ราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรและการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืช ในห้องปฏิบัติการ

Endophytic Fungi in Medicinal Plant and Studies on Antagonistic Effect Against Plant Pathogenic Fungi *in vitro*

จิตรา เกาะแก้ว[1] เลขา มาโนช[1] จีรพันธ์ วรพงษ์[2] นิพนธ์ วิสารทานนท์[1] ณรงค์ สิงห์บุระอุดม[1]
อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์[1] และ วรวรรณ ปุณณะตระกูล[1]

Jitra Kokaew[1], Leka Manoch[1], Jeerapun Worapong[2], Niphon Visarathanonth[1],
Narong Singbooraudom[1], Amnat Eamvijarn[1] and Voravan Punnatrakul[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่องนี้เป็นการศึกษาชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์บนพืชสมุนไพรจำนวน 13 วงศ์ 15 ชนิดได้แก่ กระวาน กระชายขาว ราชพฤกษ์ โคลงเคลง ค้อนตีหมา เตยหนาม นาวน้ำ โกฐจุฬาลำพา ทับทิม ตะขาบปีนกล้วย ผักหวานใหญ่ ฝางส้ม ชะเอมเถา เถาตดหมูตดหมา ส้มกุ้ง จากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ.นครราชสีมา และสวนสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จ. นครปฐม และวิทยาเขตไทรโยค จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม ถึง สิงหาคม 2549 แยกเชื้อโดยวิธี Sodium hypochlorite – ethanol surface sterilization บนอาหาร WA และ PDA ครึ่งสูตร พบราเอนโดไฟท์ 210 สายพันธุ์ (isolate) จัดเป็นรา Hyphomycetes 25 สายพันธ์ จำแนกได้ 7 สกุล 6 ชนิด Coelomycetes 135 สายพันธุ์ 5 สกุล 3 ชนิด Ascomycetes จำนวน 20 สายพันธุ์ และราที่ไม่สร้างส่วนขยายพันธุ์หรือสปอร์ จำนวน 55 สายพันธุ์ ราที่พบมากที่สุดได้แก่ *Colletotrichum, Pestalotiopsis*, *Phyllosticta* , *Phoma* และ *Phomopsis* ตามลำดับ นำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จำนวน 7 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช 10 ชนิดบนอาหาร PDA พบว่าราเอนโดไฟท์ที่เจริญช้าและไม่สร้างสปอร์จำนวน 5 สายพันธุ์ และรา *Pestalotiopsis* sp. 1 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria alternate*, *Bipolaris maydis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora palmivora*, และ *Sclerotium rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ

ABSTRACT

This research aimed to isolate endophytic fungi from 13 families, 15 species of medicinal plants namely *Ampelocissus martini*, *Amomum* sp., *Ancistroclaudus extensus*, *Artabotrys spinosus, Artemisia annua*, *Cassia javanica*, *Claoxylon indicum, Globba* sp., *Melastoma malabathricum*, *Muehlenbeckia platyclada, Myriopteron extensum* , *Pandanus* sp., *Punica granatum* and *Spondias* sp., collected from Khao Yai National Park, Nakhon Rachasrima province and Sireerukhachart Garden, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom and Sai Yok Campus, Kanchanaburi during March to August 2006. For isolation method, Sodium hypochlorite – ethanol surface sterilization and cultured on water agar or half strength PDA were employed. The total

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[2] โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ วิทยาเขตศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล

of 210 isolates of endophytic fungi comprising the Hyphomycetes 25 isolates, 7 genera; Coelomycetes 135 isolates, 5 genera; Ascomycetes 20 isolates and non sporulation fungi (sterile hyphae) 55 isolate. The most dominant genera were *Colletotrichum, Pestalotiopsis*, *Phyllosticta* , *Phoma* and *Phomopsis* respectively. Seven species of endophytic fungi were selected for antagonistic activity test to ten species of plant pathogenic fungi *in vitro*. five slow growing, non sporulateting fungi and *Pestalotiopsis* sp. (E-41) could effectively inhibite plant pathogens namely *Alternaria alternata*, *Bipolaris maydis, Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora palmivora*, and *Sclerotium rolfsii*.

Key Words: endophytic fungi, medicinal plant, antagonistic, plant pathogenic fungi

คำนำ

ราเอนโดไฟท์ (endophyte) หมายถึงราที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้พืชอาศัยแสดงอาการของโรค ปัจจุบันมีการศึกษาราเอนโดไฟท์กันมาก Li *et al.* (2005) ได้คัดเลือกสายพันธุ์รา endophyte ที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (antitumour) และสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา(antifungal) จากพืชสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศจีนแยกราเอนโดไฟท์ได้ 130 สายพันธุ์ เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก และการเจริญของเชื้อรา พบว่าราเอนโดไฟท์ ดังกล่าวเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่มีประสิทธิภาพสูง Radu and Kqueen (2002) คัดเลือกสายพันธุ์ราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรในประเทศมาเลเซีย แยกราได้ทั้งหมด 121 สายพันธุ์ จากพืช 72 ชนิด แยกจากใบพืชได้มากที่สุด 90.9 % เมื่อเทียบกับราที่แยกได้จากกิ่ง และลำต้น เมื่อนำสาร isopropanone ที่สกัดได้จากราเอนโดไฟท์ มาทดสอบหาสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus substilis*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Alternaria* sp. ได้ Azevedo *et al.*, 2000 พบว่าราเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช Liu *et al.*, 2001 รายงานพบว่าราเอนโดไฟท์สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราซึ่งนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช Yuan *et al.*, 2006 รายงานว่าราเอนโดไฟท์หลายชนิดสร้างสาร ทุติยภูมิที่สำคัญในการพัฒนาเป็นยาใช้รักษาโรคของคนเช่น สาร taxol ซึ่งปกติแยกได้จากต้น yew (*Taxus cuspidata*) มีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านมะเร็ง (anticancer) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชต่าง ๆ สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และปฏิชีวนะสาร (antibiotic) (Strobel *et al.*, 2002; Strobel and Daisy, 2003; Lu *et al.*, 2000) Schutz *et al.*, 1998 ได้สรุปรายงานว่า 51 % ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแยกได้จากราเอนโดไฟท์ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืชทุกชนิดและได้มีการศึกษาพบในพืชมากกว่า 300 ชนิดทั้งพวก พืชดอก (angiosperms) พืชเมล็ดเปลือย (gymnosperms) สาหร่ายน้ำเค็ม (marine macro algae) มอส (moss) และ เฟิร์น (fern) (Petrini and Fisher, 1990; Clay, 1991)

ดังนั้นการศึกษาราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการค้นหาราที่เป็นประโยชน์สามารถนำมาใช้เป็นชีวินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรหรืออาจเป็นการค้นพบราสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีประสิทธิภาพในการ

นำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ อุตสาหกรรม และการเกษตรเพื่อนำไปสู่การทำการเกษตรแบบยั่งยืนซึ่งจะส่งผลให้เกษตรกรและผู้บริโภคมีคุณภาพชีวิตที่ดียิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรจากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ในเดือนมิถุนายน 2549 จำนวน 7 ชนิด จากสวนสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา และวิทยาเขตไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 4 ชนิด และ 5 ชนิดตามลำดับ (Table 1) โดยเลือกเก็บใบอ่อน ใบแก่ ลำต้น และกิ่ง ใส่ถุงพลาสติกนำมาที่ห้องปฏิบัติการเพื่อแยกราเอ็นโดไฟท์โดยล้างทำความสะอาดผิวใบด้วยวิธีของ Bhuvaneswari, 2005 โดยนำตัวอย่างมาแช่ใน Sodium hypochlorite 4 % 3 นาที ล้างด้วย อัลกอฮอล์ 70% 30 วินาที นำไปล้างน้ำกลั่นแล้วใช้กระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อ และใช้กรรไกรที่นึ่งฆ่าเชื้อตัดตัวอย่างใบและกิ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 5 X 5 มม. นำชิ้นส่วนตัวอย่างพืชไปวางบนอาหาร water agar (WA) และ half potato dextrose agar (1/2 PDA) ที่ผสม streptomycin บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ หรือ 2 เดือน เมื่อราเจริญสร้างเส้นใยออกมา ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใย (hyphal tip) วางบน slant PDA บ่มไว้ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อเก็บไว้จำแนกชนิด และศึกษาคุณสมบัติด้านอื่นต่อไป

การศึกษาการจำแนกชนิดเชื้อรา เพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA), cornmeal agar (CMA) และ oat meal agar (OA) บันทึกลักษณะการเจริญ สี การสร้างสปอร์ เปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยมีรายงานไว้ เตรียม permanent slide เพื่อถ่ายภาพเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์แบบ compound และวาดภาพจาก camera lucida (เลขา และคณะ, 2547)

การเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อรา เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราไว้ใน culture collection ที่ห้องปฏิบัติการเชื้อราภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์โดยเก็บรักษาเชื้อรา 2 วิธีคือ เก็บเชื้อราบน slant PDA ในขวดปากเกลียว แล้วเททับด้วยพาราฟินเหลว และบนกระดาษกรอง (เลขา และคณะ, 2547)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช คัดเลือกราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จำนวน 7 ชนิด โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่เจริญช้าและไม่สร้างสปอร์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช โดยเลี้ยงราเอ็นโดไฟท์บนอาหาร PDA ไว้ที่มุมด้านหนึ่งของจานเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำราสาเหตุโรคพืชมาวางด้านตรงข้ามโดยวาง 3 จุดให้ห่างจากราเอนโดไฟท์ 0.5, 1.0 และ 1.5 ซม. (Worapong *et al*., 2001) ราสาเหตุโรคพืชที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Alternaria alternat*a, *Bipolaris maydis*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora palmivora*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium deliense*, *Pythium vexan*s, *Rhizoctonia solani*, และ*Sclerotium rolfsii*, บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28° C และตรวจสอบผลการทดลองทุกวันเป็นเวลา 1- 2 สัปดาห์

ผลและวิจารณ์

พบราเอ็นโดไฟท์จากพืชสมุนไพรจำนวน 210 สายพันธุ์ (isolates) จำแนกเป็นราใน Class Hyphomycetes 25 สายพันธ์, 7 สกุล(genera) ได้แก่รา *Alternaria alternata* (2), *Curvularia lunata* (5), *Curvularia pallescens*(3), *Cylindrocladium* sp. (4), *Drechslera* sp.(2), *Fusarium semitectum*(2),

Table 1 Endophytic fungi isolated from various host plants at different locations.

No.	Host Plants	Location	Endophytic fungi
1	วงศ์ Anacadiaceae *Spondias* sp. (มะกอกป่า)	ผาเดียวดาย เขาใหญ่ นครราชสีมา	*Colletotrichum gloeosporioides, Colletotrichum* spp., , *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium
2	วงศ์ Ancistrocladaceae Ancistroclaudus extensus (ค้อนตีหมา)	เขาใหญ่ นครราชสีมา	*Colletotrichum gloeosporioides,, Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp, sterile mycelium
3	วงศ์ Anonaceae *Artabotrys spinosus* (นาวน้ำ)	สวนสิรีรุกขชาติ ศาลายา นครปฐม	*Colletotrichum gloeosporioides, Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Phoma* sp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium
4	วงศ์ Compositae *Artemisia annua* (โกฐจุฬาลำพา)	สวนสิรีรุกขชาติ ศาลายา นครปฐม	*Colletotrichum gloeosporioides, Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium
5	วงศ์ Euphobiaceae *Claoxylon indicum* (ผักหวานใหญ่)	ไทรโยค กาญจนบุรี	*Fusarium semitectum, F. graminearum, Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium
6	วงษ์ Leguminosae *Cassia javanica* (ราชพฤษ์) *Caesalpinia sappan* (ฝางส้ม)	เขาใหญ่ นครราชสีมา ไทรโยค กาญจนบุรี	*Curvularia lunata, Nigrospora oryzae, Colletotrichum* *gloeosporioides, Colletotrichum* spp., , *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium *Colletotrichum gloeosporioides, Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium
7	วงศ์ Melastomaceae *Melastoma malabathricum* (โคลงเคลง)	เขาใหญ่ นครราชสีมา	*Alternaria alternat*a, *Colletotrichum gloeosporioides,* *Colletotrichum* spp., *Cylindrocladium sp.,* *Pestalotiopsis palustris*, *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium
8	วงศ์ Myristicaceae *Myriopteron extensum* (ชะเอมเถา)	ไทรโยค กาญจนบุรี	*Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium
9	วงศ์ Pandanaceae *Pandanus* sp. (เตยหนาม)	เขาใหญ่ นครราชสีมา	*Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium
10	วงศ์ Polygonaceae *Muehlenbeckia platyclada* (ตะขาบปีนกล้วย)	สวนสิรีรุกขชาติ ศาลายา นครปฐม	*Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium
11	วงษ์ Punicaceae Punica granatum (ทับทิม)	สวนสิรีรุกขชาติ	*Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium
12	วงศ์ Vitaceae *Ampelocissus martini* (ส้มกุ้ง)	ไทรโยค กาญจนบุรี	*Colletotrichum dermatium, Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium

Table 1 (continue)

No.	Host Plants	Location	Endophytic fungi
13	วงศ์ Zingiberaceae *Amomum* sp. (กระวาน, เร็ว) *Globba* sp. (กระชายขาว, ขิงป่า)	เขาใหญ่ นครราชสีมา เขาใหญ่ นครราชสีมา	*Drechslera* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis palustris*, *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium *Curvularia pallescens, Nigrospora oryzae, Drechslera* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis palustris*, *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* spp., *Xylaria* spp., sterile mycelium

Fusarium graminearum (1), *Nigrospora oryzae* (5)และ *Phaeotrichoconis* sp. (1) Class Coelomycetes แยกได้ 135 สายพันธุ์ 5 สกุลได้แก่รา *Colletotrichum gloeosporioides* (20), *Colletotrichum dermatium* (5), *Colletotrichum* spp. (15), *Pestalotiopsis palustris* (5), *Pestalotiopsis* spp. (15), *Phomopsis* spp. (10) *Phoma* spp. (10) *Phyllosticta* spp. (15) และรา Coelomycetes ที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิด 15 สายพันธุ์ พบราใน Class Ascomycetes จำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่รา *Xylaria* spp. (15) รา Ascomycetes ที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ 5 สายพันธุ์ และราที่ยังไม่สร้างส่วนขยายพันธุ์หรือสปอร์ (sterile mycelium) จำนวน 55 สายพันธุ์

ราเอนโดไฟท์ที่พบเสมอบนพืชสมุนไพรทุกชนิดในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่รา Class Coelomycetes สกุล *Colletotrichum* , *Pestalotiopsis* *Phomopsis* , *Phoma* , *Phyllosticta* และราใน Class Ascomycetes สกุล *Xylaria* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Okane *et al.* (1997) ได้รายงานราเอนโดไฟท์ดังกล่าวบนใบ กิ่ง และลำต้น ในพืชหลายชนิดในประเทศญี่ปุ่น ในประเทศไทย Bussaban *et al.* (2001) ศึกษาราเอนโดไฟท์ในพืช *Amomum siamense* (วงศ์ : Zingiberaceae เช่น ก๊า เร่ว เร่วแดง เร่วดง กระวาน กระวานป่า) (เต็ม, 2544) ในเขตดอยสุเทพ จ. เชียงใหม่ แยกราจาก ใบ กิ่ง และราก ของพืชชนิดนี้ พบว่ารา Ascomycetes 7 ชนิด (species) และราในกลุ่มImperfect fungi (mitosporic fungi) 26 ชนิด ราที่พบมากได้แก่รา *Colletotrichum gloeosporioides*, Xylariaceous fungi และ *Phomopsis* spp. นอกจากนี้ Mekkamol *et al.* (2000) ได้ศึกษาราเอนโดไฟท์บนใบสัก (*Tectona grandis* L.) ที่จังหวัดเชียงใหม่ ได้รายงานว่าบนใบแก่จะพบเชื้อราในกลุ่ม Xylariaceae เป็นส่วนใหญ่ ส่วนใบอ่อนพบเชื้อรา *Phomopsis* และ *Colletotrichum* และสรุปว่ารา *Colletotrichum* spp. ซึ่งพบมากในการศึกษาดังกล่าวมีรายงานว่าสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Lu *et al.* (2000) รายงานพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ชนิดใหม่จากรา *Colletotrichum* sp. ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากก้านโกฐจุฬาลำพา (*Artemisia annua*) สารดังกล่าวได้แก่ ergosterol (I), 3β,5α,6 β-trihydroxyergosta-7,22-diene (II), 3β-hydroxy-ergosta-5-ene (III), 3-oxo-ergosta-4,6,8(14),22-tetraene (IV), 3β-hydroxy-5α,8α-epidioxy-ergosta-6,22-diene (V), 3β-hydroxy-5α,8α-epidioxy-ergosta-6,9(11),22-triene (VI) และ 3-oxo-ergosta-4-ene (VII) เมื่อนำสาร ergosterol (I), 3β,5α,6 β-trihydroxyergosta-7,22-diene (II), 3β-hydroxy-ergosta-5-ene (III) มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*,

Sarcina lutea และ*Pseudomonas* sp. และสามารถยับยั้งการเจริญของรา *Candida albicans* และ *Aspergillus niger* นอกจากนี้พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum* และ*Phytophthora capsici* ได้เช่นกัน

จากการศึกษาพบว่า *Pestalotiopsis* spp. เป็นราที่พบมากรองลงมาจากรา *Colletotrichum* spp. *Pestalotiopsis* เป็นราที่น่าสนใจเนื่องจากสามารถสร้างสารทุติยภูมิที่เป็นประโยชน์ทางการแพทย์ Strobel *et al.* (2002) รายงานการค้นพบสาร isopestacin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม isobenzofuranone จากรา *Pestalotiopsis microspora* ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ สารประกอบชนิดนี้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของรา และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจะปลดปล่อย superoxide และhydroxyl free radicals ออกมา ผลการทดสอบความสามารถของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของรา สาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ พบว่าราเอนโดไฟท์ที่เจริญช้าและไม่สร้างสปอร์ 5 ชนิดและรา Pestalotiopsis sp. 1 สายพันธุ์(E41) สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria alternata*, *Bipolaris maydis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora palmivora* และ *Sclerotium rolfsii* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Pythium aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. vexan*s และ *Rhizoctonia solani* (Table2, Figure 1)

สรุป

จากตัวอย่างพืชสมุนไพร 13 วงศ์ 15 ชนิดพบราเอนโดไฟท์ 210 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เป็นราใน Class Coelomycetes พบจำนวน 135 สายพันธุ์ จำแนกได้ 5 สกุลได้แก่รา *Colletotrichum gloeosporioides* (20), *Colletotrichum dermatium* (5), *Colletotrichum* spp. (15), *Pestalotiopsis palustris* (5), *Pestalotiopsis* spp. (15), *Phomopsis* spp. (10) *Phoma* spp. (10) *Phyllosticta* spp. (15) และรา Coelomycetes ที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิด 15 สายพันธุ์ ราที่พบมากรองลงมาได้แก่ราใน Class Hyphomycetes จำนวน 25 สายพันธ์, 7 สกุลได้แก่รา *Alternaria alternata* (2), *Curvularia lunata* (5), *C. pallescens*(3), *Fusarium semitectum* (2), *F. graminearum* (1), *Nigrospora oryzae* (5), *Cylindrocladium* spp. (4), *Drechslera* spp.(2), และ *Phaeotrichoconis* sp. (1)

พบรา Ascomycetes จำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่รา *Xylaria* sp. (15) และรา Ascomycetes ที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้อีก 5 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบราที่เจริญช้าและไม่สร้างส่วนขยายพันธุ์หรือสปอร์ (sterile mycelium) จำนวน 55 สายพันธุ์

ราที่พบมากได้แก่รา *Colletotrichum* รองลงมาได้แก่รา *Pestalotiopsis Phyllosticta* และ *Phomopsis* ตามลำดับ ราที่มีรายงานสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่รา *Colletotrichum* และ *Pestalotiopsis*

ผลการทดสอบความสามารถของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ พบว่าราเอนโดไฟท์ที่เจริญช้าและไม่สร้างสปอร์ 5 ชนิดและรา *Pestalotiopsis* 1 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Alternaria alternat*a, *Bipolaris maydis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora palmivora* และ *Sclerotium rolfsii* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Pythium aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. vexan*s และ *Rhizoctonia solani*

Table 2 Antagonistic test of seven selected species of endophytic fungi against ten species of plant pathogenic fungi on PDA, 7 days at 28°C

Plant pathogenic fungi	Endophytic fungi						
	E-24	E-36	E-41	E-47	E-53	E-61	E-72
Alternaria alternata	-	-	-	+	+	-	+
Bipolaris maydis	-	+	+	+	-	-	-
Fusarium oxysporum	-	-	-	-	-	-	-
Lasiodiplodia theobomae	-	-	-	-	-	-	+
Phytophthora palmivora	+	+	-	+	-	-	+
Pythium aphanidermatum	-	-	-	-	-	-	-
Pythium deliense	-	-	-	-	-	-	-
Pythium vexans	-	-	-	-	-	-	-
Rhizoctonia solani	-	-	-	-	-	-	-
Sclerotium rolfsii	-	+	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + ราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชได้

_ ราเอนโดไฟท์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้

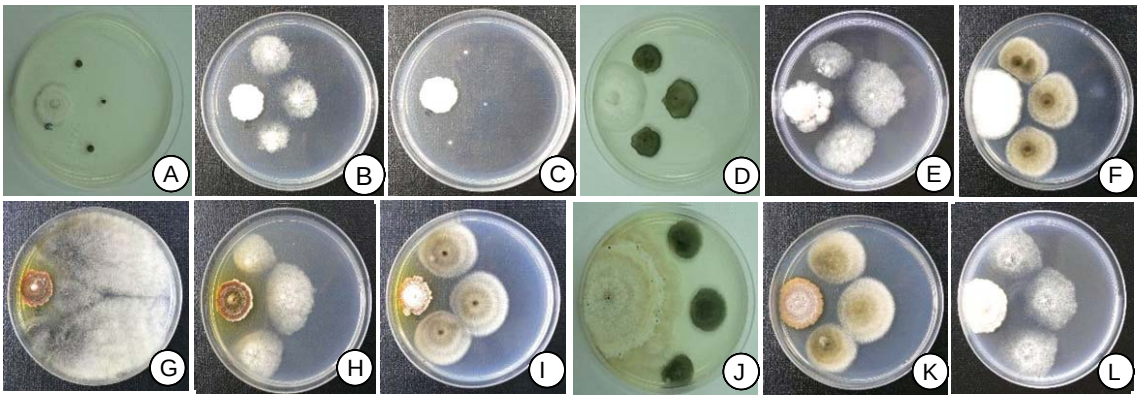

Figure 1 Antagonistic activity test as dual cultures of selected species of endophytic fungi (left) and plant pathogenic fungi (right) on PDA, 7 days at 28°C

A) E-36 vs *Bipolaris maydis* B) E-36 vs *Phytophthora palmivora* C) E-36 vs *Sclerotium rolfsii* D) E-47 vs *Bipolaris maydis* E) E-47 vs *Phytophthora palmivora* F) E-47 vs *Alternaria alternata* G) E-72 vs *Lasiodiplodia theobromae* H) E-72 vs *Phytophthora palmivora* I) E-72 vs *Alternaria alterna* J) *Pestalotiopsis* sp. (E-41) vs *Bipolaris maydis* K) E-53 vs *Alternaria alternata* L) E-24 vs *Phytophthora palmivora*

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกของ จิตรา เกาะแก้ว สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

เต็ม สมิตินันทน์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ส่วนพฤษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

เลขา มาโนช, พรพิมล อธิปัญญาคม, กัญญา เจริญไทย, คนึงนิจ บุศราคำ, อรอุมา เจียมจิตต์, ธิดา เดชฮวบ, จิตรา เกาะแก้ว และ ผจงจิต ภูจิญญาณ์. 2547. เชื้อราโรคพืชบนผลไม้ พืชผักและราดินบริเวณจอมปลวก, น. 544-552 ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 (สาขาพืช) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

Azevedo, J.L., W. Maccheroni, J.O. Pereira and W. L. de Araujo. 2000. Endophytic microorganism : a review on insect control and recent advances on tropical plants. Journal of Biotechnology. 3: 40 – 65.

Bhuvaneswari, V. 2005. Studies on fungal endophytes from some medicinal plants with special reference to taxol production by Endophytic Coelomycetes. Thesis Doctor of philosophy. University of Madras

Bussaban, B., S. Lumyong, P. Lumyong, E.H.C. Mckenzie and K.D. Hyde. 2001. Endophytic fungi from Amomum siamense. Can. J. Micro. 47: 943 – 948.

Clay, K. 1991. Fungi endophytes, grasses and herbivores. *Microbial mediation of plant-herbivore interactions*. Edited by P. Barbosa, V.A. Krischik and E.B.G. Jones Wiley and Sons, New York.

Li, H., C. Qing, Y. Zhang and Z. Zhao. 2005. Screening for endophytic with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21: 1515– 1519.

Liu, C.H., W.X. Zon, H. Lu and R.X. Tan. 2001. Antifungal activity of Artemisia annua endophyte cultures against phytopathogenic fungi. Journal of Biotechnology. 88: 277 – 282.

Lu, H., W.X. Zou, J.C. Meng, J. Hu and R.X. Tan. 2000. New bioactive metabolites produced by*Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in Artemisia annua. Plant Science. 151: 67 – 73.

Mekkamon, S., N. Joglaeha and A.J. Swhalley. 2000. p 27. Endophytic fungi from teak leaves. ABS. *In* tropical mycological 2000. Liverpool John Moores University.

Okane, I., A. Nakagiri and T. Ito. 1996. *Discostroma tricellulare*, 2 endophytic ascomycetes with a *Seimatosporium* anamoph isolated from *Rhododendron*. Can. J. Bot. 74: 1338-1344.

Petrini, O. and P.J. Fisher. 1990. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. Mycological Research. 94: 1077 - 1080

Radu, S., and C.Y. Kqueen. 2002. Preliminary screening of Endophytic fungi from Medicianl Plants in Malasia for antimicrobial and antitunour activity. Malasian Journal of Medicical Sciencees. 9: 23 – 33.

Schultz, B., S. Guske, U. Dammann and C. Boyle. 1998. Endophyte-host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. Symbiosis. 25: 213 – 327.

Strobel, G. and B. Daisy. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. Microbiology and Molecular Biology Review. 67: 491 – 502.

Strobel, G., E. Ford, J. Worapong, J. K. Harper, A.M. Arif, D.M. Grant, P.C.W. Fung and R.M. Wah Chu. 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from Pestalotiopsis microspora, possessing antifungal and antioxidant activities. Phytochemistry. 60: 179 – 183.

Worapong, J., G. A. Strobel, E.J. Ford, J. Y. Li, G. Baird and W.M. Hess. 2001. Muscodor albus gen. et sp. nov., an endophyte from Cinnamomum zeylanicum. Mycotaxon 79: 67-79.

Yuan, J., B. Jian-Nan, Y. Bing and Z. Xu-Dong. 2006. Taxol-Producing Fungi : a New Approach to Industrial Production of Taxol. Chinese Journal of Biotechhnology. 22: 1 – 6.