ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของราเอนโดไฟท์สกุล *Kalmusia* จากรักใหญ่
Antifungal Activity of Endophytic Fungus, Genus *Kalmusia* from *Gluta usitata* (Wall.) Ding Hou

ศกุนตลา ศิริอุดม[1] เมทินี วสุนธราวัฒน์[1]
E-mail: sakuntala.si@udru.ac.th

บทคัดย่อ

เชื้อราเอนโดไฟท์เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้พืชแสดงอาการของโรคและมีประสิทธิภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชและป้องกันพืชจากแมลง สัตว์และเชื้อก่อโรค เชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) ถูกคัดแยกจากดอกของรักใหญ่ (*Gluta usitata* (Wall.) Ding Hou) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum, Phellinus noxius* และ *Rigidoporus microporus* เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Dual culture สารสกัดหยาบของเชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) เมื่อใช้ ethyl acetate เป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคสำคัญในยางพารา ได้แก่ โรครากน้ำตาล (*P. noxius*) และโรครากขาว (*R. microporus*) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 46.6±1.6 % และ 73.0±1.0 % ตามลำดับ และมีความเข้มข้นน้อยสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากขาวเท่ากับ 3.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อแยกสารประกอบทุติยภูมิที่เชื้อราสร้างขึ้นด้วย Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ 95:5 (v/v) dichloromethane : methanol เป็น mobile phase พบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) ประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิด โดยมีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.18-0.96

คำสำคัญ: ราเอนโดไฟท์ รักใหญ่ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Kalmusia*

Abstract

Endophytic fungi live in healthy plant tissues without causing any disease symptoms and play an important role to produce bioactive compounds that enhance plant growth and protect plant from insect pests and pathogens. *Kalmusia* sp. (Gu03) was isolated from flowers of *Gluta usitata* (Wall.) Ding Hou. This fungus exhibited board range of antifungal activity by dual culture technique toward to *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum, Phellinus noxius* and *Rigidoporus microporus*. Ethyl acetate extract of *Kalmusia* sp. (Gu03) showed a strong antifungal activity on the phytopathogens, *P. noxius* and *R. microporus* causing root rot disease of the rubber tree. Crude extract of *Kalmusia* sp. (Gu03) at the concentration of 50 mg/ml inhibited mycelial growth of *P. noxius* and *R. microporus* as 46.6±1.6 % and 73.0±1.0 %, respectively and inhibited *R. microporus* with MIC value of 3.1 mg/ml. The presence of fungal secondary metabolite was detected by thin layer chromatography (TLC). The results showed the separation of active compounds (separated using 95:5 (v/v) dichloromethane: methanol) and Rf values ranged from 0.18-0.96.

Keywords: endophytic fungi, *Gluta usitata,* antifungal activity, *Kalmusia*

ความเป็นมาของปัญหา

เชื้อราเอนโดไฟท์อาศัยในเนื้อเยื่อพืชบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืช (intercellular space) โดยไม่ทำให้พืชแสดงอาการของโรคหรือมีผลข้างเคียงใดๆกับพืช (Huang et al., 2001; Khan et al., 2015) โดยอาศัยในราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เมล็ด และสามารถสร้างสปอร์ในเนื้อเยื่อพืชได้ (Stone et al., 2004; Yu et al., 2018) การอาศัยอยู่ร่วมกันกับพืชเป็นแบบพึ่งพาอาศัย ส่งผลด้านบวกเกี่ยวกับการเจริญและพัฒนาเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะการเจริญในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ โดยพืชให้อาหารขณะที่เชื้อราสร้างสารทุติยภูมิ เมแทบอไลต์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและป้องกันพืชจากเชื้อโรค แมลงและสัตว์ได้ ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งในการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆและถูกนำใช้ประโยชน์ทางการเกษตร การแพทย์ และอุตสาหกรรมอาหาร โดยเป็นสารปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็ง และสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น ซึ่งเป็นที่ยอมรับในประสิทธิภาพการทำงานและความปลอดภัยไม่ก่อผลข้างเคียงกับสุขภาพของมนุษย์ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ในกลุ่ม alkaloids

[1] อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

terpenoids steroids quinines lignans phenols และ lactones มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ฆ่าแมลง เป็นพิษกับเซลล์และต้านมะเร็ง (Zhao et al., 2010) กระบวนการได้มาซึ่งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ อาจได้จากการสกัดสารจากเชื้อราโดยตรงหรือกระบวนการหมักของเชื้อรา ในประเทศไทยได้มีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์ เช่น เชื้อราเอนโดไฟท์ *Talaromyces trachyspermus* ที่คัดแยกจากโสน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Bipolaris maydis* และ *Alternaria alternata* ที่เป็นสาเหตุโรคใบไหม้ข้าวโพดและโรคผลเน่าของสาลี่ได้ตามลำดับ (ชุติมา และคณะ, 2557) เชื้อราเอนโดไฟท์ *Aspergillus rhizopodus* ที่แยกจากสาหร่ายทะเลมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะได้ (อามีนา และคณะ, 2560) นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์บางชนิดสามารถสร้างไอระเหยอินทรีย์ (Volatile organic compounds; VOCs)ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (Suwannarach et al., 2013) เช่น ราเอนโดไฟท์สกุล *Muscodor* ในวงศ์ Xylariaceae โดยไอระเหยอินทรีย์ของเชื้อราสกุล *Muscodor* มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ (Siri-Udom et al., 2015)

ดังนั้นจึงทำให้มีผู้สนใจศึกษาราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากขึ้น มีรายงานพบว่า ราเอนโดไฟท์ *Phoma glomerata* และ *Penicillium* sp. สามารถสร้าง GAs และ IAA กระตุ้นการเจริญของพืชในสภาวะแห้งแล้งและมีความเค็มได้ (Waqas et al., 2012) ราเอนโดไฟท์จากข้าวในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้ 6 ชนิด ซึ่งไอโซเลต GR03 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ *Trichoderma hazianum* สามารถสร้าง IAA และเอนไซม์ย่อยสลาย ได้แก่ chitinase, protease และ cellulase ได้อีกด้วย (อนันต์, 2557) พืชในวงศ์ Anacardiaceae หลายชนิด เช่น *Lithraea caustica*, *Mangifera zeylanica* และ *Spondias mombin* (มะกอกน้ำ) มีรายงานการคัดแยกราเอนโดไฟท์ได้ (Senevirathana et al., 2015; Rodrigues et al., 2000; Vidal et al., 2020) โดยรักใหญ่(*Gluta usitata*)เป็นพืชในวงศ์ Anacardiaceae มีสรรพคุณทางยา สามารถใช้ส่วนต่างๆ เช่น เปลือกต้น เปลือกราก เมล็ด น้ำยาง ราก และใบ เป็นต้น มาใช้ในการปรุงยา ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการคัดแยกราเอนโดไฟท์จากรักใหญ่ โดยนำส่วนใบซึ่งเป็นส่วนของพืชที่มีการอยู่อาศัยของราเอนโดไฟท์จำนวนมาก และส่วนดอกที่มีรายงานว่าราเอนโดไฟท์สามารถเข้าอยู่อาศัยในดอกของพืชได้ (Yu et al., 2018) โดยอาจเป็นส่วนที่พบเจอราเอนโดไฟท์ชนิดใหม่ และเป็นแหล่งในการพบราเอนไฟท์ที่มีฤทธิ์ในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มใหม่ๆ

การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีรายงานพบราเอนโดไฟท์สกุล *Kalmusia* จากดอกของรักใหญ่ โดยมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช องค์ความรู้ที่ได้สามารถใช้เป็นความรู้พื้นฐานนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางการเกษตร การอุตสาหกรรม และทางการแพทย์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของราเอนโดไฟท์ *Kalmusia* sp. จากพืชป่าได้แก่ รักใหญ่
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phellinus noxius* และ *Rigidoporus microporus* ของราเอนโดไฟท์ *Kalmusia* sp.

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างพืชและคัดแยกราเอนโดไฟท์

1.1 เก็บตัวอย่างรักใหญ่โดยเก็บส่วนใบและดอกในพื้นที่โครงการพัฒนาป่าไม้ตามแนวพระราชดำริลำห้วยบอง บ้านตาดไฮ ต.โคกม่วง อ.โนนสัง จ.หนองบัวลำภู

1.2 นำตัวอย่างใบและดอก มาล้างโดยการผ่านน้ำประปาประมาณ 15 นาที และตัดตัวอย่างแบบสุ่มให้เป็นชิ้นขนาด 5 ตารางมิลลิเมตร ส่วนใบตัดให้ผ่านเส้นกลางใบ (vein) และระหว่างเส้นกลางใบ (inter vein) นำตัวอย่างไปฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterile) ใน 75% ethanol นาน 30 วินาที, 1-2% sodium hypochlorite นาน 3 นาที และ95% ethanol นาน 30 วินาที ตามลำดับ (Suwannarach et al., 2010)

1.3 นำตัวอย่างมาวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่เติม rose bengal (0.033 กรัม/ลิตร) และ chloramphenicol (50 มิลลิลิตร/ลิตร) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25±2 °C) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาในอาหาร PDA

2. การศึกษาสัณฐานวิทยาเชื้อราเอนโดไฟท์และจัดจำแนกหมวดหมู่

2.1 เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยา โคโลนีและสปอร์ ในกรณีเชื้อไม่สร้างสปอร์ให้กระตุ้นการสร้างสปอร์บนอาหาร water agar (WA) และ malt extract agar (MEA) (Gazis and Chaverri, 2010)

2.2 การจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลให้สกัดดีเอ็นเอ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี ITS-rDNA amplification โดยใช้ universal ITS4 และ ITS5 primer และวิเคราะห์ลำดับเบส ดัดแปลงตามวิธีของ Suwannarach et al. (2010) และจัดจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล วิเคราะห์หาลำดับเบสและนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ที่ NCBI website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) จัดทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 7

3. ฤทธิ์ยับยั้งของราเอนโดไฟท์ต่อเชื้อราก่อโรคพืช

3.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชด้วยวิธี Dual culture (Aramsirirujiwet et al., 2016)

3.1.1 วางชิ้นวุ้นโคโลนีเชื้อราก่อโรคที่มีอายุ 5 วัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ด้านใดด้านหนึ่งของอาหาร PDA แล้ววางชิ้นวุ้นเชื้อราเอนโดไฟท์ฝั่งตรงข้ามเชื้อราก่อโรค บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

3.1.2 วัดขนาดโคโลนีของเชื้อราก่อโรคและคำนวณ % การยับยั้งการเจริญเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent inhibition of radial growth-PIRG) คำนวณได้ดังนี้

PIRG = (R1-R2) x100/R1

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานทดสอบ

3.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบ (crude extract) กับเชื้อราก่อโรคพืช

3.2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

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

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Agar well diffusion

ละลายสารสกัดหยาบด้วยสารละลาย 50% methanol ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใส่สารละลายปริมาตร 35 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน วัดขนาดโคโลนีของเชื้อราก่อโรคเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและคำนวณ % การยับยั้งการเจริญ

3.2.3 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentrations: MICs) ของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

ละลายสารสกัดหยาบด้วยสารละลาย 50% methanol ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นระหว่าง 25.0-0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามวิธี two-fold dilution (Taechowisan et al., 2009) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion โดยใส่สารละลายปริมาตร 35 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดรัศมีโคโลนีของเชื้อราก่อโรคเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.2.4 การทดสอบ Thin layer chromatography (TLC) ของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

เตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ Dichloromethane : methanol ในอัตราส่วน 95:5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้บรรยากาศภายในแท็งก์อิ่มตัวด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ ใช้แผ่น TLC silica gel 60GF 254 (Merck, Germany) ขนาด 1x10 เซนติเมตร จุดสารสกัดหยาบของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC นำไปใส่ในแท็งก์ที่มีเฟสเคลื่อนที่ Dichloromethane : methanol อัตราส่วน 95:5 จนเฟสเคลื่อนที่เดินทางถึงจุดสิ้นสุด นำแผ่น TLC ออกจากภาชนะแล้วเป่าให้แห้ง ตรวจดูตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Prakash et al., 2013) คำนวณหาค่า Rf ดังนี้ Rf =ระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นในเวลาเดียวกัน

ผลการวิจัย

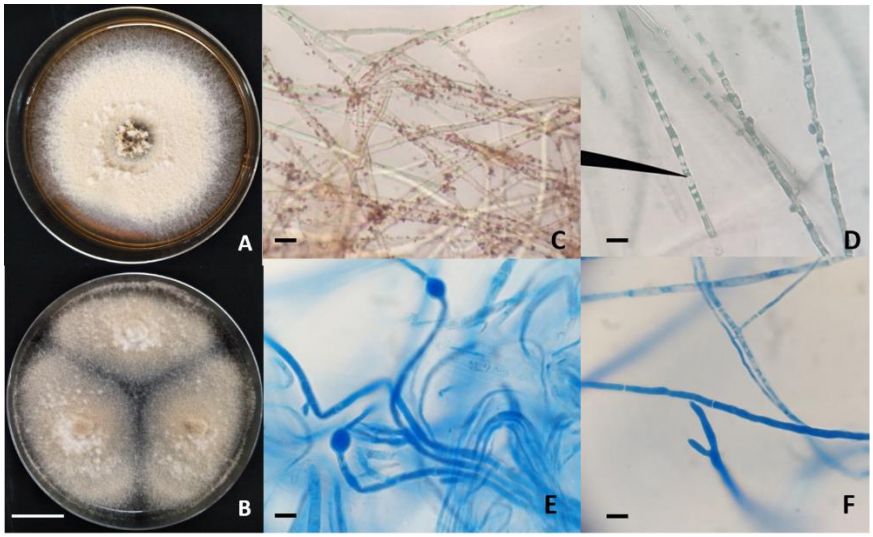
1. ลักษณะสัณฐานวิทยาและจัดจำแนกชนิดราเอนโดไฟท์

เชื้อราไอโซเลต Gu03 คัดแยกจากส่วนดอกของรักใหญ่ (*Gluta usitata* (Wall.) Ding Hou) จากลักษณะสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกทางชีวโมเลกุลจาก phylogenetic tree ของ ITS rRNA พบว่าเชื้อราไอโซเลต Gu03 มีความใกล้ชิดเชื้อรา

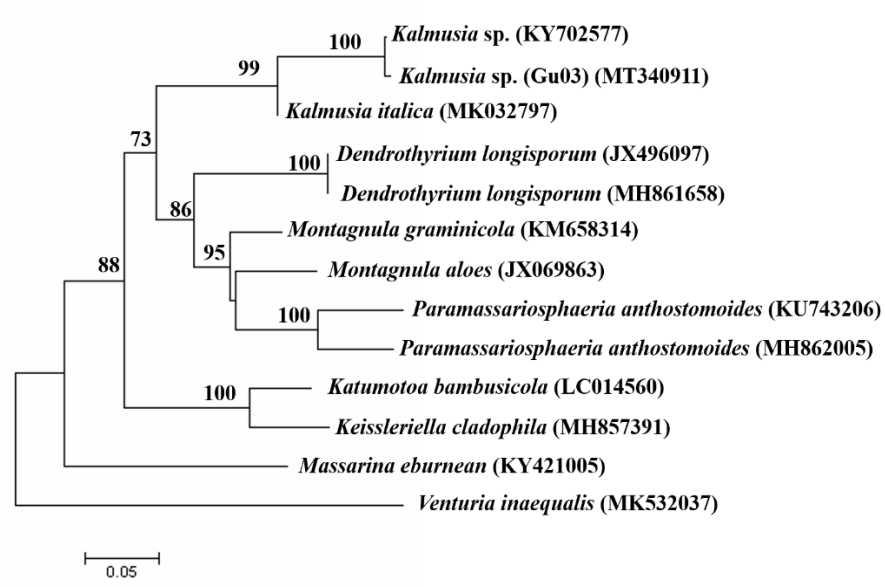
Kalmusia sp. (KY702577) โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 100 ดังนั้นเชื้อราไอโซเลต Gu03 จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota สกุล *Kalmusia* (ภาพประกอบที่ 1-2)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03)

มีโคโลนีสีขาวเมื่ออายุน้อย และจะเปลี่ยนเป็นสีส้มอ่อนบริเวณกลางโคโลนีเมื่ออายุประมาณ 5-7 วัน และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่ออายุประมาณ 2 สัปดาห์ และเปลี่ยนสีอาหารให้เป็นสีน้ำตาล ลักษณะโคโลนีจะฟูเล็กน้อยคล้ายกำมะหยี่เมื่ออายุ 14 วัน ลักษณะของเส้นใยแตกแขนง เส้นใยบริเวณกลางโคโลนีมีความกว้าง 5.0-6.3 ไมโครเมตร เส้นใยที่ขอบโคโลนีพบการแตกแขนงเป็นส่วนน้อยและมีความกว้าง 2.5-3.8 ไมโครเมตร เส้นใยมีผนังกั้น พบเซลล์ลักษณะโป่งพอง (swollen cell) ระหว่างเส้นใย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0-15.0 ไมโครเมตร



ภาพประกอบที่ 1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) บนอาหาร PDA (A) และ MEA (B) อายุ 14 วัน, scale bar = 2 เซนติเมตร และโครงสร้างใต้กล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะสารสีส้มที่เส้นใยผลิตออกมา (C), เส้นใยบริเวณกลางโคโลนี (D), ลักษณะ swollen cell ระหว่างเส้นใย (E); scale bar = 10 ไมโครเมตร, เส้นใยที่แตกแขนงบริเวณขอบโคโลนี (F), scale bar = 5 ไมโครเมตร



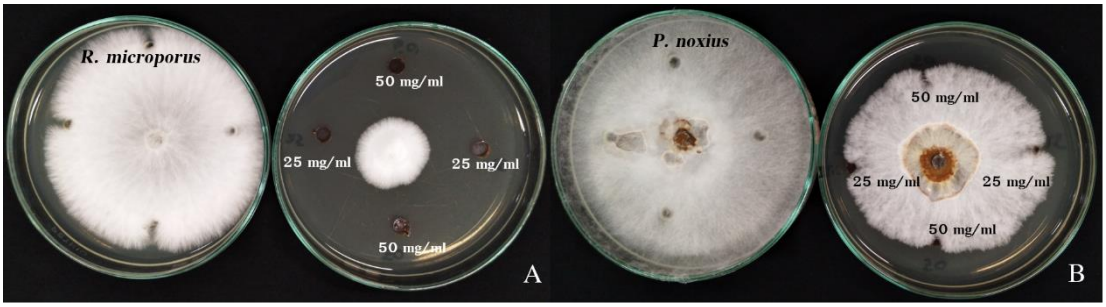
ภาพประกอบที่ 2 Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree ของ ITS rRNA ของเชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) โดยมีเชื้อรา *Venturia inaequalis* เป็น out group

2. ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคของราเอนโดไฟท์

เชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรครากขาว (*Rigidoporous microporus*) และเชื้อราก่อโรครากน้ำตาล (*Phellinus noxius*) ได้มากที่สุด เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Dual culture โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเชื้อราก่อโรคเท่ากับ 88 % และ 74 % ตามลำดับ ขณะที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* ได้เท่ากับ 35% และ 39% ตามลำดับ สารสกัดหยาบของเชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรครากขาวและรากน้ำตาลเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Agar well diffusion พบว่า ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อราก่อโรครากขาว เท่ากับ 67.1±1.0 %และ 73.0±1.0 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพประกอบที่ 3) และยับยั้งเชื้อราก่อโรครากน้ำตาลโดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 25.6±0.8 % และ 46.6±1.6 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพประกอบที่ 3)

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคของสารสกัดราเอนโดไฟท์ *Kalmusia* sp. (Gu03) เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Agar well diffusion

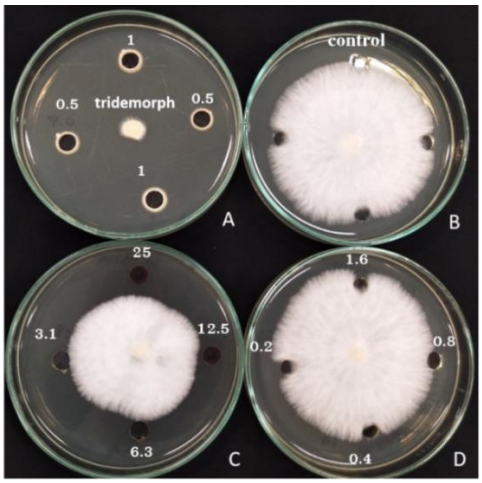
ความเข้มข้นสารสกัดหยาบ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา	
	R. microporus	*P. noxius*
25	67.1±1.0	25.6±0.8
50	73.0±1.0	46.6±1.6



ภาพประกอบที่ 3 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Rigidoporus microporus* (A) และ *Phellinus noxius* (B) ของสารสกัดหยาบเชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) ด้วยเทคนิค Agar well diffusion บนอาหาร PDA และบ่มนาน 6 วัน

3. การหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

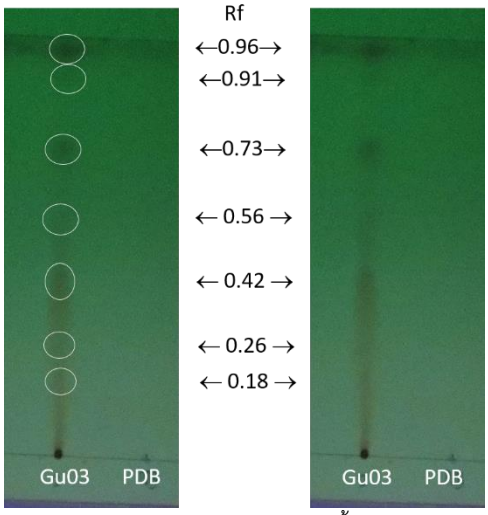
สารสกัดหยาบของเชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) เมื่อนำมาหาค่า MIC พบว่ามีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรครากขาว (*R. microporus*) เท่ากับ 3.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาพประกอบที่ 4)



ภาพประกอบที่ 4 แสดงการหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบเชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Rigidoporus microporus* เมื่อใช้สารฆ่าเชื้อรา (tridemorph) เป็น positive control (A) และสารละลาย 50% Methanol เป็น negative control (B) โดยค่า MIC เท่ากับ 3.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (C-D)

4. การทดสอบ Thin layer chromatography (TLC) ของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช

เมื่อนำสารสกัดหยาบเชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) มาทดสอบ TLC โดยดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลต Gu03 ประกอบด้วยสารประกอบอย่างน้อย 7 ชนิด โดยมีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.18-0.96 โดยเปรียบเทียบกับอาหาร PDB ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา พบว่า สารประกอบทั้ง 7 ชนิดไม่ได้เป็นส่วนประกอบของอาหาร PDB



ภาพประกอบที่ 5 Thin layer chromatography (TLC) ของสารสกัดหยาบเชื้อรา *Kalmusia* sp. (Gu03) ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อภิปรายผล

รักใหญ่ (*Gluta usitata* (Wall.) Ding Hou) เป็นพืชในวงศ์ Anacardiaceae ซึ่งยังไม่มีรายงานการคัดแยกราเอนโดไฟท์ ขณะที่พืชในวงศ์ Anacardiaceae ชนิดอื่นมีรายงานการคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ เช่น มะกอก (*Spondias mombin*) พบว่าสามารถคัดแยกราเอนโดไฟท์ ได้แก่ *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. และ *Pestalotiopsis guepinii* โดยสารสกัดหยาบจากเชื้อราเอนโดไฟท์เหล่านี้สามารถสามารถยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราเส้นสายได้ (Rodrigues et al., 2000) เชื้อราเอนโดไฟท์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญและความแข็งแรงของพืช (Xia et. al., 2015) ทั้งนี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พืชสร้างขึ้นอาจจะเกิดจากเชื้อราเอนโดไฟท์เป็นผู้ผลิตหรือกระตุ้นให้พืชผลิตขึ้นมา โดยเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและเชื้อรา (Radu and Kqueen, 2002; Tejesvi et al., 2007) เชื้อราเอนโดไฟท์ *Kalmusia* sp. (Gu03) สามารถคัดแยกจากดอกของรักใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราโดยเฉพาะราก่อโรคที่ทำลายระบบรากของยางพาราที่เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย โดยทำให้พืชยืนต้นตายและให้ผลผลิตน้ำยางน้อยลง จากคุณสมบัติที่ราเอนโดไฟท์ไฟท์ *Kalmusia* sp. (Gu03) สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ได้จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาต่อยอดการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานการใช้เชื้อรา *Trichoderma hazianum* ในการควบคุมโรครากเน่าได้สำเร็จ (Jayasuriya and Thennakoon, 2007) และการใช้เชื้อรา *Chaetomium* ในการควบคุมเชื้อราก่อโรครากขาว (*R. microporus*) ในระดับโรงเรือนได้ (Kaewchai and Soytong, 2010)

สรุปผลการวิจัย

เชื้อราเอนโดไฟท์ *Kalmusia* sp. (Gu03) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชโดยเฉพาะเชื้อ *R. microporus* และ *P. noxius* ที่เป็นสาเหตุสำคัญในการทำลายระบบรากของยางพารา โดยให้ผลทดสอบที่ดีเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Dual culture มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 88 และ74% ตามลำดับ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบและหาค่า MIC ด้วยเทคนิค Agar well diffusion พบว่ามีค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* เท่ากับ 3.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อวิเคราะห์ด้วย Thin layer chromatography (TLC) พบว่าสารสกัดหยาบของไอโซเลต Gu03 ประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิด โดยมีค่า Rf อยู่ในช่วง 0.18-0.96 และจากงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่มีรายงานพบราเอนโดไฟท์สกุล *Kalmusia* จากดอกของรักใหญ่ (*Gluta usitata*)

ข้อเสนอแนะ

1. ในการคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ ขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterile) ตัวอย่างพืช สามารถปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ sodium hypochlorite และระยะเวลาในการแช่ตัวอย่างพืชให้เหมาะสม ขึ้นกับชนิดและความหนาของตัวอย่างพืช

2. สามารถศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นเพิ่มเติม เช่น ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย, ความสามารถในการสร้าง 3-indole acetic acid (IAA) และการนำจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์

เอกสารอ้างอิง

ชุติมา แก้วกระจาย, ธิดา เดชฮวบ, เลิศชาย สถิตพนาวงศ์. (2557). ประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์จากโสน (*Sesbania javanica*) ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช. **แก่นเกษตร**. 42(3), 271-282.

อนันต์ วงเจริญ. (2557). การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งราสาเหตุโรคข้าว. **แก่นเกษตร.** 42(3), 385-396.

อามีนา สาแม, อัษฎาวุธ หิรัญรตัน์, สมพงศ์ โอทอง, พฤทฐิภร ศุภพล, นุกูล อินทระสังขา. (2560). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากสาหร่ายทะเล ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข.** 45(4), 793-804.

Aramsirirujiwet, Y., Gumlangmak, C., Kitpreechavanich, V. (2016). Antagonistic effect against plant pathogenic fungi from endophytic fungi isolated from *Hottuynia cordata* Thunb. and screening for siderophore and indole-3-acetic acid production. **KKU Research Journal**. 21(1), 55-66.

Gazis, R., Chaverri, P. (2010). Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**. 3(3), 240-254.

Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z., Su, W. (2001). Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei, Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. 31(2), 163-167.

Jayasuriya, K.E., Thennakoon, B.I. (2007). Biological control of *Rigidoporus microporus*, the cause of white root disease in rubber. **Ceylon Journal of Science**. 36(1), 9-16.

Kaewchai, S., Soytong, K. (2010). Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees. **Journal of Agricultural Technology**. 6(2), 349-363.

Khan, A.R., Ullah, I., Waqas, M., Shahzad, R., Hong, S., Park, G., Jung, B.K., Lee, I., Shin, J. (2015). Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 31(9), 1461-1466.

Prakash, S., Ramasubburayan, R., Iyapparaj, P., Kumar, C., Mary, C.J., Palavessam, A., Immanuel, G. (2013). Screening and partial purification of antifungal metabolite from *Streptomyces rochei* MSA14: an isolate from marine mining soil of Southwest coast of India. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**. 42(7), 888-897.

Radu, S., Kqueen, C.Y. (2002). Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in Malaysia for antimicrobial and antitumor activity. **Malaysian Journal of Medical Sciences**. 9(2), 23-33.

Rodrigues, K.F., Hesse, M., Werner, C. (2000). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**. 40(4), 261-267.

Senevirathana, H.D.A.A., de Silva, E.D., Wijayarathna, C.D., Wijesundara, R.L.C. (2015). Antimicrobial potential of the endophytic fungal extracts of *Mangifera zeylanica* (Anacardiaceae), an endemic plant of Sri Lanka, against selected patgogenic bacteria species. Proceeding of the 35th Annual sessions of the institute of biology, p.58.

Siri-Udom, S., Suwannarach, N., Lumyong, S. (2015). Existence of *Muscodor vitigenus*, *M. equiseti* and *M. heveae* sp. nov. in leaves of the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll.Arg.), and their biocontrol potential. **Annals of Microbiology**. 66(1), 437-448.

Stone, J.K., Polishook, J.D., White, Jr J.F. (2004). Endophytic fungi in **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods (ed.)**. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

Suwannarach, N., Bussaban, B., Hyde, K.D., Lumyong, S. (2010). *Muscodor cinnamomi*, a new endophytic species from *Cinnamomum bejolghota*. **Mycotaxon**. 114(1), 15-23.

Suwannarach, N., Kumla, J., Bussaban, B., Hyde, K.D., Matsui, K., Lumyong, S. (2013). Molecular and morphological evidence support four new species in the genus *Muscodor* from northern Thailand. **Annals of Microbiology**. 63(4), 1341-1351.

Taechowisan, T., Chuaychot, N., Chanaphat, S., Wanbanjob, A., Tantiwachwutikul, P. (2009). Antagonistic effects of *Streptomyces* sp. SRM1 on *Collectotrichum musae*. **Biotechnology.** 8(1), 86-92.

Tejesvi, M.V., Nalini. M.S., Mahesh, B., Prakash, H.S., Kini, K.R., Shetty, H.S., Subbiah, V. (2007). New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. **Boletín de la Sociedad Química de México**. 1(1), 19-26.

Vidal, A., Parada, R., Mendoza, L., Cotoras M. (2020). Endophytic fungi isolated from plants growing in Central Andean Precordillera of Chile with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Journal of fungi**. 6 (149), 1-14.

Waqas, M., Khan, A.L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S., Kim, Y., Lee, I. (2012). Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**. 17(9), 10754-10773.

Xia, Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott, D., Williams, M.A. (2015). Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth using organic or conventional practices. **Frontiers in Plant Science**. 6(490), 1-10.

Yu, J., Wu, Y., He, Z., Li, M., Zhu, K., Gao, B. (2018). Diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with *Camellia oleifera*. **Mycobiology.** 46(2), 85-91.

Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X., Gao, X. (2010). Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. in **Applied microbiology and Microbial Biotechnology**, A. mendez-Vilas (Ed.). Spain: Formatex.