บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

แปะก๊วย หรือต้น maidenhair มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ginkgo biloba* L. เป็นพืชโบราณที่ยังหลงเหลืออยู่ใน Division ของพืชพวกสน จัดอยู่ใน Family *Ginkgoaceae* ซึ่งเป็นสมาชิกเดียวใน Order Ginkgoales ที่สามารถอยู่รอดมาได้จากยุค Upper Jurassic ถึงยุค Lower Cretaceous และเรียกว่า living fossil (Tremouillaux-Guiller *et al.,* 2002) เนื่องจากเป็นพืชที่มีอายุเก่าแก่ที่สุดในโลก โดยมีประวัติศาสตร์ยาวนานย้อยหลังไปกว่า 200 ล้านปี (Foster, 2000) และใช้เป็นยาสมุนไพรมามากกว่า 5,000 ปี (มานพ, 2545) สำหรับประวัติของแปะก๊วยมีกำเนิดมาตั้งแต่ยุคสมัยก่อนประวัติศาสตร์ โดยพบเจริญเติบโตอยู่ในทุกแห่งของโลกในระหว่างยุคน้ำแข็ง อย่างไรก็ตามพบว่าส่วนใหญ่มีการสูญพันธุ์ไปเกือบหมด คงเหลือสืบพันธุ์ได้ในท้องถิ่นแถบเอเชียเท่านั้น โดยพบมากในป่าทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศจีน (มานพ, 2545; Foster, 2000; Tremouillaux-Guiller *et al.,* 2002) สำหรับในประเทศญี่ปุ่นพบว่ามีการปลูกแปะก๊วยเป็นไม้ประดับอยู่ในสวนของวัดญี่ปุ่นซึ่งดูแลบำรุงโดยพระสงฆ์ เมื่อประมาณ 1,000 ปีมาแล้ว (มานพ, 2545) ซึ่งปัจจุบันสามารถพบเห็นต้นแปะก๊วยที่มีขนาดความสูงมากกว่า 100 ฟุต และมีอายุมามากกว่า 1000 ปี ได้ตามวัดโบราณในประเทศญี่ปุ่น (Foster, 2000) ภายหลังจากมีการนำออกจากประเทศญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 1727 แปะก๊วยได้ถูกนำเข้าสู่ประเทศอเมริกาในปี ค.ศ. 1784 โดยมีการปลูกเป็นไม้ประดับอยู่ในสวนวิลเลี่ยมแอมมิลตัน เมืองฟิลาเดลเฟีย และหลังจากนั้นก็เริ่มมีการปลูกแพร่หลายในสวนสาธารณะ และสวนสมุนไพรของเมืองต่างๆ โดยเฉพาะเมืองใหญ่ๆ เช่น นิวยอร์คเป็นต้น (มานพ, 2545) สำหรับในทวีปยุโรปมีการนำเข้าต้นแปะก๊วยเป็นครั้งแรกเมื่อศตวรรษ 18 และได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในเวลาต่อมา โดยมีการนำไปปลูกเป็นไม้ประดับตามริมถนนในเมืองใหญ่ๆ โดยเฉพาะในเมืองลอนดอน อีกทั้งมีการปลูกไว้ในสวนสมุนไพรในประเทศฮอลแลนด์ (Foster, 2000)

สำหรับที่มาของชื่อแปะก๊วยในภาษาอังกฤษ (*Ginkgo biloba* L.) พบว่าชื่อ ginkgo ได้มาจากการออกเสียงคำในภาษาญี่ปุ่นที่เรียกพืชชนิดนี้ว่า ginkyo และคำที่มาจากภาษาจีนคือ yinkuo ซึ่งทั้งสองคำมีความหมายว่า “แอปริคอทสีเงิน” (มานพ, 2545) ส่วนชื่อ biloba ได้มาจากลักษณะรูปร่างของใบแปะก๊วยที่มีลักษณะคล้ายพัด ประกอบไปด้วยสองกลีบ (lobe) มาบรรจบกันตรงกลาง ซึ่งเป็นลักษณะที่โดดเด่นจำเพาะในพืชชนิดนี้ และจากลักษณะที่โดดเด่นนี้ทำให้ง่ายต่อการจัดจำแนกชนิดของพืชแปะก๊วย (Foster, 2000) ส่วนที่มาของชื่อ maidenhair ซึ่งใช้เป็นชื่อสามัญของแปะก๊วยนั้น ได้มาจากการที่ใบของแปะก๊วยมีลักษณะคล้ายกับต้นเฟิร์น maidenhair ซึ่งจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความคล้ายคลึงกันนี้ ทำให้มีนักวิทยาศาสตร์บางคนจัดแปะก๊วยเป็นพืชที่อยู่ระหว่างพืชชนิดเฟิร์นกับพืชพวกไม้ดอกชนิดอื่นๆ (มานพ, 2545)

แปะก๊วย จัดเป็นไม้ยืนต้นผลัดใบ (deciduous gymnosperm) ซึ่งมีทั้งชนิดตัวผู้และตัวเมียแยกจากกัน โดยลักษณะของดอกตัวผู้จะมองดูคล้ายหางแมวซึ่งเรียกว่า แคทคิน (catkin) ส่วนลักษณะของดอกตัวเมียจะมีรูปร่างคล้ายกับลูกปาล์ม บางทีเรียกว่าลูกนัท ในดอกตัวผู้จะมีเกสรตัวผู้เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ โดยกระแสลมจะพัดพาเกสรตัวผู้ไปผสมกับเกสรตัวเมีย ซึ่งเมื่อเกสรตัวผู้เข้าไปในรังไข่แล้วจะเกิดการผสม และกลายเป็นเมล็ดสีเหลืองยาวประมาณ 1 นิ้ว มีเปลือกสีเงินห่อหุ้มอยู่เมื่อยังเป็นผลอ่อน แต่เมื่อผลสุกเต็มที่แล้วจะมองเห็นผลเป็นสีเหลืองได้ชัดเจน โดยทั่วไปผลของแปะก๊วยจะมีกลิ่นเหม็น และมียางมาก ดังนั้นเวลาเก็บผลแปะก๊วยควรใส่ถุงมือป้องกัน (มานพ, 2545)

ความสำคัญของแปะก๊วย

แปะก๊วย จัดเป็นพืชที่มีความทนทานต่อโรค แมลง ความร้อน และมลพิษทางอากาศได้เป็นอย่างดี จึงมักนิยมปลูกตามเมืองใหญ่ๆ ที่ซึ่งมีสภาพแวดล้อมไม่เอื้ออำนวยแก่การเจริญเติบโตของพืชชนิดอื่น (รัตนา, ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์; Foster, 2000) โดยทั่วไปนิยมปลูกต้นแปะก๊วยเป็นไม้ประดับตามริมถนน และสวนสาธารณะเพื่อให้ร่มเงา อีกทั้งช่วยในการฟอกอากาศ (รัตนา, ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์) ซึ่งนอกจากความสำคัญในด้านสิ่งแวดล้อม แปะก๊วยยังมีความสำคัญในแง่ของพืชสมุนไพรที่มีการนำมาผลิตเป็นรักษาโรคได้หลายชนิด โดยจากอดีตพบว่าแปะก๊วยเป็นสมุนไพรที่สำคัญของชาวจีนมานานนับพันปี มีการนำมาใช้ในการบำบัดอาการไอ หอบหืด ภูมิแพ้ ได้ดีเท่าๆ กันกับการบำบัดโรคทางระบบเลือด ความจำเสื่อม และอาการต่างๆ ที่มาพร้อมกับความแก่ชรา นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมหนึ่งในตำราการแพทย์แบบฮินดู ซึ่งรู้จักกันในชื่อโซมา (soma) แต่ไม่ได้รับความนิยมในประเทศอเมริกา จนเมื่อในปี ค.ศ. 1980 ได้มีการแยกสารสกัดจากใบแปะก๊วยที่มีความสำคัญ 2 กลุ่มหลักคือ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid glycoside) หรือสารแอนตี้ออกซิแด้น (antioxidant) และสารเทอร์ปีน (terpene trilactone) หรือสารต้านทานการแข็งตัวของเลือด ซึ่งจะช่วยให้ระบบการไหลเวียนโลหิตดีขึ้น และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของสมองให้ดีขึ้นได้ (มานพ, 2545)

รัตนา (ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์) รายงานสรรพคุณของสารสกัดจากใบแปะก๊วยที่นำมาใช้เป็นยารักษาโรค ซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น flavonoid glycoside, A,-B,-C, biflavone (เช่น sciadopityrin และ ginkgetin) และ diterpene (เช่น bilobalide, ginkgolide, sterol และ organic acid เป็นต้น) ทั้งนี้การเก็บใบแปะก๊วยเพื่อนำมาใช้เป็นยาควรทำในช่วงฤดูใบไม้ร่วง ในขณะที่ใบเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ซึ่งจะพบสาร flavonoid ได้ในระดับสูง สำหรับสาร diterpene ที่มีอยู่ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารสกัดจากใบแปะก๊วยจะทำหน้าที่เป็น receptor antagonist โดยสามารถจับกับ Platelet-Activating-Factor (PAF) ซึ่งสาร PAF จะมีผลต่อการรวมตัวของเกล็ดเลือด และการหดตัวของกล้ามเนื้อหลอดลม โดย ginkgolide B จะมีฤทธิ์สูงสุด (IC50~10-7M) ทั้งนี้สรุปว่าสารสกัดจากใบแปะก๊วยจะช่วยป้องกันและรักษาความสมบูรณ์ของผนังเส้นเลือดฝอย และปรับปรุงระบบหมุนเวียนของเลือด ต่อต้านการอักเสบ การบวม (cerebral edema) และจัดเป็นสารแอนตี้-ออกซิแด้น (antioxidant) ที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ uric acid

การศึกษาเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับพืชแปะก๊วย

Aoki (1997) รายงานว่าการศึกษาเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับพืชแปะก๊วยมีน้อย เนื่องมาจากการแพร่กระจายของต้นแปะก๊วยพบได้น้อยในป่าทั่วไป และมีการจำกัดการใช้ในวงการอุตสาหกรรมการผลิตไม้ และยาสมุนไพรจากพืชแปะก๊วย จนถึงปัจจุบันความสนใจของนักวิจัยส่วนใหญ่จึงจำกัดอยู่แค่การศึกษาเชื้อราสาเหตุของโรคในต้นแปะก๊วยที่ปลูกตามริมถนน โดยมีรายงานการพบเชื้อราดังกล่าวในประเทศต่างๆ ดังนี้ เชื้อรา *Ceuthospora melaleuca* มีการพบในประเทศอังกฤษ, เชื้อรา *Fomes meliae*, *Glomerella cingulata*, *Irpex lacteus*, *Trametes hirsuta*, และ *Trametes versicolor* ซึ่งพบในประเทศอเมริกา, และเชื้อรา *Pestalotia sinensis* ที่พบในประเทศจีน เป็นต้น

สำหรับการศึกษาเชื้อราสาเหตุของโรคในต้นแปะก๊วย ที่มีรายงานว่าพบในประเทศญี่ปุ่น มีการบันทึกไว้จำนวนทั้งหมด 10 ชนิดได้แก่ เชื้อรา *Botrytinia fuckeliana* ที่เป็นสาเหตุของโรค gray mold, *Ceratobasidium anceps* ที่เป็นสาเหตุของโรค thread blight, *Erythricium salmonicolor* ที่เป็นสาเหตุของโรค pink disease, *Fusarium* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรค canker, *Gonatobotryum apiculatum*, *Helicobasidium mompa* ที่เป็นสาเหตุของโรค violet root rot, *Hendersonia ginkgonis* ที่เป็นสาเหตุของโรค brown leaf-spot, *Pestalotia ginkgo* ที่เป็นสาเหตุของโรค Pestalotia leaf-spot, *Rosellinia necatrix* ที่เป็นสาเหตุของโรค white root rot, และ *Thanatephorus cucumeris* ที่เป็นสาเหตุของโรค web blight (Aoki, 1997)

Aoki (1997) ได้ทำการศึกษาเชื้อราที่อาศัยอยู่ในใบแปะก๊วยที่มีการย่อยสลายในช่วงฤดูหนาวที่ประเทศญี่ปุ่น โดยแยกเชื้อจากตัวอย่างใบร่วง (leaf litter) ที่พบอยู่บริเวณใต้ต้นแปะก๊วย ซึ่งแบ่งชนิดของตัวอย่างที่พบออกเป็น 3 ชนิด ตามสภาพการย่อยสลายของใบ ชนิดแรกคือ L-type leaves เป็นใบที่มีสีน้ำตาลทองจนถึงสีน้ำตาลอ่อน และมีความยืดหยุ่น, ชนิดที่สองคือ L/F-type leaves ใบมีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาล และบางส่วนมีสีซีดขวา (discolored) ถึงน้ำตาลเทา เนื้อใบจะบางลงอย่างชัดเจนแต่ยังคงความยืดหยุ่น และตัวอย่างสุดท้ายคือ F-type leaves ที่ใบมีสีน้ำตาลเข้มถึงน้ำตาลเทา และเปราะบาง ภายหลังการแยกเชื้อพบเชื้อราทั้งหมด 36 ชนิด จากตัวอย่างใบทั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3 ชนิด ซึ่งในจำนวนนี้มีเชื้อราบางชนิดที่สามารถแยกพบได้ในทุกระยะการย่อยสลายของใบคือ *Pestalotiopsis gracilis*, *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium* sp., *Phoma* sp. และ unidentified coelomycetous species ส่วนเชื้อราชนิดอื่นๆ พบมีการแพร่กระจายเฉพาะตัวอย่างใบบางชนิดเท่านั้น ซึ่งจากเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้พบชนิดที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคในพืชแปะก๊วย คือเชื้อรา *Fusarium* และ *Pestalotia* (*Pestalotiopsis*) ในบางสปีชีส์ (species)

สำหรับการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์ในแปะก๊วยมีรายงานโดย Kim *et al*. (1999) ซึ่งทำการตรวจหาสาร taxol ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืช 2 ชนิดที่มีสรรพคุณทางยาคือ แปะก๊วย (*Ginkgo biloba)* และ *Taxus cuspidata* ในประเทศเกาหลี โดยสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 18 และ 12 ชนิดจากพืชแต่ละชนิดตามลำดับ โดยในจำนวนนี้พบเชื้อรา *Alternaria* ที่แยกได้จากแปะก๊วย มีการผลิต taxol ได้ในปริมาณที่สูงที่สุดคือเท่ากับ 260 ng/l และยังมีการผลิตสาร antifungal บางชนิดที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อรา *Pythium ultimu* อย่างไรก็ตามพบว่ากิจกรรมของสารเหล่านี้จะลดลงเมื่อเก็บเชื้อราเอนโดไฟต์ไว้ที่ 4 ºC เป็นเวลา 6 เดือน

นอกจากการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์ในแปะก๊วย ยังมีการรายงานการพบสาหร่ายเอนโดไฟต์ภายในเซลล์ของพืชแปะก๊วย โดย Tremouillaux-Guiller (2002) ได้ทำการเพาะเลี้ยง protoplast ที่ได้มาจากเซลล์ชนิด haploid ของพืชแปะก๊วยภายในหลอดทดลอง ซึ่งผลการทดลองมีการค้นพบเซลล์ของสาหร่าย Eukaryote ภายในเซลล์ของแปะก๊วย ซึ่งการค้นพบครั้งนี้ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่ามีการพบเซลล์ของสาหร่ายภายในเซลล์ของพืชชั้นสูง

เชื้อราเอนโดไฟต์

คำจำกัดความของเอนโดไฟต์มีอยู่ในรายงานการวิจัยมามากกว่า 100 ปี โดยเริ่มจาก de Bary (1866) (อ้างโดย Petrini, 1991) ได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า เอนโดไฟต์ หมายถึงจุลินทรีย์ทั้งหมดที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งต่อมา Carroll (1986) ได้กำหนดนิยามคำว่าเอนโดไฟต์ขึ้นมาใหม่ว่า เอนโดไฟต์ คือจุลินทรีย์ที่เข้าไปอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรคแก่พืชอาศัย ทั้งนี้ไม่นับรวมเชื้อราสาเหตุโรคพืช และเชื้อราพวก mycorrhiza แต่อย่างไรก็ตาม Petrini (1991) ได้เพิ่มเติมคำจำกัดความเดิมที่กำหนดไว้โดย Carroll โดยให้รวมจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ในช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตซึ่งจะสั้นหรือยาวก็ตามเข้ามาอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำอันตรายแก่พืชอาศัย ทั้งนี้พบว่าสภาพภายในเนื้อเยื่อพืชมีสภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญของเอนโดไฟต์ในหลากหลายกลุ่มทางระบบนิเวศน์วิทยา เกิดเป็นความสัมพันธ์ระหว่างเอนโดไฟต์กับพืชอาศัยในรูปแบบต่างๆ เช่น การพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันโดยเอื้อประโยชน์แก่ทั้งสองฝ่าย (mutualist)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

และการพึ่งพาอาศัยที่ฝ่ายหนึ่งได้รับประโยชน์แต่อีกฝ่ายไม่ได้ประโยชน์แต่ไม่เป็นอันตราย (commensal) นอกจากนี้ยังรวมไปถึงจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ก่อให้เกิดโรคแก่พืชอาศัย (latent pathogen) (Stone *et al*., 2000)

ความสำคัญของเชื้อราเอนโดไฟต์

เชื้อราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่ที่พบทั่วไปจัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycotina, Basidiomycotina, Deuteromycotina, และบางชนิดพบใน Class Oomycetes (Sinclair, 1991) การพบเชื้อราเอนโดไฟต์แพร่กระจายอยู่ทั่วต้นพืช โดยไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติใดๆ แก่พืชอาศัยนั้น คาดว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนี้น่าจะมีความสัมพันธ์กันในรูปแบบของการพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) (Petrini, No date) อีกทั้งยังมีรายงานการวิจัยจำนวนมากที่ระบุชัดเจนว่าเชื้อราเอนโดไฟต์กับพืชอาศัยในตระกูลหญ้าว่ามีความสัมพันธ์กันแบบ mutualism ที่เอื้อประโยชน์แก่พืชอาศัยในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ (Carroll, 1988; Clay, 1988a; 1988b; 1989) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเชื้อราเอนโดไฟต์มักจะสร้างเอนไซม์ (enzyme) ที่จำเป็นในการรวมกลุ่มขึ้นภายในเนื้อเยื่อพืชอาศัย จากการศึกษาการใช้สับสเตรท (substrate) และการวิเคราะห์ด้วย isozyme พบว่าเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่จะสามารถใช้ส่วนประกอบของเซลล์พืชได้ และมีการสร้าง factor ที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืชอาศัย (Bacon, 1988) อีกทั้งยังมีศักยภาพในการผลิตสาร secondary metabolite บางชนิดที่เอื้อประโยชน์แก่พืชอาศัยในการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อศัตรูพืช (Carroll, 1988; Fisher *et al*., 1984a; 1984b; 1986) ซึ่งจากศักยภาพนี้นำไปสู่การผลิตสารควบคุมทางชีวภาพ (biological control agent) ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร และเป็นแหล่งที่มาของสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ (unique metabolite) จำนวนหลายชนิดที่สามารถนำไปพัฒนาใช้ในอุตสหกรรมทางการแพทย์และเภสัชกรรมได้ (Suryanarayanan, 2002)

การศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์

จากการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์ในพืชอาศัยหลากหลายชนิด พบว่าโดยทั่วไปสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวนมากได้จากพืชแต่ละชนิดภายหลังการฆ่าเชื้อที่ผิวพืช (Petrini, 1986) โดยในจำนวนนี้สามารถตรวจพบเชื้อราเพียงแค่หนึ่งหรือไม่กี่ชนิดที่มีแบบแผนชัดเจน และสามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักของพืชอาศัยนั้นๆ (Petrini, 1991) สำหรับชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่แยกพบในพืชอาศัยแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสถานที่ที่พบพืชอาศัยชนิดนั้น (Petrini, 1987) โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ในไม้ยืนต้นที่เจริญเติบโตในบริเวณเดียวกันจะมีชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์เหมือนกัน แต่จะแตกต่างกันในปริมาณของเชื้อที่แพร่กระจาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แตกต่างกันในเนื้อเยื่อของพืชอาศัย และยังขึ้นอยู่กับอายุของเนื้อเยื่อพืชอาศัยนั้น (Pritini and Carroll, 1981; Espinosa-Garcia and Langenheim, 1990)

สำหรับเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลัก (dominant endophytic fungi) หมายถึงเชื้อราที่แยกพบได้บ่อยในพืชอาศัยนั้นๆ โดยจำนวนเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเนื้อเยื่อของพืชอาศัยแต่ละชนิด จะผันแปรไปตามอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเช่น ความสูงจากระดับน้ำทะเล ความสูงของกิ่งก้านสาขาที่แตกแขนงออกไปยังทิศทางต่างๆ โดยรอบต้น (canopy) ความชื้นในบริเวณที่เก็บตัวอย่าง และการสัมผัสลมของต้นพืช ซึ่งตัวแปรเหล่านี้คือ ปัจจัยทางกายภาพ (abiotic factor) ที่มีอิทธิพลต่อการเข้าไปอยู่อาศัยภายในต้นพืช (infection) ของเชื้อราเอนโดไฟต์ (Holdenrieder and Sieber, 1992)

มีรายงานการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชชนิดต่างๆ จำนวนมากดังนี้

Sahashi *et al.* (1999) ได้ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบ ก้านใบ และกิ่งอ่อนอายุประมาณ 1-5 ปีของ Japanese beech *(Fagus crenata* Blume.) ที่ไม่แสดงอาการของโรค และตรวจสอบความถี่ในการแยกพบเชื้อ หรือ Isolation Frequency (IF) เพื่อกำหนดเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักของ Japanese beech พบว่าสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมดจำนวน 13 ชนิด ซึ่งในจำนวนนี้พบ 3 ชนิด ที่มีค่า IF สูงคือ เชื้อรา *Discula* sp. และ unidentified sterile fungus (Lb) ที่มีค่า IF สูงในใบ และเชื้อ *Phomopsis* ที่มีค่า IF สูงในกิ่งอ่อน ซึ่งเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลัก 2 ชนิดที่แยกได้จากใบนั้น สามารถแยกพบได้เช่นเดียวกันในก้านใบ และกิ่งอ่อน ถึงแม้ว่าค่า Isolation Frequency (IF) ของเชื้อราเหล่านี้จะมีความแตกต่างกันไปในเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด ซึ่งผลที่ได้ชี้ให้เห็นถึงการแพร่กระจายของเชื้อราภายในพืชอาศัยที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อชนิดของเนื้อเยื่อพืชอาศัย (organ-specific distribution) และสามารถสรุปได้ว่าเชื้อราทั้ง 3 ชนิดนั้นเป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักของ Japanese beech

Taylor *et al.* (1999) ทำการตรวจหาเชื้อราเอนโดไฟต์ของปาล์ม (*Trachycarpus fortunei)* ทั้งบริเวณภายในและภายนอกของแนวเขตภูมิศาสตร์ตามธรรมชาติ (natural geographic range) พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่แยกได้จะมีความถี่ในการเกิดอยู่ในช่วง 23-57% ในทั้ง 4 เขตพื้นที่ทดลอง โดยพบเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมดจำนวน 75 ชนิด จากทั้ง 4 เขตทดลอง และพบว่ามีเชื้อราบางชนิดที่สามารถแยกพบเหมือนกันจากในแต่ละเขตทดลองประมาณ 7-13 ชนิด หรือเท่ากับ 81-89% ของจำนวนเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้ที่มีความถี่ในการเกิดมากกว่า 1% ซึ่งในจำนวนนี้พบว่าเชื้อรา *Glomerella cingulata* และ *Phomopsis* spp. เป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักที่แยกพบได้บ่อย และนอกจากนี้ยังพบเชื้อราตัวอื่นที่แยกพบได้ไม่บ่อยอีกเป็นจำนวนมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า จำนวนชนิดของเชื้อราที่แยกได้ในแต่ละเขตพื้นที่จะเหมือนกัน แต่จะต่างกันในปริมาณของเชื้อราที่แยกพบ และจากการสังเกตความแตกต่างของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อพืชที่แก่และเนื้อเยื่อพืชที่ยังอ่อน พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่ที่แยกได้จะแยกพบในเนื้อเยื่อแก่โดยไม่ขึ้นอยู่กับอายุของต้นปาล์ม และบริเวณที่พบเชื้อส่วนใหญ่จะพบบริเวณเส้นกลางใบมากกว่าบริเวณพื้นที่ระหว่างเส้นใบ โดยไม่ขึ้นอยู่กับอายุของใบหรืออายุของต้นพืช และจากการศึกษาความเฉพาะเจาะจงของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อเนื้อเยื่อพืช พบว่าไม่มีเชื้อราชนิดใดๆ ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเนื้อเยื่อใบและเนื้อเยื่อก้านใบ ยกเว้นแต่เชื้อราในกลุ่ม Xylariaceous ซึ่งเป็นเชื้อราเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเนื้อเยื่อของใบปาล์ม

Sahashi *et al.* (2000) ทำการเก็บตัวอย่างใบของ Japanese beech (*Fagus crenata*) ในระยะที่ใบมีการเจริญเติบโต (vegetative period) ในเขตพื้นที่ต่างๆ 5 แห่งในเขตโตโฮกุของประเทศญี่ปุ่น นำมาแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ ซึ่งพบเชื้อรา 2 ชนิดคือ เชื้อรา *Discula* sp. และเชื้อราอีก 1 ชนิดที่ไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ (sterile mycelium) ซึ่งสามารถกำหนดได้ว่าเป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ชนิดหลักของ Japanese beech และพบว่าเชื้อราทั้ง 2 ชนิดมีความสัมพันธ์กับใบของ Japanese beech ในเขตพื้นที่ที่แตกต่างกัน ซึ่งในแต่ละเขตพื้นที่ค่า Isolation Frequency (IF) ของ *Discula* sp. จะมากในเดือนมิถุนายน และลดลงในเดือนกรกฎาคมเรื่อยไปจนถึงเดือนตุลาคม ส่วนค่า IF ของ sterile mycelium นั้นจะยังคงมีค่า IF สูงจนถึงเดือนตุลาคม โดยสปอร์ของ *Discular* sp. จะถูกปลดปล่อยในระยะเวลาสั้นๆ ในช่วงปลายเดือนพฤษภาคมภายหลังจากหิมะละลาย จึงสรุปได้ว่าสปอร์เหล่านี้น่าจะมีความสำคัญในการเข้าไปอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช (infection) โดยเฉพาะใบพืชที่เพิ่งผลิตาใบออกมาใหม่ในช่วงเวลานั้น

Ragazzi *et al.* (2001) ทำการหาความสัมพันธ์ของค่า Isolation Frequency (IF) ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จาก *Quercus cerris* ที่เชื่อมโยงกับวันที่เก็บตัวอย่าง สภาวะของพืช และเนื้อเยื่อในส่วนต่างๆ ของพืช โดยทำการเก็บตัวอย่างปีละสามครั้งคือ ในเดือนเมษายน (ระยะที่ใบอ่อนแตกหน่อออกมา) เดือนมิถุนายน (ระยะที่ใบมีการเจริญเต็มที่) และเดือนตุลาคม (ระยะที่ใบเริ่มจะร่วง) เป็นระยะเวลา 2 ปี (ปี 1999 และ 2000) พบว่าสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมดจำนวน 15 ชนิด จากทุกชนิดของเนื้อเยื่อพืช โดยในเนื้อเยื่อกิ่งอ่อนนั้นจะสามารถพบเชื้อได้มากที่สุด และพบเชื้อทุกชนิดได้มากในเนื้อเยื่อของใบในต้นที่เสื่อมสลายมากกว่าในต้นที่แข็งแรง และเชื้อราที่แยกได้ส่วนใหญ่จะพบมากในเดือนมิถุนายน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Diplodia mutila, Discula quercina* และ *Phomopsis quercina* ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรค สามารถตรวจพบปรากฏบนต้นโอ๊กเกือบทั้งปี ซึ่งสรุปได้ว่าเชื้อราเหล่านี้มีบทบาทเป็นทั้ง saprophyte (หรือคือ endophyte) และ parasite ดังนั้นเป็นไปได้ว่าการแพร่กระจายของเชื้อเหล่านี้อาจเป็นปัจจัยส่งเสริมให้เกิดการเสื่อมลงของต้นโอ๊ก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Cannon and Simmons (2002) ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบของไม้ยืนต้นจำนวน 12 ชนิด ใน 2 เขตพื้นที่ใน Guyana พบว่าสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมดจำนวน 64 ชนิด จากตัวอย่าง 2520 ตัวอย่าง โดยในจำนวนนี้พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* sp., *Nodulisporium* sp., *Pestalotiopsis* sp. และ *Phomopsis* sp. มีความถี่ในการแยกพบ (IF) สูง ซึ่งการแพร่กระจายของเชื้อราจะพบมากบริเวณเส้นกลางใบมากกว่าบริเวณแผ่นใบ และบริเวณปลายสุดของใบจะพบเชื้อมากกว่าบริเวณที่ฐานของใบ

Parungao *et al.* (2002) ทำการตรวจสอบเพื่อกำหนดความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราที่เกิดขึ้นบนใบพืชจำนวน 13 ชนิดจากป่าในเขตฝนที่มีความแตกต่างกันสองแหล่งในเขตควีนสแลนด์ทางตอนหนือของประเทศออสเตรเลีย โดยตรวจพบเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมดจำนวน 57 ชนิด ซึ่งพบว่าเชื้อที่แยกได้จากป่าเขต Mt. Lewis จะมีปริมาณมากกว่าป่าในเขต Butchers Creek ซึ่งในจำนวนเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้ พบเชื้อราจำนวน 36 ชนิดที่แยกพบได้เฉพาะในเนื้อเยื่อของใบเท่านั้น จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความเฉพาะเจาะจงต่อเนื้อเยื่อของพืชอาศัย

Suryanarayanan (2002) ทำการศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์ที่เกิดขึ้นในใบของไม้ยืนต้นทั้งชนิดที่เป็น angiosperm และ gymnosperm จำนวน 5 ชนิด ในป่าไม้เขตอบอุ่น 4 แห่งใน Western Ghats พบว่าชนิดของเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นไม้ในป่าแบบ semi-evergreen มีความหลากหลายของเชื้อราสูงที่สุด โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ส่วนใหญ่จะสามารถแยกพบได้ในช่วงฤดูฝน และถึงแม้ว่าเชื้อราเอนโดไฟต์หลายชนิดในพืชอาศัยที่แตกต่างกันซึ่งเจริญเติบโตในป่าที่ต่างกันจะมีความเหมือนกันในชนิดของประชากร แต่อย่างไรก็ตามเชื้อราเอนโดไฟต์หลักนั้นจะแตกต่างกันไปในแต่ละเขตพื้นที่ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าต้นไม้ในเขตอบอุ่นแต่ละต้นจะมีเอนโดไฟต์อยู่จำนวนมากและมีความหลากหลายในชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวนมากเช่นกัน

Gennaro *et al.* (2003) ทำการศึกษาเพื่อประเมินความผันแปรในจำนวนประชากรของเชื้อราเอนโดไฟต์ และตรวจหาความสัมพันธ์ของเชื้อราเอนโดไฟต์กับความแข็งแรงของต้นโอ๊ก (English oak, *Quercus robur*) และต้นโอ๊ก (Turkey oak, *Q. cerris*) ทั้งในต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง และต้นที่มีลักษณะเสื่อมถอยเป็นโรค puzzle disease ซึ่งพบอยู่ทั่วไปในป่าโอ๊กทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศอิตาลี การทดลองทำโดยเก็บตัวอย่างจากตาใบในช่วงฤดูใบไม้ผลิและในฤดูใบไม้ร่วงจะเก็บตัวอย่างจากใบ ยอดอ่อน และกิ่งอ่อน ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมดจำนวน 26 ชนิด ซึ่งในจำนวนนี้พบเชื้อราชนิดที่พบบ่อยคือ *Tubakia dryina, Dendrodochium* sp., *Eutypella* sp. และ sterile mycelium และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเชื้อที่แยกได้จากกิ่งอ่อน และเชื้อที่แยกได้จากยอดอ่อน โดยพบว่าเชื้อรา *Tubakia dryina* จากกิ่งอ่อนจะพบในความถี่ต่ำ แต่จะแยกพบในความถี่สูงจากตาอ่อน ใบ และยอดอ่อน และจะพบเชื้อในความถี่ที่สูงมากในใบโอ๊กที่เสื่อมถอยและในตาอ่อนของต้นโอ๊กที่แข็งแรง นอกจากนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยังพบว่าในจำนวนเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่แยกได้จากใบ กิ่งอ่อน และยอดอ่อนของต้นโอ๊ก (English oak, *Quercus robur*) ที่เสื่อมถอยและเป็นโรคนั้นมีจำนวนน้อยกว่า เชื้อราที่แยกได้จากต้นโอ๊ก (Turkey oak, *Q. cerris*) ที่เสื่อมถอยและเป็นโรคเช่นกัน แต่ในต้นโอ๊กที่มีลักษณะแข็งแรงจะพบว่าจำนวนเชื้อราที่แยกได้นั้นไม่มีความแตกต่างกันระหว่างต้นโอ๊ก (English oak, *Quercus robur*) กับต้นโอ๊ก (Turkey oak, *Q. cerris*)

Ragazzi *et al*. (2003) ทำการตรวจหาเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมดภายในต้นโอ๊กจำนวน 3 ชนิด คือ *Quercus cerris, Q. pubescens* และ *Q. robur* ที่มีความอ่อนแอต่อโรคในเขตพื้นที่ทดลอง 3 แห่งในประเทศอิตาลี โดยศึกษาหน้าที่ของกลุ่มของเชื้อราเอนโดไฟต์ภายในเนื้อเยื่อใบ และกิ่งของต้นพืชที่มีสภาพแข็งแรง และทดสอบผลกระทบของตำแหน่ง altitude ต่อต้นพืช *Q. cerris* โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างจากต้นที่แข็งแรงและต้นที่เสื่อมถอย ในเดือนเมษายน (เวลาที่ตาใบแตก) มาทำการแยกเชื้อ โดยพบเชื้อราทั้งหมดจำนวน 27 ชนิด ซึ่งในจำนวนนี้พบ 7 ชนิดที่แยกพบได้ในต้นโอ๊กทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่เชื้อราชนิดอื่นๆ พบเพียงแค่บนต้นโอ๊กชนิดเดียว ผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงความเฉพาะเจาะจงของเชื้อราต่อพืชอาศัย และในจำนวนเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้พบบางชนิดที่มีบันทึกไว้ว่าเป็นเชื้อสาเหตุของโรคพืช เช่น *Apiognomonia quercina, Colpama quercinum, Diplodia mutila* และ *Phomopsis quercina* และจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชนิดของต้นโอ๊กที่นำมาใช้ทดสอบ

การเข้ามาอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชของเชื้อราเอนโดไฟต์

ในขณะที่เชื้อราเอนโดไฟต์ของหญ้ามีการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด (systemic) หรือที่เรียกว่า vertical transmission แต่เชื้อราเอนโดไฟต์ของไม้ยืนต้นโดยทั่วๆ ไป พบมีการถ่ายทอดผ่านทางสปอร์ (horizontally transmission) (Petrini *et al*., 1992; Wilson and Carroll, 1994) โดยสปอร์จะฟุ้งกระจายอยู่ในอากาศ ซึ่งเมื่อฝนตกน้ำฝนจะพาสปอร์เหล่านี้ตกลงบนใบพืช หลังจากนั้นสปอร์จะเพิ่มปริมาณบนผิวพืช และเริ่มมีการงอก germ tube ซึ่งเมื่อถึงฤดูร้อนความร้อนจากอากาศจะทำให้พืชอ่อนแอ และสปอร์จะสามารถเจริญเข้าไปอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเซลล์พืชได้ (Petrini, 1991; Wilson and Carroll, 1994) ซึ่งเมื่อศึกษาแบบแผนการเข้าไปอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช (infection) ของเชื้อราเอนโดไฟต์ พบว่าในขณะที่ใบยังคงอยู่ในตาใบนั้นจะปราศจากเอนโดไฟต์เข้ามาอยู่อาศัย (Wilson and Carroll, 1994) ซึ่งการเข้ามาอยู่อาศัยของเชื้อราเอนโดไฟต์นั้นจะเกิดขึ้นภายหลังจากที่ใบมีการพัฒนาจนสมบูรณ์แล้ว โดยอัตราการเข้ามาอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชนั้นจะเพิ่มขึ้นตามอายุของใบพืช (Pitrini, 1991; Rodrigues, 1994; Wilson, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในจำนวนเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่มีการแยกพบ พบว่าบางครั้งอาจมีการการปะปนของเชื้อราที่เป็น epiphyte ได้ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราที่เป็น epiphyte บางครั้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชได้ (Petrini, 1986) โดย O'Donnell and Dickison (1980) รายงานว่าเชื้อราที่เป็น epiphyte บางชนิดจะสามารถ penetrate เข้าสู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชอาศัยภายใต้ระบบนิเวศวิทยาและสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสม ยกตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Alternaria alternata, Cladosporium cladosporioides* และ *C. herbarum* ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณ phylloplane จะสามารถ penetrate เข้าสู่เนื้อเยื่อของใบได้ในขณะที่ใบพืชแก่ ซึ่งจากผลการทดลองของ Cabral (1985) สรุปว่าเชื้อราที่เป็น phylloplane จะเข้ามาอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชได้ เมื่อเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แท้จริงมีปริมาณลดลงในระยะที่ใบแก่ ซึ่งเอนโดไฟต์ชั่วคราว (facultative endophyte) เหล่านี้จะสามารถแยกพบได้ในระยะแรกของกระบวนการย่อยสลายในใบร่วงในปริมาณเท่ากันกับที่พบในเนื้อเยื่อของใบแก่

Ragazzi *et al.* (1999) ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จาก ตาใบ และกิ่งของต้นโอ๊ก (*Quercus cerris*) ที่เจริญอยู่ในสถานที่ทดลองที่แตกต่างกัน 2 แห่ง พบว่าสามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมดจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Discular querecina*, *Acremonium* spp., *Diplodia mutila, Phomopsis quercina, Hypoxylon mediterraneum, Cylindrocarpon* sp., *Phoma cava* และ *Trichoderma viride* ซึ่งพบว่าเชื้อราทั้งหมดมีการแพร่กระจายที่ไม่สัมพันธ์กับตำแหน่งของสถานที่ตั้ง (altitude) ซึ่งอยู่สูงเหนือระดับน้ำทะเล 600 m และไม่สัมพันธ์กับความแตกต่างระหว่างสถานที่ทดลองทั้ง 2 แห่ง ซึ่งเมื่อทำการศึกษาการปรากฏของเชื้อ *D. querecina* ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของต้นโอ๊ก พบว่าสามารถแยกเชื้อ *D. querecina* ได้จากทั้งจากในกิ่ง (18.02% จากเนื้อเยื่อภายในกิ่ง และ 5.82% จากเปลือกไม้ของกิ่ง) และในตาใบ (11.62% จาก embryo และ 14.55% จากเปลือกหุ้มตาใบ) ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *D. querecina* มีความสัมพันธ์กับต้นโอ๊กที่เป็นพืชอาศัยในแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) แม้ว่าการเข้ามาอยู่อาศัยภายในพืชบริเวณลำต้นเหนือดินน่าจะมาจากการเข้ามาอยู่อาศัยของ wind-borne inoculum แต่ก็มีเส้นใยของเชื้อราจำนวนเล็กน้อยที่มีการแผ่ขยายมาจากเนื้อเยื่อในส่วนของกิ่งและมาอาศัยอยู่ที่ใบ

ความต่อเนื่องของเชื้อราเอนโดไฟต์

Rayner and Todd (1979) ได้กำหนดนิยามของความต่อเนื่องของเชื้อรา (fungal succession) ว่าคือ การเข้าครอบครองอย่างต่อเนื่องของเส้นใยในเชื้อราแต่ละชนิดที่มีความแตกต่างกันภายในตำแหน่งเดียวกัน

เชื้อราเอนโดไฟต์สามารถแยกพบได้บ่อยในระยะแรกของกระบวนการย่อยสลายของใบร่วง (Aoki *et al*., 1990) ซึ่งบทบาทของเอนโดไฟต์ในขณะที่ใบร่วงนี้ เกี่ยวข้องกับการเข้ามาใช้ประโยชน์จากแหล่งพลังงานที่เกิดขึ้นในช่วงระยะแรกที่ใบร่วง และในระยะที่ใบเริ่มมีการย่อยสลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(Boddy and Griffith, 1989) สำหรับการศึกษาความต่อเนื่องของเชื้อราเอนโดไฟต์ในไม้ผลัดใบ (deciduous) สามารถแยกพบเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวนหลายชนิด ได้แก่ *Xylaria* sp., *Nodulisporium* sp., *Geniculosporium* sp., *Idriella* sp., *Fusarium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Hormonema* sp., *Exphiala* sp., *Phomopsis* sp., *Ascochyta* sp., *Colletotrichum* sp., *Cryptosporiopsis* sp., *Sphaeropsis* sp. ซึ่งจะสามารถแยกพบได้ทันทีจากใบที่เพิ่งร่วงใหม่ในป่าไม้พวก angiosperm ดังนั้น กลุ่มของเอนโดไฟต์ที่เกิดขึ้นในภาวะต่อเนื่องชั่วคราวเหล่านี้จะเริ่มต้นจากเป็นผู้บุกรุกแบบแฝง (latent pathogen) ในต้นไม้ และจะขยายออกไปเป็นการเข้าไปอยู่บริเวณพื้นผิวของชั้นใบร่วงที่มีการทับถมกัน ซึ่งในที่สุดจะถูกแทนที่ด้วยเชื้อราที่เป็น secondary saprobe ในชั้นที่ต่ำลงไป (Bills, 1996)

Tokumasu (1998) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลที่มีผลกระทบต่อความต่อเนื่องของเชื้อราภายในใบสนที่ร่วงหล่น โดยทำการเก็บตัวอย่างใบร่วงจากบริเวณพื้นดินในป่าสนในแต่ละฤดูกาล มาทำการแยกเชื้อด้วยวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิว ซึ่งผลจากการสังเกตความต่อเนื่องของเชื้อราภายในใบร่วงที่แยกได้จากทั้ง 4 ฤดู สามารถแบ่งเชื้อราที่ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม และสรุปได้ว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดความต่อเนื่องของเชื้อราภายในใบร่วง

Osono (2002) ได้ทำการแยกเชื้อรา phyllosphere fungi จากใบ ใบแก่ ใบที่เพิ่งร่วงใหม่ และใบที่เริ่มมีการย่อยสลาย จากพืช *Fagus crenata* โดยวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิว และวิธี washing method เพื่อตรวจหาการเกิด การเข้ามาอยู่อาศัย และความต่อเนื่องของเชื้อรา phyllosphere fungi ภายในใบร่วง (leaf litter) พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมดจำนวน 18 ชนิดจากใบ และ 47 ชนิดจากใบแก่ ซึ่งในจำนวนนี้มี 15 ชนิดที่แยกพบบ่อย และเชื่อว่าเป็นเชื้อรา phyllosphere fungi โดยเชื้อเหล่านี้จะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามความถี่ในการแยกพบบนใบร่วงใหม่ และใบที่เริ่มมีการย่อยสลาย โดยในกลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยเชื้อ 9 ชนิด ซึ่งพบบ่อยในใบที่เริ่มมีการย่อยสลาย กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยเชื้อ 2 ชนิดที่พบเฉพาะในใบที่เพิ่งร่วงใหม่ และกลุ่มที่ 3 ประกอบไปด้วยเชื้อ 4 ชนิด ที่แยกพบได้บ่อยในใบและใบที่แก่เท่านั้น การศึกษาการเข้ามาอยู่อาศัยของเชื้อรา phyllosphere fungi ในใบที่เพิ่งร่วงใหม่โดยทดสอบหาความสามารถของเชื้อในการเข้าไปอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อของพืชอาศัย (infection) ในใบพืชที่เพิ่งร่วงใหม่โดยตรง พบว่าเชื้อรา 4 ชนิดที่แยกได้จากใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อจะมีความถี่ต่ำกว่าใบที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในขณะที่ความถี่ของเชื้อราชนิดอื่นๆ จะไม่แตกต่างกันระหว่างเชื้อที่แยกได้จากใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อกับใบที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ การศึกษาความต่อเนื่องของเชื้อราเอนโดไฟต์ และ epiphyte ในระหว่างกระบวนการย่อยสลายของใบ พบว่าผลรวมค่าความถี่ของเชื้อราเอนโดไฟต์จะลดลงอย่างชั่วคราวในใบที่เพิ่งร่วงใหม่และเพิ่มขึ้นในใบที่กำลังย่อยสลาย ส่วนผลรวมค่าความถี่ของ epiphyte จะลดลงตั้งแต่ใบร่วงใหม่ไปจนถึงใบที่กำลังย่อยสลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Osono (2003) รายงานว่าภายหลังจากการทำ pretreatment ด้วยเชื้อรา phyllosphere fungi จำนวน 2 ชนิดที่แยกได้จากต้น beech ซึ่งได้แก่เชื้อรา *Xylaria* sp. และเชื้อรา *Ascochyta* sp. ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพขึ้นในใบร่วง (leaf litter) ซึ่งมีผลต่อการย่อยสลายของใบร่วงที่เกิดขึ้นโดยเชื้อราจำนวน 12 ชนิดในลำดับต่อมา จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา 1 ชนิดคือเชื้อรา *Mycena* sp. จากเชื้อราทั้งหมด 12 ชนิด สามารถทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหนักมวลรวมสูงมากอย่างมีนัยสำคัญในใบร่วงที่มีการย่อยสลายไปแล้วบางส่วนโดยเชื้อ *Xylaria* sp. และในใบร่วงที่มีการย่อยสลายไปแล้วบางส่วนโดยเชื้อ *Ascochyta* sp. เมื่อเทียบกับตัวควบคุม ในขณะที่เชื้อราตัวอื่นอีกจำนวน 11 ชนิดไม่ได้รับผลกระทบจากการที่ใบร่วงได้ผ่านการ pretreatment ด้วยเชื้อราทั้งสองชนิด

Osono *et al.* (2003) ได้ศึกษาแบบแผนการกระจายตัวของเชื้อราภายในใบร่วงจากพืช *Chamaecyparis obtusa* ในช่วงที่ใบมีการย่อยสลายในระยะเวลา 1 ปี และทำการทดสอบหาปัจจัยที่มีผลในการควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใยภายในใบร่วงซึ่งทับถมกันบริเวณพื้นดิน โดยแบ่งออกเป็น 4 ชั้นคือ ชั้น L1, L2, F, และ H layers ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าความยาวของเส้นใยที่มีชีวิต (live hyphal length) จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของโฮโลเซลลูโลสภายในใบร่วงทั้ง 4 ชั้น ส่วนการศึกษาความต่อเนื่องของเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับองประกอบทางเคมีอินทรีย์ภายในใบ และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ตรวจพบภายในใบร่วงที่กำลังย่อยสลายภายในถุง litter bag พบว่าความยาวของเส้นใยที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตจะเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่ใบมีการย่อยสลายซึ่งจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ ไนโตรเจน, ลิกนิน, โฮโลเซลลูโลส และคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ละลายน้ำได้ (soluble carbohydrate) ภายในใบร่วงนั้น ซึ่งการตรวจหาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยในช่วงเวลา 12 เดือนที่ใบมีการย่อยสลายนั้นทำโดยตรวจวัดในแต่ละฤดูกาล และประเมินหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า water content กับความยาวของเส้นใยที่มีชีวิต ซึ่งผลการทดลองพบว่าความยาวของเส้นใยที่มีชีวิตจะสัมพันธ์กับค่า water content ของใบร่วงในแต่ละฤดูกาล โดยค่าความสัมพันธ์เหล่านี้ยังสัมพันธ์กันแบบบวกกับค่าความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ละลายน้ำได้ในแต่ละช่วงเวลาเช่นกัน ซึ่งสรุปได้ว่าการเจริญของเส้นใยของเชื้อรานั้นขึ้นอยู่กับสภาพความชื้น และคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ละลายน้ำได้ที่มีอยู่ในใบร่วง

การเก็บรวบรวมและการขนย้ายตัวอย่างพืช (Bills, 1996)

การขนย้ายตัวอย่างพืชนั้นควรเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชให้อยู่ในสภาพดีอยู่เสมอ เพื่อทำให้การนำมาเพาะเลี้ยงในขั้นตอนต่อไปได้ผลดี ทั้งนี้พบว่ามักเกิดปัญหาเมื่อมีการเก็บตัวอย่างพืชจากพื้นที่ที่อยู่ห่างไกล อีกทั้งการนำส่งตัวอย่างพืชสดจำเป็นต้องระมัดระวังไม่ทำให้ชิ้นส่วนพืชแห้งหรือเนื้อเยื่อพืชตายเพื่อจุดประสงค์ในการนำไปแยกเชื้อ ดังนั้นจึงต้องมีการจัดการในการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถ่ายเทอากาศให้เป็นไปในสัดส่วนที่เหมาะสม โดยควบคุมการกักเก็บความชื้นจากกระบวนการหายใจของพืชเพื่อป้องกันสภาวะความชื้นสูง และกดการเจริญเติบโตของเชื้อรา epiphyte และแบคทีเรียที่ผิวของพืชตัวอย่าง ในขณะเดียวกันถ้าจำเป็นต้องขนย้ายตัวอย่างพืชข้ามพรมแดนประเทศควรมีการขออนุญาตให้เรียบร้อยก่อนทุกครั้ง เพื่อความถูกต้องตามกฎหมายในแต่ละประเทศการขนย้ายตัวอย่างพืชที่ใช้เวลานานควรหลีกเลี่ยงการเก็บตัวอย่างพืชในถุงพลาสติกที่ปิดมิดชิด เนื่องจากความชื้นและอุณหภูมิที่อยู่รอบๆ ผิวตัวอย่างพืชจะเพิ่มขึ้น และทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา epiphyte ที่อยู่บริเวณผิวใบที่สามารถเข้าไปอยู่อาศัย (infection) ภายในเนื้อเยื่อพืชภายหลังจากเก็บตัวอย่างจนถึงก่อนกระบวนการฆ่าเชื้อที่ผิว เมื่อมีการเก็บตัวอย่างพืชในสภาวะร้อนชื้นควรเป่าผิวพืชให้แห้งก่อนการบรรจุและขนส่ง อย่างไรก็ตามการขนส่งพืชที่ต้องใช้เวลานานควรห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษที่ทนทาน ถุงผ้ามัสลิน หรือถุงดิน Tyvek® และการเก็บตัวอย่างพืชไว้เป็นเวลานานโดยเฉพาะตัวอย่างที่เก็บไว้ในตู้เย็นจะทำให้เนื้อเยื่อพืชแห้งซึ่งทำให้มีการสูญเสียเชื้อราบางชนิด ภายในเนื้อเยื่อพืชไป

การแยกเชื้อราเอนโดไฟต์และวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิว

การเลือกตัวอย่างพืชและวิธีการแยกเชื้อมีความจำเป็นที่จะต้องเลือกวิธีการที่สามารถนำมาใช้ได้จริง และออกแบบการทดลองที่เหมาะสมก่อนที่จะลงมือทำการวิจัย (Bills, 1996)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในการฆ่าเชื้อที่ผิวให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์ในการลดการปนเปื้อนของสปอร์หรือเส้นใยของเชื้อที่อยู่บริเวณพื้นผิวภายนอกของตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามเป็นไปได้ว่าสปอร์หรือเส้นใยบางส่วนที่อยู่บริเวณพื้นผิวชั้น epidermis ของพืชอาศัยนั้นจะสามารถอยู่รอดได้ภายหลังจากการฆ่าเชื้อที่ผิว ซึ่งอัตราการอยู่รอดของสปอร์เหล่านี้จะแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเทคนิคที่นำมาใช้ในการฆ่าเชื้อที่ผิว (Petrini, 1986) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าไม่มีวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิววิธีการใดที่ได้ผลดีเยี่ยมโดยตลอด ยกเว้นแต่การฆ่าเชื้อที่ผิวในตัวอย่างพืชที่ไม่มีการ penetrate ของเชื้อใดๆ ซึ่งในความเป็นจริงควรเลือกใช้วิธีการที่จะสามารถลดปริมาณของเชื้อราที่อยู่บริเวณผิวพืชให้เหลือน้อยที่สุด ซึ่งพบว่าการเลือกระยะเวลาในการฆ่าเชื้อที่ผิว ความเข้มข้นและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่ผิวนั้นจำเป็นต้องคำนึงถึงความหนาของตัวอย่างพืช พื้นผิวของตัวอย่างกับความสามารถที่น้ำจะแทรกซึมเข้าไปได้ และโครงสร้างของผิวพืช (Bills, 1997) ดังแสดงในตารางที่ 1

สำหรับวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิวที่มักนำมาใช้กันมีหลากหลายวิธีแต่วิธีที่นิยมมากที่สุดคือวิธีการฆ่าเชื้อใน 3 ขั้นตอน โดยขั้นแรกจะนำตัวอย่างพืชมาแช่ใน 96% ethanol เป็นเวลา 1 นาที (ใน lichen และ moss ใช้เวลาเพียง 30 วินาที) ตามมาด้วยขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวโดย sodium hypochlorite ส่วนเวลาและความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ดังแสดงใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 และสุดท้ายจุ่มตัวอย่างพืชอีกครั้งใน 96% ethanol เป็นเวลา 30 วินาที (Petrini, 1986) ส่วนสารเคมีตัวอื่นๆ ที่นำมาใช้ในขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวได้แก่ hydrogen peroxide solution ที่โดยทั่วไปมักจะใช้ในการฆ่าเชื้อโรค แต่ไม่นิยมใช้แพร่หลายในการศึกษาการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ ส่วนการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.05-1% peracetic acid ใน 30% ethanol น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีกว่าการใช้สารละลาย sodium hypochlorite นอกจากนี้ยังมีการใช้ 96% ethanol ตามด้วย 0.1% mercuric chloride และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อสำหรับการฆ่าเชื้อที่ผิวของใบพืช *Eucalyptus viminalis* Labill. และการฆ่าเชื้อที่ผิวของใบพืช *Populus tremuloides* Michx. จะใช้ 0.1% silver nitrate และล้างด้วย sodium chloride สำหรับวิธีการการฆ่าเชื้อที่ผิวของกิ่งไม้ที่มีขนาดใหญ่ทำโดยจุ่มชิ้นพืชลงใน ethanol และนำมาลนไฟ ซึ่งพบว่าวิธีนี้เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพอย่างดีเยี่ยม ซึ่งทำโดยนำลำต้นของพืชมาจุ่มลงใน ethanol และจุดไฟกับตะเกียง Bunsen จากนั้นทำการแยกเปลือกไม้ออกจากแกนในแล้วนำไปเพาะเลี้ยงแยกส่วนกัน ส่วนการล้างชิ้นส่วนพืชโดยปล่อยให้น้ำประปาไหลผ่าน (tap water) ก่อนจะนำไปฆ่าเชื้อที่ผิวนั้น พบว่าสามารถลดเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่ผิวลงได้ แต่อย่างไรก็ตามการล้างชิ้นพืชโดยปล่อยน้ำประปาไหลผ่านเพียงอย่างเดียวไม่สามารถกำจัดเชื้อบางชนิดที่ฝังตัวอยู่ตามพื้นผิวที่ไม่สม่ำเสมอของพืชได้ ดั้งนั้นควรเลือกใช้วิธีการล้างชิ้นส่วนพืชผ่านน้ำไหลควบคู่ไปกับวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิวในวิธีการอื่นๆ ร่วมด้วย (Bills, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 วิธีการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากตัวอย่างพืชที่เป็นไม้ยืนต้นชนิดต่างๆ (Bills, 1996)

ชนิดของเนื้อเยื่อพืชอาศัย	การตัดชิ้นพืช	การฆ่าเชื้อที่ผิว	อาหารเลี้ยงเชื้อ	หมายเหตุ
Spines และลำต้นของ *Ulex* spp.	Spines และลำต้นขนาด 2 cm	96% ethanol 1 นาที, 3.25% NaOCl 3 นาที, 96% ethanol 30 วินาที	malt extract agar	ความถี่ของการแยกพบเพิ่มขึ้นจากลำต้นอ่อนถึงลำต้นอายุประมาณ 2 ปี
bark ของ *Fagus grandifolia*	เจาะ 2 mm	propane torch	bark extract, glucose-yeast extract, benomyl malt extract	bark plate in the field
xylem และ bark ของ *Alnus* spp.	ตัดลำต้น 1 cm ส่วน bark และ xylem เพาะเลี้ยงแยกส่วนกัน	35% peracetic acid	malt extract กับ cyclosporin A 10 mg/l	Multivariate analysis ใน bark และ xylem และ *Alnus* spp 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้แยกความแตกต่างภายในสังคมของเชื้อราได้
bark ของ *Castanea dentata, Quercus rubra*	เจาะโค้ง 5 mm	0.525% NaOCl 10 นาที	glucose-yeast extract	Microtiter plate สำหรับรักษา sequence ของตัวอย่าง bark
ลำต้นที่โตเต็มที่ของ *Picea abies*	เลื่อย และตามด้วย Chisel extract	ใช้เพียงอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	malt agar ใน slants	ความถี่ของ isolate จะบรรยายไปตามการตัดขวางและตามความยาวของแกนกลางของ sound และ wounded wood
รากของ *Picea abies*	ขนาด 1 cm	sink washing, ultrasound, serial washing	malt extract agar	primary fungi 3 กลุ่มที่บ่งชนิดได้ เกี่ยวข้องกับ site altitude และ edaphic factor

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดของเนื้อเยื่อพืชอาศัย	การตัดชิ้นพืช	การฆ่าเชื้อที่ผิว	อาหารเลี้ยงเชื้อ	หมายเหตุ
กิ่งของ *Fraxinus excelsior, Quercus robur, Fagus sylvatica*	ขนาด 2 cm ส่วน bark และ xylem เพาะเลี้ยงแยกส่วนกัน	จุ่มชิ้นพืชใน ethanol แล้วลนไฟ	malt extract agar	ความต่อเนื่องของกระบวนการย่อยสลายภายหลังจากการบากรอบต้นไม้
bark ของ *Carpinus caroliniana*	1 cm leather punch	0.525% NaOCl 3 นาที, เผาด้วยตะเกียง alcohol	malt yeast extract agar กับ benomyl surfactants, mycosel agar	การฆ่าเชื้อที่ผิวที่ไม่สมบรูณ์เปรียบเทียบกับการฆ่าเชื้อที่ผิวใน 3 ขั้นตอน
ต้นกล้าของ *Rhizophora mangle*	ใช้ cork borer ขนาด 1.1-2 cm ของ hypocotyl และ radicle	ล้างด้วยน้ำทะเล ฆ่าเชื้อ, 0.1% $HgCl_2$ ใน 5% ethanol	mangrove-sea water agar, 4% mangrove ground, mangrove seedling ในน้ำทะเล	ความต่อเนื่องของเชื้อราในต้นกล้าพืชที่เก็บอยู่ในถุงตาข่ายไนลอน (nylon)
ใบของ *Licuala ramsayi*	3 mm จากเส้นกลางใบและระหว่างเส้นกลางใบ	96% ethanol 1 นาที, 3.25% NaOCl 10 นาที, 96% ethanol 30 วินาที	cornmeal dextrose agar, malt extract agar	การขนส่งใบจะเก็บไว้ในถุงผ้ามัสลิน (muslin), เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเส้นกลางใบมีความถี่สูงที่สุด
ใบของ *Euterpe oleracea*	3 mm จากเส้นกลางใบ และระหว่างเส้นกลางใบ	75% ethanol 1 นาที, 3.25% NaOCl 10 นาที, 75% ethanol 30 วินาที	corn meal dextrose agar กับ cyclosporin A 5 mg/l	นำใบมาแยกเชื้อภายใน 24 ชั่วโมงภายหลังจากเก็บตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่ผิวและความเข้มข้นของ sodium hypochlorite ที่ใช้ในการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชชนิดต่างๆ (Petrini, 1986)

ชนิดของพืช	การฆ่าเชื้อใน NaOCl		อ้างอิง
	เวลา (นาที)	การเจือจาง	
Lichens	1	1:5	Petrini (unpublished)
Mosses	1	1:5	Petrini (unpublished)
Ferns	3	1:5	Dreyfuss & Petrini (1984)
Conifers a) ใบ (needles)	5	1:2	Carroll & Carroll (1978)
b) กิ่ง	7	1:2	Petrini & Muller (1979)
พืชใบเลี้ยงเดี่ยว *Triticum aestivum* L.	3	1:5	Riesen & Sieber (1985)
พืชใบเลี้ยงคู่ *Arctostaphylos uva-ursi*	3	1:5	Widler & Muller (1984)
Brassica napus L.	3	1:5	Ruckstuhl & Petrini (unpublished)
Erica carnea a) ใบ	3	1:5	Oberholzer (1982)
b) ลำต้น	5	1:5	Oberholzer (1982)
Rhododendron spp.	3	1:5	Petrini (1985)
Vaccinium spp.	3	1:5	Petrini (1985)

การชักนำให้เชื้อราเอนโดไฟต์สร้างสปอร์ (Petrini, 1986)

เชื้อราเอนโดไฟต์ส่วนมากจะสร้างสปอร์ได้ในเวลาไม่กี่สัปดาห์หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 15-21 ºC ในที่มืดหรือแสงสว่างบนอาหาร 1% malt extract agar แต่จะมีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ยังคงไม่สร้างสปอร์ ซึ่งพบว่ามีวิธีการมากมายที่สามารถใช้ในการชักนำเชื้อราชนิดที่ไม่สร้างสปอร์ (sterile strain) ให้มีการสร้างสปอร์ได้ เช่นการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 8 ºC ภายใต้แสง fluorescent หรือภายใต้แสง near-ultraviolet สลับ 12 ชั่วโมงสว่าง-มืด หรือบ่มที่อุณหภูมิ 4 ºC ในที่มืด ซึ่งจะสามารถชักนำการสร้างสปอร์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราชนิดที่เป็น sterile strain ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หรือการเลี้ยงเชื้อราชนิดที่ไม่สร้างสปอร์นั้นบนอาหารธรรมชาติ (natural media) เช่น corn meal agar, potato/carrot agar, vegetable V-8 agar และอื่นๆ หรือเลี้ยงเชื้อราบนอาหารสังเคราะห์ (chemically defined media) เช่น Czapek Dox agar, peptone dextrose agar, starch agar และอื่นๆ สำหรับการเลี้ยงเชื้อราบนชิ้นส่วนของพืชอาศัยที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 ºC เป็นเวลา 120 นาที พบว่าให้ผลดีเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการชักนำการสร้างสปอร์คือเวลาซึ่งพบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์จะสามารถสร้างสปอร์ได้ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2-3 เดือน แต่บางชนิดอาจต้องใช้เวลา 12-14 เดือนถึงจะมีการสร้างสปอร์ และเชื้อราเอนโดไฟต์จะหยุดการสร้างสปอร์ภายหลังจากการถ่ายเชื้อ (transfer) 2-3 ครั้ง การชักนำให้เชื้อราที่สร้างสปอร์ยากให้มีการสร้างสปอร์นั้นทำได้โดยเลี้ยงเชื้อเหล่านั้นบนชิ้นพืชอาศัยที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิว และหลังจากนั้นจึงย้ายเชื้อราไปเลี้ยงใน 0.1% malt extract agar ต่อไป

การบ่งชนิดและหรือกลุ่มของเชื้อราเอนโดไฟต์

การบ่งบอกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์นั้นจัดเป็นวิธีการที่ยากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากการขาดแคลนข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะของเชื้อที่บ่งชนิดไว้แล้ว อีกทั้งความรู้เกี่ยวกับพืชอาศัยที่พิเศษบางชนิดนั้นมีจำนวนน้อย (Petrini, 1986) ซึ่งโดยทั่วไปการบ่งชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีการสร้างสปอร์จะทำโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะของการเจริญตรวจสอบกับ key โดยดูลักษณะของการสร้างรงควัตถุ การเกิด sclerotium และการกระจายของเส้นใย แต่ถ้าเป็นเชื้อราชนิดที่ไม่สร้างสปอร์อาจใช้เทคนิค PCR หรือใช้ DNA ติดตาม (probe) เพื่อช่วยในการเปรียบเทียบกับเชื้อราเอนโดไฟต์ที่บ่งชนิดแล้ว (Stoyke *et al*., 1992)

ประโยชน์ที่พืชได้รับจากเอนโดไฟต์ (สายสมร และคณะ, 2541)

1. ทนการเข้าทำลายจากแมลงและสังเคราะห์แสงได้มาก
2. ไม่ทำให้เกิดโรค
3. ลดการเกิดเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยว
4. สร้างสารที่เป็นพิษในพืชเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของแมลง
5. ช่วยยับยั้งการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย
6. การสร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต
7. การสร้างสารปฏิชีวนะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved