

การแยกและการตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อราเอนโดไฟท์
ที่แยกได้จากกล้วยไม้ป่า 8 ชนิด

The Isolation and Screening of Extracellular Enzymatic Activities
of Endophytic Fungi Eight from Orchid Species

วรีรัตน์ คหะปะนะ,¹ คทาวุธ โสภากุล,² วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบุลย์,³ อัญลักษณ์ วชิรไชยการ⁴
และ ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม^{4*}

Waareerat Kahapana,¹ Kathawut Sopalun,² Wanpen Laosripaiboon,³ Anyalak Wachirachaikarn⁴
and Siriluck lamtham^{4*}

Received 14 January 2019, Accepted 30 April 2019

ABSTRACT

Endophytic fungi were isolated from 8 different species of epiphytic orchids, including *Aerides falcata*, *Aerides odorata*, *Cymbidium finlaysonianum* Lindl., *Coelogyne trinervis* Lindl., *Dendrobium lindleyi*, *Dendrobium secundum*, *Flickingeria ritaeana* and *Staurochilus fasciatus*. From the total of 105 isolates, the highest number of isolates (52) were obtained from leaf segments followed by stems (33) and roots (20). All of the endophytic isolates from orchids were assessed for their ability to produce extracellular enzymes, including amylase, lipase, cellulase, pectinase and protease. According to enzymatic tests, 68% of the isolates exhibited pectinase activities followed by the activities of, 62% for lipase, 60% for cellulase, 46% for protease and 17% for amylase. The results verified that the endophyte isolate CfS 02, isolated from the stem of *Cymbidium finlaysonianum* Lindl. has high potential to produce all of enzymes tested, particularly the highest production of the cellulase enzyme with the extracellular

¹ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

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

*Corresponding author: Tel.08-4306-8225, E-mail address: faassli@ku.ac.th

enzyme production ratios (EPR) of 2.89. CfS 02 was identified as *Xylaria* sp. using morphological characteristics combined with molecular analysis.

Keywords: Entophytic fungi, Orchid, Enzymatic activities, Morphology, DNA sequence

บทคัดย่อ

เชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วยไม้ป่าจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ เอื้องกุหลาบกระเป่าเปิด (*Aerides falcata*) เอื้องกุหลาบกระเป่าปิด (*Aerides odorata*) กะระกะร่อนปากเปิด (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) เอื้องใบหมาก (*Coelogyne trinervis* Lindl.) เอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi*) เอื้องแปรงสีฟัน (*Dendrobium secundum*) เอื้องขาไก่ (*Flickingeria ritaeana*) และเอื้องเสื่อโคร่ง (*Staurochilus fasciatus*) มีทั้งหมด 105 ไอโซเลต โดยแยกได้จากส่วนใบ 52 ไอโซเลต ส่วนลำต้น 33 ไอโซเลต และส่วนราก 20 ไอโซเลต ในการทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทั้งหมด 5 เอนไซม์ คือ เอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์เพคติเนส และเอนไซม์โปรติเอส พบว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์เพคติเนสได้มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 68 รองลงมาคือ เอนไซม์ไลเปสคิดเป็นร้อยละ 62 เอนไซม์เซลลูเลสคิดเป็นร้อยละ 60 เอนไซม์โปรติเอสคิดเป็นร้อยละ 46 และเอนไซม์อะไมเลสคิดเป็นร้อยละ 17 ของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ ราเอนโดไฟท์รหัส CfS 02 ที่แยกได้จากส่วนลำต้นของกล้วยไม้กะระกะร่อนปากเปิด พบว่ามีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทุกชนิดที่ทดสอบสูง โดยเฉพาะเอนไซม์เซลลูเลส มีค่า Extracellular enzyme production ratios (EPR) เท่ากับ 2.89 เมื่อนำมาจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการจำแนกทางพันธุกรรม พบว่าเป็นราเอนโดไฟท์ในกลุ่ม *Xylaria* sp.

คำสำคัญ: เชื้อราเอนโดไฟท์ กล้วยไม้ กิจกรรมเอนไซม์ ลักษณะสัณฐานวิทยา ลำดับเบสของดีเอ็นเอ.

บทนำ

เชื้อราเอนโดไฟท์มีความสามารถในการอยู่ร่วมกับพืชชนิดอื่นโดยไม่ก่ออันตรายหรือทำให้เกิดโรค ซึ่งอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชบริเวณส่วนที่ไม่เป็นโรค เช่น ใบ ลำต้น และราก (Arnold, 2000) ด้วยความหลากหลายทางชีวภาพของราเอนโดไฟท์ ส่งผลให้ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากมาย การกระจายตัวของเชื้อราเอนโดไฟท์ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางนิเวศวิทยาและสรีรวิทยาของพืช เช่น สถานที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ อายุและความจำเพาะของเนื้อเยื่อพืชอาศัย (Tan & Zou, 2001) เชื้อราเอนโดไฟท์จะผลิตเอนไซม์เพื่อเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชที่เป็นพืชเจ้าบ้าน เพื่อการแพร่พันธุ์ และการเจริญเติบโต โดยมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น อะไมเลส เซลลูเลส เพคติเนส ไลเปส และโปรติเอส เอนไซม์ที่ได้จาก

เชื้อรามักจะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายทางชีวภาพและถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในทางการแพทย์ และอุตสาหกรรม (Strobel & Daisy 2003; Selim *et al.*, 2012)

กล้วยไม้ (orchid) จัดเป็นพืชที่มีความหลากหลายมากที่สุด เนื่องจากสภาพแวดล้อมความหลากหลายทางชีวภาพและความแตกต่างของลักษณะทางภูมิศาสตร์ของแต่ละพื้นที่ (สลิล และนฤมล, 2550) ในระบบนิเวศวิทยาการอาศัยอยู่ร่วมกันระหว่างราเอนโดไฟท์และพืชเจ้าบ้าน (host plant) อยู่ในลักษณะต่างพึ่งพาอาศัยกันแบบภาวะสมชีพ (symbiosis) โดยที่ต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ร่วมกัน พืชเจ้าบ้านที่มีราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่นั้นจะให้สารอาหารและที่อยู่อาศัยแก่ราเอนโดไฟท์ ส่วนราจะสร้างสารเมตาบอไลต์ที่สำคัญบางอย่าง ในการช่วยปกป้องพืชเจ้าบ้านไม่ให้ได้รับอันตรายจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมรวมถึงแมลงและโรคที่

ทำลายพืชได้ดีขึ้น ช่วยให้พืชมีอัตราการดูดซึมน้ำ สารอาหารจากดินเพิ่มขึ้นเพราะเอนไซม์จากเชื้อรา ช่วยย่อยสารอาหารให้ดูดซึมง่ายขึ้น (Bacon & White, 2000) ในพืชแต่ละชนิดมีราเอนโดไฟท์อยู่มากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งมีความจำเพาะต่อพืชและสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ทำให้ราเอนโดไฟท์มีความหลากหลายสูง (Huang *et al.*, 2008)

ปัจจุบันทั่วโลกต่างให้ความสนใจมากขึ้นเกี่ยวกับการคัดเลือกจุลินทรีย์ใหม่ๆ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ให้เหมาะกับงานในระดับอุตสาหกรรม (Burhan *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2003) อุตสาหกรรมหลายประเภทจำเป็นต้องใช้เอนไซม์พื้นฐานหลายชนิด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส ไลเปส เพคติเนส และโปรติเอส ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้พบได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ต่าง ๆ การผลิตเอนไซม์จากเชื้อราได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื้อรานั้นเลี้ยงง่ายและให้ผลผลิตสูง เช่น เอนไซม์อะไมเลส ถูกนำมาใช้ในกระบวนการย่อยสลายแป้ง ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและการผลิตผงซักฟอก เอนไซม์เซลลูเลส ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ อาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมยา เอนไซม์ไลเปสใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก ผลิตภัณฑ์นม และกระบวนการผลิตเครื่องหนัง เอนไซม์โปรติเอสใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหาร และอุตสาหกรรมยา (Kavitha *et al.*, 1997) ส่วนเอนไซม์เพคติเนสนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม ช่วยทำให้การสกัดน้ำผลไม้ง่ายขึ้น ได้ผลผลิตมากขึ้น หรือใช้เพื่อทำให้น้ำผลไม้ใส (clarification)

การเติบโตของอุตสาหกรรมเหล่านี้ทำให้ความต้องการในการใช้เอนไซม์เพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นต้องมีงานวิจัยในการหาแหล่งของเอนไซม์ใหม่ๆ เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของอุตสาหกรรมต่างๆ (Torres *et al.*, 2003) งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วยไม้เพื่อสามารถเพิ่มแหล่งในการผลิตเอนไซม์ต่างๆ สำหรับนำไปต่อยอดใน

การใช้เอนไซม์ในทางอุตสาหกรรมที่หลากหลาย อีกทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับกล้วยไม้ไทยอีกทางหนึ่งด้วย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างกล้วยไม้

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้ป่าจากอำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต ประเทศไทย โดยเก็บจากต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีอาการของโรคใดๆ

2. การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

เลือกส่วนของใบ ลำต้น และรากของตัวอย่างกล้วยไม้ โดยเลือกบริเวณที่สมบูรณ์ที่สุด ไม่มีโรคพืชหรือแมลงรบกวน นำมาล้างให้สะอาด จากนั้นแช่ใน ethanol 75% เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย sodium hypochlorite 5% เป็นเวลา 30 วินาที แช่ชิ้นส่วนพืชใน ethanol 75% เป็นเวลา 30 วินาทีอีกครั้ง และล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง นำเข้าสู่ laminar flow วางบนกระดาษที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นตัดชิ้นส่วนพืชด้วยมีดผ่าตัดที่ผ่านการเผาไฟและรอให้เย็น โดยส่วนของใบตัดขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร และลำต้นตัดขนาด 1 เซนติเมตร ประมาณ 2-4 ชิ้น โดยตัดชิ้นส่วนพืชให้ผ่านบริเวณท่อลำเลียงน้ำและอาหาร จากนั้นนำมาวางบนอาหาร Water Agar (WA) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C สังเกตผลทุกวันเป็นเวลา 7 วันเมื่อพบว่ามีอาการเจริญของเส้นใยงอกออกมาจากชิ้นตัวอย่างพืช ตัดส่วนปลายเส้นใย (Hyphal tip) ของราเอนโดไฟท์ ด้วย cork borer นำไปแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ซึ่งวิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ วรรณฤดี (2552)

3. การจำแนกเชื้อราเอนโดไฟท์

3.1 จำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษาจากลักษณะพื้นฐานของเชื้อรา คือ ลักษณะหรือสีของโคโลนี และลักษณะรูปร่างของสปอร์ ซึ่งจะใช้คู่มือมาตรฐานในการจำแนกโดยเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิงที่มีรายงาน (Raper & Fennell, 1965; Barron, 1968; Klich, 2002; Samson *et al.*, 2002)

3.2 จำแนกจากลำดับเบส

3.2.1 การสกัด genomic DNA ของเชื้อราด้วยวิธี Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method

โดยใช้เส้นใยที่บดละเอียดปริมาณ 50-100 มก. เติม CTAB lysis buffer (CTAB 2 กรัม, NaCl 8.2 กรัม, Tris HCl 1 M (pH 8) ปริมาตร 10 มล., EDTA 0.5 M (pH 8) ปริมาตร 4 มล. ปรับ pH 8.4 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มล.) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส เติมสาร phenol: chloroform: isomyl alcohol (25: 24: 1) ผสมให้เข้ากันนำไปหมุนเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส เติมสาร chloroform: isomyl alcohol (24: 1) ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำขั้นตอนข้างต้นอีก 2 ครั้ง เก็บส่วนใสที่ได้ เติมสาร 3M sodium acetate (pH 5.2) และ absolute ethanol 500 ไมโครลิตร ปริมาตร 3 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันนำไปหมุนเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเกล็ดด้วย 75% ethanol 500 ไมโครลิตร ที่แช่เย็น นำไปหมุนเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ล้างเกล็ดออกประมาณ 2-3 ครั้ง เทส่วนใสทิ้งและตากตะกอนของ DNA ให้แห้งประมาณ 30 นาที ละลายตะกอน DNA ด้วย nanopure 20 ไมโครลิตร ที่ไว้ข้ามคืน

3.2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ใน TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ 20 นาที แล้วย้อมแผ่น agarose gel ด้วย ethidium bromide 5 นาที ตรวจสอบแถบของ DNA ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Documentation และตรวจสอบปริมาณของ DNA ด้วยการวัดการ

ดูดกลืนแสงแบบ microvolume ซึ่งต้องได้ค่าการดูดกลืนแสง $A_{260/280}$ ประมาณ 1.6-1.8

3.2.3 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยปฏิกิริยา PCR

การเพิ่มปริมาณส่วน ITS1-5.8S-ITS2 (ITS; Internal transcribed spacer) ของยีน rRNA โดยใช้ universal primers ได้แก่ ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') และ ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990) การทำปฏิกิริยา PCR มีการกำหนด PCR condition ดังนี้ ชุดปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร; DNA template (10 ng/ μ l) 1 ไมโครลิตร, 10X Ampli Gold buffer (1X) 5 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ (2.5 mM) 5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs mix (0.2 mM) 1 ไมโครลิตร, 10 μ M ITS1 (0.2 μ M) 1 ไมโครลิตร, 10 μ M ITS4 (0.2 μ M) 1 ไมโครลิตร และ 5 units Taq Ampil Gold (2 units) 0.4 ไมโครลิตร เมื่อทำการผสมส่วนผสมต่างๆ เรียบร้อยแล้ว นำไปทำปฏิกิริยาภายในเครื่อง Thermal cycler (Bio-Rad) ซึ่ง PCR profile มีขั้นตอนดังนี้ ขั้นที่ 1 Initial Denaturation 95 °C เป็นเวลา 10 นาที, ขั้นที่ 2 Denaturation 95 °C เป็นเวลา 1 นาที, ขั้นที่ 3 Annealing 55 °C เป็นเวลา 1 นาที, ขั้นที่ 4 Extension 72 °C เป็นเวลา 1.30 นาที, ขั้นที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 ทั้งหมด 34 รอบ, ขั้นที่ 6 Final Extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

3.2.4 การตรวจสอบปริมาณ PCR product ด้วยวิธี electrophoresis

ใช้ PCR product 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dry (6X) 1 ไมโครลิตร ตรวจสอบใน 1.5% agarose gel electrophoresis ใน TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นย้อมแผ่น agarose gel ด้วย ethidium bromide 5 นาที แล้วตรวจสอบแถบของ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Documentation

3.2.5 การอ่านลำดับเบสของ DNA (DNA sequencing)

จาก PCR product ดำเนินการโดยบริษัท MacroGen™ สาธารณะรัฐเกาหลี เปรียบเทียบลำดับเบสของ DNA ที่ได้กับลำดับเบสของราเอนโดไฟท์ในฐานข้อมูลของ GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสที่ใกล้เคียงในฐานข้อมูล

4. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของราเอนโดไฟท์ (Sunitha *et al.*, 2013)

นำเชื้อราเอนโดไฟท์ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 5-7 วัน เมื่อมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราให้ตัดส่วนปลายของเส้นใยยาวประมาณ 5 มม. นำไปวางบนอาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน และวัดขนาดโซนใส (clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อรา หน่วยเป็น มม. ตามวิธีการที่จำเพาะดังนี้

4.1 เอนไซม์อะไมเลส

ทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast Extract Peptone agar medium (GYP); glucose 1 กรัม, yeast extract 0.1 กรัม, peptone 0.5 กรัม, agar 16 กรัม และ น้ำกลั่น 1 ลิตร ที่มีน้ำแข็ง 0.2% บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน หยดสารละลายไอโอดีน 1% ในสารละลายโพแทสเซียมไอโอดีน 2% ที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่ปรากฏรอบๆ โคโลนีของเชื้อรา

4.2 เอนไซม์เซลลูเลส

ทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มี carboxy-methylcellulose 0.5% บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน หยดสารละลาย congo red 0.2% ที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 20-30 นาที แล้วล้างออกด้วย NaCl 1 M เป็นเวลา 15 นาที บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่ปรากฏรอบๆ โคโลนีของเชื้อรา

4.3 เอนไซม์โปรติเอส

ทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มี skim milk 1% (pH 6.5) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่ปรากฏรอบๆ โคโลนีของเชื้อรา

4.4 เอนไซม์ไลเปส

ทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Peptone agar medium; peptone 10 กรัม, NaCl 0.1 กรัม, CaCl₂ 2H₂O 0.1 กรัม, agar 16 กรัม และ น้ำกลั่น 1 ลิตร (pH 6.0) ที่มี Tween 20 1% บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตะกอนขุ่นขาวที่ปรากฏรอบๆ โคโลนีของเชื้อรา

4.5 เอนไซม์เพคตินเนส

ทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Pectin agar medium; pectin 5 กรัม, yeast extract 1 กรัม, peptone 0.5 กรัม, agar 15 กรัม และ น้ำกลั่น 1 ลิตร (pH 5.0) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน หยดสารละลาย Hexadecyl trimethylammonium bromide 1% ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่ปรากฏรอบๆ โคโลนีของเชื้อรา

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้โปรแกรม SPSS version 16.0 เปรียบเทียบความแตกต่างด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (One-Way ANOVA) และ Duncan : LSD Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P<0.05)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากกล้วยไม้

แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ป่าในอำเภอดงหลวง จังหวัดสุโขทัย ทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ เอื้องกุหลาบกระเปาะเปิด (*Aerides falcata*) เอื้องกุหลาบกระเปาะปิด (*Aerides odorata*) กะระกระร่อนปากเปิด (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) เอื้องใบหมาก (*Coelogyne trinervis* Lindl.) เอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi*) เอื้องแปรงสีฟัน

(*Dendrobium secundum*) เอื้องขาไก่ (*Flickingeria ritaeana*) และเอื้องเสื่อโคร่ง (*Staurochilus fasciatus*) พบว่าสามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 105 ไอโซเลต (Table 1) โดยสามารถแยกได้มากที่สุดจากส่วนใบ จำนวน 52 ไอโซเลต รองลงมาคือส่วนลำต้น พบราเอนโดไฟท์จำนวน 33 ไอโซเลต และส่วนที่พบน้อยที่สุดคือส่วนราก พบราเอนโดไฟท์จำนวน 20 ไอโซเลต (Table 1) Sudheep & Kandikere (2012) แยกราเอนโดไฟท์จากกล้วยไม้ *Vanda testacea* และ *Bulbophyllum neilgherrense* พบราเอนโดไฟท์น้อยที่สุดในส่วนของลำต้นและใบ แต่พบมากที่สุดในส่วนของราก อาจเป็นผลมาจากกล้วยไม้ทั้งสองชนิดนี้อาศัยอยู่ในป่าบริเวณเทือกเขากัทส์ทิศตะวันตก (Western Ghats) ซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์ของสิ่งมีชีวิตมากมาย และมีศัตรูพืชจำนวนมาก จึงเป็นไปได้ว่า

ราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่บริเวณใบอาจถูกทำลายได้ง่ายจากศัตรูพืช

กล้วยไม้ที่นำมาแยกราเอนโดไฟท์ในการทดลองนี้มีลักษณะการเจริญเติบโต ลักษณะของใบ ลำต้นและรากที่ต่างกัน คือ ประเภทแตกกอ (Sympodial) เป็นกล้วยไม้ในสกุลหวาย (*Dendrobium*) ลักษณะใบจะบางไม่หนา แต่ลักษณะของลำต้นจะบวมเป่ง ทำหน้าที่สะสมน้ำและอาหาร เรียกส่วนนี้ว่า ลำลูกกล้วย มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำมากกว่า และประเภทไม่แตกกอ (Monopodial) เป็นกล้วยไม้ในสกุลกุหลาบ (*Aerides*) สกุลเสื่อโคร่ง (*Staurochilus*) ลักษณะของเนื้อใบหนา และแบน การสะสมอาหารจึงเกิดที่ส่วนใบมากกว่า จึงส่งผลให้พบจำนวนราเอนโดไฟท์จากส่วนของพืชต่างกัน (Soon, 1995)

Table 1 Number of endophytic fungi isolated from leaves, stems and roots of eight Thai epiphytic orchid species

Orchid Species	Number of Isolates			Total
	leaves	stems	roots	
<i>Aerides falcata</i>	8	0	5	13
<i>Aerides odorata</i>	6	0	4	10
<i>Cymbidium finlaysonianum</i> Lindl.	6	5	0	11
<i>Coelogyne trinervis</i> Lindl.	6	5	0	11
<i>Dendrobium lindleyi</i>	6	10	0	16
<i>Dendrobium secundum</i>	6	3	6	15
<i>Flickingeria ritaeana</i>	7	6	0	13
<i>Staurochilus fasciatus</i>	7	4	5	16
Total	52	33	20	105

การตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ของราเอนโดไฟท์

การตรวจสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วยไม้ทั้งหมด 105 ไอโซเลต พบว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์เพคติเนสได้มากที่สุด (68%) รองลงมาคือเอนไซม์ไลเปส (62%) เอนไซม์เซลลูเลส (60%) และเอนไซม์โปรติเอส (46%) ส่วนเอนไซม์

อะไมเลสพบว่ามีสร้างได้น้อยที่สุด (17%) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sunitha *et al.* (2013) ที่แยกราเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพร 4 ชนิดพบว่ามีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพคติเนสและเอนไซม์อะไมเลส คิดเป็น 62% และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของประไพพิศ (2552) พบเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลน สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากที่สุด (31.7%) และพบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสน้อยมาก (1.1%) แต่ใน

งานวิจัยของประไพพิศไม่พบเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งอาจเนื่องมาจากการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ ของเชื้อราเอนโดไฟท์อาจถูกควบคุมโดยสภาวะของสารอาหารภายในเซลล์พืช โดยพืชสามารถชักนำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้ จึงทำให้ตรวจพบปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ต่างกัน (Centis *et al.*, 1997) และจากงานวิจัยของ Pavithra *et al.* (2012) ที่แยกราเอนโดไฟท์จากต้นกะเพราซึ่งเป็นพืชสมุนไพร พบว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์อะไมเลสได้ คิดเป็น 50%

ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลสพบว่าราเอนโดไฟท์รหัส Sfl 06 มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด โดยมีค่า EPR เท่ากับ 1.61 ± 0.11 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสพบว่าราเอนโดไฟท์รหัส AoL 05 มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด โดยมีค่า EPR เท่ากับ 2.05 ± 0.03 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสพบว่าราเอนโดไฟท์รหัส CfS 02 มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด โดยมีค่า EPR เท่ากับ 2.89 ± 0.09 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เพคติเนสพบว่าราเอนโดไฟท์รหัส FrS 07 มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เพคติเนสได้สูงสุด โดยมีค่า EPR เท่ากับ 2.76 ± 0.23 การทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสพบว่าราเอนโดไฟท์รหัส CfL 04 มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด โดยมีค่า EPR เท่ากับ 3.21 ± 0.23 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p < 0.05$) กับราเอนโดไฟท์ทุกไอโซเลต ที่ทำการทดสอบ ในการทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ในครั้งนี้พบว่าราเอนโดไฟท์รหัส CfS 02 สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทุกชนิดที่มีการทดสอบ (Table 2)

การที่เชื้อราเอนโดไฟท์แต่ละชนิดมีการผลิตเอนไซม์ต่างกัน เป็นผลมาจากการถูกควบคุมโดยสภาวะของสารอาหารภายในเซลล์พืช โดยพืชสามารถชักนำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้ และเชื้อราเอนโดไฟท์จะสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสับ

เสตรทต่าง ๆ ของพืชที่จำเพาะต่อเอนไซม์นั้น ๆ (Centis *et al.*, 1997) โดยมีเอนไซม์หลายชนิดที่เชื้อราสร้างขึ้นเพื่อนำไปใช้ประโยชน์กับตัวเอง เช่น สร้างเอนไซม์เซลลูเลส ขึ้นเพื่อย่อยผนังเซลล์ ซึ่ง Picard *et al.* (2000) พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Tichoderma viride* สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเซลลูโลสบนผนังเซลล์ของเชื้อ *Phytophthora* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และมีรายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สร้างเอนไซม์เพคติเนสขึ้นเพื่อย่อยสลายเพคติทิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการให้ความแข็งแรงแก่ผนังของเซลล์พืช ส่วนเอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolases มีรายงานว่าถูกสร้างขึ้นเพื่อใช้เปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาลโดยการทำลายพันธะ 1,4-glycosidase ในโมเลกุลของแป้ง ทำให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนช่วยในการเจริญเติบโต (วิราสิณี และ นพพล, 2556) และเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ (Jaeger *et al.*, 1994)

การจำแนกราเอนโดไฟท์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะของโคโลนี ลักษณะสปอร์ของรา พบว่าราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่ไม่สามารถสร้างสปอร์เองได้ จึงต้องมีการชักนำการสร้างสปอร์โดยการใส่ชิ้นพืชที่เป็นพืชเจ้าบ้านของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ จากการทดลองพบว่ามีราเอนโดไฟท์ 1 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสปอร์เองได้ คือราเอนโดไฟท์รหัส DsR-04 แยกได้จากส่วนรากของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน (*Dendrobium secundum*) ซึ่งเมื่อนำสปอร์มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นเชื้อราในกลุ่ม *Pestalotiopsis* sp. เนื่องจากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (PDA) พบว่าลักษณะของเส้นใยมีสีขาวและค่อนข้างหยาบ (Figure 1A) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบลักษณะโคนิเดียคล้ายรูปกระสวย มีสีน้ำตาลเข้มตรงกลาง ส่วนหัวและท้ายมีลักษณะแหลมเรียวไม่มีสีมีรยางค์ยื่นออกไปที่ปลาย (Figure 1B)

Table 2 Summary of evaluation of the enzyme production rate (clear zone in mm/colony diameter in mm) of endophytic fungi isolated from eight epiphytic orchid species on solid medium

Endophytic fungi isolate	Amylase	Lipase	Cellulase	Pectinase	Protease
AfL-01	0.00±0.00 ^a	1.35±0.02 ^{bcdefghij}	0.00±0.00 ^a	1.10±0.03 ^{bcdef}	0.00±0.00 ^a
AfL-02	1.21±0.23 ^{def}	0.00±0.00 ^a	1.05±0.00 ^{bcde}	1.06±0.01 ^{bcde}	1.03±0.01 ^b
AfL-03	0.00±0.00 ^a	1.14±0.02 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	1.13±0.02 ^{bcdefgh}	0.00±0.00 ^a
AfL-04	0.00±0.00 ^a	1.28±0.02 ^{bcdefghi}	1.04±0.01 ^{bcde}	1.09±0.02 ^{bcde}	1.11±0.03 ^{bcdef}
AfL-05	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.05±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
AfL-06	1.21±0.25 ^{def}	1.37±0.03 ^{cdefghijkl}	0.00±0.00 ^a	1.08±0.01 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
AfL-07	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.05±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	1.03±0.00 ^b
AfL-08	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.04±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
AfR-01	0.00±0.00 ^a	1.12±0.00 ^{bcd}	1.03±0.00 ^{bc}	1.08±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
AfR-03	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.06±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
AfR-04	0.00±0.00 ^a	1.30±0.02 ^{bcdefghij}	1.07±0.01 ^{bcdef}	1.07±0.01 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
AfR-05	1.28±0.07 ^{fg}	1.14±0.02 ^{bcde}	1.30±0.04 ^{jk}	1.37±0.02 ^{hi}	1.22±0.02 ^{bcdefgh}
AoL-01	0.00±0.00 ^a	1.24±0.01 ^{bcdefgh}	1.05±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
AoL-02	0.00±0.00 ^a	1.42±0.03 ^{efghijklm}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.12±0.01 ^{bcdefg}
AoL-03	0.00±0.00 ^a	1.37±0.06 ^{cdefghijkl}	1.04±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	1.07±0.01 ^{bcde}
AoL-04	0.00±0.00 ^a	1.30±0.01 ^{bcdefghij}	0.00±0.00 ^a	1.07±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
AoL-05	0.00±0.00 ^a	2.05±0.03st	0.00±0.00 ^a	1.29±0.04 ^{efghi}	0.00±0.00 ^a
AoL-06	0.00±0.00 ^a	1.41±0.01 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
AoR-01	0.00±0.00 ^a	1.18±0.03 ^{bcdef}	1.07±0.02 ^{bcdef}	1.05±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
AoR-02	0.00±0.00 ^a	1.15±0.03 ^{bcde}	1.04±0.01 ^{bcde}	1.05±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
AoR-03	0.00±0.00 ^a	1.96±0.11 ^{qrst}	1.05±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	1.04±0.00 ^b
CfL-01	0.00±0.00 ^a	1.93±0.04 ^{qrst}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
CfL-02	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.03±0.01 ^{bcd}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
CfL-03	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
CfL-04	0.00±0.00 ^a	1.59±0.07 ^{klmno}	0.00±0.00 ^a	1.09±0.02 ^{bcde}	3.21±0.23^m
CfL-05	0.00±0.00 ^a	2.02±0.02 ^{rst}	1.29±0.07 ^{ijk}	1.13±0.06 ^{bcdefgh}	1.44±0.04 ^{ijk}
CfL-06	1.18±0.05 ^{cdef}	1.91±0.09 ^{pqrst}	1.13±0.02 ^{cdefg}	1.28±0.03 ^{cdefghi}	1.34±0.06 ^{hijk}
CfS-01	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.05±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
CfS-02	1.50±0.05 ^h	1.77±0.06 ^{nopqr}	2.89±0.09^o	1.16±0.03 ^{bcdefgh}	1.52±0.10 ^k
CfS-03	1.09±0.02 ^{bcd}	0.00±0.00 ^a	1.04±0.00 ^{bcde}	1.06±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
CfS-04	0.00±0.00 ^a	1.13±0.09 ^{bcd}	1.05±0.01 ^{bcde}	1.04±0.00 ^{bcd}	1.06±0.01 ^{bcd}
CtL-01	0.00±0.00 ^a	1.09±0.02 ^{bcd}	1.02±0.00 ^b	1.06±0.01 ^{bcde}	1.27±0.05 ^{efghi}
CtL-03	0.00±0.00 ^a	1.36±0.04 ^{cdefghijk}	1.02±0.00 ^b	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
CtL-04	0.00±0.00 ^a	1.51±0.18 ^{hijklmn}	1.52±0.07 ^m	1.20±0.01 ^{bcdefghi}	2.29±0.10 ^l
CtL-05	0.00±0.00 ^a	1.39±0.00 ^{defghijkl}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.04±0.00 ^{bc}
CtL-06	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.04±0.00 ^{bcd}	0.00±0.00 ^a
CtL-07	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.07±0.01 ^{bcdef}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
CtS-02	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.04±0.00 ^{bcde}	1.03±0.00 ^b	0.00±0.00 ^a
CtS-03	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.20±0.00 ^{gh}	1.08±0.01 ^{bcde}	1.08±0.02 ^{bcde}
CtS-04	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.05±0.01 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a

Table 2 (Continued)

Endophytic fungi isolate	Amylase	Lipase	Cellulase	Pectinase	Protease
CtS-05	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
DIL-02	0.00±0.00 ^a	1.30±0.01 ^{bcdefghij}	1.04±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	1.04±0.00 ^b
DIL-03	0.00±0.00 ^a	1.25±0.02 ^{bcdefghi}	0.00±0.00 ^a	1.16±0.02 ^{bcdefgh}	0.00±0.00 ^a
DIL-04	0.00±0.00 ^a	1.65±0.14 ^{lmnop}	0.00±0.00 ^a	2.58±0.06 ^m	1.10±0.01 ^{bcde}
DIL-05	0.00±0.00 ^a	1.49±0.09 ^{ghijklm}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.03±0.00 ^b
DIL-07	0.00±0.00 ^a	1.16±0.03 ^{bcde}	1.06±0.00 ^{bcde}	1.07±0.00 ^{bcde}	1.06±0.00 ^{bcd}
DIL-08	0.00±0.00 ^a	1.29±0.03 ^{bcdefghi}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.04±0.00 ^b
DIS-01	0.00±0.00 ^a	1.15±0.01 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	1.07±0.00 ^{bcde}	1.06±0.02 ^{bcd}
DIS-02	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.03±0.00 ^{bcd}	1.06±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
DIS-03	0.00±0.00 ^a	1.14±0.02 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	1.33±0.04 ^{fghi}	0.00±0.00 ^a
DIS-04	0.00±0.00 ^a	1.16±0.03 ^{bcde}	1.07±0.00 ^{bcdef}	1.37±0.08 ^{hi}	0.00±0.00 ^a
DIS-05	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.04±0.00 ^{bcde}	1.23±0.02 ^{bcdefghi}	1.06±0.00 ^{bcd}
DIS-06	0.00±0.00 ^a	1.15±0.02 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	1.38±0.06 ^{hi}	0.00±0.00 ^a
DIS-07	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.08±0.00 ^{bcdef}	1.05±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
DIS-08	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
DIS-09	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.09±0.02 ^{bcdef}	1.06±0.00 ^{bcde}	1.05±0.00 ^{bcd}
DsL-01	0.00±0.00 ^a	1.77±0.06 ^{nopqr}	1.21±0.03 ^{ghi}	1.44±0.06 ^{ij}	1.13±0.02 ^{bcdefg}
DsL-02	0.00±0.00 ^a	1.21±0.01 ^{bcdefg}	1.09±0.01 ^{bcdef}	1.03±0.01 ^b	1.06±0.01 ^{bcd}
DsL-03	1.14±0.01 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	1.06±0.01 ^{bcde}	1.06±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
DsL-04	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.07±0.00 ^{bcdef}	0.00±0.00 ^a	1.04±0.00 ^b
DsL-05	0.00±0.00 ^a	1.78±0.38 ^{nopqr}	1.08±0.01 ^{bcdef}	1.06±0.01 ^{bcde}	1.05±0.01 ^{bcd}
DsL-06	0.00±0.00 ^a	1.40±0.02 ^{defghijkl}	0.00±0.00 ^a	1.20±0.02 ^{bcdefghi}	1.09±0.01 ^{bcde}
DsS-01	0.00±0.00 ^a	1.28±0.06 ^{bcdefghi}	1.04±0.00 ^{bcde}	1.04±0.01 ^{bcd}	1.05±0.00 ^{bcd}
DsS-03	0.00±0.00 ^a	1.08±0.01 ^{bc}	1.11±0.01 ^{bcdef}	1.04±0.01 ^{bcd}	1.05±0.01 ^{bcd}
DsS-04	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.05±0.01 ^{bcde}	1.05±0.00 ^{bcde}	1.05±0.01 ^{bcd}
DsR-01	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
DsR-02	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.03±0.00 ^{bcd}	1.04±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
DsR-03	1.06±0.01 ^{bc}	0.00±0.00 ^a	1.12±0.00 ^{bcdefg}	1.07±0.00 ^{bcde}	1.09±0.15 ^{bcde}
DsR-04	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.03±0.00 ^b	1.04±0.15 ^{bc}
DsR-05	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
FrL-01	0.00±0.00 ^a	1.35±0.05 ^{bcdefghij}	1.11±0.01 ^{bcdef}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
FrL-02	0.00±0.00 ^a	1.36±0.01 ^{cdefghij}	0.00±0.00 ^a	1.08±0.01 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
FrL-04	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.06±0.00 ^{bcde}	1.04±0.01 ^{bcd}	1.04±0.00 ^b
FrL-06	1.07±0.00 ^{bc}	0.00±0.00 ^a	1.07±0.00 ^{bcdef}	1.11±0.02 ^{bcdef}	0.00±0.00 ^a
FrL-07	1.12±0.00 ^{bcde}	1.18±0.05 ^{bcdef}	0.00±0.00 ^a	1.33±0.00 ^{fghi}	0.00±0.00 ^a
FrL-08	1.03±0.00 ^b	0.00±0.00 ^a	1.04±0.01 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
FrL-09	1.13±0.02 ^{bcde}	1.36±0.03 ^{cdefghijk}	1.24±0.01 ^{hij}	1.14±0.01 ^{bcdefgh}	1.39±0.07 ^{hijk}
FrS-01	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.07±0.02 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
FrS-02	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.05±0.01 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
FrS-03	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.05±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
FrS-04	0.00±0.00 ^a	1.46±0.00 ^{ghijklm}	1.04±0.00 ^{bcde}	1.12±0.00 ^{bcdefg}	1.25±0.00 ^{cdefghi}

Table 2 (Continued)

Endophytic fungi isolate	Amylase	Lipase	Cellulase	Pectinase	Protease
FrS-06	0.00±0.00 ^a	1.06±0.00 ^b	1.05±0.01 ^{bcde}	1.33±0.08 ^{fghi}	1.09±0.00 ^{bcde}
FrS-07	0.00±0.00 ^a	1.60±0.05 ^{klmno}	0.00±0.00 ^a	2.76±0.23^m	1.48±0.22 ^{jk}
SfL-01	0.00±0.00 ^a	1.26±0.09 ^{bcdefghi}	0.00±0.00 ^a	1.21±0.03 ^{bcdefghi}	1.10±0.00 ^{bcde}
SfL-02	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.09±0.01 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a
SfL-04	1.23±0.00 ^{ef}	1.65±0.25 ^{lmnop}	0.00±0.00 ^a	1.23±0.01 ^{bcdefghi}	0.00±0.00 ^a
SfL-05	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.04±0.01 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
SfL-06	1.61±0.11ⁱ	1.29±0.04 ^{bcdefghi}	0.00±0.00 ^a	1.95±0.18 ^l	0.00±0.00 ^a
SfL-07	1.29±0.03 ^{fg}	1.69±0.08 ^{mnpq}	0.00±0.00 ^a	1.68±0.08 ^k	0.00±0.00 ^a
SfL-08	0.00±0.00 ^a	1.30±0.04 ^{bcdefghij}	1.16±0.02 ^{fgh}	0.00±0.00 ^a	1.14±0.00 ^{bcdefg}
SfS-02	0.00±0.00 ^a	1.46±0.04 ^{ghijklm}	1.34±0.07 ^{kl}	1.15±0.00 ^{bcdefgh}	1.15±0.02 ^{bcdefg}
SfS-03	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.10±0.02 ^{bcdef}	0.00±0.00 ^a	1.05±0.00 ^{bc}
SfS-04	0.00±0.00 ^a	1.59±0.06 ^{klmno}	1.42±0.01 ^l	1.34±0.08 ^{ghi}	1.14±0.01 ^{bcdefg}
SfS-05	0.00±0.00 ^a	1.54±0.06 ^{ijklmno}	0.00±0.00 ^a	1.28±0.05 ^{bcdefghi}	1.26±0.01 ^{defghi}
SfR-01	0.00±0.00 ^a	1.32±0.05 ^{bcdefghijk}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.31±0.06 ^{ghij}
SfR-02	0.00±0.00 ^a	1.12±0.01 ^{bcd}	0.00±0.00 ^a	1.60±0.05 ^{jk}	0.00±0.00 ^a
SfR-03	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.05±0.00 ^{bcde}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
SfR-04	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.13±0.00 ^{defg}	1.04±0.00 ^{bc}	1.02±0.00 ^b
SfR-05	0.00±0.00 ^a	1.42±0.13 ^{efghijklm}	1.10±0.01 ^{bcdef}	1.11±0.02 ^{bcdef}	1.30±0.03 ^{fghij}
Enzyme activity (%)	17	62	60	68	46

Note: Af; *Aerides falcata*, Ao; *Aerides odorata*, Cf; *Cymbidium finlaysonianum* Lindl., Ct; *Coelogyne trinervis* Lindl., Df; *Dendrobium lindleyi*, DS; *Dendrobium secundum*, Fr; *Flickingeria ritaeana* and Sf; *Staurochilus fasciatus*.
L; Leaf, S; Stem and R; Root

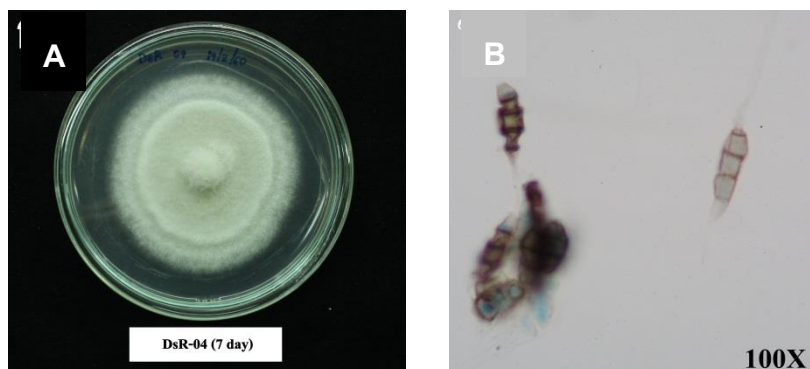


Figure 1 Morphological characteristics of the endophyte isolate DsR-04 (*Pestalotiopsis* sp.): (A) colony after 7 days on PDA medium and (B) conidigenous cells (100 x)

การจำแนกเชื้อราโดยการวิเคราะห์ลำดับเบส

การจัดจำแนกราเอ็นโดไฟท์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นเป็นปัญหาที่พบบ่อยในกรณีศึกษากราเอ็นโดไฟท์ จึงได้มีการใช้การจัดจำแนกลักษณะทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วย โดยในการจำแนกราเอ็นโดไฟท์ด้วยลักษณะทาง

ชีวโมเลกุล จะทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) ที่อยู่ในยีนใน ribosomal RNA ของเชื้อรา โดยมีความแปรผันมากที่สุดเหมาะสมในการจำแนกสิ่งมีชีวิตในระดับ genus และ species ได้ (ณัฐวุฒิ, 2549) ในงานวิจัยครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เป็น universal

primer สามารถ amplified ครอบคลุมได้ทั้งหมดใน ส่วนของยีน ITS1, ITS2 และ 5.8S coding sequence สอดคล้องกับงานวิจัยของ You *et al.* (2013) ที่ใช้ ITS1 และ ITS4 primer ในการจำแนก ราเอนโดไฟท์จาก *Rheum palmatum* L.

ในกรณีของราเอนโดไฟท์รหัส CfS-02 ที่แยกได้จากส่วนลำต้นของกล้วยไม้กะเหรี่ยงปากเปิด ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ เซลลูเลสได้สูงสุดรวมทั้งสามารถสร้างเอนไซม์อีก 4 ชนิดได้ดีด้วยนั้น การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาทำได้ไม่ชัดเจน เนื่องจากไม่พบการสร้าง สปอร์จึงต้องจัดจำแนกด้วยลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งจะให้ผลการจัดจำแนกที่แม่นยำ ทำได้โดยนำราเอนโดไฟท์รหัส CfS-02 ไปเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Broth แล้วกรองส่วนของเส้นใยนำมาสกัด DNA ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ที่สกัดได้ด้วยการวัดการดูดกลืนแสง พบว่า

ผลการวิเคราะห์ทาง DNA ของราเอนโดไฟท์รหัส CfS-02 มีค่าการดูดกลืนแสง (A_{260}/A_{280}) เท่ากับ 2.20 และมีปริมาณ DNA เท่ากับ 66.12 ng/ μ L ผลการวิเคราะห์พบว่า DNA ที่สกัดได้มีปริมาณเพียงพอและมีความบริสุทธิ์ที่สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณขั้นต่อไปได้

การนำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณใน ส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) ที่อยู่ บน ribosomal RNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ผลการ ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ PCR product บนแผ่น agarose gel เกิดแถบของ PCR product ภายใต้แสงยูวี (Figure 2) พบแถบที่ 1 เป็น PCR product ของราเอนโดไฟท์รหัส CfS 02 ซึ่งมีขนาด 560 คู่เบส (bp.) เมื่อเทียบกับ marker (100 bp. Marker, Thermo Scientific.)

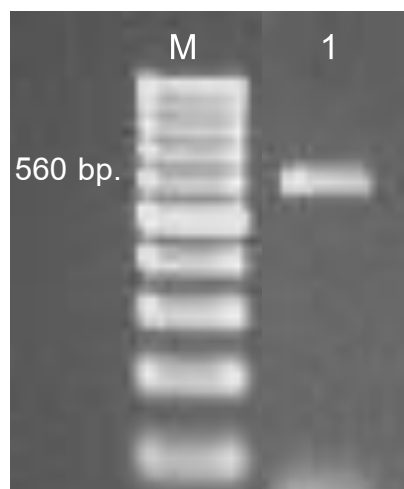


Figure 2 Electrophoresis gel results of PCR amplification of the marker (M) and the endophyte isolate CfS 02 (1) using universal ITS1 and ITS4 primers which amplified 560 bp

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ของราเอนโดไฟท์รหัส CfS 02 นำไปเปรียบเทียบกับ ลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม BLAST search ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าราเอนโดไฟท์รหัส CfS 02 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อ *Xylaria* sp. (Table 3) ซึ่งเป็นเห็ดราขนาดใหญ่ในวงศ์ Xylariaceae มีความหลากหลายทางชีวภาพค่อนข้างสูง มีรายงานการพบเห็ดราในวงศ์นี้มากกว่า 300 ชนิด

(Fournier *et al.*, 2011) เชื้อราในสกุลนี้พบได้ทั้งที่เป็นผู้ย่อยสลาย (saprophyte) อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช (endophyte) และบางชนิดเป็นเชื้อก่อโรคในพืช (parasite) (Whalley, 1996) จากงานวิจัยของ Isaka *et al.* (2000) รายงานว่าราในวงศ์ Xylariaceae เป็น filamentous fungi ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด โดยเฉพาะ *Xylaria* sp. BCC 1067 ที่แยกได้จาก

ป่าในประเทศไทย และพบว่ามีความสามารถในการผลิตสาร secondary metabolite ได้หลายชนิด จึง

นิยมนำไปใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช

Table 3 The Identity percentage of the endophytic fungi CfS02 from host plant (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl), and accession number found in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) website

Orchids	Code of endophyte	Species of fungi	%Identity	Accession number
<i>Cymbidium finlaysonianum</i> Lindl	CfS 02	<i>Xylaria</i> sp.	99%	KF564638

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากกล้วยไม้ป่าจำนวน 8 ชนิด สามารถแยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 105 ไอโซเลต โดยแยกราเอนโดไฟท์ได้มากที่สุดจากส่วนใบ จำนวน 52 ไอโซเลต รองลงมาคือส่วนลำต้น พบราเอนโดไฟท์จำนวน 33 ไอโซเลต และส่วนที่พบน้อยที่สุดคือส่วนราก พบราเอนโดไฟท์จำนวน 20 ไอโซเลต

ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ทั้งหมด 5 เอนไซม์ พบว่าราเอนโดไฟท์รหัส CfS 02 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้ทุกชนิดที่ทำการทดสอบ เมื่อนำมาจัดจำแนกด้วยลักษณะทางชีวโมเลกุล พบว่าเป็นราที่อยู่ในสกุล *Xylaria* sp.

เอกสารอ้างอิง

ณัฐภูมิ รุ่งจินตมัย. (2549). ราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์จากพืชสกุล *Garcinia*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประไพพิศ เชาวลิต. (2552). การคัดเลือกราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนที่สร้างเอนไซม์ไลเปส เซลลูเลส อะไมเลส หรือ โปรติเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิราสิณี จันทร์เป็ง และนพพล เล็กสวัสดิ์. (2556). เอนไซม์อะไมเลส. เชียงใหม่: สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วรรณฤดี หิรัญรัตน์. (2552). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ, 12(2): 90-100.

สลิล สิทธิธรรม และนฤมล กฤษณชาติ. (2550). คู่มือกล้วยไม้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์สารคดี.

Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. *Ecology letters*, 3(4), 267-274.

White Jr, J. F., Reddy, P. V., & Bacon, C. W. (2000). *Biotrophic endophytes of grasses: a systematic appraisal*. (pp.49-62) New York: Marcel Dekker

Barron, G.L. (1968). *The Genera of Hyphomycetes from Soil*. USA: Waverly Press.

- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., & Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38(10), 1397-1403
- Centis, S., Guillas, I., Séjalon, N., Esquerré-Tugayé, M. T., & Dumas, B. (1997). Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(6), 769-775.
- Fournier, J., Flessa, F., Peršoh, D., & Stadler, M. (2011). Three new *Xylaria* species from southwestern Europe. *Mycological Progress*, 10(1), 33-52.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Hyde, K. D., Corke, H., & Sun, M. (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal diversity*, 33, 61-75.
- Isaka, M., Jaturapat, A., Kladwang, W., Punya, J., Lertwerawat, Y., Tanticharoen, M., & Thebtaranonth, Y. (2000). Antiplasmodial compounds from the wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. *Planta medica*, 66(05), 473-475.
- Jaeger, Stephane R., Bauke W.D., Charles C., Margreet van H., & Onno M. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*;15, 29-63.
- Kavitha, N. S., Hilda, A., Gopinath, S., & Latha, K. (1997). Ecoethical Technology Using Extracellular Enzymes of *Chrysosporium* Species. *Centre for Advanced Studies in Botany, Guindy Campus, University of Madras, Chennai*.
- Klich, M. A. (2002). *Identification of common Aspergillus species*. (p. 116). Netherlands: Utrecht.
- Pavithra, N., L. Sathish, & K. Ananda. (2012). Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolated from Tulsi. *J. Pharmace. Biomed. Sci*, 16(12),1-6.
- Picard, K., Tirilly, Y., & Benhamou, N. (2000). Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4305-4314.
- Raper, K.B., & D.I. Fennell. (1965). *The Genus Aspergillus*. (p. 686). Maryland: The William & Wilkins.

- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Van Oorschot, C. A. (2002). *Introduction to Food-Borne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands: Utrecht.
- Selim, E. I., Basheer, A. A., Elqady, G., & Hafez, M. A. (2014). Shallow seismic refraction, two-dimensional electrical resistivity imaging, and ground penetrating radar for imaging the ancient monuments at the western shore of Old Luxor city, Egypt. *Archaeological Discovery*, 2014.
- Soon, T. E. (1995). *Orchids of Asia*. (p. 317). Singapore: Times Book International.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 491-502..
- Sudheep, N. M., & Sridhar, K. R. (2012). Non-mycorrhizal fungal endophytes in two orchids of Kaiga forest (Western Ghats), India. *Journal of Forestry Research*, 23(3), 453-460.
- Sunitha, V. H., Devi, D. N., & Srinivas, C. (2013). Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences*, 9(1), 01-09.
- Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*, 18(4), 448-459.
- Torres, M., Dolcet, M. M., Sala, N., & Canela, R. (2003). Endophytic fungi associated with Mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(11), 3328-3333.
- Whalley, A. J. S. (1996). The xylariaceous way of life. *Mycological research*, 100(8), 897-922.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, & J. Taylor. (1990). *PCR protocols: A Guide to methods and applications amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. San Diego: Academic press.
- You, X., Feng, S., Luo, S., Cong, D., Yu, Z., Yang, Z., & Zhang, J. (2013). Studies on a rhein-producing endophytic fungus isolated from *Rheum palmatum* L. *Fitoterapia*, 85, 161-168