การทดสอบชนิดของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ซึ่งแยกได้จากกล้วยไม้ไทยต่อการเจริญเติบโตและสร้างสารออกฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืช

Examination on Type of Culture Media and Suitable Conditions for Growth and Synthesis of Antifungal Compounds of Endophytic Fungi Isolated from Thai Orchid

ณัฐวดี บุญทองดี[1] คฑาวุธ โสภาลุน[2] วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์[3] ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม[4]*

Nattawadee Bungtongdee[1], Kathawut Sopalun[2], Wanpen Laosripaiboon[3] and Siriluck Iamtham[4*]

ABSTRACT

The objective of this research was to optimize culture medium and parameter for growth and antifungal activity of endophytic fungi isolated from Thai orchid species. A total of 97 endophytic fungi were isolated from the leaves (43), stems (39) and flowers (15) of 20 species of Thai orchids. Fungal endophyte CKL19-3 isolate from leaf of *Ascocentrum curvifolium*, which was identified as *Lasiosphaeria* sp. on the basis of morphologjcal and molecular analysis showed the strongest antifungal activity against *Cuvularia* sp. and *Fusarium s*p. The medium compositions and cultural parameters, including incubation time, initial pH and temperature of culture conditions of the fungus for the growth and antifungal activities were optimized. The results showed that maximum cell growths were obtained in the potato dextrose broth (PDB) medium at the optimal temperature 30 °C and pH 5 and growth for 5 days. The cell dry weight was 547.67 mg per 100 ml of medium. The medium also contained antifungal activities against *Cuvularia* sp. and *Fusarium* sp.

Keywords: Endophytic fungi, Orchids, Antimicrobial activity, Optimization, Bioactive compounds.

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของชนิดอาหารและปัจจัยการเลี้ยงสำหรับการเจริญเติบโตและการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วยไม้ไทย โดยแยกราเอนโดไฟท์ได้

[1]หลักสูตรวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Bioproduct Science Program, Department of Science, Graduate School, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

[2]โครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Microbiology, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

[3]โครงการจัดตั้งภาควิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

[4*]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

[*]Corresponding author: E-mail address: faassli@ku.ac.th

จำนวนทั้งหมด 97 ไอโซเลต แยกจากใบ 43 ไอโซเลต ลำต้น 39 ไอโซเลต และดอก 15 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากกล้วยไม้ไทยจำนวน 20 ตัวอย่าง ราเอนโดไฟท์รหัส CKL19-3 ซึ่งแยกได้จากใบของกล้วยไม้ *Ascocentrum curvifolium* เมื่อจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ชีวโมเลกุล พบว่าคือราเอนโดไฟท์ *Lasiosphaeria* sp. และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรค *Cuvularia* sp. และ *Fusarium* sp. ได้อย่างดี จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ในสภาวะที่มีการควบคุมองค์ประกอบของอาหาร และการเลี้ยงเชื้อในสภาวะต่างๆ ซึ่งได้แก่ ระยะเวลาการบ่มเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ผลการทดลองพบว่าในสภาวะอาหาร potato dextrose broth (PDB) ที่อุณหภูมิ 30 °C pH 5 และระยะเวลา 5 วัน เชื้อราเอนโดไฟท์ *Lasiosphaeria* sp. มีการเจริญเติบโตได้สูงสุด 547.67 mg น้ำหนักแห้ง/100 ml และยังมีฤทธิ์ในการต้าน *Cuvularia* sp. and *Fusarium* sp.ได้

คำสำคัญ: ราเอนโดไฟท์ กล้วยไม้ การต้านจุลินทรีย์ สภาวะที่เหมาะสม สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

บทนำ

กล้วยไม้ (orchids) เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ซึ่งมีสารในกลุ่มอัลคาลอยด์และไกลโคไซด์สูง จึงถูกใช้เป็นแหล่งของตัวยารักษาโรคมาเป็นระยะเวลานาน (Hossain, 2011) สำหรับประเทศไทยซึ่งมีพื้นที่ที่มีความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และความหลากหลายทางชีวภาพสูง ส่งผลให้กล้วยไม้มีความหลากหลายมากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก (สลิล และนฤมล, 2550) สำหรับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ซึ่งจำเป็นต้องพึ่งพาราในการรับสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการงอกของเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ของกล้วยไม้มีการกักเก็บอาหารสำรองไว้น้อยมากการพึ่งพาราจึงจำเป็นสำหรับกล้วยไม้ (Smith and Read, 1997) ในระหว่างที่พืชมีการเจริญเติบโต เส้นใยของราสามารถเจริญเข้าไปยังเซลล์พืชเพื่ออยู่อาศัย หรือรู้จักกันในนามของ ราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi) เป็นราที่เข้าไปอาศัยอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืช โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคใดๆกับพืชที่อาศัย เนื้อเยื่อของพืชที่มีราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ยังสามารถทำงานได้อย่างปกติ ลักษณะการอยู่อาศัยของราเอนโดไฟท์บนพืชอาศัยมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiotic) (Redlin and Carris, 1985; Strobel and Daisy, 2003; Strobel *et al*., 2004; Selim *et al*., 2012) โดยพืชแต่ละชนิดจะมีราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่มากกว่าหนึ่งสปีชีส์ และจะมีความจำเพาะต่อพืชนั้นในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ทำให้ราเอนโดไฟท์มีความหลากหลายค่อนข้างสูง (Huang *et al*., 2008)

มีราหลายชนิดที่เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ตึงเครียด เช่น อุณหภูมิสูง ความเข้มข้นของเกลือสูง ความเป็นกรด-ด่าง หรือมีการแผ่รังสีที่สูง ราจะมีความสามารถในการปรับตัวและสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ได้ (Mathan *et al.,* 2013) นำไปสู่การผลิตสารปฐมภูมิ (primary metabolite) ที่ใช้ในการเจริญเติบโต และสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ใช้ในขบวนการป้องกันตัวเอง ดังนั้นการควบคุมการเจริญเติบโต (Bernhoft, 2010) ของรามีอิทธิพลอย่างมากต่อการผลิตสารทุติยภูมิ เช่น การควบคุมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งฟอสฟอรัส การชักนำการผลิตสารโดยเอนไซม์ เป็นต้น (Betina, 1994) ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วยไม้ เพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ของราเอนโดไฟท์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกราเอนโดไฟท์

ทำการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้จากอำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย โดยเลือกเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีลักษณะอาการของโรค และจำแนกกล้วยไม้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากนั้นเลือกส่วนของเนื้อเยื่อพืช (ใบ ดอก ลำต้น) มาล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพื่อชะล้างคราบฝุ่น สิ่งสกปรกออกจากเนื้อเยื่อพืช พืช 2-3 นาที จากนั้นแช่เนื้อเยื่อพืชใน 75% Ethanol 30 วินาที ตามด้วยสารละลาย 5% Sodium hypochlorite (NaOCl) 30 วินาที และ 75% Ethanol 30 วินาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ผึ่งให้เนื้อเยื่อพืชแห้งภายในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) แล้วจึงตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชขนาดประมาณ 1×1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2-4 ชิ้น วางบนอาหาร Water agar (WA) นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-4 วัน สังเกตผลทุกวัน เมื่อพบว่ามีการงอกของราออกมาจากเนื้อเยื่อพืช ให้ย้ายราลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เจาะวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของรา (hyphal tips) ย้ายลงบนอาหาร PDA และเก็บรักษาราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ใน 15% กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -20 และ -80 °C

2. การคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้านราก่อโรคพืชเบื้องต้น

ราก่อโรคพืชทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งของราเอนโดไฟท์ คือ *Fusarium* sp.,*Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Phytophthora* sp. และ *Sclerotium* sp. ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยนำราก่อโรคมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 °C และใช้ทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี Dual culture technique ตามวิธีการของ Photita *et al.* (2001) โดยวางราเอนโดไฟท์และราก่อโรคบนอาหาร PDA ให้ห่างกันประมาณ 5 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C สังเกตผลทุกวันและบันทึกผลการยับยั้งเชื้อโดยการวัด inhibition zone ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์บนอาหารเพาะเลี้ยง

3.1. การทดสอบหาชนิดของอาหารเลี้ยงสภาวะการเลี้ยงและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสม

ราเอนโดไฟล์ที่คัดเลือกไว้ เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน เจาะวุ้นบริเวณปลายเส้นใยขนาด 6 mm 3 ชิ้น ใส่ลงในขวดที่บรรจุอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 100 mm นำขวดบรรจุอาหารไปเขย่าบนเครื่องเพาะเลี้ยงแบบเขย่า (shaker incubator) โดยใช้ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟท์ตลอดระยะเวลา 10 วัน โดยทำการกรองเส้นใยราด้วยกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว และล้างเส้นใยราด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง ซับให้แห้ง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา บันทึกผล ใช้ระยะเวลาที่มีการเจริญเติบและยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชที่ดีที่สุด มาใช้ในการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในสภาวะต่างๆ ดังนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ อาหาร PDB MEB (Malt extract broth) และ CDB (Czepek-Dox broth) บ่มที่อุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ 25 30 และ 35 °C และมีค่าความเป็นกรดด่าง ได้แก่ pH 5 pH 7 และ pH 9 รวมทั้งสิ้น 27 สิ่งทดลอง (Table 1) ในแต่ละการทดลองทำการบันทึกน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา และใช้อาหารเหลวที่เลี้ยงราเอนโดไฟท์และกรองเส้นใยราออกแล้ว มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและราก่อโรคพืช

3.2. การยับยั้งแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* ด้วยวิธี agar well diffusion ดัดแปลงจากวิธีการของณัฐวุฒิ (2549) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 100 µl (0.5 McFarland standard) เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วเจาะวุ้นด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm จำนวน 4 หลุมต่อจานเพาะเลี้ยงเชื้อ หยอดอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงในแต่ละการทดลองข้างต้นปริมาตร 80 µl ลงในหลุมที่เจาะไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำการวัด inhibition zone ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.3. การยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชด้วยอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Phytophthora* sp. และ *Sclerotium* sp. โดยเจาะวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm จำนวน 4 หลุมต่อจานเพาะเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นหยอดอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงในแต่ละการทดลองข้างต้นปริมาตร 80 µl ลงในหลุมที่เจาะไว้ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการยับยั้งเชื้อราก่อโรค 3-7 วัน แล้วจึงทำการบันทึกผลการยับยั้งโดยการวัด inhibition zone ทั้งหมด 3 ซ้ำ

4. สถิติที่ใช้ในการทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองโดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละสิ่งทดลองโดยใช้วิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0 ($P<0.05$)

Table 1 Optimization of three parameters (27 treatments) of growth conditions of the test endophytic fungi.

Temperature(°C)	pH	Medium optimization		
		PDB	MEB	CDB
25	5	(1) 25-PDB-5	(10) 25-MEB-5	(19)25-CDB-5
	7	(2) 25-PBD-7	(11) 25-MED-7	(20) 25-CBD-7
	9	(3) 25-PDB-9	(12) 25-MEB-9	(21) 25-CDB-9
30	5	(4) 30-PDB-5	(13) 30-MEB-5	(22) 30-CDB-5
	7	(5) 30-PBD-7	(14) 30-MED-7	(23) 30-CBD-7
	9	(6) 30-PDB-9	(15) 30-MEB-9	(24) 30-CDB-9
35	5	(7) 35-PDB-5	(16) 35-MEB-5	(25) 35-CDB-5
	7	(8) 35-PBD-7	(17) 35-MED-7	(26) 35-CBD-7
	9	(9) 35-PDB-9	(18) 35-MEB-9	(27) 35-CDB-9

*The number in the bracket indicates each treatment.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกราเอนโดไฟท์จากกล้วยไม้

จากตัวอย่างกล้วยไม้ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ที่เก็บจากบริเวณอำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย เมื่อจัดจำแนกกล้วยไม้ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีกล้วยไม้อยู่ 8 สกุล (genus) คือ *Dendrobium, Ascocentrum, Venda, Catteya*, *Hygrochilus, Cymbidium*, *Aerides* และ *Cleisostoma* ส่วนใหญ่เป็นสกุล *Dendrobium* ได้แก่ *D. umbonatum D. secundum D. lindleyi D. infundibulum* และ *Dendrobium* sp. โดยสามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้รวมทั้งสิ้น 97 ไอโซเลต โดยสามารถแยกราเอนโดไฟท์มากสุดได้จากส่วนของใบ จำนวน 43 ไอโซเลต รองลงมาคือส่วนของลำต้น จำนวน 39 ไอโซเลตและน้อยสุดคือส่วนของดอก จำนวน 15 ไอโซเลต แสดงให้เห็นว่า ราเอนโดไฟท์พบได้ทุกส่วนของพืช และพบราเอนโดไฟท์ในส่วนของใบและลำต้นได้ปริมาณใกล้เคียงกัน เนื่องมาจากเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว เป็นส่วนของ Xylem และ Phloem ซึ่งเป็นท่อลำเลียงน้ำและอาหารของพืชทำให้ราเอนโดไฟท์เจริญเติบโตได้ในบริเวณดังกล่าว (ณัฐวุฒิ, 2549) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับพฤติกรรมการอยู่อาศัยของราในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน (Dreyfuss and Chapela, 1994) หรืออาจขึ้นกับอายุของเนื้อเยื่อที่ใช้แยกราเอนโดไฟท์ โดยที่เนื้อเยื่อพืชส่วนที่ยังอ่อนเหมาะสมใช้ในการแยกราเอนโดไฟท์ได้ดีกว่าเนื้อเยื่อส่วนที่แก่แล้ว เนื้อเยื่อพืชส่วนที่ยังอ่อน จะเกิดโรคน้อยและทำให้แยกราเอนโดไฟท์ได้จำนวนมาก (Selim *et al.*, 2012)

2. ราเอนโดไฟท์ที่สามารถต้านราก่อโรคพืช

ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วยไม้ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน และนำมาศึกษาความสามารถในการต้านราก่อโรคพืชด้วยวิธี dual culture technique พบว่า ราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 97 ไอโซเลต มี 17 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืชได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด โดยราเอนโดไฟท์ที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืชได้ดีที่สุด แตกต่างจากชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ คือ ราเอนโดไฟท์ *Lasiosphaeria* sp. ซึ่งแยกได้จากส่วนใบของกล้วยไม้เข็มแดง (*Ascocentrum curvifolium*) และมีความสามารถในการยับยั้ง *Fusarium* sp. ซึ่งมี clear zone กว้าง 3.10 mm และยับยั้ง *Curvularia* sp. ซึ่งมี clear zone กว้างถึง 7.17 mm (Figure 1) จึงคัดเลือกมาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารออกฤทธิ์

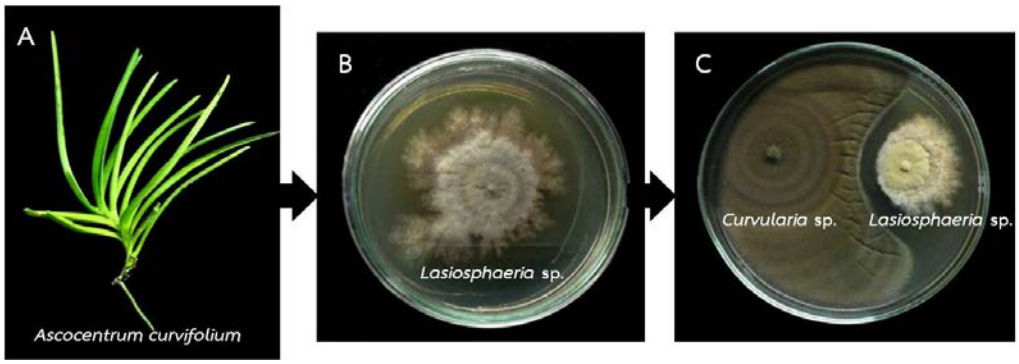

Figure 1 The epiphyte orchid host, *Ascocentrum curvifolium* (A). *Lasiosphaeria* sp.was isolated from the flower of *Ascocentrum curvifolium* (B). *Lasiosphaeria* sp. exhibited the strongest anti-pathogenic fungal activity against *Cuvularia* sp.by dual culture (C).

3. สภาวะที่เหมาะสมของราเอนโดไฟท์ *Lasiosphaeria* sp.

การศึกษาการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟท์ *Lasiosphaeria* sp. บนอาหาร PDB ซึ่งใช้เป็นอาหารพื้นฐานในการเลี้ยง และทำการเก็บผลการทดลองตลอดช่วงระยะเวลา 10 วัน โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของเส้นใยรา พบว่า ราเอนโดไฟท์ *Lasiosphaeri* sp. มีอัตราการเจริญเติบโตในระยะ log phase ในช่วงวันที่ 4-6 (Figure 2) และเลือกใช้วันที่ 5 หลังจากการเลี้ยงเป็นระยะเวลาอ้างอิงในการศึกษาสภาวะอื่นๆ ได้แก่ สภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่าง (pH 5 7 และ 9) อุณหภูมิ (25 30 และ 35 องศาเซลเซียส) และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDB, MEB และ CDB) จำนวนทั้งหมด 27 สิ่งทดลอง ผลการวัดน้ำหนักแห้งเส้นใยของ *Lasiosphaeria* sp. พบว่า *Lasiosphaeria* sp. เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 30 °C pH 5 และมีน้ำหนักแห้ง 547.67 mg/100 ml ของอาหารเลี้ยง (Table 2) โดยอาหาร PDB เป็นอาหารพื้นฐานที่ใช้เลี้ยงราทั่วไป มีอัตราส่วนของคาร์บอน:ไนโตรเจน (C:N ratio) สูง ช่วยให้ราหลายกลุ่มเจริญเติบโตได้ดี และมีองค์ประกอบสำคัญช่วยในการสร้าง spore (sporulation) ในการสร้างเม็ดสี (pigmentation) (Griffith *et al.*, 2007) Mathan *et al.* (2013) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราเอนโดไฟท์ *Aspergillus terreus* KC 582297 พบว่าเจริญเติบโตในอาหาร PDB ได้ดีสุด และสอดคล้องกับผลการสร้างสารออกฤทธิ์ยังยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella oxytoca* ได้ดีกว่าการเจริญเติบโตในอาหาร CDB

สอดคล้องกับผลทดสอบการต้านราก่อโรคพืช พบว่า *Lasiosphaeria* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Cuvularia* sp. และ *Fusarium* sp. ได้ดี ในขณะที่ไม่พบความสามารถในการต้านแบคทีเรียชนิดใดได้ (Table 3) แต่เมื่อเปรียบเทียบจากผลการทดสอบการยับยั้งราก่อโรคพืชของราเอนโดไฟท์ *Lasiosphaeria* sp. โดยวิธี dual culture กับวิธี agar well diffusion พบการยับยั้งราก่อโรคพืชลดลงในวิธี agar well diffusion นอกจากนี้ยังพบผลการต้านแบคทีเรียได้น้อย อาจเนื่องมาจากในวิธี agar well diffusion ใช้อาหารเลี้ยงราในการทดสอบ ราเอนโดไฟท์จะสร้างสารออกมาภายนอกเซลล์ และละลายอยู่ในอาหารเลี้ยง อาจมีปริมาณสารน้อย ทำให้สารออกฤทธิ์ถูกเจือจาง เป็นผลให้การยับยั้งราก่อโรคมีประสิทธิภาพน้อย ดังนั้นอาจต้องทำให้สารออกฤทธิ์มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยวิธีทางเคมี (ณัฐวุฒิ, 2549)

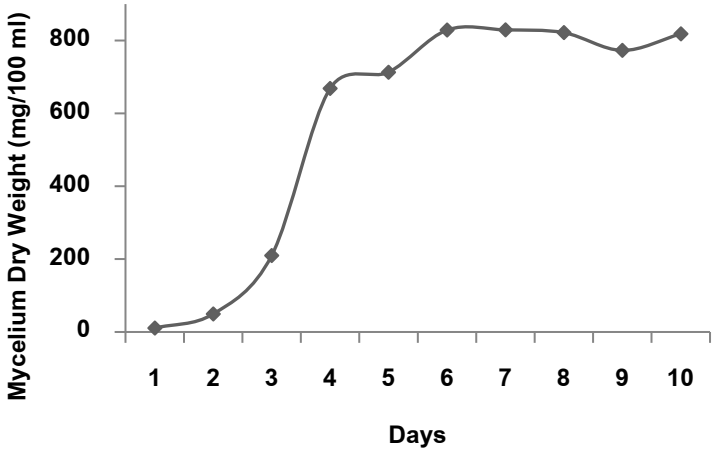

Figure 2 Mycelium dry weight of *Lasiosphaeria* sp. was obtained from PDB culture (pH 5.2) with various incubation times. Incubation was performed at 30 °C and 180 rpm.

Table 2 Effect of different medium composition, initial pH and temperature on biomass of *Lasiosphaeria* sp.

Temperature (°C)	pH	Mycelium dry weight (mg/100 ml)		
		CDB media	MEB media	PDB media
25	5	17.03 ± 1.77^{kl}	137.17 ± 25.20^{h}	386.80 ± 37.51^{c}
	7	17.27 ± 2.67^{kl}	123.10 ± 13.53^{h}	312.80 ± 32.28^{e}
	9	14.33 ± 0.47^{kl}	130.00 ± 16.69^{h}	336.07 ± 18.25^{de}
30	5	26.13 ± 1.33^{jkl}	184.87 ± 60.98^{g}	547.67 ± 21.40^{a}
	7	24.30 ± 3.03^{jkl}	183.37 ± 4.65^{g}	456.97 ± 12.56^{b}
	9	23.23 ± 0.91^{jkl}	234.33 ± 18.05^{f}	374.73 ± 70.53^{cd}
35	5	18.00 ± 4.62^{kl}	81.80 ± 13.13^{i}	77.37 ± 21.35^{i}
	7	9.93 ± 1.93^{l}	66.48 ± 9.47^{ij}	76.53 ± 32.84^{i}
	9	6.93 ± 1.44^{l}	57.87 ± 3.72^{ijk}	48.33 ± 32.69^{ijkl}

Values are given as means ± SD of three experiments in each group. Values not sharing a common marking (a, b, c …) differ significantly at $P<0.05$ (DMRT).

Table 3 *In vitro* antimicrobial activity of *Lasiosphaeria* sp. against the tested organisms.

Temp. (°C)	pH	Inhibition zone (mm)																	
		CDB media						MEB media						PDB media					
		Cu	Fu	Sa	Ec	Bs	Pa	Cu	Fu	Sa	Ec	Bs	Pa	Cu	Fu	Sa	Ec	Bs	Pa
25	5	-	4.50±0.50^{a}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.60±0.17^{c}	2.03±0.06^{b}	-	-	-	-
	7	1.60±0.17^{a}	2.33±0.29^{d}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.90±0.10^{bc}	1.33±0.29^{d}	-	-	-	-
	9	1.67±0.29^{a}	3.73±0.25^{b}	-	-	-	-	1.67±0.29^{d}	1.60±0.17^{cd}	-	-	-	-	1.93±0.12^{d}	2.93±0.12^{a}	-	-	-	-
30	5	-	2.93±0.16^{c}	-	-	-	-	2.97±0.05^{b}	3.97±0.06^{a}	-	-	-	-	1.67±0.29^{d}	1.33±0.29	-	-	-	-
	7	-	2.60±0.17^{cd}	-	-	-	-	3.87±0.32^{a}	3.23±0.25^{b}	-	-	-	-	4.13±0.32^{a}	1.83±0.29^{bc}	-	-	-	-
	9	1.17±0.29^{b}	2.83±0.29^{cd}	-	-	-	-	3.57±0.12^{a}	1.83±0.29^{c}	-	-	-	-	3.07±0.12^{b}	1.57±0.12^{cd}	-	-	-	-
35	5	-	-	-	-	-	-	2.43±0.12^{c}	1.17±0.29^{e}	-	-	-	-	1.17±0.29^{e}	1.17±0.29^{d}	-	-	-	-
	7	1.17±0.29^{b}	1.17±0.29^{e}	-	-	-	-	3.07±0.12^{b}	1.33±0.29^{de}	-	-	-	-	1.17±0.29^{e}	1.33±0.29^{d}	-	-	-	-
	9	1.67±0.29^{a}	2.90±0.36^{c}	-	-	-	-	1.67±0.29^{d}	1.17±0.29^{e}	-	-	-	-	1.07±0.12^{e}	1.17±0.29^{d}	-	-	-	-

Cu = *Curvularia* sp., Fu = *Fusarium* sp., Sa = *Staphylococcus aureus*, Ec = *Escherichia coli*, Bs = *Bacillus subtilis*, Pa = *Pseudomonas aeruginosa* and

Values are given as means ± SD of three experiments in each group. Values not sharing a common marking

(a, b, c …) differ significantly at P<0.05 (DMRT)

สรุป

จากการแยกราเอนโดไฟท์จากกล้วยไม้ จำนวน 20 ตัวอย่าง ใน 8 สกุล ได้แก่ *Dendrobium, Ascocentrum, Venda, Catteya*, *Hygrochilus, Cymbidium*, *Aerides* และ *Cleisostoma* ได้ราเอนโดไฟท์จำนวนทั้งหมด 97 ไอโซเลต โดยแยกได้จากส่วนของใบ จำนวน 43 ไอโซเลต ส่วนของลำต้น จำนวน 39 ไอโซเลต และส่วนของดอก จำนวน 15 ไอโซเลต พบว่าราเอนโดไฟท์ชนิด *Lasiosphaeria* sp. ซึ่งแยกได้มาจากส่วนใบของกล้วยไม้ *Ascocentrum curvifolium* สามารถต้านราก่อโรคพืช *Fusarium* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ดีบนอาหาร PDA ราเอนโดไฟท์ *Lasiosphaeria* sp. เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 5 ซึ่งชั่งน้ำหนักแห้งของเส้นใยได้ 547.67 mg/100 ml อาหารเลี้ยง นอกจากนี้น้ำเลี้ยงเชื้อรายังสามารถยับยั้งรา *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. ได้ ดังนั้นราเอนโดไฟท์ *Lasiosphaeria* sp. จะถูกนำมาศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์อื่นๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ราก่อโรคพืชจากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และได้รับการสนับสนุนวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์ส่งเสริมการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

เอกสารอ้างอิง

ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย. 2549. ราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์จากพืชสกุล *Garcinia*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สลิล สิทธิสัจธรรม และนฤมล กฤษณชาญดี. 2550. คู่มือกล้วยไม้. สานักพิมพ์สารคดี, กรุงเทพฯ.

Bernhoft, A. 2010. A brief review on bioactive compounds in plants, pp. 11-17. *In* The Norwegian Academy of Science and Letters.

Betina,V.1994. Bioactive secondary metabolites of microorganisms progress in industrial microbiology, vol.30, Elsevier. Amsterdam.

Dreyfuss, M.M. and I.H. Chapela. 1994. Discovery of novel Natural Products with Therapeutic Potential. Butterworth-Heinemann, Stoneham.

Griffith, G.W., G.L. Easton, A. Detheridge, K. Roderick, A. Edwards, H.J. Worgan, J. Nicholson and W.T. Perkins. 2007. Copper de¢ciency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. FEMS Microbiol Lett 276: 165–171.

Hossain, M.M. 2011. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advancen. Fitoterapia 82: 102-140.

Huang, W.Y., Y.Z. Cai, K.D. Hyde, H. Corke and M. Sun. 2008. Biodiversity of Endophytic Fungi Associated with 29 Traditional Chinese Medicinal Plants. Fungal Diversity 33: 61-75.

Mathan, S., V. Subramanian and S. Nagamony. 2013. Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297

European Journal of Experimental Biology 3(4):138-144.

Photita, W., S. Lumyong, P. Lumyong and K.D. Hyde. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuninata*) at Doi Suthep Pui national park. Mycol. Res. 105: 1508-1513.

Redlin, R.C. and L.M. Carris. 1985. Endophytic Fungi of Grasses and Woody Plants. APS Press, USA.

Selim, K.A., A.A. El-Beih, T.M. AbdEl-Rahman and A.I. El-Diwany. 2012. Biology of endophytic fungi. Current Research in Environmental and Applied Mycology 2(1): 31-82.

Smith, S.E. and D.J. Read. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Cambridge.

Strobel, G.A. and B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67: 491-502.

Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo and J. Harper.2004. Natural products from endophytic microorganisms. Journal of Natural Products 67(2): 257-26

Received 9 February 2018

Accepted 31 August 2018