C. Silverman, G.F. Bills, C. Cascales, M. Sanchez, R.G.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Jenkins, S.E. Gartner, I. martin, M.T. Diez, F. Pelaez, S. Mochales, Y.L. Kong, R.W. Burg, M.S. meinz, L. Huang, M. Nallin-Omstead, S.D. Mosser, M.D.Schaber, C.A.Omer, D.L. Pompiano, J.B. Gibbs and S.B. Singh. 1993. *Chaetomella acutiseta* produces chaetomellic acids A and B which are reversible inhibitors of farnersyl-protein transferase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 370-374.

Moller, C.,G. Weber and M.M. Dreyfuss. 1997. Intraspecific diversity in the fungal species *Chaunopycnis alba*: implications for microbial screening programs. *J. Indust. Microbio. Biotechnol.*17, 359-372.

Okane, I., A. Nakagiri and T. Ito. 1996. *Discostroma tricellulare*, a new endophytic ascomycetes with a *Seimatosporium* anamorph isolated from Rhododendron. *Can. J. Bot.* 74, 1338-1344.

Okane, I., A. nakagiri and T. Ito. 1998. Endophytyc fungi in leaves of ericaceous plants. *Can. J. Bot.* 76, 657-663.

Pelaze, F., J. Collado, F. Arenal, A. Basilio, A. Cabello, M.T. Diez Matas, J.B. Garcia, A. Gonzalez del val, V. Gonzalez, J. Gorrochategui, P. Hernandez, I. Martin,G. Platas and F. Vicente. 1998. Endophytic Fungi from plants living on gypsaum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Mycol. Res* 102 : 775-761.

Sneath, P.H., A and R.R. Sokal. 1973. Numrical Taxonomy. W.H. Freemass and Co : San Francisco.

Schulz, B., U. Wanke, S. Draeger and H.J. Aust. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs : effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol. Res.* 97, 1447-1450.

Sieber, T.N., F. Sieber-Canavest and C.E. Dorworth. 1990. Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. *Can. J. Bot.* 69, 407-411.

Richardson, M.J. and R. Watling. 1997. *Keys to Fungi on Dung*. British

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Mycological Society, BPC-AUP Aberdeen LTD, Scotland.

Sivanssan, A. 1984. *The Bitunicate Ascomycetes and their anamorphs.* Strauss&Cramer GmbH,Hirschberg.

Van Arx, 1981. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture.

Shivas, R.G. and K.D. hyde. 1997. Biodiversity of plants pathogenic fungi in the tropic. In *Biodiversity of Tropical Microfungi* (ed. K.D. Hyde), pp.47-56. Hong Kong University Press, Hong Kong.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# บทที่ 3

## ลักษณะ culture ของ endophytic xylariaceae

จากกล้าพืชป่า 40 species ที่ได้จากการเพาะเมล็ดพืชป่า ที่เก็บจากบริเวณอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อายุประมาณ 8 เดือน - 1 ปี และพืชต้นแก่ 2 ชนิด เมื่อนำมาแยกเชื้อในอาหารแข็ง Rose bengal หลังผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว แยกได้รา endophytes ที่มีลักษณะอยู่ในกลุ่มของ xylariaceae ทั้งหมด 145 isolates ซึ่งจัดลักษณะตามความแตกต่างของลักษณะสัณฐาน ศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารต่างๆ และการสร้าง pseudostromata แยกได้ 24 กลุ่ม ได้ทำการถ่ายภาพเพื่อเก็บไว้ใช้เป็น key เบื้องต้นในการจำแนกกลุ่มของรา xylariaceae ที่เป็น endophytes ซึ่งจำเป็นต้องยืนยันกับการชักนำให้สร้าง fruiting body ต่อไป ในการบ่งบอกชนิดถึงระดับ species หรือการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

### คำนำ

รา xylariaceae เป็นราตระกูลหนึ่งใน Class Ascomycetes ซึ่งประกอบด้วยซีนัสที่รู้จักกันดีคือ *Xylaria, Hpoxylon* และ *Daldenia* มีผลงานหลาย paper ซึ่งส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างที่แยกจากพืชดอกที่ตายแล้ว มีการแยกจากกลุ่มพืช Gymonosperm นอกจากนี้ก็อยู่ในมูลสัตว์และดิน Xylariaceae รู้จักกันดีว่าเป็น saprophyte บางชนิดเป็น parasite ที่ไม่รุนแรง แต่ทำให้เกิดการทำลายได้ (Roger, 1979) จากที่มีการศึกษาต่อๆมาก็เป็นที่ยอมรับกันว่าส่วนใหญ่ Xylariaceae ส่วนใหญ่จะเป็น endophytes fungi ที่แยกได้จากไม้เนื้อแข็ง Carroll and Carroll (1978) และ Petrini and Mueller (1979) แยกและบ่งบอกชนิด Hyphomycetes ที่เชื่อมกับ perfect stage ของราใน xylariaceae โดยอาศัยลักษณะการเพาะเลี้ยงและสัณฐานของ conidiopore นอกจากนี้ Luginbuehl and Mueller (1980) รายงานการแยก Xylariaceae ในใบพืชที่มีชีวิตของพืชใบเลี้ยงคู่ที่เป็นไม้พุ่มไม่ผลัดใบ ผลยืนยันโดยการศึกษาจากนักวิจัยหลายคน สรุปโดย Petrini (1984)

Laessoe and Lodge (1994) รายงานว่า *X. axifera* มักจะพบอยู่ที่ก้านใบของพืชในตระกูล Araliaceae ซึ่งจะพบโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้เมื่อก้านใบร่วงจากต้นพบ Xylaria ชนิดใหม่ 2 ชนิด ที่พบเฉพาะบน litter ของต้นพืชในตระกูล Meliaceae คือ *X. meloacearum* บนก้านใบและ *X. guareae* บนแขนงของต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Whalley 1996 รายงานถึง 11 genera ของ Xylariaceaeที่มีรายงานว่าเป็น endophytes ซึ่งในอนาคตจะมีการรวม *Camillea* เข้าเป็น genus ที่ 12 ตัวแทนของ endophytic fungi คือ *Asthostomella*, *Biscogniauxia*, *Daldinia*, *Hypoxylon*, *Kretzschmaria*, *Nemania*, *Rosellinia* และ *Xylaria*

คุณสมบัติที่น่าสนใจในรากลุ่มนี้คือ เป็นกลุ่มที่สร้าง secendary metabolite ชนิดใหม่ๆหลายชนิด (Whalley, 1985) การบ่งบอกชนิดของ Xylariaceae ที่เป็น endophytes ค่อนข้างยากเมื่ออาศัย anamorph ขณะที่ teleomopy ซึ่งง่ายในการบ่งบอกชนิดเกิดยากในอาหารที่เพาะเลี้ยง การอธิบายลักษณะโดยส่วน anamoph นั้นให้ชื่อได้ถึงระดับสปีชีส์เช่นกัน

การทดลองในครั้งนี้ได้มีการแยกเชื้อ endophytic fungi จากกล้าพืชป่า 40 ชนิด และจากพืชยืนต้น ต้นแก่ 2 ชนิด ได้ราซึ่งเส้นใยแสดงลักษณะ typical ของรากลุ่ม xylariaceae ซึ่งลักษณะของเส้นใยที่เจริญในจานอาหารชนิดต่างๆและในหลอดทดลองสามารถจำแนกความแตกต่างได้บางส่วน นอกจากนี้ยังได้ชักนำให้มีการสร้าง fruiting body จากเชื้อที่แยกได้ในขวดเพาะเลี้ยง

วิธีการทดลอง

1. ทำการแยกเชื้อ endophytic fungi จากกล้าพืชป่าธรรมชาติ 40 ชนิด และพืชป่าต้นแก่ 2 ชนิด โดยเพาะเนื้อเยื่อในอาหาร 2% malt extract agar + rose bengal และ streptomycin sulfate หลังผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยวิธี triple surface sterilization แล้วบ่มเชื้อนาน 2 เดือน

2. เก็บรวบรวมเชื้อราที่มีลักษณะ unique ของกลุ่มที่เป็น xylariaceae เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานต่อไป

3. ทำการเพาะเส้นใยของรากลุ่มนี้ในจานอาหารแข็งชนิดต่างๆ malt extract agar PDA, corn meal agar, oat meal agar และ CYPD ในอาหาร oat meal agar นั้น จะบ่มเชื้อไว้ในสภาพที่ได้รับแสง 12 ชม. สลับมืด 12 ชม. เพื่อศึกษาการเจริญและลักษณะของโคโลนี บันทึกรายละเอียดและถ่ายภาพ

4. ทำการเพาะเส้นใยของแต่ละไอโซเลตลงในอาหาร oat meal agar ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำไปตั้งไว้บริเวณที่มีแสงส่องผ่าน ตรวจผลทุก 1 เดือน นำท่อนไม้ที่นึ่งฆ่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อแล้วใส่ลงไปในขวดที่มีเส้นใยเจริญ บ่มทิ้งไว้จนเส้นใยเจริญคลุมผิวของท่อนไม้ ทำการแยกไปเพาะในถุงทรายชื้นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มในสภาพที่ชื้นจนสังเกตการสร้าง fruiting body ระยะ teleomorph บ่มจนแก่ นำมาศึกษาลักษณะของ ascospores

5. ศึกษาการเจริญของเส้นใยของราบางชนิดในกลุ่ม Xylariaceae ในอาหารเหลวชนิดต่างๆ วัดน้ำหนักเปียก การเตรียมอาหารที่ใช้เลี้ยงราในกลุ่มที่เลือกมาศึกษาใช้อาหาร 3 ชนิด คือ potabodextrose yeast extract broth (PDYB) ซึ่งประกอบด้วย 2% PDB และ yeast extract 0.5% (w/v) อาหาร CYM ที่ประกอบด้วย (% w/v) $KH_2PO_4$.0.069; $K_2HPO_3$, 0.15; $MgSO_4.7H_2O$, 0.075; dextrose, 3; yeast extract, 0.1; peptone, 0.3; อาหาร potato dextose tween (PDT) ซึ่งประกอบด้วย (%w/v) PDB, 2; Tween 80, 2 (v/v)

เตรียมอาหารเหลวทั้ง 3 ชนิด จำนวน 50 ml. ใส่ฟลาส ขนาด 125 ml ใส bead 10 เม็ด ทำ 3 ซ้ำ การเพาะ Xylariaceae ใช้ corh borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 cm เจาะเส้นใยของ Xylaria 5 isolates อายุ 3 วัน ใส่ลงในอาหารแต่ละชนิด ฟลาสละ 5 ชิ้น นำไปบ่มที่อุรหภูมิห้อง โดยเขย่าแบบวงกลม ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 3-6 วัน จากนั้นกรองเอาเส้นใย โดยกรองผ่าน chess cloth หรือใช้กระดาษกรอง Whatmae No.1 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำไปทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 65 $^{\circ}C$ ข้ามคืน ชั่งน้ำหนักแห้ง

**ผลการทดลอง**

1. การกระจายของเชื้อรา endophyte กลุ่ม xylariaceae ในกล้าเชื้อชนิดต่างๆ

จากการแยกเชื้อจากกล้าพืช 40 ชนิด และพืชต้นแก่ 2 ชนิด คือ พยอม (Shorea roxbugii) บุนนาค (Mesae ferrea) พบกลุ่มที่สงสัยว่าเป็น xylariaceae ในพืชทุกชนิดอย่างน้อย 1 สายพันธุ์ต่อพืช 1 ชนิด

2. ลักษณะสัณฐานระยะ anamorph (ลักษณะที่เจริญบนอาหารซึ่งสร้าง conidia และเส้นใย)

โดยทั่วไปราในกลุ่ม xylariaceae จะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารต่างกัน 2 ชนิดคือ malt extract agar และ oat meal agar อาหารที่เหมาะกับการสร้างโคนีเดียโดย species ที่อยู่ในจีเนร่า *Biscogniauxia, Daldinia, Hypoxylon* และ *Nemania* คือ malt extract agar ขณะที่กลุ่ม *Xylaria* species เจริญดีและสร้างโคนีเดียได้ดีบนอาหาร oat meal agar (Petrini and Petrini, 1985 ; Petrini and Muller, 1986 ; Callan and Rogers 1990 ; Consalez

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

and Roger, 1993) ส่วน *Kelzschmaria* species ใช้อาหารทั้ง 2 ชนิดได้ ผลจากการแยกเชื้อ endophytic จากพืช 42 ชนิดได้กลุ่มที่เส้นใยและลักษณะโคโลนีน่าจะเป็น xylariaceae อยู่ 24 กลุ่มดังนี้

1. X1. แยกได้ 7 isolates จากบุนนาค ต้นแก่ 2 isolates กล้าบุนนาค isolates และมณฑา 4 isolates

สายพันธุ์ BNMRYLWI แยกจากกล้าบุนนาคบริเวณเส้นกลางใบ จากอาหาร water agar เลี้ยงใน CM agar เส้นใยจะฟูขาวมีการสร้าง stroma จากเส้นใยเป็นเส้นยาว เจริญในอาหาร OM agar ระยะแรกเส้นใยสีขาว แก่จะเปลี่ยนเป็นสีดำ มีการสร้าง stroma จำนวนมาก สีขาวขึ้นมา (รูป 3.1 1.)

สายพันธุ์ BN2B8W2 แยกจากบุนนาค จากใบในอาหาร water agar เช่นกัน เลี้ยงใน CM agar เส้นใยบาง แต่ส่วนที่เจริญในอาหารเป็นสีดำ ลักษณะ stroma เป็นเส้นในอาหาร OM agar ระยะแรกเส้นใยสีขาวเจริญช้าปานกลาง ส่วนแก่เปลี่ยนเป็นสีเทา-ดำ มี concentric ring หยักคล้ายหัวกะหล่ำปลี สร้าง stroma ที่ส่วนโคนเป็นสีน้ำตาล ปลายมีสีขาว-เหลือง (รูป 3.1 2.)

2. X2 แยกได้ 3 isolates จากกล้า *Litsea salicifolia* 2 isolates และ ชะม่วง (*Garcinia cowa*) 1 isolates เจริญในอาหาร CM เส้นใยบางมาก เส้นใยเจริญลงในอาหารเมื่อแก่มีสีดำเข้ม (รูป 3.2)

3. X3 แยกได้ 5 isolates แยกได้จาก พยอม 1, อบเชย 2 และ มะม่วงป่า 2 ในอาหาร CM agar เส้นใยจะฟู ขาว ไม่มี stroma (รูป 3.3)

4. X4 แยกได้ 5 isolates แยกจากชา 2, กล้าบุนนาค 1, พยอม 1, บุนนาค ต้นแก่ 1 เจริญดีใน OM agar เส้นใยมีลักษณะหนาแต่ไม่ฟู สีขาว เมื่อแก่จะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีดำตรงบริเวณขอบๆ ใน CM agar เส้นใยขาว มีการเจริญของเส้นใยลงในอาหาร แก่เป็นสีน้ำตาลเข้ม ด้านล่างสีเข้ม มี zonation สีดำ สร้าง stroma ใน CM agar (รูป 3.4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. X5 แยกได้ 4 isolates แยกจากมณฑาดอย 2, บุนนาคต้นแก่ 1 และกล้าบุนนาค 1 isolate เมื่อเจริญใน OM agar ลักษณะการเจริญของโคโลนี คล้าย X4 แต่ขอบโคโลนีจะมีรอยแยกสีน้ำตาลดำ (รูป 3.5)

6. X6 แยกได้ 13 isolates แยกจาก พยอม 7, กล้าบุนนาค 3, อบเชย 1 มะขาม 1 เส้นใยในอาหาร OM agar มีสีน้ำตาลเข้มปนขาว stroma สร้างขึ้นในอาหาร stroma มีลักษณะผอมเส้นเล็ก ก้านสีดำ ปลายสีขาว เมื่อเจริญใน CM agar slant เส้นใยฟู ขาว เจริญทำให้อาหารมีสีน้ำตาลเหลือง เส้นใยแก่เปลี่ยนเป็นสีเทาอ่อน ด้านล่างสีดำ (รูป 3.6)

7. X7 แยกได้ 13 isolates : กล้าบุนนาค 2, บุนนาคต้นแก่ 2, ชา 2 ; มะกอกฟาน 1, มณฑาดอย 2, พยอม 1, ชัยพฤกษ์ 1, *Trichilla connaroides* 1, และ *Litsea salicifolia* 1 เจริญดีใน OM agar มีลวดลายของเส้นใยสีขาว พื้นมีสีเขียว เป็นวง เมื่อเจริญในอาหารชนิดอื่นจะมีลักษณะที่แตกต่างกันมาก เจริญได้น้อยในอาหาร corn meal (รูป 3.7)

8. X8 แยกได้ 13 isolates, บุนนาค 5, ชา 1, พยอม 3, จำปีดง 2, *Litsea salicifolia* 2 (รูป 3.8)

9. X9 แยกได้ 6 isolates : กล้าบุนนาค 1, มณฑาดอย 2, บุนนาคต้นแก่ 2ม, เจริญใน OM agar ส่วนแก่สีดำเข้มที่ตรงขอบๆ ส่วนใหญ่บางครั้งมีการสร้าง stroma สายพันธุ์ P26-36(3) แยกจากชัยพฤกษ์ เพาะใน OM agar เส้นใยอายุอ่อนเป็นสีโอรส เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีดำ คล้ายกำมะหยี่ มีโครงสร้างคล้าย stroma (รูป 3.9)

10. X10 แยกได้ 7 isolates แยกจากชา2, Trichilla connaroides 2, Litsea salicifolia 2, และชัยพฤกษ์ 1, เส้นใยบาง ดำเรียบ มี stroma 1-2 อัน ปลายสีขาว ในอาหาร CM agar slant เอเจริญในอาหาร OM agar เส้นใยเจริญดี ลักษณะคล้ายขนนก แก่จะเปลี่ยนเป็นสีดำ สร้าง stroma ในอาหาร โคนดำ ปลายขาว (รูป 3.10)

11. X11 แยกได้ 13 isolates จากกล้าบุนนาค 2 isolates, กล้า *Litsea salicifolia* 4 isolates จากพยอม 1 isolates, บุนนาคต้นแก่ 1 isolates, จำปีดง 1 isolates, ชา 1 isolates สายพันธุ์ P2ABR2 เจริญใน CM agar เส้นใยฟู แต่ไม่หนา สีขาว เจริญใน OM agar เส้นใยระยะอ่อนสีขาว เมื่อแก่บางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ไม่สร้าง stroma (รูป 3.11)

12. X12 แยกได้ 18 isolates แยกจาก มณฑาดอย 14 isolates, อบเชย 2 isolates, พยอม 1 isolate, ชา 1 isolate ลักษณะเมื่อเจริญในหลอด CM agar เส้นใยจะฟูเป็นคล้ายปุยสีขาว แก่จะมีสีดำด้านล่าง แต่เจริญใน OM agar มีหลายลักษณะ isolate 10STV2R2 แยกจากมณฑา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คอย เส้นใยเรียบบนผิวอาหาร ตอนอ่อนจะมีสีปลาซามอน จาง เส้นใยแก่เกิน 30 วัน จะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำ มีการสร้างกลุ่มเส้นใยเป็นตุ่มขนาดเล็กในอาหาร มีสีส้มบริเวณขอบๆ เส้นใย (รูป 3.12, 1.)

สายพันธุ์ 10TVIR ที่แยกจากมณฑาดอย เช่นกันเจริญในอาหาร OM agar จะมีลักษณะเป็นสีดำ แต่ก็สร้างส่วนกลุ่มเส้นใยคล้ายจะสร้าง stroma บริเวณขอบของเส้นใยเป็นตุ่มสีส้มเช่นกัน (รูป 3.12,2.)

สายพันธุ์ 10BV2R-1แยกจากมณฑาดอย สร้างเส้นใยฟู่ เป็นคล้ายผงแป้ง สีส้มปลาซามอน มี concentric ring เมื่อแก่เส้นใย ด้านล่างเปลี่ยนเป็นสีดำ สร้าง stroma ตรงแนว concentric ring เป็นเส้นมีปลายแหลมชูขึ้นในอากาศ โคนมีสีดำ ปลายมีสีส้ม (รูป 3.12, 3.)

13. X13 แยกได้ 2 isolates แยกจากกล้า ชะม่วง คือ4A-15R2 และ 4A-15R3 ลักษณะ เจริญในอาหาร CM agar (รูป 3.13)

14. X14 แยกได้ 4 isolates จากกล้า *Trichilla connaroides* 2 isolates และ *Litsea salicifolia* 2 isolates ลักษณะเจริญใน CM agar เส้นใยสีขาวบาง สายพันธุ์ 3B-15R1 จาก *Litsea salicifolia* เมื่อเจริญในอาหาร OM agar เส้นใยเป็นสีขาวคล้ายปุยฝ้ายหนา ไม่สร้าง stroma (รูป 3.14)

15. X15 แยกได้ 2 isolates จากพยอม 1 isolates และกล้าบุนนาค 1 isolates ตัวแทน คือสายพันธุ์ PRb1-12 แยกจากพยอม เจริญในอาหาร CM agar slant เส้นใยบางมาก ดูไม่มีการเจริญ เส้นใยสีขาว สร้าง stroma เป็นเส้นเล็กๆ เมื่อเจริญใน OM agar เส้นใยฟูหนา สีโอรส (ปลาซามอน) แก่มีโครงสร้างเป็น stroma เป็นสีเดียวกัน เส้นใยบางเช่นกัน สร้าง stroma เป็นเส้นขาว ในอาหาร OM agar เส้นใยสร้าง sector แห้งคล้ายหนัง ส่วนที่เป็นเส้นใยปกติจะมีสีเข้ม แก่จะมีสีดำและมีการสร้าง stroma บริเวณขอบๆเป็นตุ่มๆ (รูป 3.15)

16. X16 แยกได้ 3 isolates จากกล้าบุนนาค : 2 isolattes, จากมณฑาดอย 1 isolates ในอาหาร CM agar เส้นใยฟูขาว มี zone สีขาว ไม่สร้าง stroma สายพันธุ์ P2A15R1 เจริญในอาหาร OM agar สร้างเส้นใยหนาสีขาว เมื่อแก่ส่วนกลางของโคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวปนเหลือง ไม่สร้าง stroma (รูป 3.16)

17. X17 แยกได้ 8 isolates จากกล้าบุนนาค 5 isolates, พยอม 3 isolates ตัวแทนสายพันธุ์ 162 S1-3-1 แยกจากกล้าบุนนาค เจริญใน CM agar เส้นใยขาว ด้านล่างสีดำ ในอาหาร OM agar เส้นใยสีปลาซามอน เมื่อแก่บางส่วนตรงขอบๆจะมีสีดำ (รูป 3.17, 1.) สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

P2B154 แยกจากพยอมเจริญในอาหาร CM agar เส้นใยฟู ขาว แต่บาง ในอาหาร OM agar เส้นใยฟู สีโอรส ไม่สร้าง stroma (รูป 3.17, 2.)

18. X18 แยกได้ 5 isolates จากกล้าบุนนาค 4 isolates และจากชัยพฤกษ์ 1 isolate สายพันธุ์ 162S1-8 ที่แยกจากกล้าบุนนาค เจริญใน PDA agar เส้นใยสีขาว หนา แต่มีสีคล้ำด้านล่าง (ดำ) ในอาหาร OM agar เส้นใยหนาเรียบ สีขาว แก่มีสีน้ำตาล (รูป 3.18)

19. X19 แยกได้ 2 isolates จากกล้าชา isolate 20 TIVIW ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อใบระหว่างเส้นใบด้วยอาหาร water agar เจริญใน CM agar slant เส้นใยบนผิวอาหารบาง สีขาว เมื่อแก่เจริญในอาหารทำให้มีสีดำ สร้าง stroma สีน้ำตาลอ่อน ในอาหาร OM agar สร้างเส้นใยสีขาวหนา ไม่สร้าง stroma (รูป 3.18, 1.) สายพันธุ์ S169 20 TIVIW-2 แยกจากบริเวณเนื้อเยื่อใบเช่นเดียวกัน ในอาหาร CM agar slant เส้นใยสีขาวบาง แต่เจริญมากกว่าสายพันธุ์แรก สร้าง stroma โคโลนีในอาหาร OM agar เส้นใยระยะแรกสีขาว เจริญเร็ว เมื่อเต็มจาน ส่วนขอบมีสีขาว มีลายที่เกิดจากการรวมของเส้นใย ส่วนแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มปนดำมาก สร้าง stroma ที่ก้านมีสีดำ ปลายสีขาวปนน้ำตาล (รูป 3.19, 2.)

20. X20 แยกได้ 2 isolates จากบุนนาค สายพันธุ์ BN2B10R3 เจริญใน CM agar slant เส้นใยบางมาก แก่จะมีสีดำเข้ม สร้าง stroma เป็นเส้น ในอาหาร OM agar เส้นใยสีขาว เมื่อแก่ขอบโคโลนีจะมีสีเทา ไม่สร้าง stroma (รูป 3.20, 1.) สายพันธุ์ BN2B10R2 การเจริญใน CM agar slant เหมือนกับ BN2B10R3 ส่วนในอาหาร OM agar เส้นใยจะบางกว่า และมีสีเทาดำ ไม่สร้าง stroma (รูป 3.20, 2.)

21. X21 แยกได้ 2 isolates จาก พยอม 1 และ มณฑาดอย 1 isolate เจริญใน CM agar slant เส้นใยขาวฟู แก่ด้านล่างสีน้ำตาลเข้ม ไม่สร้าง stroma (รูป 3.21)

22. X22 แยกได้ 3 isolates จาก พยอม 2 isolates จากกล้าชา 1 isolate สายพันธุ์ PRb1-9-1 ที่แยกจากต้นพยอม เจริญใน CM agar slant ไม่เห็นการเจริญของเส้นใย แต่เจริญแล้วทำให้ส่วนล่างอาหารมีสีน้ำตาลเข้ม ไม่สร้าง stroma เจริญใน OM agar เส้นใยค่อนข้างบาง ลักษณะคล้ายๆปีกนก (ส่วนปลาย) เมื่อแก่เส้นใยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มปนดำ ไม่สร้าง stroma (รูป 3.22)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

23. X23 แยกได้ 3 isolates จากพยอม 2 isolates จากกล้าชา 1 isolate การเจริญในอาหาร CM agar slant เส้นใยบาง เมื่อแก่อาหารเป็นสีเหลือง เส้นใยมีการเจริญลงในอาหารมีสีดำ (รูป 3.23)

24. X24 แยกได้ 1 isolates BNIV4 จากบุนนาคต้นแก่ เจริญในอาหาร OM และ PDA ให้โคโลนีสีขาว ขอบโคโลนีคล้ายขนนก ด้านล่างจะเป็นสีส้ม (ปลาซามอล) (รูป 3.24)

**3.การเจริญของ xylaria บางชนิดในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

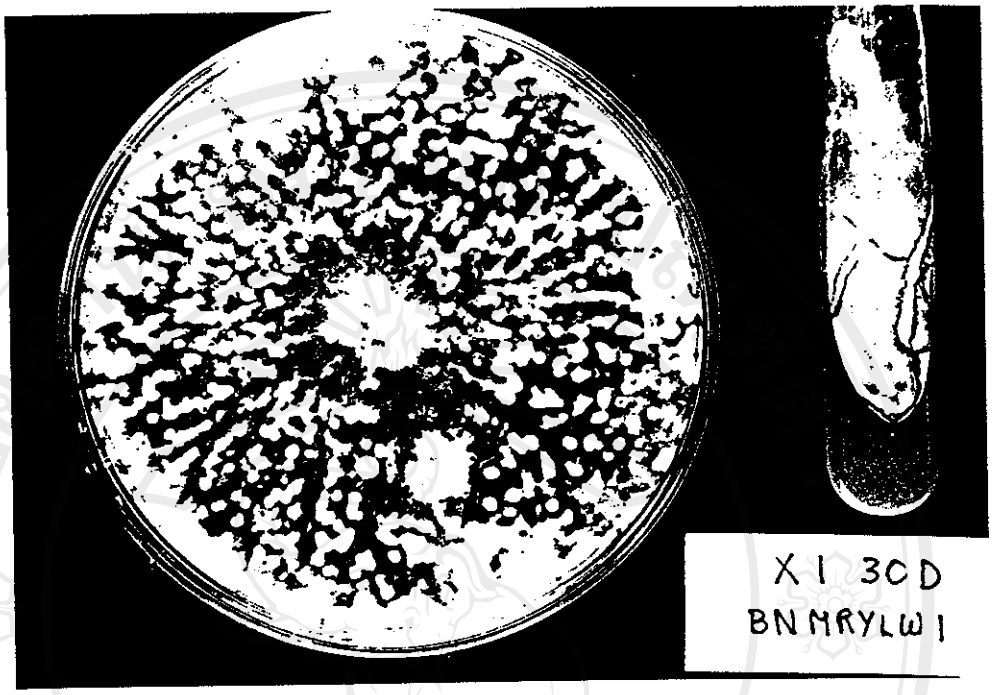
*Xylaria* sp. 20 isolates เมื่อเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหาร oat meal agar หรือ PDA พบว่าจะเจริญได้ดี และสร้าง stramata ทุก isolates แต่ stromataส่วนใหญ่ ไม่แก่ มีบางชนิดที่สร้าง conidia แต่เมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์ conidia มีลักษณะคล้ายกัน ทำให้ไม่สามารถ identified ได้

การกระตุ้นให้สร้าง teleomorph สามารถกระทำได้ โดยวิธีการที่ได้อธิบายข้างต้น (Sureewan, 1998, ติดต่อส่วนตัว ) ซึ่งต้องทำต่อจากการเพาะในอาหาร oat meal หรือ PDA ในขวดเพาะเนื้อเยื่อ โดยใส่ท่อนไม้จากกิ่งลำใย ลิ้นจี่ มะม่วง หรือพืชที่ใช้แยกเชื้อ ที่อบฆ่าเชื้อแล้วลงไป บ่มไว้ 1 เดือน ให้เส้นใยเจริญทั่วท่อนไม้ จากนั้นก็นำไปบ่มในสภาพที่มีความชื้น 1-3 เดือน ก็จะสังเกตการสร้าง freeitry body : ascocarp บนท่อนไม้ เมื่อแก่ก็สามารถตรวจสอบ ลักษณะของ ascospore ได้ บ่งบอกชนิดได้ ผลการทดลองยังไม่สำเร็จ เพราะยังต้องการเวลาในการบ่มต่อไปอีก บาง cu;ture ก็มีการปะปนโดยแบคทีเรียทำให้ต้องเริ่มการทดลองใหม่

**4. การเจริญของเส้นใยในอาหารเหลว**

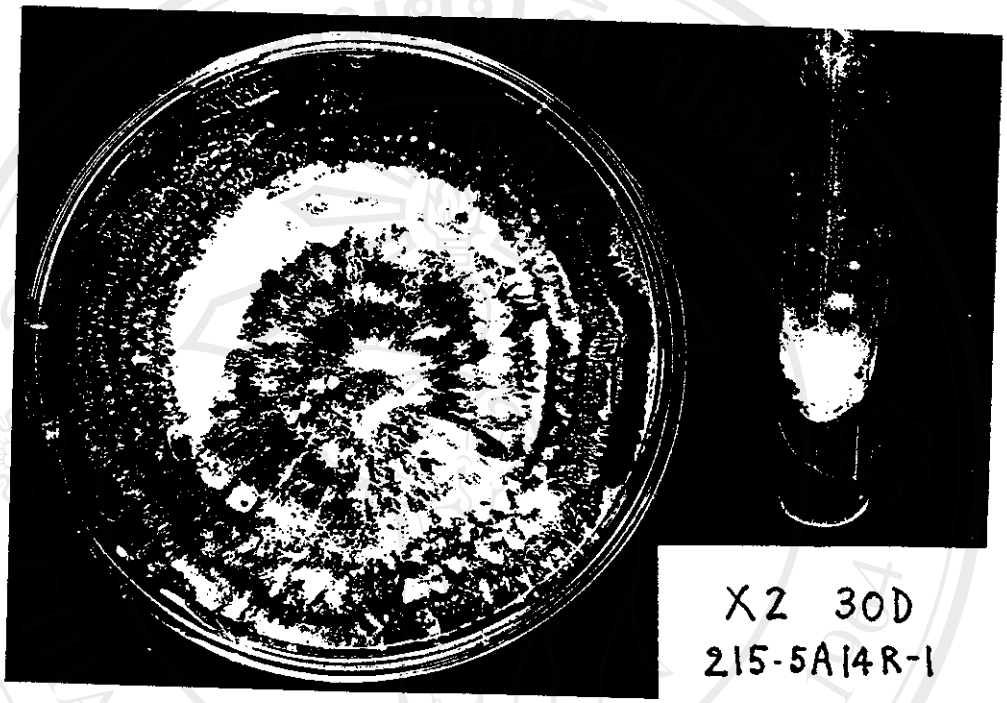
การทดลองนี้ก็เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเตรียมเส้นใยของกลุ่ม Xylasaceae เพื่อเป็น inoculum หรือเพื่อการสกัด DNA ทำการทดลองโดยใช้ตัวแทน 5 isolates พบว่าอาหาร CYM เป็นอาหารที่ xylariaceae เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้ดี แต่เนื่องจากการเตรียมยุ่งยากเพราะมีส่วนประกอบหลายชนิด การใช้ PDYA จะสะดวกกว่า เพราะความแตกต่างของน้ำหนักแห้งที่ได้ไม่ค่อยมีนัยสำคัญ (ตาราง 3.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 3.1 Xylariaceae X1 1. แยกจากบุนนาคส่วนเส้นกลางใบ 2. แยกจากส่วนใบ




รูป 3.2 Xylariaceae X2 แยกจาก *Lissea salicifolia*

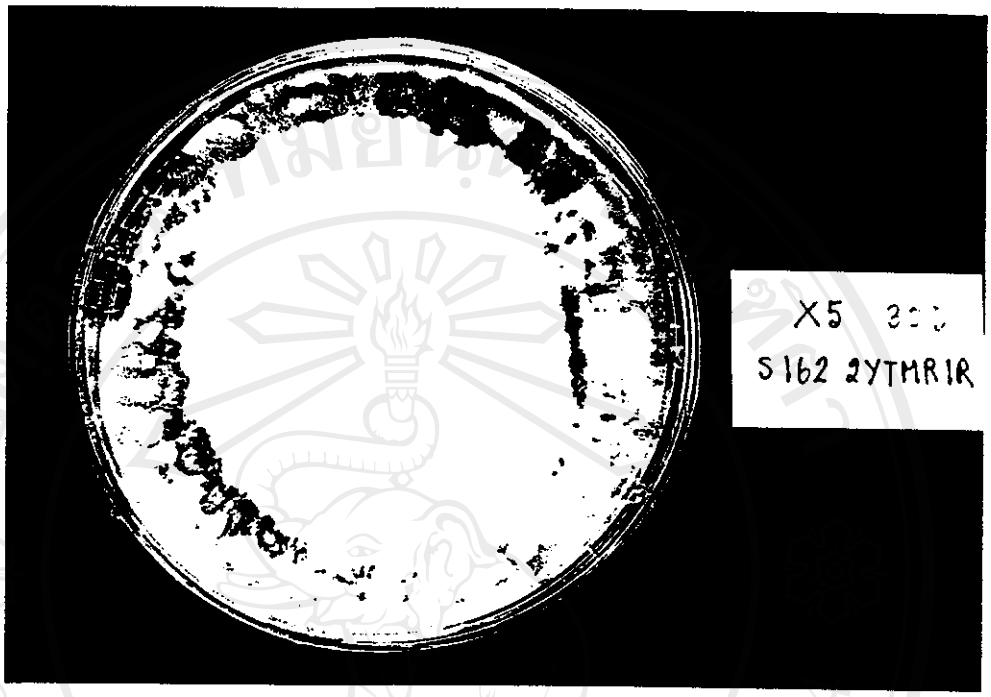
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 3.3 Xylariaceae X 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 3.4 Xylariaceae X4 แยกจากกล้า บุนนาค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

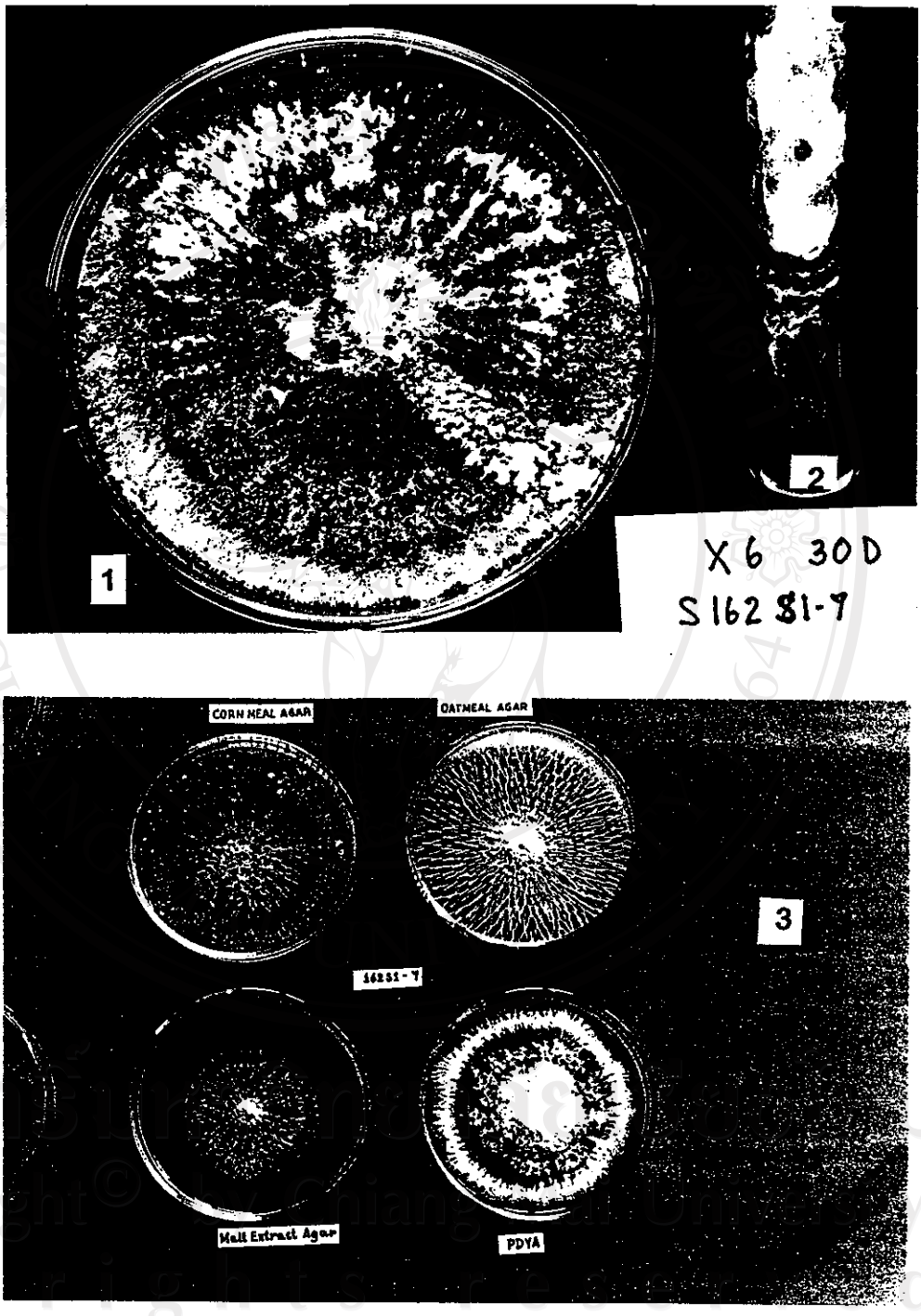



1

2

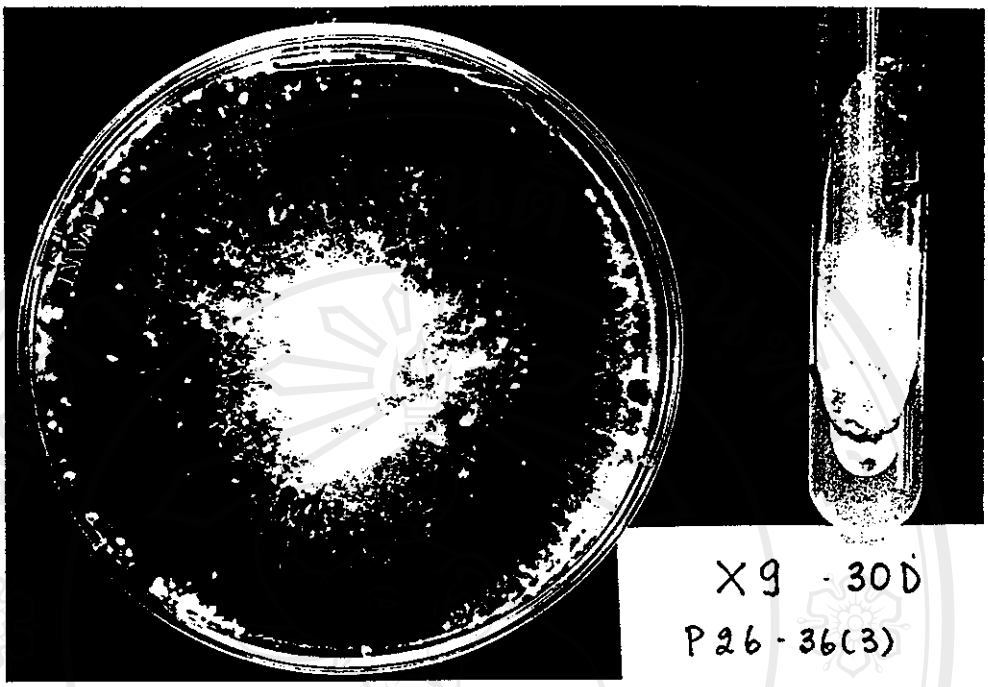
รูป 3.5 Xylariacea X5 1. แยกจากกล้าบุนนาคส่วนเส้นกลางใบอ่อน 2. มณฑาดอย
- ระหว่างเส้นใบของใบอ่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

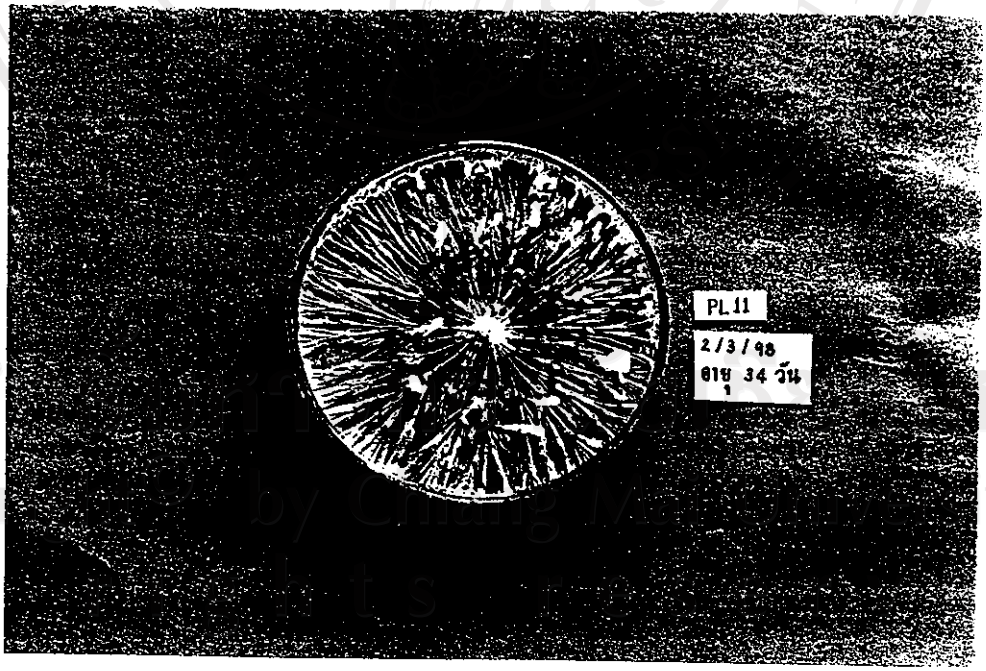



รูป 3.6 Xylariaceae X6 1. ในจานอาหาร oat meal agar 2. ใน corn mael agar slant 3. การเจริญในอาหารชนิดต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

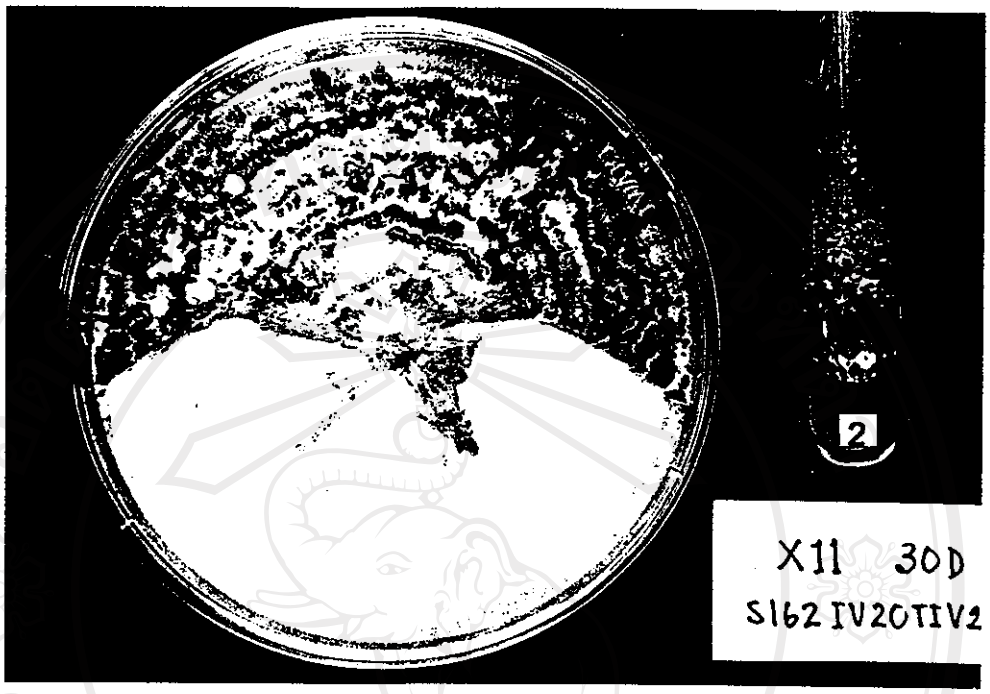



รูป 3.9 Xylariaceae X9 แยกจากชันพฤกษ์




รูป 3.10 Xylariaceae X10 แยกจากพยอม เจริญในอาหาร corn meal agar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

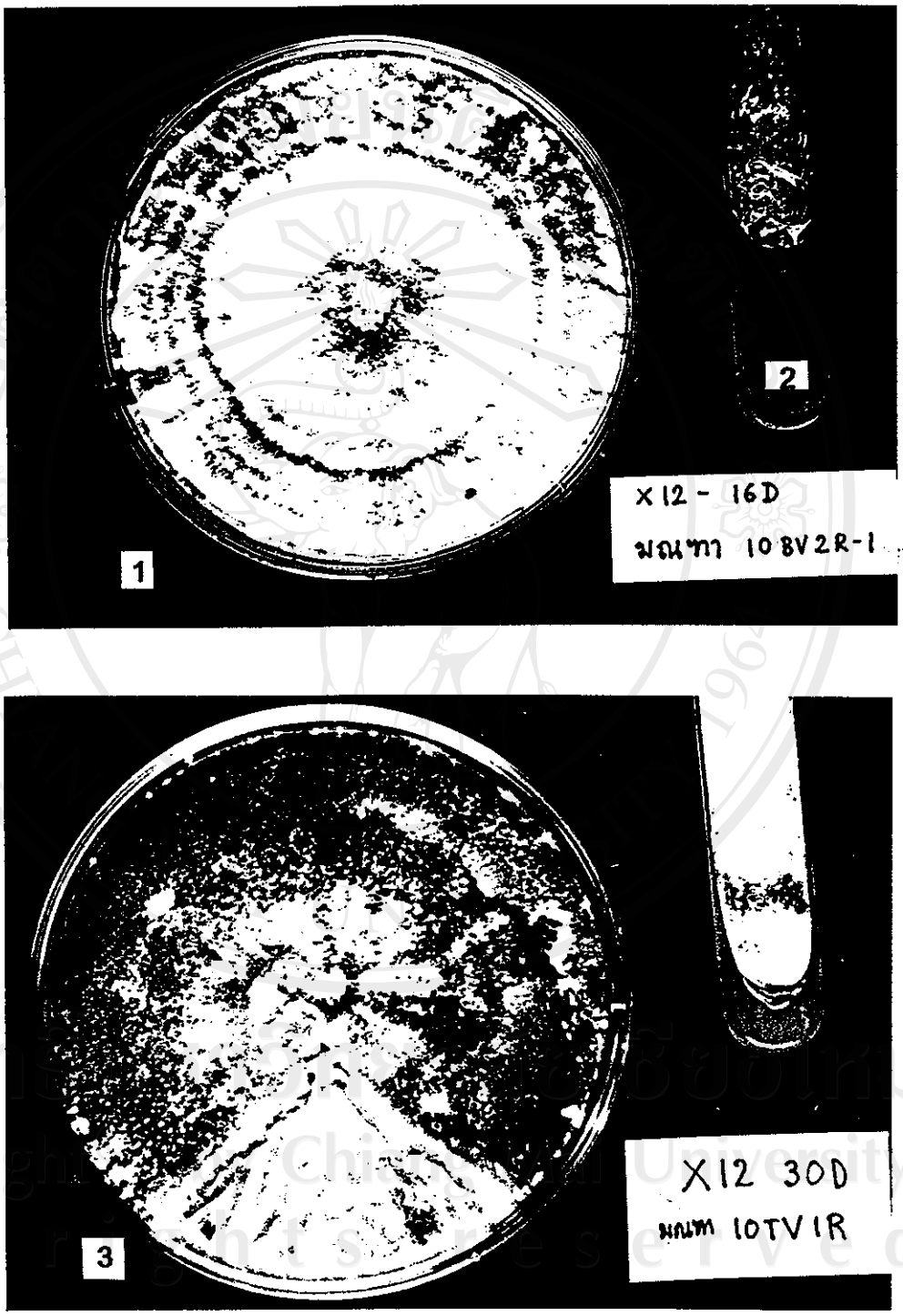



1

3

รูป 3.11 Xylariaceae X11 1. แยกจากกล้าบุนนาคในจานอาหาร oat meal agar 2. ใน
- อาหาร corn meal agar slant 3. แยกจากกล้าชาในอาหาร oat meal agar

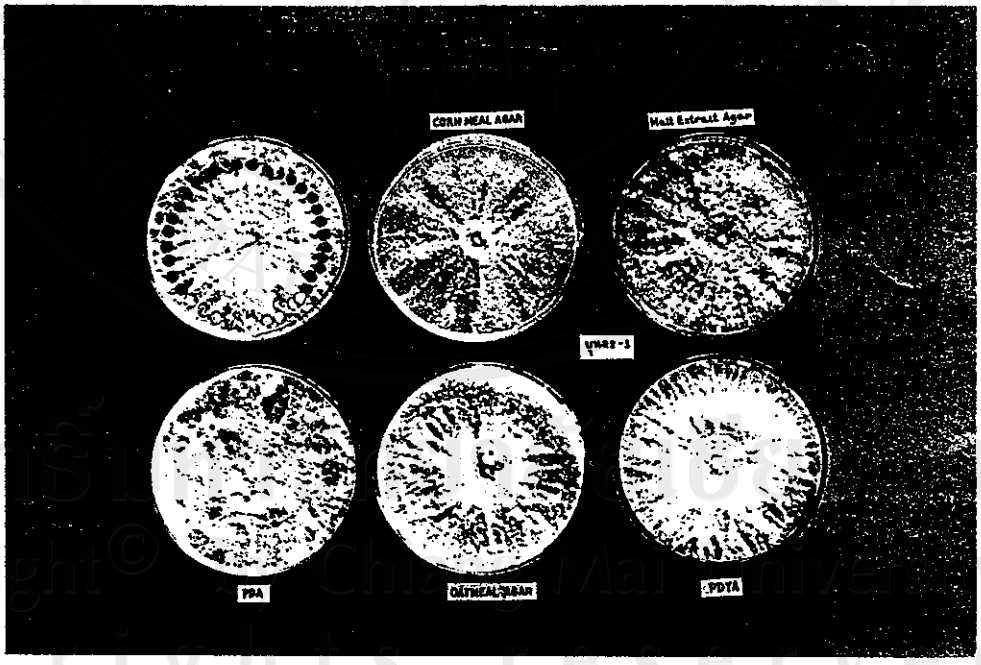
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




รูป 3.12 Xylariaceae X12 1. แยกจากมณฑาดอยส่วนใบส่วนฐาน อายุ 16 วันในอาหาร oat meal agar 2. ในอาหาร corn meal agar slant 3. แยกจากส่วนเส้นใบด้านบนใบ อายุ 30 วัน ในอาหาร oate meal agar 4. ในอาหาร corn meal agar slant

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

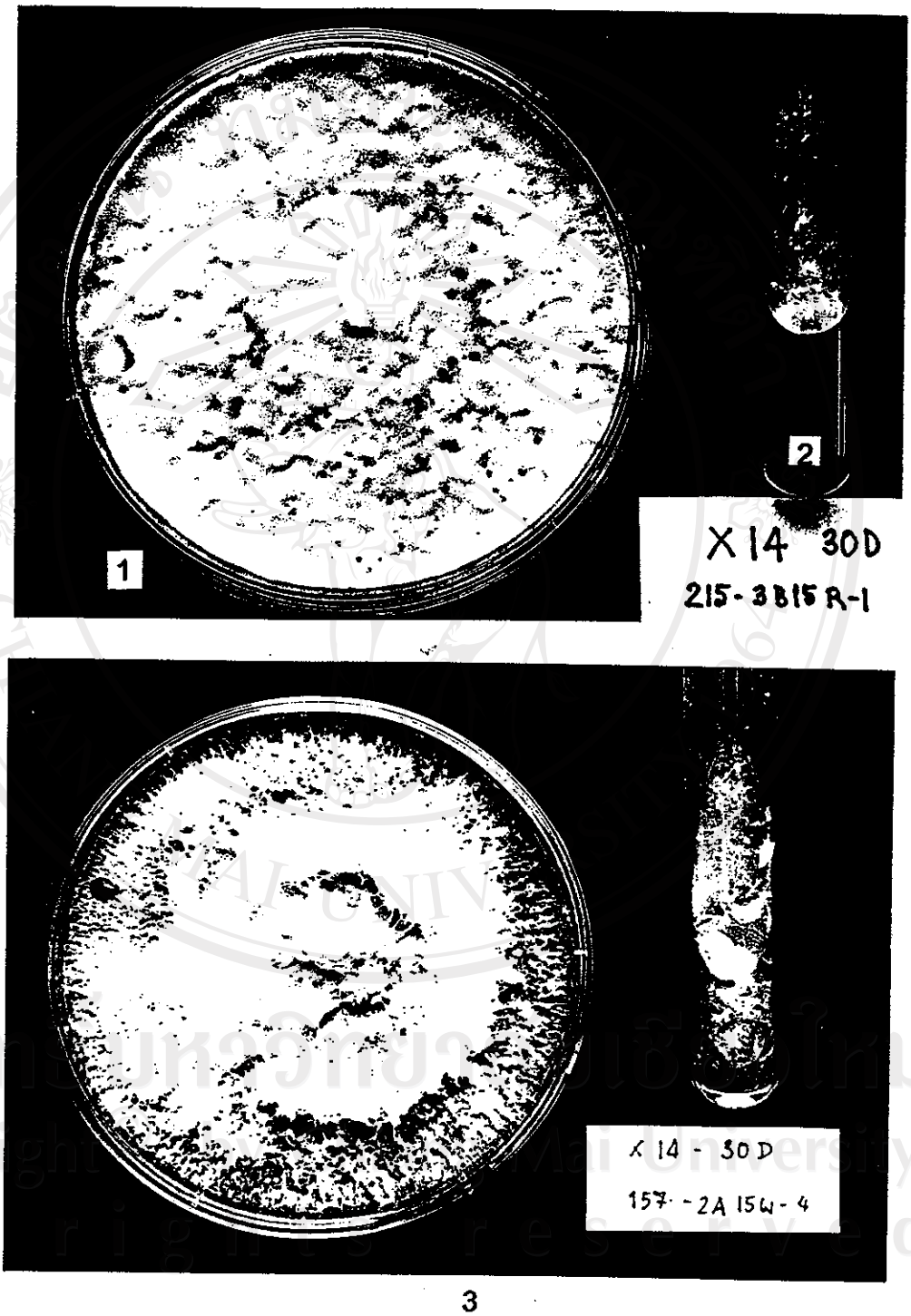
1




2

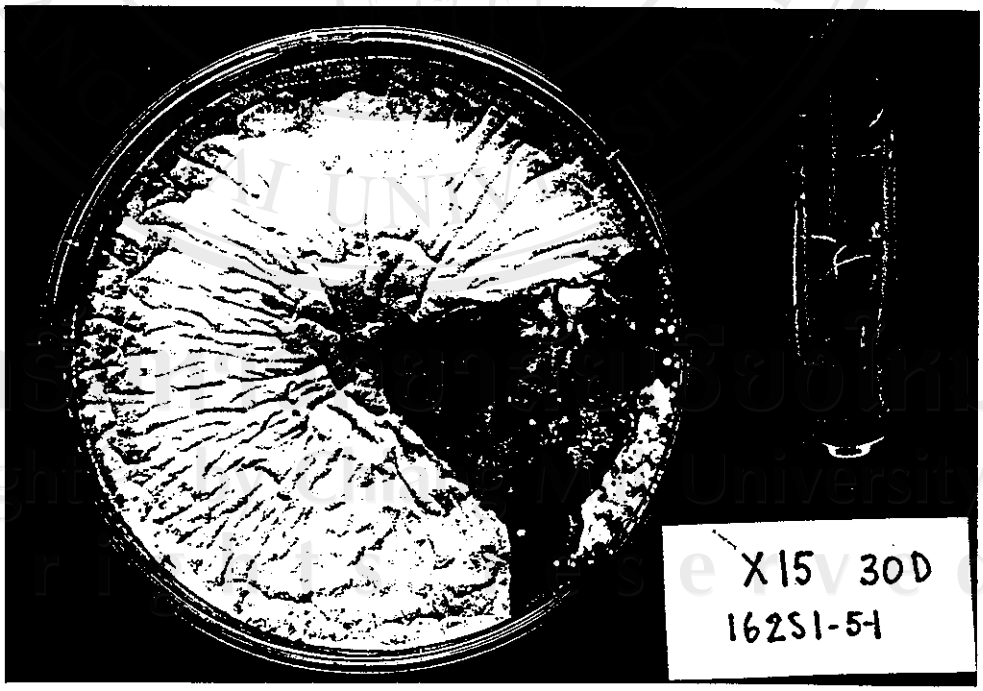
**รูป** 3.13 Xylariaceaa X13 แยกจากบุนนาค 1. ในอาหาร oat meal agar อายุ 30 วัน 2. ในอาหารชนิดต่างๆ อายุ 14 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




รูป 3.14 Xylariaceae X14 1. แยกจาก Litsea salicifolia เจริญใน oat meal agar 2. ใน อาหาร corn meal agar slant 3. แยกจาก Trichila connaroides ในอาหาร oat meal agar และ corn meal agar slant

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




รูป 3.15 Xylariacea X15 1. แยกจากพยอม ในอาหาร oat meal agar และ corn meal agar slant 2. แยกจาก กล้าบุนนาค เจริญใน oat meal agar และ corn meal agar slant

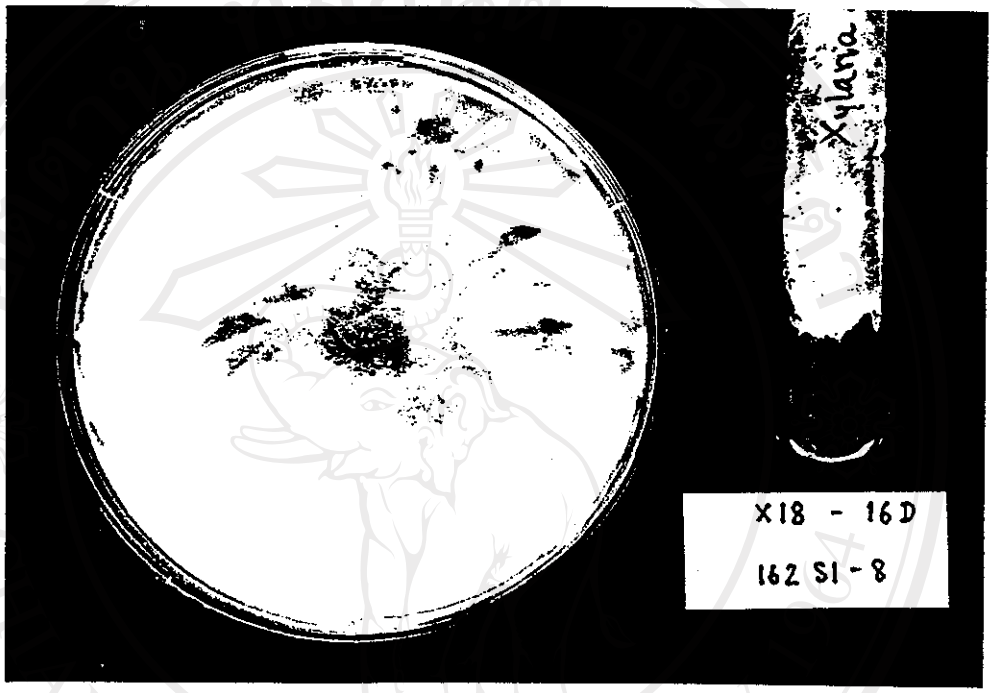
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 3.16 Xylariacea X16 แยกจากพอซอม ในอาหาร oat meal agar และ corn meal agar slant

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**รูป 3.17** Xylariaceae X17 1. แยกจาก กล้าบุนนาค เจริญใน oat meal agar และ corn meal agar slant 2. แยกจากพยอม ส่วนกน้าใบ ในอาหาร oat meal agar และ corn meal agar slant




รูป 3.18 Xylariacea X18 แยกจากกล้าบุนนาค ในอาหาร oat meal agar อายุ 16 วัน และ corn meal agar slant

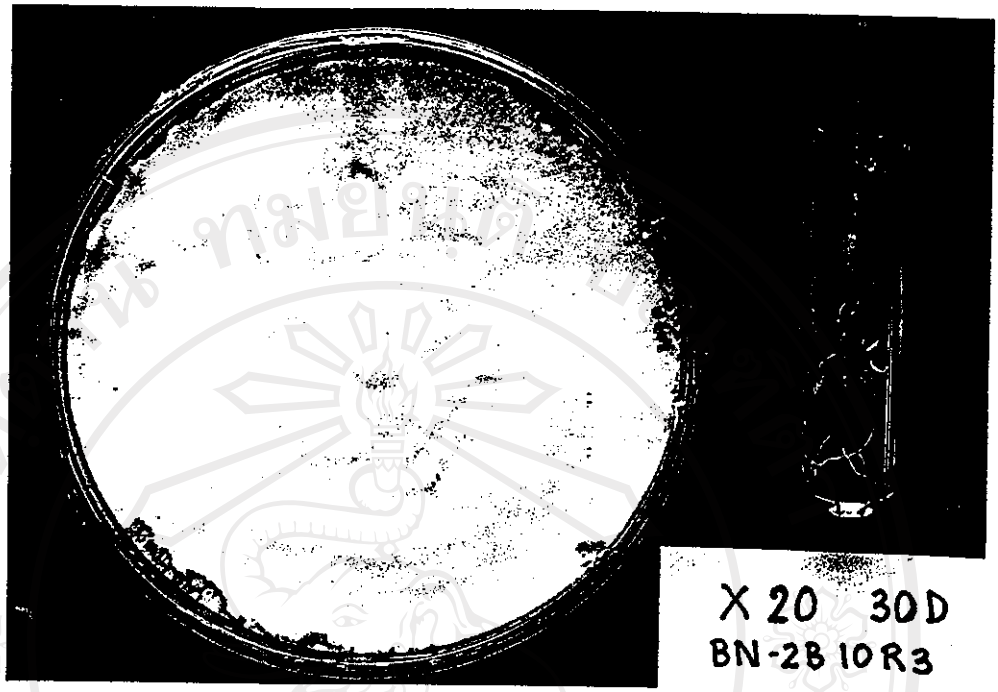
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1

2

**รูป 3.19** Xylariaceae X19 1. **สายพันธุ์** W1 **เจริญในอาหาร** oat meal agar **และ** corn meal agar slant 2. **สายพันธุ์** W2 **เจริญในอาหาร** oat meal agar **และ** corn meal agar slant

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



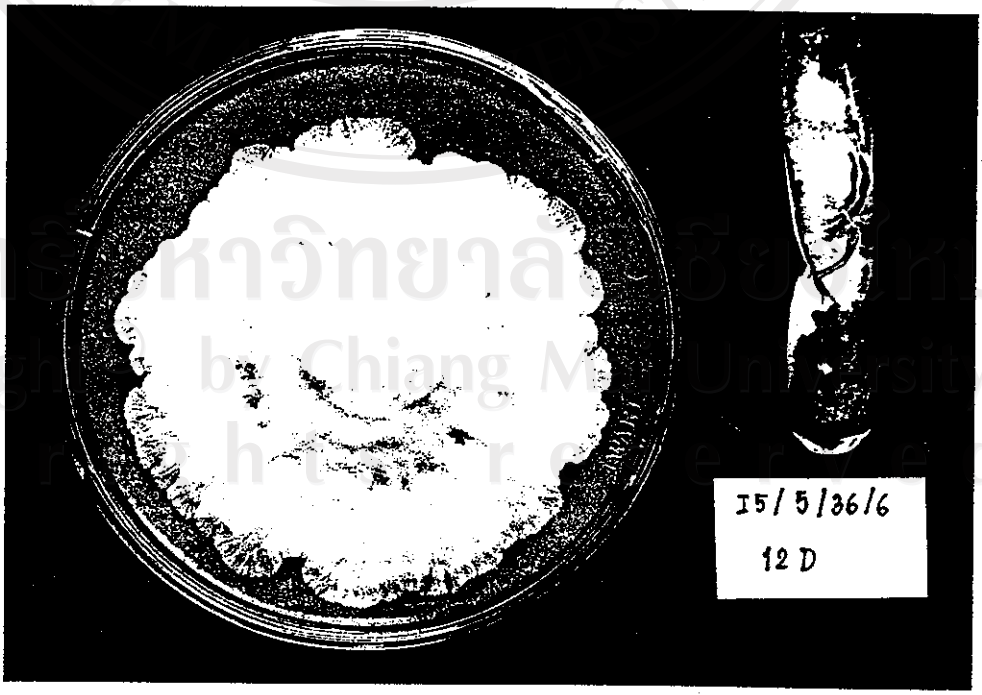

1

2

**รูป** 3.20 Xylariacea X20 1. **สายพันธุ์ R3 เจริญในอาหาร** oat meal agar และ corn meal agar slant 2. **สายพันธุ์** R2 **เจริญในอาหาร** oat meal agar และ corn meal agar slant

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 3.22 Xylariaceae X21 แยกจากพยอมแจริญในอาหาร oat meal agar และ corn meal agar slant




รูป 3.24 Xylariaceae X24 แยกจากพยอมแจริญในอาหาร oat meal agar และ corn meal agar slant

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง3.1 เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของ xylaria แต่ละไอโซเลท ที่เลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน

| Isolate | Incubation time (day) | dry weight each medium (g) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | PDYA | CYM | 2%PDB+0.2%Tween) |
| 3 | 3 | 0.12 | 0.38 | 0.17 |
| 43 | 6 | 0.16 | 0.28 | 0.10 |
| 44 | 6 | 0.02 | 0.03 | 0.02 |
| 45 | 3 | 0.17 | 0.35 | 0.13 |
| 58 | 3 | 0.07 | 0.20 | 0.06 |
| 212/4/4 | 2 | - | 0.32 | - |

การบ่งบอกชนิดของ xylariceous endopytes นั้นเป็นเรื่องยาก เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้ไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ที่จะนำไปใช้ในการบ่งบอกชนิด มีน้อยที่สร้าง teleomorph ในอาหาร การใช้ลักษณะที่เจริญในอาหารและ ลักษณะ anamorph มีความเป็นไปได้บ้าง แต่ไม่แน่นอนเท่ากับลักษณะทางพันธุกรรมหรือระดับชีวโมเลกุล (Petrini, *et. al.* 1995) ลักษณะสัณฐานและการวิคคราะห์ทางชีวเคมีอาจจะใช้บ่งบอกชนิได้อย่างน่าพอใจ (Rogrigues, *et. al.*, 1992) นอกจากนี้การใช้ secondary metabolites profile ของ endophytes isolates กับ teleomorph ที่แยกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเปรียบเทียบกันก็ได้ผลดีเช่นกัน ( Whalley and Edwards, 1995)

## เอกสารอ้างอิง

Callan, B.E. and J.D. Roger. 1990. Teleomorph – anamorph, connection and correlation in some *Xylaria* species. *Mycotaxon* 36, 343-369.

Callan, B.E. and J.D. Roger. 1993. A synoptic key to Xylaria species from continental United State and cannada based on culture and anarmorphic fatures. Mycotaxon XIVI,141-154.

Carroll, G.C. and F.E. carroll. 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. Can.J.Bot. 56, 3034-3043.

Consalez, F.S.M. and J.D. Roger. 1993. Biscogniauxia and Camillea in Mexico.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Mycotaxon 47, 229-258.

Laessoe, T. and D.J. Lodge. 1994. Three host specific Xylaria species. Mycologia 86, 436-446.

Luginbuehl, M. and E. Mueller. 1980. Endophytische pilze in den oberirdischen organen von vier grmeinsam an gleichen standerten wachsenden pflanzen (*Buxus, Hedera, Ilex, Ruscus*). *Sydowia* 33, 185-209.

Petrini, O. 1984. *Zur Verbreitung und Oekologie endophytischer Pilze.* Habilitationsschrift, ETH-Zurich, 209pp.

Petrini, O. and E. Muller. 1979. Pilziche Endophyten, am Beispiel von *Juniperus communis* L. *Sydowia* 32, 224-251.

Petrini, L.E. and E. Muller. 1986. Untersuchungen uber die Gattung *Hypoxylon* (Ascomycetes, Xylariaceae) und verwandte Pilze. *Mycologia Helvetica* 1, 501-639.

Petrini, L.E. and O. Petrini. 1985. Xylariaceous fungi as endophytes. *Sydowia* 56, 216-234.

Petrini, O., L.E. Petrini. And K.F. Rodrigues. 1995. Xylariaceous endophytes: an exercise in biodiversity. *Fitopatologia Brasileira* in press.

Rodrigues, K.F. A. Leuchtmann. And O. petrini. 1993. Endophytic species of *Xylaria*: culture and isozymic studies. *Sydowia* 45, 116-138.

Roger, J.D. 1979. The Xylariaceae: Systematic, biological and evolutionary aspects. *Mycologia* 71, 1-42.

Roger, J.D. 1985. Anamorphs of *Xylaria*: taxonomic considerations. *Sydowia* 38, 255-262.

Whalley , A.J.S. 1996. The Xylariaceous way of life. *Mycol. Res.* 100, 897-922.

Whalley, A.J.S. and R.L. Edwards. 1995. Secndary metabolites and systematic arrangement within the Xylariaceae. *Can. J. Bot.* 73 (Supplement 1), S802-S810.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# บทที่ 4

# การจัดจำแนกเชื้อราโดยวิธี Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)

วิธี Randomly Amplified Polymorphic DNA หรือ RAPD นี้ อ่าน "rapids" เป็นวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำ ที่จะทำให้ได้ข้อมูลของสิ่งมีชีวิตที่ทำการทดลอง การใช้วิธีนี้ร่วมกับเทคนิค PCRมีรายงานในการนำมาใช้เพื่อแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ของเชื้อราได้หลายระดับได้อย่างรวดเร็ว (Hadrys, *et.al.*,1992;Williams,*et.al.*, 1990; Zimand,*et.al.*,1994) โดยเฉพาะในระดับของ strain (Goodwin and Annis, 991) แต่เป็นข้อมูลที่ต้องใช้เชื้อมาตรฐานเปรียบเทียบ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ที่ตรวจสอบ การทำ PCR โดยใช้ DNA ทั้งหมดเป็น template ก็จะมีการเข้าคู่กันโดยบังเอิญ เกิดขึ้นในทางปฏิบัติ จะมีการสร้าง primer ที่มีความยาวช่วงหนึ่ง 5-10 PCR band สิ่งมีชีวิตชั้นสูง primer มีประมาณ 10 bases เมื่อนำไปตรวจสอบโดย gel electrophorysis ก็สามารถวัดขนาดได้ ใช้ primer ที่ต่างลำดับกันทำซ้ำอีก ผลที่ได้ก็จะบ่งบอกรูปแบบของแถบบน gel ว่าต่างกันมากน้อยอย่างไร ถ้าแถบใกล้กันก็จะเป็นชนิดเดียวกัน วิธีนี้เราจะไม่ทราบว่าขีนใดของแถบ PCR เป็น orginal แต่ก็หาความสัมพันธ์ได้ ซึ่งวิธีนี้ไม่ได้ขึ้นกับลำดับข้อมูลของ DNA แต่สามารถขยายรูปแบบจากจำนวน DNA ที่มีปริมาณน้อยได้ นอกจากนี้วิธีการนี้ ยังสามารถหา specific fragment ได้ก็จะทำให้หา probe ได้

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ที่จะใช้ RAPDs ในการบ่งบอกความสัมพันธ์ของ endophytic fungi ต่างจีนัสที่แยกได้จากพืช

## อุปกรณ์และวิธีการ

**เชื้อ** : เชื้อราที่เลือกเป็นตัวแทนในการศึกษาคือเชื้อรา endophytes *Fusarium* sp. แยกจากมณฑาดอย และ *Xylaria sp.* จากพยอม (*Shorea roxbugii*) เปรียบเทียบกับ *Aspergillus* ที่แยกจากดิน

ทำการเพาะเชื้อราทั้ง 3 จีนัส ในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องและเครื่องเขย่าแบบวงกลมที่ความเร็ว 160 rpm ทำการกรองเส้นใยผ่านกระดาษกรอง Whatmen No. 1. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำไปทำ freeze dry แล้วเก็บใน vial ที่ฆ่าเชื้อแล้วที่ –20°C

## สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และ Department of Life Science, Nottingham University, UK

**การเตรียม DNA**

กรดนิวคลีอิคสกัดตามวิธีของ Muller, *et.al.* (1992) นำเส้นใยแห้งของเชื้อราทั้ง 3 จีนัสมาบดให้เป็นผงใน liquid nitrogen เติม TE buffer แช่ใน ice bath 15-30 นาที สกัดด้วย phenol และ chloroform นำส่วนที่ได้มาผสมด้วย 50 µl RNAase (solution RNAase A; Sigma Chemical Co.;10 µg/ml ใน 10 ml Tris HCl pH7.5) บ่มที่ 37°C 1 ชม. สารละลายที่ได้สกัดซ้ำ 2 ครั้ง ด้วย chloroform ตกตะกอน DNA ด้วย 0.5 ml 2-propanol (ที่ -70°C ข้ามคืน) ปั่น 5 วินาทีแยกของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol, ทำให้แห้งใต้สูญญากาศและละลายใน 100 µl 10mM TE buffer

**การตรวจความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA**

นำ DNA ที่ได้มาตรวจความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ โดย run ด้วย gel electrophorysis ที่ปริมาณ 0.5 µl, 1.0 µl และ 2 µl เทียบกับ Lambda DNA ซึ่งเป็น marker ที่ความเข้มข้น 5 ng, 10 ng, 20 ng, 40 gn, 60 ng และ 100 ng ทำการ load sample ทั้งหมด 8 µl โดยผสมกับ loading buffer และน้ำ run gel นาน 1.30 ชม. ที่ 100 VC

**การ amplified DNA**

DNA amplified โดยเทคนิค RAPD-PCR(Williams, *et.al.*, 1990) ซึ่งการ amplified จะทำใน DNA thermal cycle (Hybrid) ใช้ block control เตรียมปฏิกิริยา amplification PCR/RAPD Mix ใน 50 µl โดยมีส่วนผสมคือ 1 tube eppendoff ดังตาราง

| ส่วนผสม | µl |
|---|---|
| น้ำกลั่น | 42.1 |
| PCR buffer (10x) | 5.0 |
| Primer (50µlmo)each | 0.2 |
| 25 mMdNTP | 0.2 |
| Dynazyme (2U/µl) | 0.5 |
| รวม | 48µl |

Primer ที่ใช้ มี 3 ชนิดคือ A02 = (5′T G C C G A G C T G –3′) A17 = (5′G A C C G C T T G T –3′) และ A20 (5′G T T G C G A T C C –3′) เติม DNA ตัวอย่างลงในหลอด หลอดละ 2 µl (DNA เข้มข้น 10-20 ng ใน TE buffer 10 mMTris pH 7.4 และ 0.1mM EDTA pH 8.0) ส่วนผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

EDTA pH 8.0) ส่วนผสมทั้งหมดทำที่อุณหภูมิห้องแล้วปิดทับด้วย light minerol oil 2 หยด (สำหรับ PCR) เพื่อกันการระเหยก่อน thermal cycling การ amplified จะ run ใน DNA thermal cycle ใช้ block control โปรแกรมที่ตั้งคือ heat ตัวอย่างเพื่อ denature ที่ 94°C 4 นาที แล้วตามด้วย 45 cycle ของการ denature 94°C 2 นาที, annealing (50°C 2 นาที) และ extension (72°C, 2 นาที) สุดท้าย extension ที่ 72°C 10 นาที ทำการวิเคราะห์ PCR-products โดย gel electrophorysis 1.5% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer (45mM Tris base, 45mM boric acid, 1 mMEDTA pH 8.0) เทียบกับ DNA marker 1 kb. แถบ DNA ย้อมใน 0.5 µl ethidium bromide ตรวจโดยใช้แสง UV และถ่ายภาพโดยใช้ Polaroid MP-4 Land Camera และ ฟิลม์ 667

**ผลการทดลองและวิจารณ์**

จากการ run gel เทียบกับ marker พบว่า DNA ของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด นั้น เตรียมได้ไม่ค่อยดี (ภาพ 1) มีการสลายไปมาก ความเข้มข้นที่ได้ของเชื้อ *Fusarium sp.*(A) ประมาณ 10 ng. เชื้อ *Xylaria sp.*(B) และ *Aspergillus sp.*[C] เตรียมได้ DNA เข้มข้นประมาณ 5 ng. สาเหตุที่ DNA มีการสลายตัวเนื่องจากการทำการศึกษาครั้งนี้ได้นำไปทำที่ประเทศอังกฤษ ณ ห้องปฏิบัติการของ Prof. J. F. Peberdy ที่มหาวิทยลัย Nottingham เส้นใยที่ทำการ freeze dried ไปนั้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเกินไป ปกติต้องเก็บที่ -80°C หรือ -20°C ก่อนนำมาสกัด แสดงว่าการสกัดวิธีนี้ก็ได้ผลดี

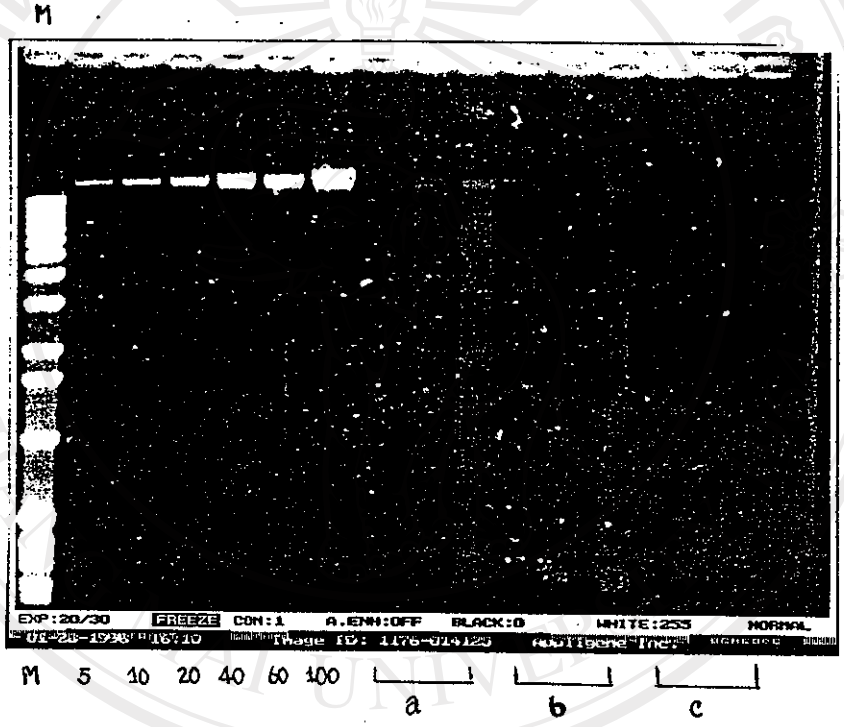
การวิเคราะห์ RAPD ของเชื้อรา 3 จีนัส แสดงความแตกต่างกันชัดเจน จาก primer 3 ชนิดที่ใช้ให้ลักษณะลายพิมพ์นิ้วมือ (ภาพ 2) จากผลการวิเคราะห์ RAPD ผลที่ปรากฏ DNA จะมีหลายแบบเกินไป อาจเนื่องมาจาก Primer ที่ใช้คือ A02 และ A17 เก่าเกินไป ดูได้จาก product ที่อยู่ในน้ำมีหลายแบน แสดงว่ามีการปะปนมาก ส่วน primer A20 นี้ ใช้ได้ดีสังเกตเชื้อ A, B และ C ต่างกันอย่างชัดเจน *Xylaria* sp. ถ้าใช้วิธีนี้ในการแยกความแตกต่างระหว่าง species ก็น่าจะได้ผลดี และอ่านผลได้รวดเร็ว แต่การจะบ่งบอกถึงชนิดนั้นจะต้องมี standard คือ *Xylaria* spp.ที่ทราบ species แล้ว นำเปรียบเทียบส่วน *Fusarium* sp.เนื่องจาก primer ที่ใช้ไม่ใช่ primer จำเพาะ ถ้าจะใช้ในการแยกความแตกต่างจะไม่ค่อยได้ผลดี อย่างไรก็ตามเชื้อในกลุ่ม *Fusarium* มีนักวิจัยหลายคนที่ศึกษาและทราบ primer ที่จำเพาะ ซึ่งจะแยกความแตกต่างได้ดี รวมทั้งบ่งบอกชนิดได้แม่นยำและรวดเร็วกว่าวิธี conventional เพราะ microconidia และ macroconidia ของแต่ละ species ค่อนข้างจะดูความแตกต่างได้ยาก

เชื้อจีนัส *Aspergillus* ก็เช่นกัน primar ทั้ง 3 ชนิด แยกความแตกต่างไม่ชัดเจน คงต้องใช้ primer ที่จำเพาะกว่านี้ เพราะกลุ่มของ base ยังไม่แยกกันชัดเจน

วิธีการนี้จะมีประโยชน์มากขึ้นถ้าสามารถแสดงให้เห็นได้ว่า RAPD-PCR profiles จะ consistent เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของ parameter หลายตัวคือ จำเป็นต้องทดสอบให้เห็น consistency ใน (1) reaction tube 2 tubes ที่ทำขึ้นโดยวิธีการอย่างเดียวกัน (2) reaction tube ที่มี

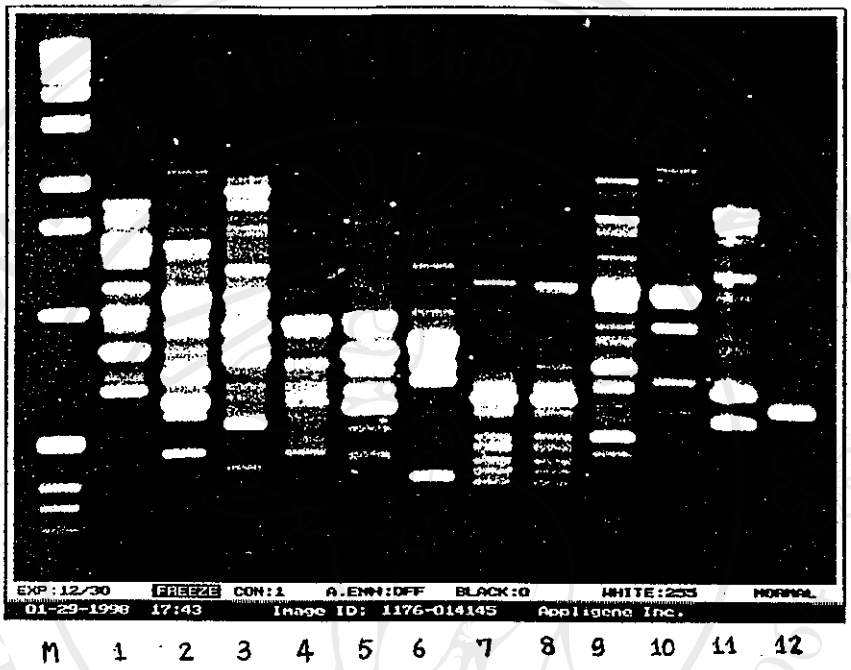
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

template ต่างกัน (3) ปฏิกิริยาการใช้ template ที่เตรียมโดยวิธีการสกัดที่ต่างกัน และต้องแสดงให้เห็นว่า (4) ปฏิกิริยา RAPD-PCR ที่ไม่มี template ก็จะไม่มี band เกิดขึ้น ด้วยวิธีดังกล่าว RAPD-PCR profile ที่ได้จะขึ้นอยู่กับ fungal isolate เท่านั้น ไม่ใช่ผันแปรเพราะ (1) ความบังเอิญ (2) ความเข้มข้นของ template (3) วิธีการสกัดกรดนิวคลีอิค หรือ (4) การปะปนของ DNA จากภายนอก (Leal, *et.al.*, 1994)




ภาพ 1 gel electrophorpis เพื่อตรวจความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดจากเส้นใยของเชื้อ *Fusarium* (a), *Xylaria* (b) และ *Aspergillus* (c) เทียบกับ DNA marker (1 kb) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20,40, 60 และ 100 gn.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




ภาพ 2 RAPD fingerprint band pattern ของเชื้อรา 3 จีนัส *Fusarium* sp., *Xylaria* sp.และ *Aspergillus* sp. หลังทำ PCR ด้วย 3 primers DNA lambda ใช้เป็นมาตรฐานของขนาดโมเลกุล (M) 1,2,3 เป็น product ของ PCR จากเชื้อ *Fusarium* sp. ที่ใช้ Primer A02 (1), A17(2) และ A20(3), 4 = PCR reaction น้ำ 5,6,7 เป็น product ของ *Xylaria* sp.จาก primer A02(5), A17 (6), A20(7) ; 8 PCR reaction + น้ำกลั่น 9,10,11 เป็น PCR product จาก *Aspergillus* sp. จาก primer A02(9) A17(10) และ A20(11) ; 12 = PCR reaction + น้ำกลั่น

**สรุป**

วิธี RAPD นี้ น่าจะใช้ได้ในการแยกความแตกต่างกันในกลุ่มของ *Xylaria* sp. ซึ่งต้องมีการทดสอบต่อไป ส่วนการใช้แยกความแตกต่างในกลุ่มของ endophytic fungi นั้น ในราที่เป็นกลุ่ม mycelia sterilia จะใช้ได้ดีในการแยกระหว่างเชื้อที่มีเส้นใยแตกต่างกันว่าต่างกันจริงหรือไม่ รวมทั้ง *Fusarium* spp. ซึ่งลักษณะต่างกันแต่บางครั้งก็จะเป็นชนิดเดียวกัน สามารถยืนยันได้ด้วยวิธี RAPD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## เอกสารอ้างอิง


1. Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1:55-63.
2. Goodwin, P.J. and Annis, S.L. 1991. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptoshearia maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Apply Environmental Microbiology* 57: 2482-2486.
3. Leal, S.C.M., Bertioli, D.J., Butt, T.M. and Peberdy, J.F. 1994. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Mertarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. *Mycological Research* 98: 1077-1081.
4. Moller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H. and Geiger, H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruiting bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20: 6115-6116.
5. Williams, J.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
6. Zimand,G., Valinsky, L., Elad, Y., Chet, I. and Manulis, S. 1994. Use of the RAPD precedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycological Research* 98:531-534.


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# บทที่ 5

## การบ่งบอกชนิดของราที่เป็น unknown โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

ในการเปรียบเทียบหรือหาความสัมพันธ์ของ Phylogenetic ในแบคทีเรียและยูคาริโอท การเปรียบเทียบโดยใช้ลำดับของ rRNA (rDNA) เป็นวิธีการที่มีประโยชน์ที่สุด (Woose, 1987) ซึ่งในการวิเคราะห์ลำดับของ DNA จำเป็นต้องมีการเพิ่มจำนวน (amplified) ลำดับเบสโดยปฏิกิริยา polymerase chain (PCR) เนื่องจากวิธีการนี้สามารถเพิ่มลำดับ DNA ที่บริเวณจำเพาะเจาะจงโดยใช้ primers ที่เข้าคู่กัน (Medlin, *et al*, 1988) ซึ่งคู่ของ primers ดังกล่าวเป็นสิ่งจำเป็นในการเพิ่มจำนวน ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบเพื่อนำเอาวิธีการหาลำดับของ 18S ribosomal RNA ในรา 3 ชนิดที่อยู่ในระยะที่ไม่มีการสร้างโครงสร้างในการสืบพันธุ์ ซึ่งทำให้การบ่งบอกชนิดของเชื้อราทำไม่ได้ เชื้อรา endophytes ที่แยกได้จากต้นพืช 50% จะเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างโครงสร้างในการสืบพันธุ์ วิธีนี้มีรายงานที่ทำกับราต่างๆหลายชนิด ซึ่งก็น่าจะใช้ได้ดีกับกลุ่มของ endophytic fungi เช่นกัน จึงได้ศึกษากับรา endophytes 3 isolates เพื่อหาลำดับของ 18S ribosonal DNA และจัด phylogenetic ของแต่ละ isolates ที่รายงานในที่นี้จะศึกษาสัณฐานของเชื้อรา endophytes –3 isolates ประกอบ รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่แสดงถึง Phylogenic tree ของรา *Guignardia* sp.โดยใช้ลำดับเบส 18S rDNA ราชนิดนี้มีกระจายในพืชหลายชนิดทั้งในประเทศไทย (บทที่ 1 และ 2)และเขตอบอุ่นเช่นญี่ปุ่นที่มีรายงานการแยก *Guignardia* sp. ที่เป็น endophyte จาก Rhododendron (Okane, 1997)

### อุปกรณ์และวิธีการ

***Fungal strain*** : รา endophytes 3 isoates คือ MK3 ที่แยกได้จากบุนนาค อบเชย และ *Tricilla connaroides* รา P2A12W แยกจากพยอมและเชื้อ BN2B8R1 แยกจากบุนนาค เชื้อทั้ง 3 isolates เก็บใน PDA slant ที่ 25°C

เพาะเชื้อราทั้ง 3 isolates ใน potato dextrose broth ที่ 28°C เป็นเวลา 3 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที เก็บเส้นใยโดยการเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 8000 rpm ล้างเส้นใยด้วย TEN buffer (Tris HCl + EDTA + NaCl) นำไป freeze dried เส้นใยที่ผ่าน freezed dried จะนำบดเป็นผงในโกร่งที่ฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่ง DNA ทั้งหมดจะถูกสกัดจากเส้นใยเมื่อเติมส่วนผสมของ phenol และ chloroform และ RNase A ลงไปตามวิธีการดัดแปลงที่อธิบายโดย Reader, *et al.* (1985) ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ DNA โดย gel electrophoysis (10 μg/ml) และ spectrophotometer ที่ OD260nm ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**การ amplified 18S rDNa โดยวิธี PCR ใช้ primer 4 ตัว**

Priner ที่ใช้จะเป็น Priner รวมที่อ่าน forward และ roverse โดยใช้ อัตราส่วนของ primer9ต่อ DNA เป็น 50 : 1 primer ดังกล่าวที่ใช้คือ

NS1 + NS8, NS1 + NS6 และ NS5 + NS8

NS1 คือ GTAGTCATATGCTTGTCTC

NS5 คือ AACTTAAAGGAATTGACGGAAG

NS6 คือ GCATCACAGGTTCACCTACGGA

NS8 คือ TCGGCAGGTTCACCTACGGA

NS1 + NS8 จับเบสบน 18S rDNA ที่ความยาวประมาณ 1300 bp, NS1+NS6 จับเบสที่ความยาวประมาณ 860 bp ส่วน NS5+NS8 จับเบสที่ความยาวประมาณ 600 bp

ปฏิกิริยาPCR จะทำในเครื่อง PCR ( Phamacia) โดยเริ่มdenature DNA สายคู่ที่ 95°C 3 นาที และทำปฏิกิริยาซ้ำ 35 cycle (จะทำให้ได้ product ที่เป็น single-stranded โดย denatureที่ 95°C 30 วินาที annealing 53°C 30 วินาที, extension ที่ 72°C 2 นาที หลังการ cycling บ่มที่ 72°C 10 นาที เพื่อให้เกิด elongation สมบูรณ์ PCR products (3 μl ของ 50 μl) ตรวจบน agarose gel electrophoresis (1.5% agarose) run นาน 30 นาที แล้วนำไปแช่ใน ethidium bromide 30 นาที และล้างในน้ำ 15 นาที ก่อนถ่ายภาพใต้แสง UV

**การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์**

ทำให้ PCR products ที่ได้ให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลั่ม Microspin S300 HR column S (Phamacia Biotech) และตกตะกอนโดยการเติม 1/10 volumn ของ 5M sodium acetate ตามด้วย 2.5 volum ของ 100% ethanol และบ่มที่ -80°C 30 นาที ตะกอนของ nucleic acid เก็บโดย centrifuge ที่ 15,000 รอบ/นาที 30 นาที 4°C ล้างตะกอนด้วย 1 ml 70% ethanol ปั่น 10 นาที และทำให้แห้งใต้สูญญากาศ ละลายตะกอนด้วย 20 μl TE buffer เมื่อต้องการใช้

**การทำ sequence ของ 18SrDNA**

ทำการ sequence DNA ที่ amplified แล้ว โดยใช้ Thermo Seuquenase core sequencing kit กับ 7-deaza-d GTP (Phamacia Biotech) ใช้ NS1, NS3, NS5, NS6 และ NS8 dyed เป็น priner ( White, *et. Al.*, 1990)

NS1 5′GTAGTCATATGCTTGTCTC 3′ ให้ product ขนาด 555bp

NS3 5′GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC 3′ ให้ product ขนาด 597 bp

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NS5 5′ AACTAAAGGAATTGACGGAAG 3′ ให้ product ขนาด 310 bp

NS6 5′ AACTTAAAGGAATTGACGGAAG 3′ ให้ product ขนาด 310bp

NS8 5′ TCCGCAGGTTCACCTACGGA 3′ ให้ product ขนาด 377 bp

หลังผสม นำไป amplified ใน PCR machine โดยใช้อุณหภูมิเป็นลำดับคือ denature ที่95°C 30 วินาที, annealing ที่ 55°C 30 วินาที และ extension ที่ 72°C 1 นาที เป็นจำนวน 25 cycles จากนั้น นำไปหาลำดับโดยใช้ ALF Fexpress DNA Sequencer Electropholysis System โดย set condition ตามที่กำหนดไว้ (Phamacia Biotech)

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

ลำดับเบสของ 18s rDNA ของรา endophytes ที่นำมาสกัด DNA และ sequence แล้วนำไป align โดยใช้ Genetyx-Mac 9.0 program เทียบกับข้อมูลของ 18S rDNA ที่มีตีพิมพ์ไว้ใน database ของ Genbank, dna และ EMBL การตรวจหา phylogenetic จะใช้ Bootstrap method (PHVLIP)

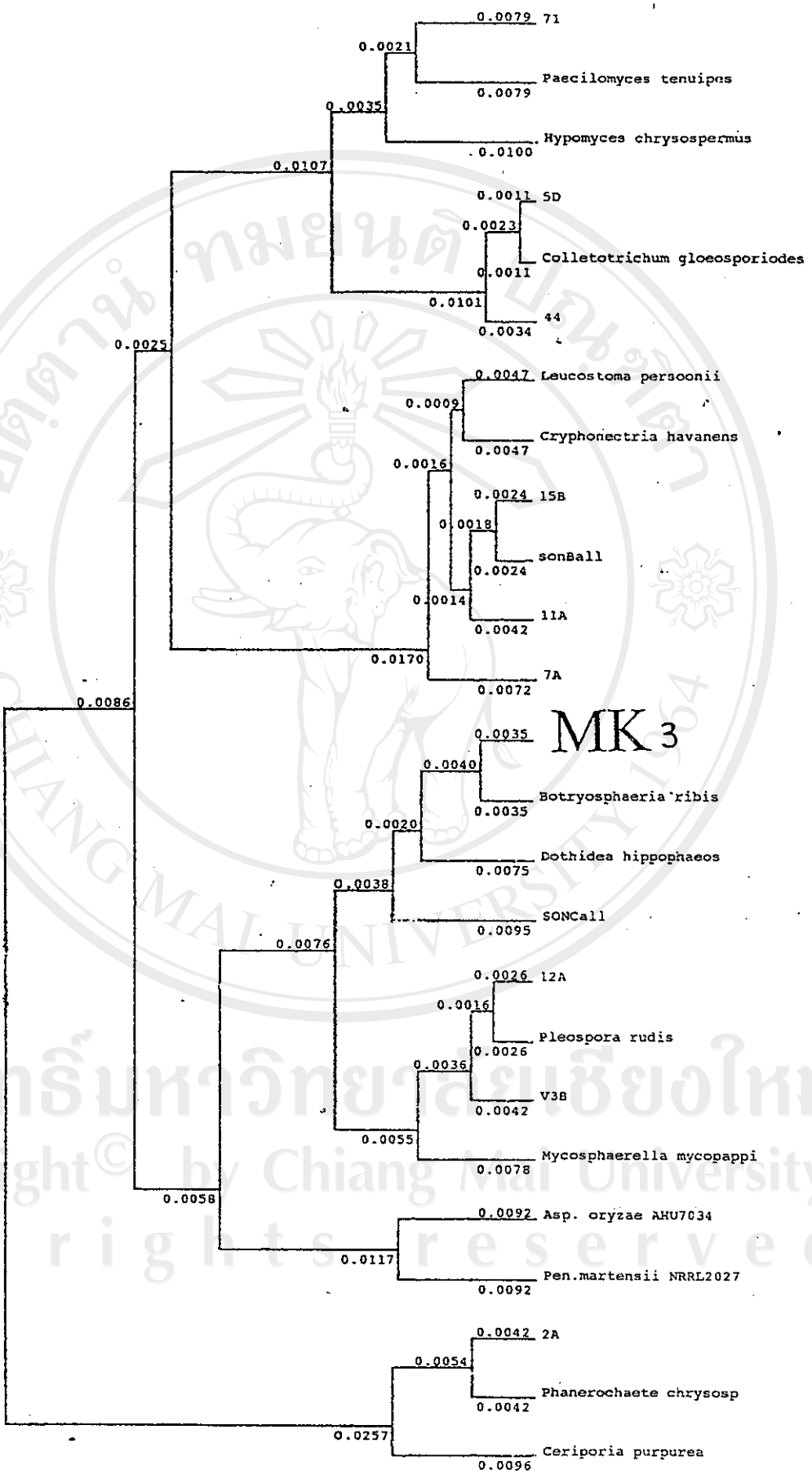
**ผลการทดลองและวิจารณ์**

การสกัด DNA จากราเอนโดไพท์ทั้ง 3 ชนิด ได้จำนวน DNA พอเพียงและบริสุทธิ์ (รูป 5.1) การใช้ primer ดังกล่าวก็ให้ PCR products ที่พอเพียงในแต่ละกลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ (รูป 5.2) แต่ลำดับ base ที่มีคุณภาพสูงทั้ง 2 สาย ได้จากการ amplified 18S rDNA coding region จากเพียง 2 isolates คือ *Guignardia* sp. MK3 และ P2A12W ลำดับเบสของ MK3 (1731 bases) มีระดับความเหมือนกับลำดับเบสของ *Botryosphaeria ribis* 18S rRNA ต่างไป 19 นิวคลีโอไทด์ (ระดับความเหมือน 98.715%) ซึ่งสร้าง Phylogenetic tree ได้ดังรูป 5.3 แสดงถึงวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน

ผลที่ได้นี้เปรียบเทียบจากวิธี conventional ที่อาศัยลักษณะสัณฐานของเชื้อโดยดูลักษณะทั้ง anamorph และ telemorph ของเชื้อที่พบว่าสร้างทั้ง 2 stage ในอาหาร corn meal agar ซึ่งจากการศึกษาลักษณะก็บ่งบอกชนิดว่าเป็น *Guignardia* sp. (telemorph) และมี *Phyllostricta* sp. เป็น anamorph ซึ่งจีนัสนี้ก็ใกล้เคียงกันมาก เพียงแต่ *Botryospheria* (telemorph) จะมีระยะ anamorph เป็น *Brotryodiplodia* สาเหตุนี้มีความแตกต่างกันนี้ก็อาจเนื่องจากว่ามีวิวัฒนาการตอนเริ่มต้นเหมือนกันจากนั้นจะค่อยๆต่างกันในภายหลัง ทั้งนี้จาก data base ที่มีอยู่ยังไม่มีมีการบันทึก sequence DNA ของจีนัส *Guignardia* sp. ไว้จึงทำให้บ่งบอกชนิดได้ใกล้เคียงเท่านั้น

เชื้อ P2A12W นั้น เป็นเชื้อที่แม้จะทิ้งไว้นาน 3 เดือน ก็ยังไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ใดๆ จนเดือนที่ 4 ก็มีการสร้างระยะ anamorph ขึ้น ลักษณะเป็นเส้ยวพระจันทร์ บ่งบอกชนิดว่าเป็น *Selenophorma* sp. ซึ่งจากการหาลำดับของเบสใน 18S rDNA พบว่ามีวิวัฒนาการมาใกล้เคียงกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved




รูป 5.3 Phylogenetic rank of Guignardia sp MK3 ( MK3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

species : *Lasioderma serricorne* ซึ่งเป็นระยะ telemorph โดยมีลำดับเบส 1580 base มีระดับความเหมือน 97.063% มีส่วนต่างกัน 42 นิวคลีโอไทด์

อย่างไรก็ตาม ความถูกต้องคงต้องมีการทำซ้ำอีกเนื่องจากการทดลองนี้ ได้ทำเพียงครั้งเดียว นอกจากนี้อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้มีราคาแพงมาก ซึ่งเป็นปัญหาหลักของการใช้วิธีการนี้ในการบ่งบอกชนิดถึงระดับ species

## เอกสารอ้างอิง


Medlin, LH., J. Elwood, S. Stickel and M.L. Sogin . 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding region. Gene. 71: 491-499.

Okane, I., A. Nakagiri and T. Ito. 1998. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. *Can. J. Bot.* 76, 657-663.

Reader, U. and broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1:17-20.

White, T.J., Bruns, T. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols,. A guide to methods and Applications* (ed. Innis, A.M., D.H. Gelfamd, J.J. Sinnsky & T.J. White), pp315-321, Acardemic Press Inc :California.

Woose, C. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สรุป

การกระจายของ endophytic fungi ในกล้าพืชป่านั้นจะมี diversity ของเชื้อราน้อยกว่าพืชต้นแก่ จำนวน taxa ของราที่พบจะประมาณ 5-12 species.ส่วนของพืชที่มีการ colonized ของเชื้อรามาก species คือส่วนของลำต้นหรือกิ่งและก้านใบที่แก่ อาหารที่เหมาะสมในการใช้แยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชคือ 2% malt extract agar ที่มี 30 mg/l rose bengal และ 50 mg/l streptomycin sulphate หรือ chloramphinicol

รา endophytes ที่แยกได้ 30% จะเป็นกลุ่มที่ไม่สร้างโครงสร้างในการสืบพันธุ์ (mycelia sterilia) นอกจากนั้นก็จะเป็นจีนัสที่มีรายงานว่าเป็น endophytes คือ *Gloeosporium* sp., *Glomellera* sp.,(ซึ่งเป็น teleomorph ของ *Colletotrichum* sp.) *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp., Xylariaceous fungi ราที่ไม่ค่อยพบว่าเป็น endophytes คือ *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., และ *Penicillium* sp. ราที่น่าสนใจซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีรายงานว่าเป็น endophytes และ ไม่ค่อยพบในธรรมชาติโดยทั่งไป (rare species) มี 7 species คือ *Apiosordaria striatispora, Guignardia* sp., *Didymella* sp., *Sporomella* sp., *Selenophoma* sp., *Volutella* sp and *Seimatosporium* sp.

เชื้อราที่แยกได้สามารถเก็บในสภาพที่มีชีวิตโดยเก็บในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด เชื้อจะอยู่ได้นานอย่างน้อย 1 ปี รองลงมาคือการเก็บในหลอดอาหาร เอียง PDA ที่ใช้จุก silicone stopper เก็บได้นานที่อุณหภูมิห้อง 6 เดือน

การบ่งบอกชนิดรา endophytes โดยทั่วไปใช้การศึกษาสัณฐานของโคโลนี ลักษณะ สปอร์ หรือโคนีเดีย แต่ในกลุ่มที่ไม่สร้างโครงสร้างในการสืบพันธุ์ในอาหารเช่น Xylariaceous fungi หรือที่ไม่มีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ใดๆการใช้วิธีทางชีวโมเลกุลเช่น เทคนิค RAPD-PCR และ 18S rDNA sequencing จะทำให้สามารถบ่งบอกชนิดได้เมื่อมีการศึกษาเทียบกับข้อมูลในศูนย์ข้อมูลหรือจากการทดลองกับเชื้อมาตรฐาน จากการศึกษาโดยใช้วิธี 18S rDNA sequencing ก็พบว่า เชื้อรา endophyte :*Guignardia* sp.MK3 มี phylogenic tree ใกล้เคียงกับ เชื้อรา *Botryospharia ribis* มาก ( 98.715% identity) ส่วนเชื้อรา P2A12W ที่มี anamorph เป็น *Selenophoma* sp. ก็มีวิวัฒนาการมาใกล้เคียงกับ *Lasioderma serricorne* ( 97.063% identity)

การกระจายของเชื้อราที่เจริญในต้นพืชนี้จะต้องมีการศึกษาต่อไปโดยเฉพาะกับพืชป่าต้นแก่ไม่เฉพาะพวกพืชใบเลี้ยงคู่เท่านั้น พืชใบเลี้ยงเดี่ยวก็มีรายงานการศึกษาในประเทศอื่นมากในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับ endophytes จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เพื่อเก็บรวบรวมเป็นแหล่งพันธุกรรมที่จะใช้ประโยชน์ต่อไปโดยเฉพาะการค้นหาสารที่มีประโยชน์จากราเหล่านี้และการศึกษาพฤติกรรมการอยู่ร่วมกับพืชที่เป็นโฮสท์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Mycoscience 38: 437–439, 1997

100

Short Communication

# *Apiosordaria striatispora*, an endophyte of *Mesua ferrea* and *Prunus arborea* from Thailand

**Kevin D. Hyde[1], S. W. Wong[1], Saisamorn Lumyong[2] and Pipob Lumyong [3]**

[1] Department of Ecology and Biodiversity, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong, China
[2] Department of Biology, Chiang Mai University, Thailand
[3] Department of Plant Pathology, Chiang Mai University, Thailand

Accepted for publication 3 October 1997

***Apiosordaria striatispora*** **isolated as an endophyte of** ***Mesua ferrea*** **and** ***Prunus arborea*** **is described, and illustrated with interference contrast light micrographs and scanning electron micrographs.**

Key Words——endophyte; fungi; Sordariales; systematics.

In a study of the endophytes occurring on seedlings of native trees at Doi-Suthep Pui National Park, near Chiang Mai, we isolated an ascomycete with unitunicate asci and brown bullet-shaped ascospores. This ascomycete readily produced ascomata in culture and therefore we were able to carry out a study of its morphology and examine the species at the SEM level. The isolate is identified as *Apiosordaria striatispora* (Furuya & Udagawa) Guarro (Sordariales) (Guarro and Cano, 1988).

## Materials and Methods

Seedlings about 1 yr old were obtained from the Forest Restoration Research Unit, CMU, at Doi-Suthep Pui National Park. These were grown beneath existing forest from seeds collected on the forest floor. Random sections were cut from the leaf and stem samples in the laboratory, and these were surface-sterilized in 70% alcohol (1 min), sodium hypochlorite (5.25% available free chlorine, 3 min), to kill any superficial fungal spores or mycelium and then washed in distilled water. These were then plated onto cornmeal agar and treated as in other endophytes studies. All measurements were made in water. Material was fixed for SEM following the method of Read et al. (1995).

## Results and Discussion

*Apiosordaria striatispora* (Furuya & Udagawa) Guarro, Trans. Br. Mycol. Soc. 91: 589. 1988. Figs. 1–17
≡ *Triangularia striatispora* Furuya & Udagawa, J. Jpn. Bot. 51: 407. 1976.

Colonies fast growing, reaching 5 cm in diam in 5 d at room temperature (22°C) on PDA, with superficial scant white cottony mycelium, discoloring media pale brown, with ascomata forming in concentric rings. Ascomata immersed in agar, or superficial amongst aerial mycelium; no anamorph produced (Fig. 1). Ascomata 150–200 μm high, 110–150 μm in diam, lenticular, pyriform; ostiole central (Figs. 2, 3). Peridium comprising several layers of somewhat angular cells. Paraphyses 2.5–3 μm wide at the base, hypha-like, septate, hyaline, numerous, tapering distally, not embedded in a gelatinous matrix. Asci 90–120×10–12 μm, 8-spored, cylindrical, pedicellate, thin-walled, unitunicate, with a narrow refractive apical ring (Figs. 4, 5). Ascospores 12–16×7–9 μm, uniseriate, bullet-shaped, comprising an apical brown cell, with up to 6 longitudinal furrows, with a small apical protuberance in some, and a germ pore at the end, and a smaller basal irregular hyaline cell (Figs. 6–17).

Material examined: Thailand, Moung, Chiang Mai, at Doi-Suthep Pui National Park, seedling nursery of Forest Restoration Research Unit, CMU, isolated from young seedlings of *Mesua ferrea* and *Prunus arborea*, Oct. 1996, P. Lumyong (HKU(M) 1501).

The specimen isolated here as an endophyte is identical to the excellent description of *A. striatispora*, originally isolated from soil in Thailand and Malaysia (Furuya and Udagawa, 1976). The nature of the wall striations is illustrated at the SEM level (Figs. 15–17).

Acknowledgements——Helen Leung, Beatrice Tread and A. Y. P. Lee are thanked for technical assistance. We are grateful to The Thailand Research Fund (BR/17/2539) for the support of a grant and the Forest Restoration Research Unit CMU, Suthep Pui National Park for providing us with seedlings.

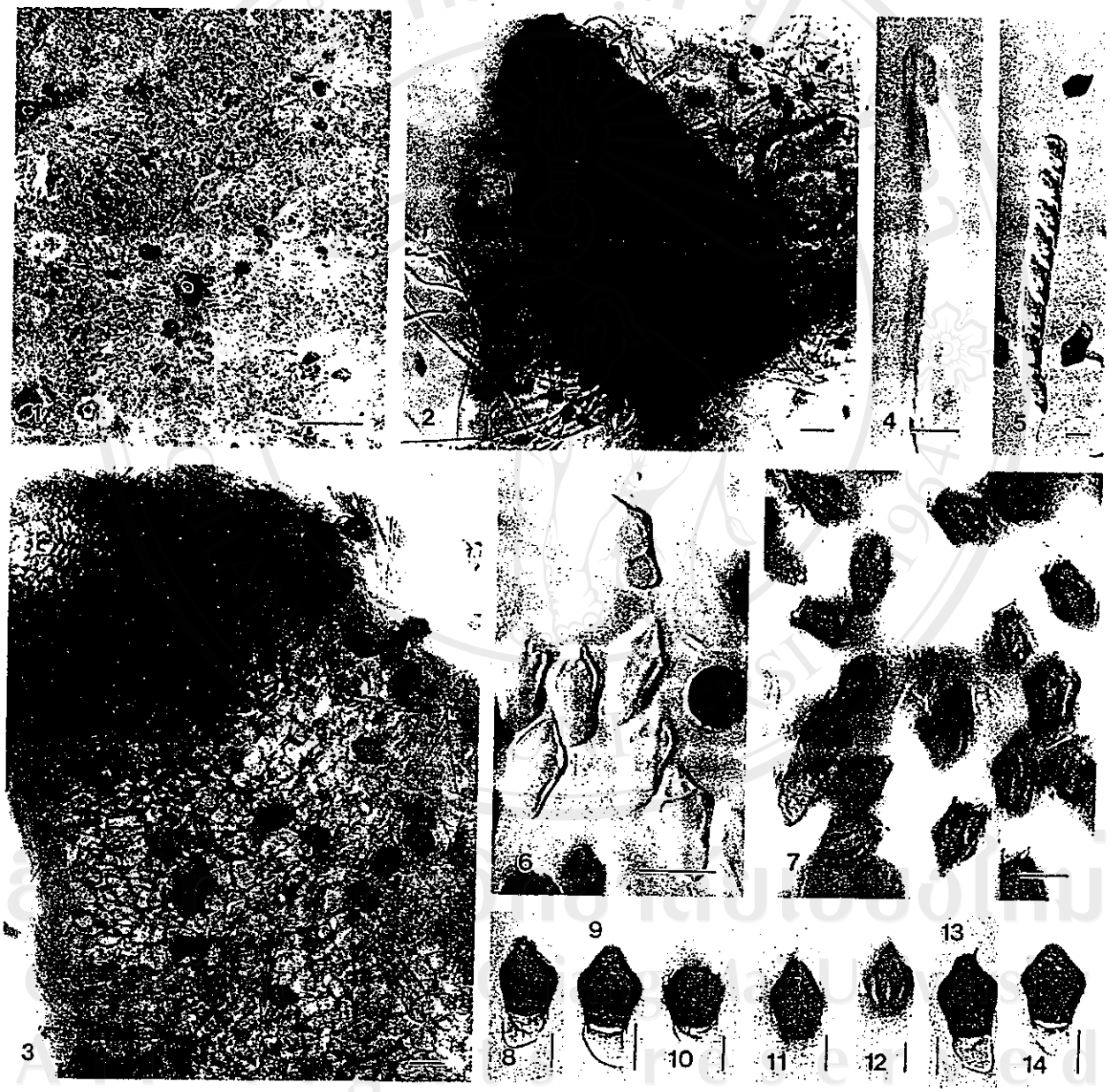
## Literature cited

Furuya, K. and Udagawa, S. 1976. A new species of *Triangularia*. J. Jpn. Bot. 51: 406–409.
Guarro, J. and Cano, J. 1988. The genus *Triangularia*. Trans.

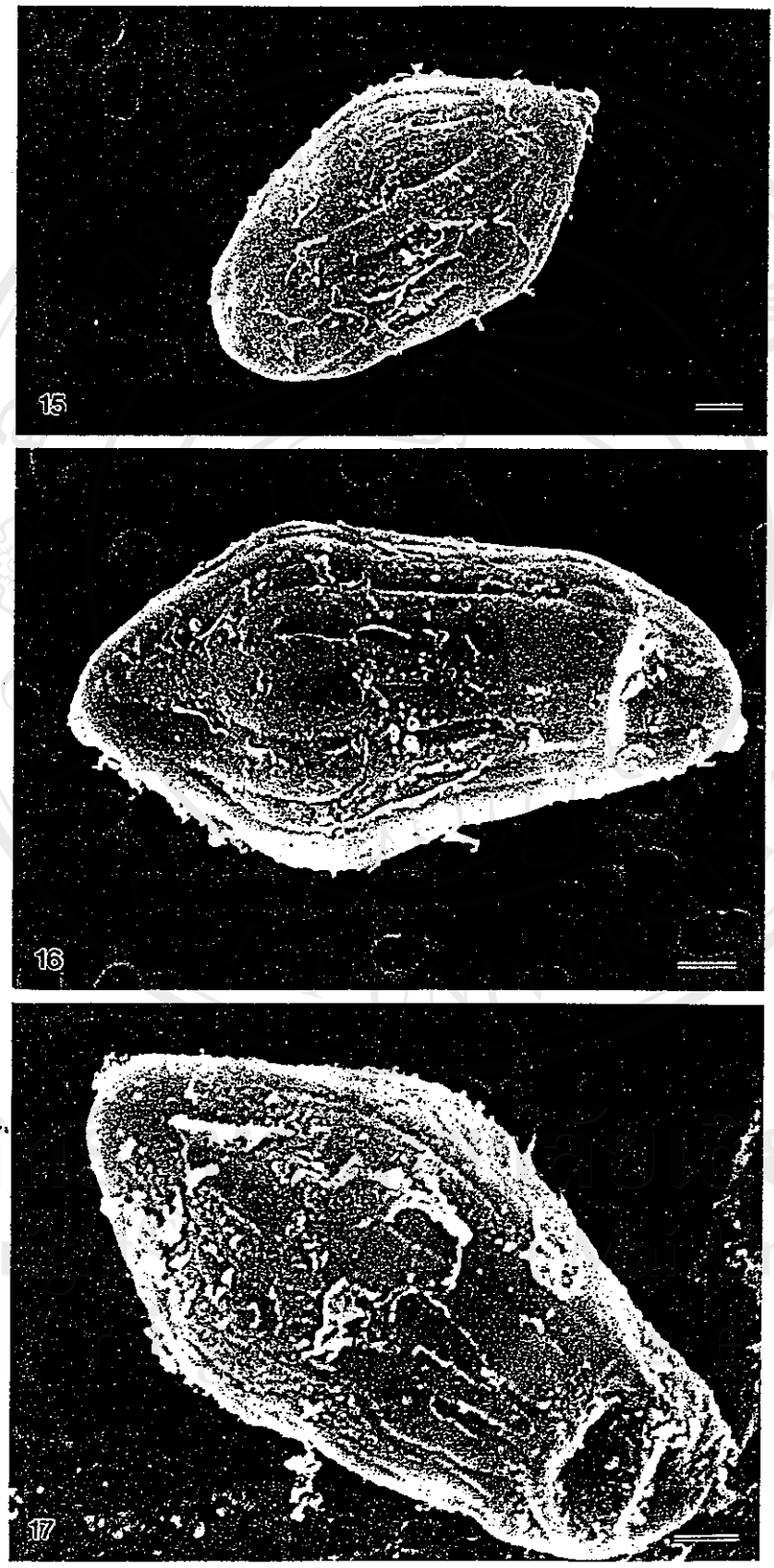
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights

Brit. Mycol. Soc. 91: 587–591.

Read, S. J., Jones, E. B. G., Moss, S. T. and Hyde, K. D. 1995. Ultrastructure of asci and ascospores of two marine fungi: *Swampomyces armeniacus* and *Marinosphaera mangrovei*. Mycol. Res. 99: 1465–1471.




Figs. 1–14. *Apiosordaria striatispora*.
1. Ascomata on agar surface. 2. Ascoma. 3. Cells of peridium and neck. 4, 5. Asci. Note the apical ring. 6. Immature ascospores. 7–14. Ascospores. Note the wall striations, hyaline basal cell, and apical germ pore. Bars: 1 = 500 μm; 2 = 20 μm; 3–7 = 10 μm; 8–14 = 5 μm.




Figs. 15–17. *Apiosordaria striatispora*.
Scanning electron micrographs. Note the wall striations. Bars = 1 $\mu$m.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# Phylogenetic studies of endophytic fungi: Amplification of 18s ribosomal DNA of endophytic fungi

Saisamorn Lumyong[1], Pipob Lumyong[2], Kasuo Tanaka[3] and Fusao Tomita[3]

[1] Deaprtment of Biology , Chiang Mai University, Chiang mai 50200, Thailand
[2] Department of Plant Pathology, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
[3] Lab of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Japan

## Abstract

Endophytic fungi strain MK3 isolated from *Mesua ferrea* was identified as *Guignardia* sp.MK3 and has closly phylogenic relationship to *Botryosphaeria ribis* as to the sequence of 18s rDNA studied.

## Introduction

Among bacteria and eucaryotes, the comparison of rRNA (rDNA) sequences is the most useful method for deducing phylogenetic relationship (Woese, 1987). In analyzing a DNA sequences, it is nescessary to amplifiy the sequence, and for this the polymerase chain reaction (PCR) is the most useful method because it can amplify a paricular DNA sequence region by use of a pair of primers (Medlin, *et. al.*, 1988; Boettger, 1989; Edwards, *et. al.*, 1989). Conseguently, a pair of primers is essential for amplification. In this study, base on the 18S ribosomal DNA sequence of MK3 sp (which belong to Ascomycetes, ) isolated as endophytic from *Mesua ferrea* and *Cinnamonium iners* native plant of Thailand, we amplify 18S rDNA and sequence of endophytic fungi *Guignardia* sp. MK 3 for the first time.

## Materails and Methods

*Fungal strain*

Endophytic fungi isolate MK3 was isolaed from *Mesua ferrea* and *Cinnamonium iners* and maintained on PDA slant. Colony grow well on 2% malt extract agar, oat meal agar and corn meal agar. On PDA plate this species ia an anamorph of *Phylostricta* sp. The strain was maintained through out the study on PDA slant store at 28°C.

*Culture and harvesting of fungal strain*

Potato dextrose broth was inoculated with mycelium of fungal isolate and culture were grown at 28°C with shaking at 150 rev/min. After 3 days incubation, the fungal mycelium mass was harvested by filtration

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and wash twice with TEN buffer (tris HCl + EDTA+ NaCl) pH 8 and freeze dried. The mycelium mass was kept at –80°C.

*DNA extraction*

The freze-dried mycelium was disrupted in sterile mortar and pestle into fine powder and total DNA was isolated by phenal-chloroform and RnaseA (150 µg/ml) followed an adaptation of the method described by Raeder, *et al.* (1985).

*PCR primer and oligonucleotide probe*

PCR primer probe and their location are summerized in Table 1.

Table 1 neucleotide sequence of the peimer used to amplified and an internal probe used to verified a portion of the 18S rRNA gene

| Primer | Position | Nucleotide sequence (5'-3') |
|---|---|---|
| NS1 | | GTAGTCATATGCTGTCTC |
| NS3 | | GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC |
| NS5 | | AACTTAAAGGAATTGACGGAAG |
| NS6 | | AACTTAAAGGAATTGACGGAAG |
| NS8 | | TCCGCAGGTTGACCTACGGA |

The fungal parts of 18S rDNA gene was amplified by PCR with the primers. These primers were design based on the conserved region of the eukaryote 18S rDNA and target with forward and reverse primers. Approximately 10 ng of DNA was amplified in 50 µl of reaction mixture. Three set of mixed primers were separate for a products.Primer NS1 and NS8 are target to a 1800 bp region of 18S rRNA gene. Primer NS1 and NS6 are amplified to 1300 bp fragement of 16S rRNA gene. NS5 and NS8 are target to 700 bp region.

*PCR conditions*

Amplification was performed in 50 µl volum containing 25 ng of template DNA, 0.1 nM of each primer NS1 and NS8, NS1 and NS6 or NS5 and NS8, 1.25U of Tag DNA polymerase (Boehringer Mannleim Biochrmicols, Indianapol8is, IN), 200 umolel- of dATP, dCTp, DTTP and dGTP, 10 mmole/l Tris-HCl (reaction buffer), 1.5 mmol/l MgCl2 and sterile distil water. The reaction was amplified in a DNA thermal cycle (Phamacia). The samples were subjected to an initial denaturation step (95°C for 3 min), followed by 35 amplification cycles. Each amplification

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cycle consisted of 30 second at 95°C (denaturation), 30 second at 53°C (primer anneling), and 2 min at 72°C (primer extension). A primer extension step (72°C for 10 min) followed the final amplification cycle and keep at 4°C.

*Analysis of PCR products*

PCR amplified fragments of 18S rDNA net ( 3µl of reaction product) were detected by electrophoretic separation (100V 30 min) on 1.5% agarose gels in a horizontal gel bed with TAE (tris-acetate/EDTA buffer) as the running buffer. DNA molecular weight marker X/HinIII (Boehringer mannheim Biochemicals) was included for base pair size comparision. The gel was stained with ethidium brominde for 20 min. and viewed on a UV transilluninator. The PCR products were transfer to Micro Spin TMS-300 HR columns (Pharmacia Biotech.) according to the manufacture's direction for purified PCR products. After pass through column the PCR product were precipitate with absoluted ethanol, keep at –80°C for 30 min and centifuge at 15,000 rpm 30 min. Washed the pellet by using 70% ethanol, centrifuge 5 min and dry under vacuum 15 min. the pellet was resuspend in TE buffer and concentration of DNA was assay from the optical density at 260 nm (Beckman spectrophotomete).

*DNA sequencing*

The sequence of PCR fragment was determined by direct sequencing of each side of a double-strand DNA fragment using a commercial sequencing kit (Thermo Sequencenase core sequence –kit, with 7 deaza-dGTP (Pharmacia Biotech) and sequencing dyed primers NS1, NS5, NS6, and NS8 (Table1). The reaction mixture , 8 µl in microcentrifuge tube consisted of Master mixed (DNA sample; 0.2-1 pmol/ul, primers and sterile distil water) 5µl were mixed with 3 µl thermosequenase solution. Each primer were in saparated tubes. The mixture were amplified in a thermal cycle program as followed: 95°C for 5 min; 25 cycle of 95°C for 30 second, 55°C for 30 second and 72°C for 1 min. Five ml of stop solution (loading dye: fluorescent samples) were added to the reaction mixture and kept at –20°C. Amplification PCR producted was denatured by boiling for 30 min and concentrate under vaccum before apply to ALF fexpress DNA sequencer electropholysis system (Phamacia Biotech)

*Phylogenetic analysis*

The DNA sequence of each fragments were aligned by Genetyx-Mac 9.0 program. Data comparing of the 18S rDNA sequence published in database from Genebank, dna and EMBL. The resulting tree was tested by a bootstrap analysis (PHYLIP)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**Results and Discussion**

The quantity of extracted DNA from this strain was enough for DNA analysis. Four primer used can gave satisfied PCR products. The high quality of base sequence in both strand was obtained from amplified coding region of *Guignardia* sp. The base sequence of 1731 bases has identity level 98.715% of the base sequence to *Botryosphaeria ribis*, only 19 nucleotides were different.The grouping of this species may change when more related taxa are incorporated in analysis as long branches often may lead to unreliable results. More data from other related strain ,*Botryosphaeria* sp. and other endophytic fungi need for comparision. Since at present no data available for DNA sequencing of *Guignardia* sp. This is the first report that succeed to prepared and sequence DNA of this strain by using universal primer for fungi. The sequence of specific ITS region may be need to identified to species level of *Guinardia* sp.

The authers gratefully acknowledge Prof. J.F Peberdy for critical reading of the manuscript. Financial support was provided by Thailand Research Fund in Basic research area (BR/17/2539) and JSPS-NRCT long term project cooperation.

**References**

Medlin, L.H., J. Elwood, S. Stickel and M.L. Sogin. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-link rRNA-coding region. *Gene*. 71:491-499.

Raeder, U. and P. Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letter in Applied Microbiology* 1: 17-20.

Woese, C. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Review* 51: 221-271.

Mozina, S.S. D. Dlaucht, T. Deak and P. Raspor. 1997. Identification of *Saccharomyces* sensu stricto and *Torulaspora* yeast by PCR ribotyping. *Letter in Applied Microbiology* 24, 311-315.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

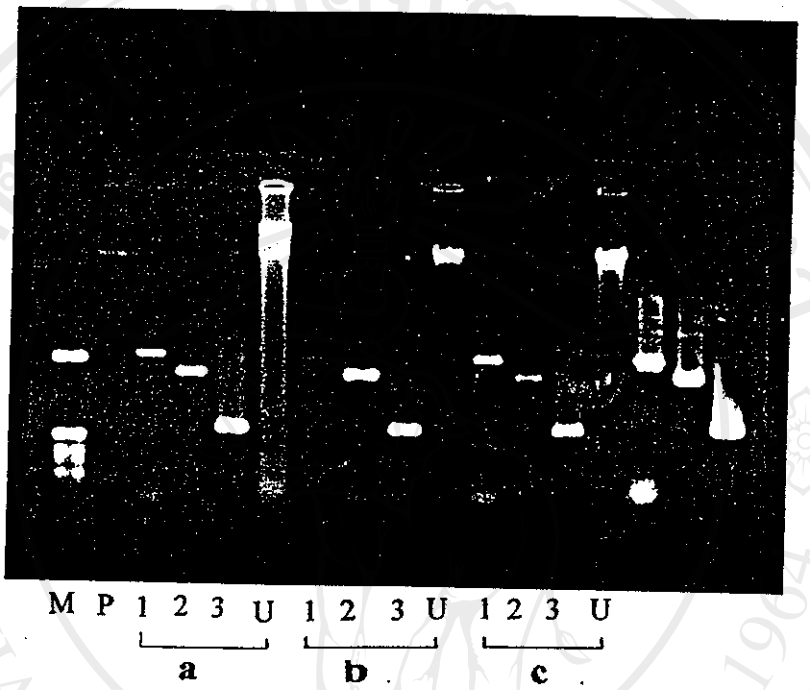



Fig1. Amplification product of DNA from endophytic fungi strain U2, U3 and *Guignardia* sp. MK3 designed a-c, respectively, with three different primers (NS!+NS8, NS!+NS6, NS5+NS8):nos 1,2&3. M= λDNA cut with HindIII as size marker. P=mixed primer. U= undigested DNA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

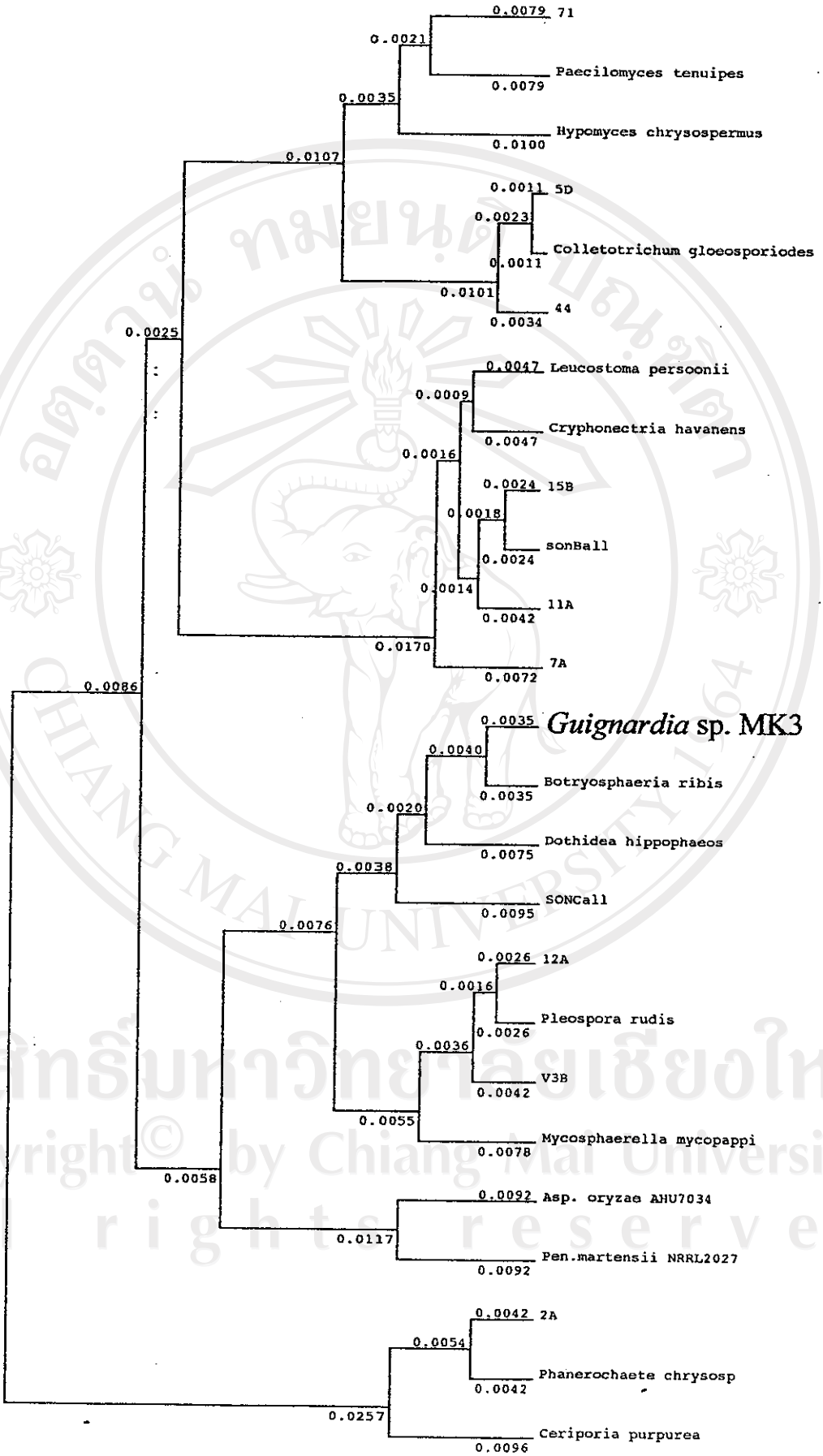



Fig2. Evolutionary tree (method UPGMA) from the 18S rDNA Sequences of *Guignardia* sp. MK3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รายละเอียดค่าใช้จ่ายโครงการ

สัญญาเลขที่ BR/.....25.....

| รายการค่าใช้จ่าย | ต่อเดือน | ปีที่ 1 | | | รวม 1 ปี | % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | งวดที่ 1 | งวดที่ 2 | งวดที่ 3 | | |
| **1. หมวดค่าตอบแทน** | | | | | | |
| นางสายสมร ลำยอง (30%) | 11,000 | 66,000 | 33,000 | 33,000 | 132,000 | |
| นายพิภพ ลำยอง (21%) | 5,000 | 30,000 | 15,000 | 15,000 | 60,000 | |
| นางนิตยา บุญทิม (15%) | 2,000 | 12,000 | 6,000 | 6,000 | 24,000 | |
| รวมหมวดค่าตอบแทน | | 108,000 | 54,000 | 54,000 | 216,000 | 28% |
| **2. หมวดค่าจ้าง** | | | | | | |
| ผู้ช่วยวิจัย (วุฒิปริญญาตรี) | 7,000 | 42,000 | 42,000 | - | 84,000 | |
| ค่าจ้างแรงงานชั่วคราว | 2,500 | 15,000 | 15,000 | - | 30,000 | |
| รวมหมวดค่าจ้าง | | 57,000 | 57,000 | - | 114,000 | 15% |
| **3. หมวดค่าวัสดุ** | | | | | | |
| ค่าวัสดุและสารเคมีในการวิจัย | | 251,000 | 138,366 | - | 388,000 | |
| ค่าวัสดุสำนักงาน | | 1,500 | 1,000 | - | 2,500 | |
| รวมหมวดวัสดุ | | 252,500 | 139,366 | - | 391,866 | 51% |
| **4. หมวดค่าใช้สอยและอื่น ๆ** | | | | | | |
| ค่าตอบแทนผู้พิมพ์รายงาน | | - | 1,000 | - | 1,000 | |
| ค่าจ้างเจ้าหน้าที่การเงินและบัญชี | | 3,000 | 3,000 | - | 6,000 | |
| ค่าจัดพิมพ์รายงานฉบับสมบูรณ์ | | - | 2,500 | - | 2,500 | |
| รวมหมวดค่าใช้สอยและอื่น ๆ | | 3,000 | 6,500 | - | 9,500 | 1% |
| **5. หมวดค่าเดินทางในประเทศ** | | | | | | |
| ค่าเดินทาง | | 5,000 | 5,000 | - | 10,000 | |
| ค่าเบี้ยเลี้ยง ที่พัก | | 2,500 | 2,500 | - | 5,000 | |
| รวมหมวดค่าเดินทางในประเทศ | | 7,500 | 7,500 | - | 15,000 | 2% |
| รวม | | 427,000 | 264,000 | 54,000 | 745,000 | 97% |
| **6. หมวดค่าเดินทางต่างประเทศ** | | | | | | |
| รวมหมวดค่าเดินทางต่างประเทศ | | 18,300 | - | - | - | 3% |
| | | | | | | 3% |
| รวมงบประมาณโครงการ | | 427,000 | 264,000 | 54,000 | 764,666 | 100% |

สายสมร ลำยอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารแนบหมายเลข 5

หน้า 2/2

สัญญาเลขที่ BR/17/2539

โครงการการกระจายของเชื้อราที่อาศัยในต้นพืชป่าในเขตดอยสุเทพ-ปุย

รายงานสรุปการเงินในรอบ 6 เดือน

ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ.ดร.สายสมร ลำยอง

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2539 ถึงวันที่ 1 มีนาคม 2540

รายจ่าย

| หมวด (ตามเอกสารโครงการ) | รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน | ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน | รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน | งบประมาณที่ตั้งไว้ (รวมสะสมจนถึงปีปัจจุบัน) | คงเหลือ (หรือเกิน) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. ค่าตอบแทน | ..... | 108,000 | 108,000 | 108,000 | ..... |
| 2. ค่าจ้าง | ..... | 57,000 | 57,000 | 57,000 | ..... |
| 3. ค่าใช้สอย | ..... | 3,000 | 3,000 | 3,000 | ..... |
| 4. ค่าวัสดุ | ..... | 277,800 | 277,800 | 251,500 | -26,300 |
| 5. ค่าครุภัณฑ์ | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| 6.ค่าเดินทางในประเทศ | ..... | 3,300 | 3,300 | 7,500 | 4,200 |
| 7.ค่าที่ปรึกษาต่างประเทศ (เดินทาง) | ..... | 18,300 | 18,300 | 18,300 | ..... |
| รวม | ..... | 467,400 | 467,400 | 445,300 | -22,100 |

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 427,000 บาท เมื่อ 13 พย. 2539

งวดที่ 2 18,300 บาท เมื่อ 19 ธค. 2539

ดอกเบี้ย ครั้งที่ 1 ..... บาท เมื่อ.....

ฯลฯ

รวม 445,300 บาท

ค่าใช้จ่าย

งวดที่ 1 เป็นเงิน 467,400 บาท

งวดที่ 2 เป็นเงิน ..... บาท

ฯลฯ

รวม 467,400 บาท

จำนวนเงินที่ใช้เกิน 22,100 บาท

(รศ.ดร.สายสมร ลำยอง)
หัวหน้าโครงการ

(.....)
เจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารแนบหมายเลข 5
หน้า 2/2

สัญญาเลขที่ BR/17/2539

โครงการ: การกระจายของเชื้อราที่อาศัยภายในต้นพืชป่าในเขตดอยสุเทพ-ปุย

Title: Distribution of Endophytic Fungi Among Indiginous Plant Species in Doi Suthep-Pui Area

## รายงานสรุปการเงินในรอบ 6 เดือน

ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ.ดร.สายสมร ลำยอง

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 2 มีนาคม 2540 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2540

รายจ่าย

| หมวด (ตามเอกสารโครงการ) | รายจ่ายสะสมจากรายงานครั้งก่อน | ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน | รวมสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน | งบประมาณที่ตั้งไว้ (รวมสะสมจนถึงปีปัจจุบัน) | คงเหลือ (หรือเกิน) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1.ค่าตอบแทน | – | 54,000 | 54,000 | 54,000 | – |
| 2.ค่าจ้าง | – | 57,000 | 57,000 | 57,000 | – |
| 3.ค่าใช้สอย | – | 6,500 | 6,500 | 6,500 | – |
| 4.ค่าวัสดุ | –22,100 | 117,850 | 139,950 | 139,000 | –950 |
| 5.ค่าครุภัณฑ์ | – | – | – | – | – |
| 6ค่าเดินทาง ประชุม | | 15,600 | 15,600 | 7,500 | –8,100 |
| 7บางส่วน | | | | | |
| รวม | 22,100 | 250,950 | 273,050 | 264,000 | –9,050 |

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

| | | | |
|---|---|---|---|
| งวดที่ 1 | 445,300 | บาท | เมื่อ 13 พย.2539 |
| งวดที่ 2 | 264,000 | บาท | เมื่อ |
| ดอกเบี้ย ครั้งที่ 1 | – | บาท | เมื่อ |
| ฯลฯ | | | |
| รวม | 709,300 | บาท | |

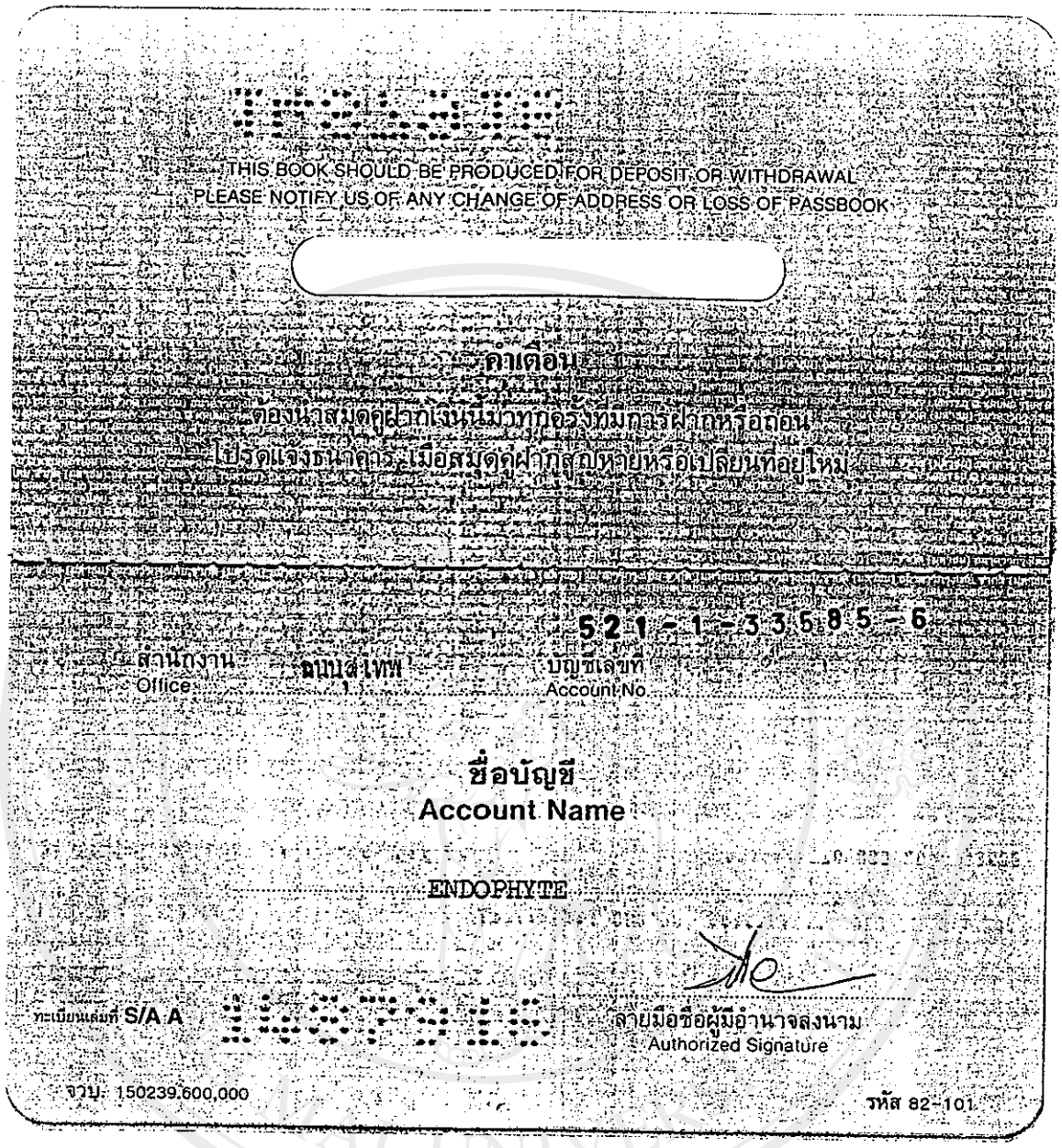
ค่าใช้จ่าย

| | | |
|---|---|---|
| งวดที่ 1 เป็นเงิน | 467,400 | บาท |
| งวดที่ 2 เป็นเงิน | 250,950 | บาท |
| ฯลฯ | | |
| รวม | 718,350 | บาท |
| จำนวนเงินคงเหลือ | –9,050 | บาท |

(รศ.ดร.สายสมร ลำยอง)
หัวหน้าโครงการ

(นางอรวรรณ อินทราทิพย์)
เจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



THIS BOOK SHOULD BE PRODUCED FOR DEPOSIT OR WITHDRAWAL
PLEASE NOTIFY US OF ANY CHANGE OF ADDRESS OR LOSS OF PASSBOOK

คำเตือน
ต้องนำสมุดคู่ฝากเงินนี้มาทุกครั้งที่มีการฝากหรือถอน
โปรดแจ้งธนาคารเมื่อสมุดคู่ฝากสูญหายหรือเปลี่ยนที่อยู่ใหม่

521-1-33585-6

สำนักงาน Office ฉบับสมบูรณ์ บัญชีเลขที่ Account No.

ชื่อบัญชี
Account Name

ENDOPHYTE

ทะเบียนเล่มที่ S/A A

ลายมือชื่อผู้มีอำนาจลงนาม
Authorized Signature

จาม. 150239.600,000

รหัส 82-101

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| วัน เดือน ปี D M Y | อาคาร DEP No. | ค่าย่อ CODE | ถอน WITHDRAWAL | ฝาก DEPOSIT | คงเหลือ BALANCE | เจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบ STAFF ID. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | บัญชีเลขที่ | |
| 14.08.39 | 521 | B/F | | | ***********0.00 | 61509 | 1 |
| 14.08.39 | 521 | DCA | | *********1,000.00 | **********1,000.00 | 33201 | 2 |
| 13.11.39 | 013 | NOT | | ********427,000.00 | *********428,000.00 | 61508 | 3 |
| 21.11.39 | 521 | WCA | *******150,000.00 | | *********278,000.00 | 39802 | 4 |
| 19.12.39 | 013 | NOT | | ********18,300.00 | *********296,300.00 | 70103 | 5 |
| 21.12.39 | 521 | INP | | *********1,669.56 | *********297,969.56 | B00000 | 6 |
| 24.12.39 | 521 | WCA | ********50,000.00 | | *********247,969.56 | 39801 | 7 |
| 20.01.40 | 521 | WCA | *******100,000.00 | | *********147,969.56 | 33003 | 8 |
| 03.03.40 | 521 | WCA | ********100,000.00 | | **********47,969.56 | 33802 | 9 |
| 29.04.40 | 521 | WCA | ********47,000.00 | | ************969.56 | 33907 | 10 |
| | | | | | | | 11 |
| 12.05.40 | 013 | TTS | | *******264,000.00 | *********264,969.56 | 31108 | 12 |
| 12.05.40 | 013 | TTSE | *******264,000.00 | | ************969.56 | 31108 | 13 |
| 12.05.40 | 013 | TTS | | *******264,000.00 | *********264,969.56 | 61408 | 14 |
| 22.05.40 | 521 | WCA | ********90,000.00 | | *********174,969.56 | 33907 | 15 |
| 22.05.40 | 521 | INP | | *********3,317.72 | *********178,287.28 | B00000 | 16 |
| 17.07.40 | 521 | WCA | *********70,000.00 | | *********108,287.28 | 34105 | 17 |
| 02.09.40 | 521 | WCA | *********80,000.00 | | **********28,287.28 | 34105 | 18 |
| 25.09.40 | 521 | WCA | *********25,000.00 | | ***********3,287.28 | 34105 | 19 |
| | | | | | | | 20 |
| | | | | | | | 21 |

คำอธิบาย "ค่าย่อ" โปรดดูปกหลังด้านใน
FOR INTERPRETATION OF "CODE" ABOVE, PLEASE SEE INSIDE BACK COVER.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## ระเบียบการฝากเงินออมสินประเภทเผื่อเรียก

1. ธนาคารออมสินจะออกสมุดคู่บัญชีให้โดยไม่เรียกเก็บเงินค่าสมุดเมื่อฝากครั้งแรก และจะเปลี่ยนให้ใหม่เนื่องจากมีรายการเต็ม แต่ถ้าผู้ฝากทำสมุดหายหรือชำรุด จะต้องเสียค่าสมุดฝากเงินที่ออกให้ใหม่
2. การฝากเงินจะต้องฝากครั้งละไม่ต่ำกว่า ๑ บาท จะฝากวันละกี่ครั้งก็ได้และธนาคารจะคิดดอกเบี้ยให้ตามประกาศธนาคารออมสิน
3. การถอนเงินจะต้องถอนครั้งละไม่ต่ำกว่า ๑ บาท
4. ผู้ฝากมีสิทธิฝาก-ถอน ต่างสำนักงานได้ตามระเบียบธนาคารออมสิน
5. ผู้ฝากอาจขอโอนย้ายสถานที่ฝากเงินได้ เมื่อฝากครบหนึ่งเดือนแล้ว
6. บัญชีที่ผู้ฝากละเลยไม่มาติดต่อเป็นเวลาห้าปี ธนาคารจะแยกเป็นบัญชีทอดทิ้งไว้ต่างหาก และบัญชีทอดทิ้งที่มีเงินคงเหลือไม่เกินยี่สิบบาท ธนาคารจะหักค่ารักษาบัญชี ๆ ละห้าบาทต่อปี
7. เมื่อเปลี่ยนชื่อ นามสกุล ย้ายที่อยู่ หรือสมุดคู่บัญชีหายให้รีบแจ้งต่อพนักงาน ณ สำนักงานที่มีบัญชีฝากไว้
8. ถ้าประสงค์จะทราบรายละเอียดอื่นใด โปรดติดต่อสอบถาม ณ สำนักงานธนาคารออมสินทุกสาขา
9. การนำสมุดฝากเงินออมสินของผู้อื่นมาถอนเงินโดยทุจริต มีความผิดตามประมวลกฎหมายอาญาต้องระวางโทษถึงจำคุก

* โปรดเก็บสมุดฝากเงินนี้ไว้ในที่ปลอดภัย ถ้าชำรุดหรือสูญหายโปรดแจ้งธนาคารทันที

**ธนาคารออมสิน**

| สาขา [illegible] | บัญชีเลขที่ 05-3405-20-063368-1 |
|---|---|

ชื่อผู้ฝาก

[illegible]

ที่ระเบียนเล่มที่ [illegible]

ผู้จัดการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| วัน/เดือน/ปี | รหัสรายการ | ถอน | ฝาก | เงินคงเหลือ | หมายเลขพ.ลง บ/ช | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 17/08/36 | CDN | | 1.00 | ##########1.00 | 012 | 1 |
| 18/08/36 | LDD | | 2,000.00 | ##########2,001.00 | 013 | 2 |
| 31/12/36 | INT | | 42.21 | ##########2,043.21 | 000 | 3 |
| 31/12/37 | INT | | 100.38 | ##########2,143.59 | 000 | 4 |
| 31/12/38 | INT | | 107.89 | ##########2,251.48 | 000 | 5 |
| 09/09/39 | QDB | | 28,600.00 | ##########30,851.48 | 112 | 6 |
| 11/09/39 | CWB | 5,500.00 | | ##########25,351.48 | 112 | 7 |
| 28/09/39 | CWB | 10,000.00 | | ##########15,351.48 | 021 | 8 |
| 04/10/39 | CWB | 5,000.00 | | ##########10,351.48 | 110 | 9 |
| 05/10/39 | CWB | 6,000.00 | | ##########4,351.48 | 020 | 10 |
| 21/11/39 | CDB | | 150,000.00 | ##########154,351.48 | 014 | 11 |
| 25/11/39 | CWB | 50,000.00 | | ##########104,351.48 | 021 | 12 |
| 02/12/39 | CWB | 20,000.00 | | ##########84,351.48 | 014 | 13 |
| 03/12/39 | CWB | 20,000.00 | | ##########64,351.48 | 021 | 14 |
| 27/12/39 | CWB | 25,000.00 | | ##########39,351.48 | 417 | 15 |
| 31/12/39 | INT | | 615.18 | ##########39,966.66 | 000 | 16 |
| 06/01/40 | CWB | 20,000.00 | | ##########19,966.66 | 014 | 17 |
| 20/01/40 | CDB | | 80,000.00 | ##########99,966.66 | 021 | 18 |
| 24/01/40 | CWB | 9,000.00 | | ##########90,966.66 | 113 | 19 |
| 03/02/40 | CWB | 52,120.00 | | ##########38,846.66 | 014 | 20 |
| 23/04/40 | CDB | | 22,000.00 | ##########60,846.66 | 113 | 21 |
| 07/05/40 | CWB | 50,000.00 | | ##########10,846.66 | 113 | 22 |

คำย่อ CDB, CDN } ฝากเงินสด  QDB, QDN } ฝากเช็ค  TDB, TDN } ฝากโดยการโอน

CWB, CWN } ถอนเงินสด  QWB, QWN } ถอนเช็ค  TWB, TWN } ถอนโดยการโอน

ORT เช็คคืน  TAX ภาษี  TRI โอนเข้า  TRO โอนออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| วัน/เดือน/ปี | รหัสรายการ | ถอน | ฝาก | เงินคงเหลือ | หมายเลขพ.ลง บ/ช | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 22/05/40 | COB | | 50,000.00 | ***********60,846.66 | 014 | 1 |
| 30/05/40 | CWB | 20,000.00 | | ***********40,846.66 | 014 | 2 |
| 17/06/40 | CWB | 10,000.00 | | ***********30,846.66 | 020 | 3 |
| 02/07/40 | CWB | 20,000.00 | | ***********10,846.66 | 014 | 4 |
| 16/07/40 | CWB | 10,000.00 | | **********846.66 | 014 | 5 |
| | | | | | | 6 |
| | | | | | | 7 |
| | | | | | | 8 |
| | | | | | | 9 |
| | | | | | | 10 |
| | | | | | | 11 |
| | | | | | | 12 |
| | | | | | | 13 |
| | | | | | | 14 |
| | | | | | | 15 |
| | | | | | | 16 |
| | | | | | | 17 |
| | | | | | | 18 |
| | | | | | | 19 |
| | | | | | | 20 |
| | | | | | | 21 |
| | | | | | | 22 |

สลากออมสินพิเศษ "สลากออมสินไม่หักทุน"

เมื่อต้องการออมทรัพย์และเสี่ยงโชค ซื้อสลากออมสินพิเศษมีสิทธิ์ถูกรางวัล 35 ครั้ง ครบอายุได้รับเงินต้นคืนพร้อมดอกเบี้ย

2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved