

ราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในพืชสกุลหนอนตายหยาก

โดย นางสาวจิตทิพร ภูปราง

ทำไมเลือกราเอนโดไฟท์ในต้นหนอนตายหยาก

หนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวประเภทไม้เลื้อยอยู่ในวงศ์ Stemonaceae พบแพร่กระจายอยู่ตามประเทศต่าง ๆ ในแถบเอเชีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และออสเตรเลีย ในประเทศไทยพบพืชสกุลหนอนตายหยากขึ้นกระจายอยู่ทั่วทุกภาคตามป่าดิบชื้น ป่าผลัดใบและป่าไผ่ หรือมีปลูกตามบ้านและสวนของผู้ที่รู้จักใช้ประโยชน์ เป็นที่รู้จักกันดีจากภูมิปัญญาท้องถิ่นว่าพืชในสกุลหนอนตายหยากมีคุณสมบัติเป็นสมุนไพร ในประเทศจีนและญี่ปุ่นใช้หนอนตายหยากเป็นยารักษาโรคผิวหนัง ยาแก้ไอ ยาถ่ายพยาธิ และยังใช้ฆ่าเห็บ เหา ไร โลน ซึ่งเป็นพยาธิภายนอกร่างกาย นอกจากนี้หนอนตายหยากยังผลิตสารทุติยภูมิหลายชนิด ที่มีคุณสมบัติต่อต้านมะเร็ง และกำจัด หนอนแมลงและเชื้อราบางอย่างที่เป็นศัตรูพืชได้อีกด้วย

ในสภาพปกติพืชไม่จำเป็นที่จะต้องผลิตสารทุติยภูมิขึ้นมาใช้เพื่อการเจริญเติบโต การผลิตสารทุติยภูมิของพืชมักเกิดจากการได้รับสิ่งกระตุ้น ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความแห้งแล้ง หรือปัจจัยทางชีวภาพ เช่น มีโรค-แมลง รบกวน เจาะทำลาย อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ดำรงชีพอยู่ในลำต้นของพืชชั้นสูงส่วนใหญ่โดยไม่ทำอันตรายกับพืชที่เป็นผู้ให้อาศัยแต่อย่างใดรวมถึงพวกราเอนโดไฟท์ด้วย ซึ่งในระยะหลายปีที่ผ่านมาเรามีรายงานวิจัยเผยแพร่อย่างต่อเนื่องว่าพืชที่มี ราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ภายในลำต้นสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ รวมทั้งผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชอีกด้วย

ราเอนโดไฟท์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชและสามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยไม่ทำให้พืชเกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืชชนิดนั้นๆ จะพบราเอนโดไฟท์ได้ในพืชตระกูลต่างๆ มากมาย พบว่ารากลุ่มนี้มีความสำคัญต่อพืชที่อาศัยอยู่ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยจะช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านทานศัตรูพืชชนิดต่างๆ เพิ่มความแข็งแรงและทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (abiotic stress) ได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ ทั้งยังมีอิทธิพลต่อความหลากหลายทางชีวภาพหรือพืชกลุ่มนั้นๆ ด้วย ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเกษตรกรรมและพืชเศรษฐกิจ

ในเบื้องต้นของการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกและจำแนกราเอนโดไฟท์จากพืชในสกุล *Stemona* ที่มีการกระจายพันธุ์ทั่วประเทศไทย โดยใช้หนอนตายหยากที่ได้รับการสำรวจรวบรวมพันธุ์และปลูกเลี้ยงไว้แล้วส่วนหนึ่ง ณ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ และสำรวจเพิ่มเติมอีกส่วนหนึ่ง องค์กรความรู้ด้านความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟท์ที่อาศัยในหนอนตายหยากและสารทุติยภูมิ

ที่ผลิตได้ สามารถนำไปพัฒนาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและเป็นการพัฒนาการใช้สารธรรมชาติเพื่อทดแทนสารเคมีการเกษตรได้ต่อไป

การคัดเลือกสายพันธุ์หนอนตายหยาก

ชนิดของหนอนตายหยากที่เลือกมาแยกราเอนโดไฟท์ในงานวิจัยครั้งนี้ เป็น *Stemona collinsae* Craib เนื่องจาก *S. collinsae* มีการสร้างสารทุติยภูมิที่มีรายงานว่าเป็นสารออกฤทธิ์กำจัดแมลง คือ didehydrostemofoline (Gregor, 2006) จึงเป็นที่น่าสนใจว่าถ้าเป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จาก *S. collinsae* นี้จะมีสารที่ออกฤทธิ์กำจัดแมลงเหมือนกันหรือไม่ และจากการสำรวจแหล่งที่เก็บตัวอย่างหนอนตายหยากนี้พบว่ามีจำนวนประชากรหนอนตายหยากมากพอสำหรับการวิจัย

หนอนตายหยาก

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Stemona collinsae* Craib

วงศ์ Stemonaceae

ชื่อพื้นเมือง พญาร้อยหัว โป่งมดง่าม สามสิบกลีบ กระเพียดหนู ปงช้าง รากลิง สลอดเขิงคำ

ลักษณะทั่วไป เป็นไม้เลื้อย ใบ เป็นใบเดี่ยวออกสลับกัน รูปใบคล้ายใบพลู กว้าง 4-6 ซม. ยาว 6-10 ซม. แผ่นใบเป็นคลื่น มีปลายใบแหลมโคนใบเว้า เส้นใบขนานเด่นชัด ลำต้นบนดินจะโถมช่วงฤดูแล้ง พอฤดูฝนจะงอกใหม่พร้อมทั้งออกดอก ลำต้นใต้ดินมีรากออกเป็นพวงหลายสิบราก ลักษณะเป็นรูปกระสวย ออกเป็นกระจุกคล้ายกระชาย ขยายพันธุ์โดยเมล็ดหรือแทงหน่อใหม่ขึ้นจากกอเดิม ขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิด

พบทั้งในที่ชื้นและแห้งแล้ง เจริญเติบโตได้ดีในฤดูฝน พบขึ้นอยู่ตามป่าเบญจพรรณ ในประเทศไทยมีอย่างน้อย 7 ชนิดพบทั่วไป

ในครั้งนี้นำมาสำรวจและรวบรวมตัวอย่างต้นหนอนตายหยากจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตศรีราชา จ.ชลบุรี ทำการคัดเลือกต้นหนอนตายหยากที่สมบูรณ์ แข็งแรง ไม่มีโรคหรือแมลงรบกวน ช่วงเวลาที่เก็บเป็นเดือนตุลาคม 2550-2551 ซึ่งตัวอย่างมีความสมบูรณ์ที่สุดเนื่องจากเป็นต้นที่โตเต็มที่ และเป็นปลายฤดูฝนที่ต้นไม้ยังไม่ขาดน้ำ ทำให้ได้ตัวอย่างที่ดีสำหรับนำมาแยกราเอนโดไฟท์

ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากต้นหนอนตายหยาก

ราเอนโดไฟท์ที่สามารถแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์จากต้นหนอนตายหยากได้ 400 ไอโซเลต โดยเก็บจาก 2 สถานที่ คือ เรือนเพาะชำ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จ.เชียงใหม่ และป่าเต็งรังบริเวณหลัง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางพระ จ.ชลบุรี ดังนี้

ตารางที่ 1 รายชื่อราเอนโคไฟท์ที่แยกจากต้นหนอนตายหยากที่เก็บจากเรือนเพาะชำสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จ.เชียงใหม่ และป่าเต็งรังบริเวณหลัง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางพระ จ.ชลบุรี

เก็บตัวอย่างครั้งที่	สถานที่	ราเอนโคไฟท์ที่แยกได้	จำนวนไอโซเลต
1	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จ.เชียงใหม่	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Colletotrichum capsici</i> <i>Colletotrichum</i> sp.1 <i>Glomerella</i> sp. <i>Guignardia</i> sp. <i>Phyllosticta</i> spp. Mycelia Sterilia no. 1 Xylariaceae no. 1	68
2	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางพระ จ.ชลบุรี	<i>Alternaria</i> sp.1 <i>Apergillus</i> sp. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Colletotrichum capsici</i> <i>Colletotrichum</i> sp.1 <i>Curvularia oryzae</i> <i>Geotrichum</i> sp. <i>Guignardia</i> sp. <i>Glomerella</i> sp. <i>Fusarium semitectum</i> <i>Penicillium</i> sp.1 <i>Phyllosticta</i> spp. <i>Phomopsis</i> sp. Basidiomycetes no.1 Mycelia Sterilia no.1 Mycelia Sterilia no.2 Mycelia Sterilia no.3	159
3	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จ.เชียงใหม่	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Colletotrichum capsici</i>	28

เก็บตัวอย่าง ครั้งที่	สถานที่	ราเอนโคไฟท์ที่แยกได้	จำนวน ไอโซเลต
		<i>Colletotrichum</i> sp.2 <i>Glomerella</i> sp. <i>Phyllosticta</i> spp. <i>Mycelia Sterilia</i> <i>Xylariaceae</i> no.2 <i>Xylariaceae</i> no.3 <i>Xylariaceae</i> no.4 <i>Xylariaceae</i> no.5 <i>Mycelia Sterilia</i> no.1	
4	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางพระ จ.ชลบุรี	<i>Alternaria</i> sp.1 <i>Alternaria</i> sp.2 <i>Colletotrichum</i> <i>gloeosporioides</i> <i>Colletotrichum capsici</i> <i>Colletotrichum</i> sp.2 <i>Curvularia lunata</i> <i>Curvularia</i> sp.2 <i>Geotrichum</i> sp. <i>Guignardia (Phyllosticta)</i> spp. <i>Fusarium semitectum</i> <i>Phaeotrichoconis</i> sp.1 <i>Phomopsis</i> sp.1 <i>Ascomycetes</i> <i>Mycelia Sterilia</i> no.1 <i>Mycelia Sterilia</i> no.2 <i>Mycelia Sterilia</i> no.3	145

ราเอนโคไฟท์ที่เก็บได้จากแหล่งธรรมชาติพบว่ามีหลากหลายของชนิดและจำนวนมากกว่าที่เก็บจากเรือนเพาะชำ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า เมื่อมีการย้ายปลูกจากแหล่งธรรมชาติสู่เรือนเพาะชำ ในระยะเวลาหนึ่ง ชนิดของราเอนโคไฟท์ที่อยู่อาศัยภายในดินหนอนตายหยากมีการเปลี่ยนชนิดตามสภาพแวดล้อมหรือวัสดุปลูก เช่น ดินที่ใช้ปลูก น้ำที่ไ้รด หรือชนิดของราดินที่อยู่บริเวณรอบแหล่งปลูก ซึ่งเห็นได้ชัดเจนจากการวิจัยนี้ เช่น *Xylariaceae* เป็นราเอนโคไฟท์ที่พบเฉพาะจากดินหนอนตายหยากที่อยู่ในเรือนเพาะชำ และไม่พบจากแหล่งธรรมชาติเลย

ราเอนโดไฟท์ที่พบจากทั้ง 2 แหล่งนั้น สกุลเด่น คือ *Colletotrichum* spp. และ *Phyllosticta* spp.

วิธีแยกราเอนโดไฟท์ออกจากต้นหนอนตายหยาก

วิธี Surface Sterilization

นำใบ ก้านใบ และลำต้น หนอนตายหยากมาล้างให้สะอาด เลือกบริเวณที่สมบูรณ์ที่สุด ไม่มีโรคพืชหรือแมลงรบกวน ตัดเป็นชิ้นเล็กขนาด 5x5 มิลลิเมตร แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% นาน 3 นาที และ sodium hypochlorite 5% นาน 3 นาที ล้างน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับบนกระดาษนิ่งฆ่าเชื้อแล้วให้แห้งแล้วนำมาวางบนอาหาร ¼ PDA+chloramphenical และ WA+chloramphenical บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใช้เข็มเย็บตัดเส้นใยที่งอกจากชิ้นส่วนพืชวางบน Potato Dextrose Agar (Difco) เพื่อเพาะเลี้ยงให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์

การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์และการเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์

ตัวอย่างราเอนโดไฟท์ตั้งแต่ปี 2550-2552 ที่แยกได้ทั้งหมดประมาณ 500 ไอโซเลท เมื่อนำมาคัดแยกเพื่อเพาะเลี้ยงให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ โดยตัดปลายเส้นใยที่แยกได้จากชิ้นส่วนพืช นำมาวางบนอาหารเลี้ยงรา ¼ PDA เป็นเวลา 7-10 วัน หรือใช้วิธี Single spore (Single colony) เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีการปนเปื้อนราชนิดอื่นหรือแบคทีเรียอื่นๆ เพื่อสังเกตลักษณะเบื้องต้นสำหรับจัดจำแนกและบันทึกอัตราการเจริญเติบโต

ระหว่างการเลี้ยงให้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์พบว่าการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย ราชนิดอื่น และการกัดกินทำลายเส้นใยของไร (Mites) และการตายของตัวอย่าง ทำให้เหลือตัวอย่างที่นำมาเก็บรักษาประมาณ 400 ตัวอย่าง นำราเอนโดไฟท์เพาะเลี้ยงบน Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 7-10 วัน และตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก หรือใช้หัวเข็มเย็บแทงเส้นใยใส่ขวดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง (Nakasone *et al.*, 2004) และ 4 องศาเซลเซียส และเพิ่มการเก็บในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อผสมกับ 15% glycerol เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส (personal communication) เพื่อเก็บเป็น duplicate

วิธีการเก็บรักษาน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง และทำการตรวจสอบการรอดชีวิตด้วยการนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ พบว่าทุกตัวอย่างที่เก็บยังสามารถเติบโตได้ดี ซึ่ง Nakasone และคณะ (2004) ทำการศึกษาการเก็บสายพันธุ์ราด้วยวิธีนี้พบว่าสามารถเก็บได้ถึง 10 ปี ที่ 20 องศาเซลเซียส แต่การเก็บในระยะยาวก็ควรจะมีวิธีการเก็บที่เหมาะสมกว่านี้ เนื่องจากลักษณะภูมิอากาศ ณ ส่วนพฤกษศาสตร์ฯ จ.เชียงใหม่ มีความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างกลางวันกับกลางคืนค่อนข้างมาก ทำให้การเก็บที่อุณหภูมิห้องอาจจะไม่เหมาะสมในระยะยาว

การปนเปื้อนของแมลง เช่น ไร (Mite) ทำให้เกิดความเสียหายกับตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยง และตัวอย่างบางส่วนที่อยู่ในสภาพ slant PDA ในหลอดทดลองฝาเกลียว นอกจากการทำ

ความสะอาดแล้ว ต้องจัดสรรเวลาการปฏิบัติการเพื่อใช้สารเคมีรมห้อง (fumigation) ด้วยฟอร์มาลินและ ค้างทับทิม เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน และควรทำทุก 3-4 เดือน เพื่อลดความเสียหายหรือการตายของ ตัวอย่างราเอนโดไฟท์ที่เก็บรักษา ผู้เชี่ยวชาญแนะนำให้เปลี่ยนวิธีการเก็บ และเพิ่มวิธีการเก็บในน้ำที่ 4 องศาเซลเซียส (personal communication)

การเพาะเลี้ยงบนแผ่นสไลด์ (Slide culture)

การศึกษาลักษณะโครงสร้างราเอนโดไฟท์ทำได้โดยใช้เทคนิค slide culture ใน moist chamber ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมปฏิบัติ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลักษณะทั่วไปและโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์ ได้แก่ เส้นใย ก้านสปอร์ ถุงหุ้มสปอร์ สี ขนาดและลักษณะของสปอร์ เป็นต้น การเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture) ตัดอาหาร PDA ออกเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร คีบสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟ วางลงบนแท่งแก้วรูปตัววีในจานเพาะเชื้อ ใช้มีดผ่าตัด ยกชิ้นรูนที่ตัดไว้มาวางบนสไลด์ที่เตรียมไว้ ใช้เข็มเย็บเชื้อราแตะทั้งสี่ด้านของชิ้นรูน นำกระจกปิด สไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% เผาไฟ แล้วค่อยๆวางปิด เทน้ำกลั่นหนึ่งมาเช็ดลงไปให้ชุ่มกระดาษกรองปลอดเชื้อ ที่วางไว้ก้นจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มอุณหภูมิ 25 °C จนเส้นใยของราแผ่ขึ้นมาบน cover slip แยกแผ่น สไลด์และ cover slip ออกจากกันจะได้ slide culture ของราชนิดนั้นๆ 2 แผ่น หยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ เปลา วาง cover slip ที่มีเชื้อปิดทับลงไป ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนำไปจัดจำแนก

การหาชื่อวิทยาศาสตร์

การศึกษาลักษณะราเอนโดไฟท์โดยใช้เทคนิค Slide culture หรือเขียนใยย้อมสีด้วย methylene blue ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Stereomicroscope, Leica Zoom 2000, Microscope, Olympus รุ่น CH2 และ BX50)

คู่มือ (keys) ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของราเพื่อเป็นเครื่องช่วยยืนยันการจัดจำแนกให้มีความแม่นยำ สามารถจัดจำแนกราคได้ในระดับ division, class, order, family และ genus ในบางกรณีอาจแยกได้ถึงในระดับชนิด (species) ได้ เมื่อสามารถจำแนกราคได้ตามต้องการแล้วต้องตรวจสอบซ้ำเทียบกับ รายงานการวิจัยที่เคยมีมาก่อน ทั้งนี้ในการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เป็นสำคัญแล้ว ยังต้องอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของรานั้นจากการเพาะเลี้ยงด้วย (Tsuneo, 1994) คู่มือการจัดจำแนกที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ Barnett and Hunter (1998); Ellis (1971, 1973); Ellis and Ellis (1997); และ Kiffer and Morelet (2000)

ลักษณะทั่วไปของราสำหรับใช้จำแนก (Morphological examination)

1. ความแตกต่างของสีของโคโลนีของราบนจานเพาะเชื้อทั้งด้านบนและด้านล่าง
2. ลักษณะกลิ่นที่มีของรานั้น

3. ลักษณะของพื้ผิวโคโลนีของราที่ขึ้นบนอาหารเพาะเลี้ยงว่ามีลักษณะอย่างไร เช่น เส้นใยมีความเป็นฟู ฟู ม้วนตัว เป็นฝุ่นผง อ่อนนุ่มเหมือนกำมะหยี่ มีน้ำเกาะ เหนียว หรือเหมือนยีสต์ เป็นต้น
4. โคโลนีของรามีขอบลักษณะเรียบหรือไม่เรียบ
5. สีของเหลวที่ราสร้าง
6. ลักษณะโครงสร้างเพื่อสืบพันธุ์ต่างๆของรา เช่น โครงสร้างของ fruiting body, sclerotia และ pseudostroma เป็นต้น

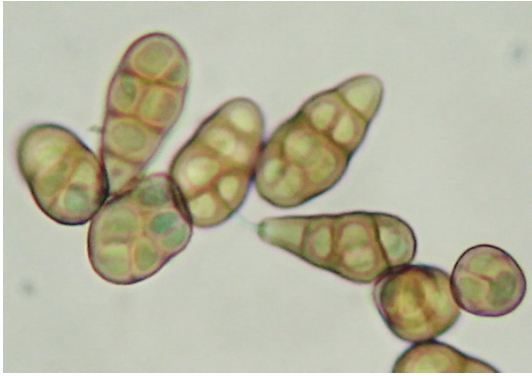
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ที่สำคัญในการจำแนก

1. ขนาด หมายรวมถึง ความกว้าง ความยาว และความหนา
2. สีของสปอร์
3. รูปร่างทั่วไป เช่น ลักษณะของเส้นใย (hyphae) ลักษณะเฉพาะของราในแต่ละกลุ่ม ลักษณะภายนอกของผิวสปอร์ และลักษณะพิเศษอื่นๆ

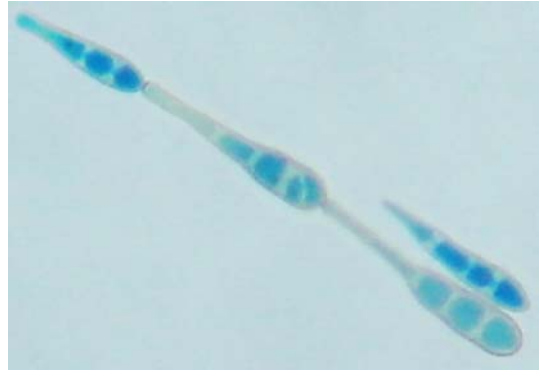
ผลการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์

- สามารถตรวจสอบชื่อสกุลจากตัวอย่างราบนโดไฟท์ประมาณ 400 ไอโซเลตได้ 12 สกุล (13 ชนิด) ได้แก่ *Alternaria* sp.1, *Alternaria* sp.2, *Aspergillus* sp.1, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici*, *Colletotrichum* sp.1, *Curvularia lunata*, *Curvularia oryzae*, *Fusarium semitectum*, *Geotrichum* sp.1, *Guignardia* spp., *Glomerella* spp., *Penicillium* sp.1, *Phyllosticta* spp., *Phomopsis* sp.1, *Phaeotrichoconis* sp.1 และยังไม่สามารถจำแนกในระดับสกุลได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม Basidiomycetes no.1, กลุ่ม Xylariaceae no.1-5 และกลุ่มที่ไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ (Mycelia Sterilia)

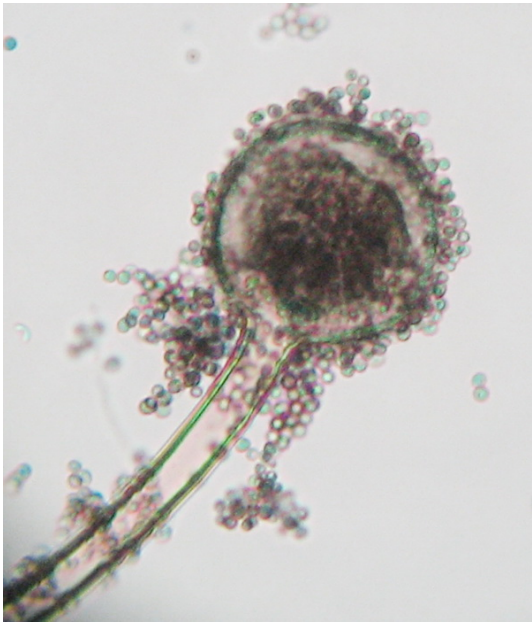
ในเบื้องต้นของการวิจัยนี้ยังขาดเอกสารและคู่มือ (Key) ทำให้ต้องใช้เวลาในการรวบรวมและค้นคว้าข้อมูล เพื่อนำมาใช้ในการจัดจำแนกราบนโดไฟท์ที่แยกได้ และจากการได้ศึกษาเทคนิคเบื้องต้นในการแยกราบนโดไฟท์กับการทำ slide culture เพื่อจัดจำแนกรา ภายใต้การแนะนำจากผู้เชี่ยวชาญ ทำให้ได้พัฒนาเทคนิคและความชำนาญในการปฏิบัติการมากขึ้น ทำให้เข้าใจถึงความยากของการจำแนกราบนโดไฟท์ ซึ่งถ้าต้องการจัดจำแนกถึงระดับชนิดนั้นต้องใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุลเข้ามามีส่วนด้วยอย่างมาก ในงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่สามารถทำได้ในระดับสกุลเท่านั้น สำหรับราบนโดไฟท์ที่ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้จะต้องนำมาเลี้ยง เพื่อเหนี่ยวนำให้สร้างสปอร์ เช่น เปลี่ยนสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง หรือปรับปัจจัย เช่น แสง อุณหภูมิ เป็นต้น เพื่อต้องการให้เห็นลักษณะของสปอร์ที่ชัดเจน ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ และยังมีตัวอย่างอีกจำนวนหนึ่งที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ จึงต้องศึกษากับผู้เชี่ยวชาญต่อไป



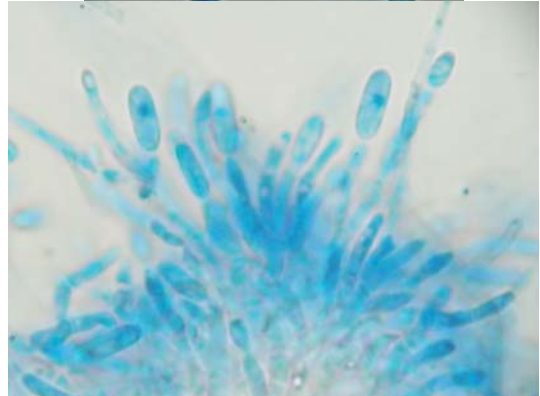
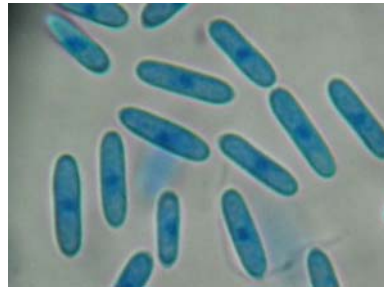
Alternaria sp.1



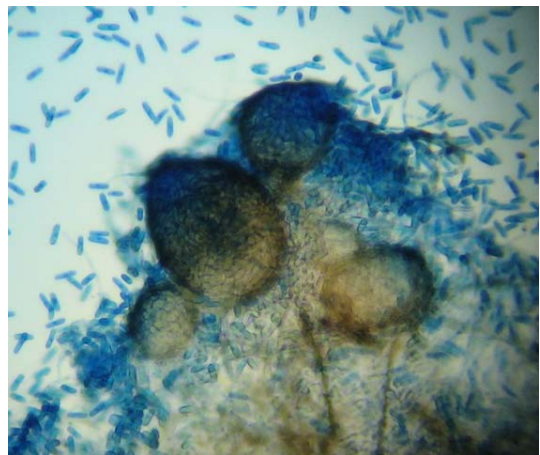
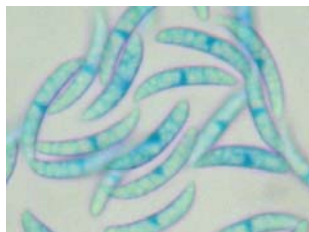
Alternaria sp.2



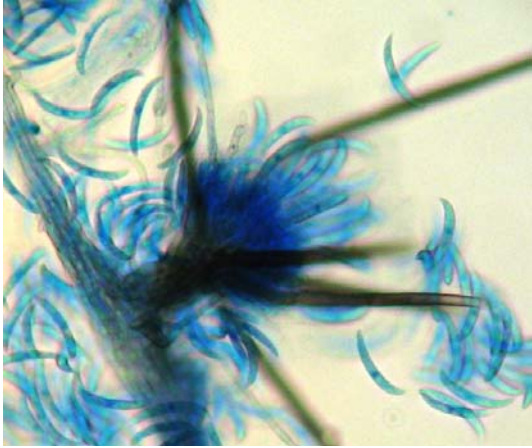
Aspergillus sp.1



Colletotrichum gloeosporioides



Colletotrichum sp.1



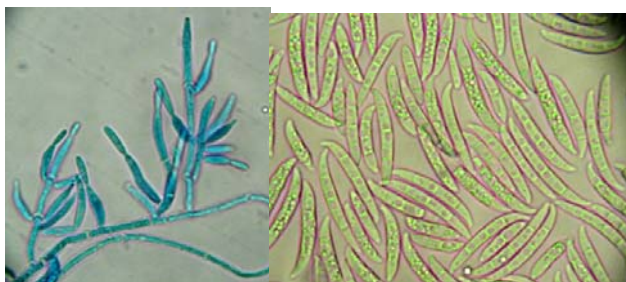
Colletotrichum capsici



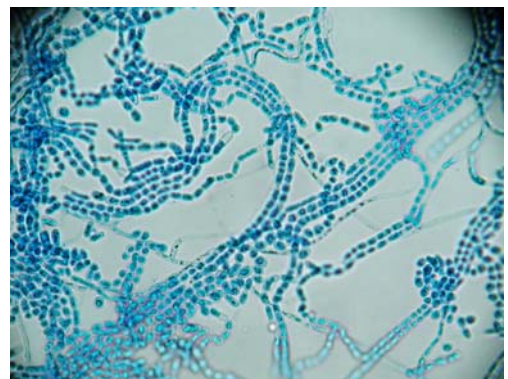
Curvularia lunata



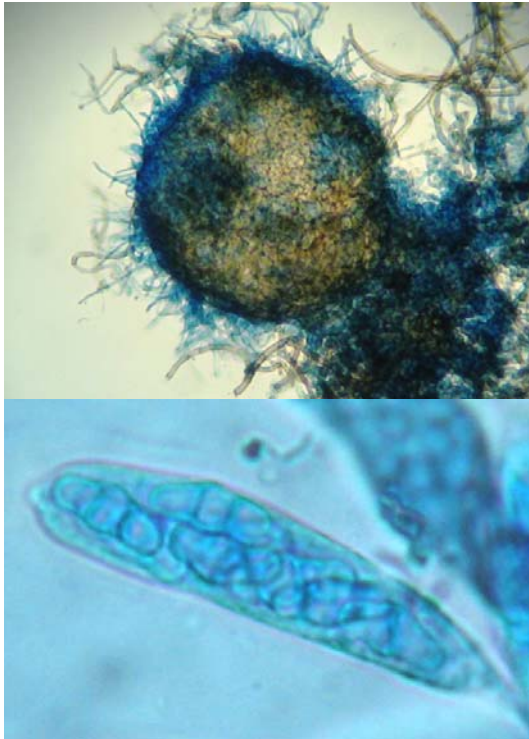
Curvularia oryzae



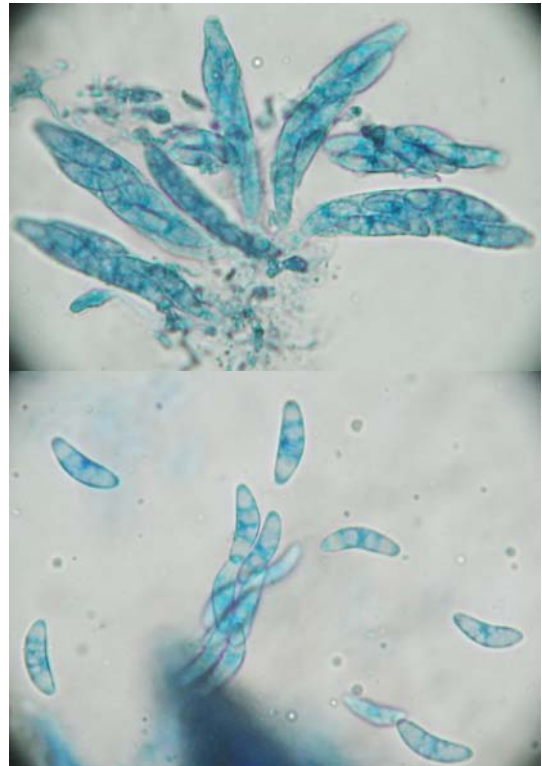
Fusarium semitectum



Geotrichum sp1.



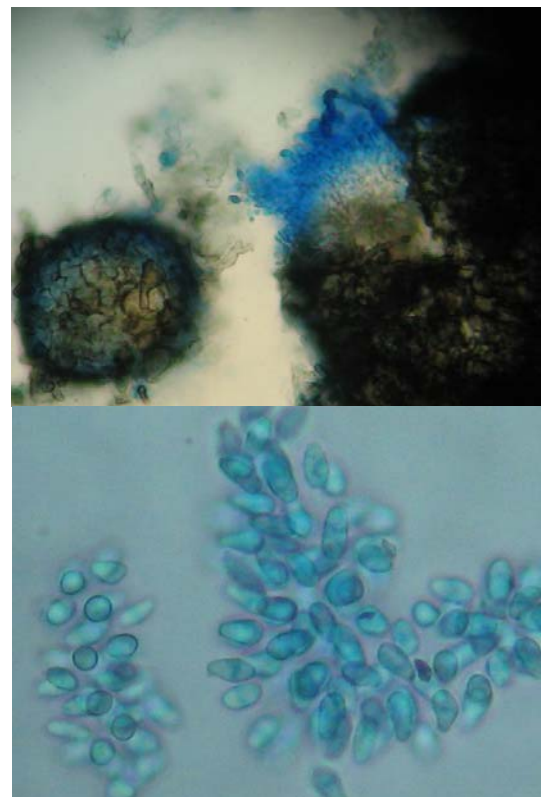
Guignardia spp.



Glomerella spp.



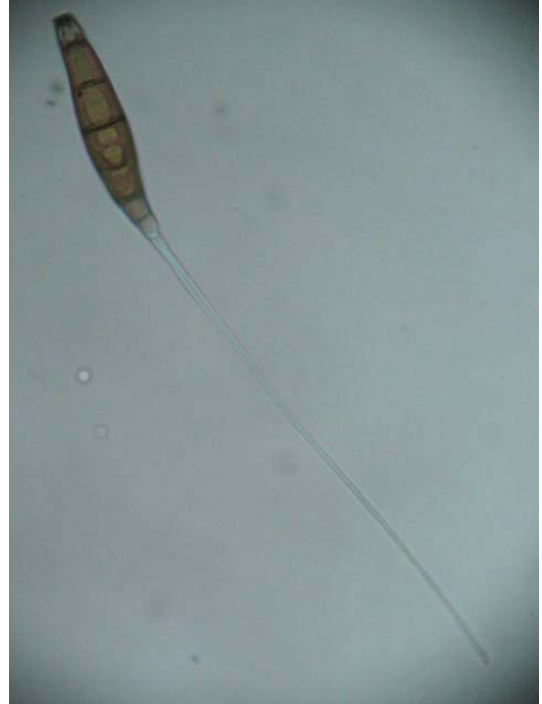
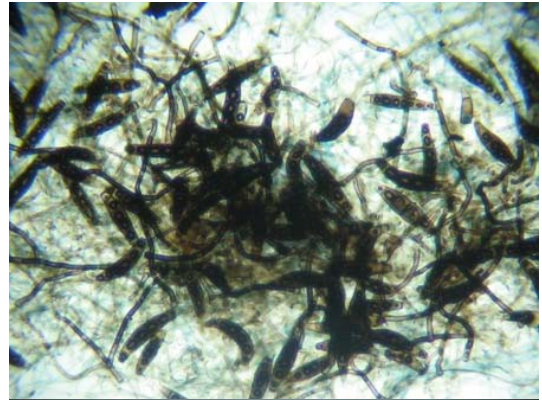
Penicillium sp.1



Phyllosticta spp.,



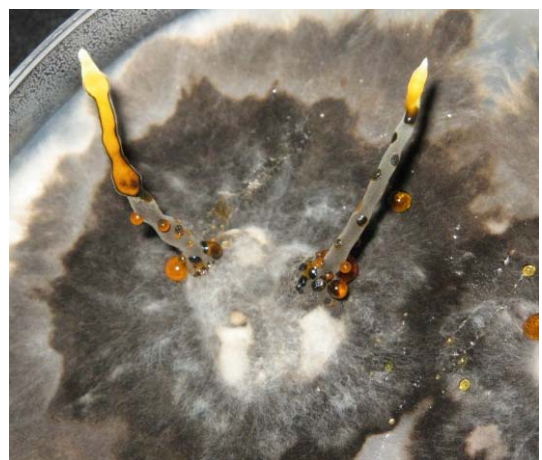
Phomopsis sp1



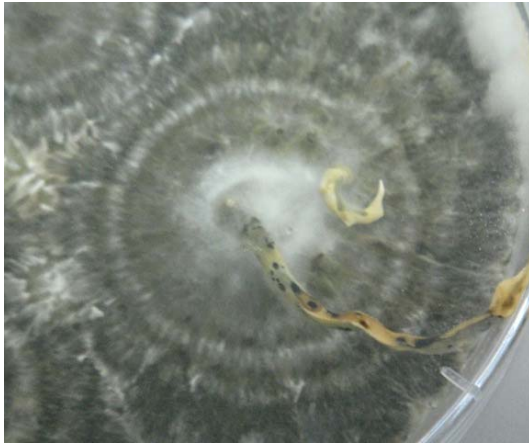
Phaeotrichoconis sp.1



Basidiomycetes no.1



Xylariaceae no.1



Xylariaceae no.2



Xylariaceae no.3



Xylariaceae no.4



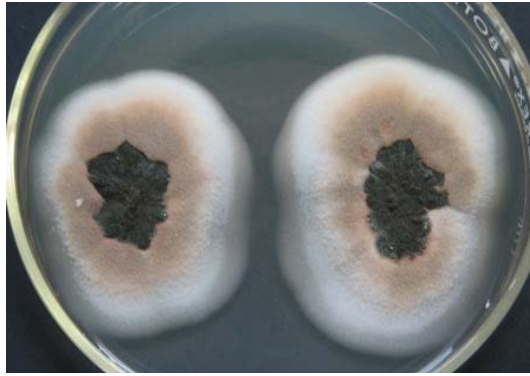
Xylariaceae no.5



Mycelia Sterilia no.1



Mycelia Sterilia no.2



Mycelia Sterilia no.3

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการสกัดและวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในการควบคุมศัตรูพืชที่ผลิตโดยเชื้อราประเภทเอนโดไฟต์ที่อาศัยอยู่ในพืชสกุลหนอนตายหายาก ได้รับงบประมาณปี 2550-2553 ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.สุญญา เวสสุตตร รศ.ดร.สรัญญา วัชรโรทัย ดร.ทวิรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล คุณส่งศรี พิพิธกุล ที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษาต่องานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- กนกพร อุ๋นใจชน. 2537. ความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงต่อหนอนกระทู้หอมในห้องปฏิบัติการ. ใน *เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 9 21 - 24 มิถุนายน 2537 กองกัญและสัตว์* วิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1 - 16.
- Bacon, C.W. and White, J.F. 2000. *Microbial Endophytes*. Marcel Decker Inc., New York.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth edition. The American Phytopathological Society.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, England.
- Ellis, M.B. 1976. *More dematiaceous hyphomycetes*. Commonwealth, Mycological Institute, Kew, UK.
- Ellis, M.B. and Ellis, J.P. 1997. *Microfungi on land plants: An Identification Handbook*. New enlarge edition. The Richmond Publishing, England.
- Greger, H. 2006. Structural Relationships, Distribution and Biological Activities of *Stemona* Alkaloids. *Planta Med* 72: 1-15.
- Kiffer, E. and Morelet, M. 2000. *The Deuteromycetes, Mitosporic Fungi: Classification and Generic Keys*. Science Publishers, USA.
- Nagasone, K.K., Peterson, S.W., and Shung-Chang Jong. 2004. Preservation and Distribution of Fungal Cultures. In *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. (Mueller et al., editors). Elsevier Academic Press. p. 37-47.
- Paterson, R.R.M. and Bridge, P.D. 1994. *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*. CAB International.
- Strobel, G. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5: 535-544.
- Strobel, G. and Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Dec: 491-502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., and Harper, J. 2004. Natural Products from Endophytic Microorganism. *J. Nat. Prod.* 67: 257-268.