# การคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ด *Trichoderma simmonsii*

# Isolation of Endophytic Fungi for Inhibiting Effect on Mushroom Pathogen *Trichoderma simmonsii*

สุชาดา มังษา (Suchada Mungsa)* ดร.โสภณ บุญลือ (Dr.Sophon Boonlue)**

## บทคัดย่อ

การคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรจำนวน 10 ชนิด จากเนื้อเยื่อส่วนใบ ลำต้น และราก ด้วยวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิว สามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 160 ไอโซเลต จากนั้นนำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดมาคัดเลือกความสามารถในการควบคุมเชื้อราโรคเห็ด *Trichoderma simmonsii* จากเห็ดนางรม ด้วยวิธี Dual culture พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวน 36 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคเห็ดได้ดี เมื่อทดสอบด้วยวิธีเดียวกันกับเส้นใยเห็ด พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวน 10 ไอโซเลตไม่ยับยั้งเส้นใยเห็ดนางรม เชื้อราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SWLSK2.2 แสดงการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ดได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 56.72 โดยไม่เป็นปฏิปักษ์กับเส้นใยของเห็ดนางรม และถูกระบุชนิดด้วยวิธีชีวโมเลกุลเป็น *Neoscytalidium dimidiatum* SWLSK2.2 จากการทดลองชี้ให้เห็นความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคเห็ดเป็นจุดเริ่มต้นที่อาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการทำฟาร์มเห็ดในอนาคต

## ABSTRACT

Endophytic fungi were isolated from leaves stems and roots of 10 Medicinal plants by surface sterilized technique. 160 of endophytic fungi were isolated. The potential of endophytic fungi against mushroom pathogen *Trichoderma simmonsii* was evaluated by Dual culture method . The results found that 36 isolates of fungal endophytes most effective on *T. simmonsii.* Inhibition. Whereas, 10 isolates were not showed the antagonistic effect on mushroom mycelium growth. The inhibition effect of endophytic fungi on *T. simmonsii* was highest in SWLSK2.2 with percentage of 56.72. Consequently, the isolate SWLSK2.2 was identified as *Neoscytalidium dimidiatum* and designated as *Neoscytalidium dimidiatum* SWLSK2.2.

**คำสำคัญ:** เชื้อราเอนโดไฟต์ เชื้อราโรคเห็ด *Trichoderma simmonsii* เห็ดนางรม Surface sterilize technique Dual culture methods

**Keywords:** Endophytic fungi Mushroom pathogen *Trichoderma simmonsii* Oyster mushroom Surface sterilize technique Dual culture methods

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**บทนำ**

ในประเทศไทยการเพาะเห็ดนางรมกลายเป็นอาชีพที่น่าสนใจ โดยเป็นการเพาะในถุงพลาสติก แต่เกษตรกรมักประสบปัญหาการปนเปื้อนเชื้อราก่อโรคในก้อนเห็ด ซึ่งเชื้อราโรคเห็ดดังกล่าวมักสร้างความเสียหายให้กับก้อนเห็ด เนื่องจากทำให้ก้อนเชื้อเห็ดมีอายุสั้น เก็บผลผลิตได้สั้นลง ส่งผลให้ผลผลิตลดลงตามไปด้วย มีรายงานว่า เชื้อราก่อโรคที่สำคัญคือ *Trichoderma harzianum* ทำให้เกิดโรคราเขียว โดยมีผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมมากถึง 30-100% (Jayalal et al., n.d.)

ปัจจุบันการควบคุมโรคโดยชีววิธีเป็นที่ยอมรับ และนิยมนำมาใช้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม จึงนำไปสู่การควบคุมโรคอย่างยั่งยืนในอนาคต ซึ่งทางเลือกที่น่าสนใจคือการใช้เชื้อราเอนโดไฟต์ โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) คือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช มีความสัมพันธ์กันแบบ symbiotic ไปจนถึงทำให้เกิดโรคเล็กน้อย บทบาทการอยู่ร่วมกันของเชื้อราเอนโดไฟต์กับพืชคือ เชื้อราเอนโดไฟต์จะใช้ประโยชน์จากพืชเพื่อเป็นแหล่งอาศัยในการเจริญเติบโต ส่วนพืชได้สารบางอย่างที่ผลิตจากเชื้อราเอนโดไฟต์ เช่น สารที่ยับยั้งการบุกรุกของเชื้อราก่อโรค การผลิตเอนไซม์ Chitinase และ β-1,3 glucanase, Indole-3-Acetic Acid หรือ IAA ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ เชื้อราเอนโดไฟต์ยังสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่สามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม (Strobel & Daisy, 2003)

ในการศึกษานี้จึงทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพร และศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟต์เพื่อใช้ในการยับยั้งหรือลดการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคเห็ด โดยไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดนางรม ซึ่งการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคและการเพิ่มผลผลิตให้กับการเพาะเห็ดนางรมในฟาร์มหรือมีการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ที่ใช้ในการควบคุมโรคแทนการใช้สารเคมีในอนาคตได้

**วัตถุประสงค์การวิจัย**

เพื่อคัดแยก จำแนกชนิด และตรวจสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ด

**วิธีการวิจัย**

**การรวบรวมตัวอย่างพืชและแยกเชื้อราเอนโดไฟต์**

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร ได้แก่ *Leea indica*, *Smilax perfoliata* Lour., *Basella alba* L., *Careya arborea* Roxb., *Phyllanthus niruri*, *Eupatorium odoratum*, *Garcinia cowa* Roxb. ex Choisy, *Azadirachta indica* และ *Cissampelos pareira* จากจังหวัดศรีสะเกษ ประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่าง ราก ลำต้น และใบของบรรจุลงในถุงซิปพลาสติกเก็บไว้ในกล่องควบคุมความเย็น และนำไปยังห้องปฏิบัติการภายใน 48 ชั่วโมง หลังการเก็บตัวอย่างจากนั้นล้างตัวอย่างพืชด้วยน้ำประปาเพื่อกำจัดฝุ่นที่เกาะติด ใช้ใบมีดผ่าตัด ตัดตัวอย่างพืชเป็นชิ้น ขนาดประมาณ 2 X 2 มิลลิเมตร และฆ่าเชื้อบนพื้นผิวของตัวอย่างพืช โดย 1) แช่ในเอทานอล 70% (v/v) นาน 1 นาที 2) สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 2% (v/v) นาน 2 นาที 3) เอทานอล 70% (v/v) นาน 20 วินาที และ 4) ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ตามลำดับ จากนั้นวางบนกระดาษปลอดเชื้อ ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่ปรับลดปริมาณส่วนประกอบลงครึ่งสูตร และผสมด้วยยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ตรวจสอบประสิทธิภาพของการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวของเนื้อเยื่อพืช โดยนำน้ำกลั่นที่ผ่านการล้างตัวอย่าง spread plate บนอาหาร PDA บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อในที่มืด 5-6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราเอนโดไฟต์ในเนื้อเยื่อพืช

โดยบันทึกร้อยละของตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชที่มีการเจริญของเส้นใยราเอนโดไฟต์เทียบกับตัวอย่างพืชที่คัดแยกทั้งหมด และคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยตัดปลายเส้นใยของโคโลนีที่แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิดและเพาะเลี้ยงบนอาหาร

**การตรวจสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไพต์ในการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ด และการเป็นปฏิปักษ์ของกับเส้นใยเห็ดนางรม ด้วยวิธี Dual culture**

การศึกษาของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคเห็ด *Trichoderma simmonsii* โดยใช้วิธี Dual culture โดยคัดแยกเชื้อราโรคเห็ด *T. simmonsii* จากตัวอย่างก้อนเห็ดที่มีการปนเปื้อน ทำการย่ายเชื้อ (sub-culture) ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จนได้เชื้อก่อโรคบริสุทธิ์ จากนั้นระบุชนิดของเชื้อราโรคเห็ดด้วยวิธีชีวโมเลกุล จากนั้นทดสอบความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคเห็ด โดยแบ่งการทดสอบเป็น 2 ชุด ได้แก่ชุดทดสอบ และชุดควบคุม สำหรับชุดทดสอบ ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะที่บริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟต์ และของเชื้อราก่อโรคเห็ด จากนั้นย้ายชิ้นส่วนเชื้อราทั้ง 2 ไปวางบนอาหาร PDA โดยให้ชิ้นของเชื้อราเอนโดไฟต์และเชื้อราโรคเห็ดวางอยู่ในจานอาหารเดียวกัน ในตำแหน่งตรงข้ามกันในแนวเส้นผ่านศูนย์กลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยวางชิ้นส่วนเชื้อราให้ห่างจากขอบจานเพาะเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร ส่วนจานอาหารชุดควบคุม เพาะเลี้ยงเฉพาะชิ้นส่วนเชื้อราก่อโรคเห็ดห่างจากขอบจานเพาะเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร บ่มจานเพาะอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชุด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน จากนั้นวัดความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ด โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (percent inhibition rate growth: PIRG) เป็นสูตรที่พัฒนาโดย (Skidmore & Dickinson, 1976)

คัดเลือกได้เชื้อราเอนโดไฟต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของราโรคเห็ด จากนั้นนำเชื้อราเอนโดไฟต์ นี้ มาทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเส้นใยเห็ดนางรม โดยใช้วิธี เช่นเดียวกับ “การตรวจสอบการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ดของเชื้อราเอนโดไฟต์ด้วยวิธี Dual culture” โดยเปลี่ยนจากการวางชิ้นวุ้นของเชื้อราก่อโรคเห็ด เป็นวางชิ้นวุ้นของเส้นใยเห็ดนางรม จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีการยับยั้งเชื้อก่อโรคเห็ดได้สูงสุด และไม่เป็นปฏิปักษ์กับเส้นใยเห็ดนางรม เพื่อไปใช้ในการจำแนกชนิดต่อไป

**การจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์**

**การจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา**

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเอนโดไฟต์ทำโดยตรวจดูลักษณะทางมหภาค (Macroscopic) ได้แก่ การสังเกตลักษณะการเจริญของโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA และลักษณะทางจุลภาค (Microscopic) โดยตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการเลี้ยงบนสไลด์ (slide culture technique) (Malakoff, 1936) เตรียมชุดเพาะเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กระจกปิดสไลด์ กระดาษ หรือแท่งแก้วงอ ที่บรรจุในจานเพาะเชื้อ นำชุดเพาะเชื้อไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นตัดชิ้นอาหาร PDA ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร วางบนแผ่นสไลด์ในชุดเพาะเลี้ยงเชื้อ แล้วปลูกเชื้อที่ต้องการศึกษาบริเวณขอบด้านข้างทั้งสี่ด้านของอาหาร ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในจานเพาะเชื้อเล็กน้อย บ่มชุดเพาะเชื้อในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 วัน จนเชื้อราเจริญแผ่ไปบนผิวสไลด์และกระจกปิดสไลด์ ยกกระจกปิดสไลด์ที่เชื้อราเจริญไปวางบนแผ่นสไลด์อีกแผ่นที่หยด lactophenol cotton blue ไว้แล้ว ส่วนสไลด์แผ่นเดิมยกชิ้นวุ้นออก แล้วหยดด้วย lactophenol cotton blue แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์ที่มีการเจริญของเชื้อทั้งหมดไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจสอบลักษณะรูปร่างของสปอร์ และลักษณะเส้นใยของเชื้อราตลอดจนวัดขนาดโครงสร้าง

เหล่านั้นตามที่ระบุไว้ในคู่มือการจัดจำแนกเชื้อรานำข้อมูลที่บันทึกได้จากการตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อราไปเทียบเคียงกับคู่มือในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราของ (Raper & Thom, 1949)

**การจัดจำเนกเชื้อราเอนโดไฟต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโดไทด์ของยีนบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) rRNA**

การจัดจำเนกเชื้อราเอนโดไฟต์โดยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) rRNA

(1) การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์บนอาหาร PDA จากนั้นเขี่ยเส้นใยที่เจริญลงในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมไนโตรเจนเหลวและบดให้ละเอียดแล้วเติม 4% sodium dodecyl sulphate (SDS) และ Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมใหเข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนสารละลายชั้นบนสุด 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท (3M NaOAc pH 7) ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอทธานอล 99.9 % ที่เย็นจัด (cold EtOH) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เติม 70% เอทธานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที เติมทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNase ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำซ้ำในขั้นตอนการเติม Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol จนถึงการผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นเติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (Yodsing et al., 2018) เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด (DNA marker) ภายใต้แสงยูวี (ultraviolet)

(2) การเพิ่มปริมาณ DNA

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) rDNA ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Vinayarani & Prakash, 2018) โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาของพีซีอาร์ มีดังนี้ 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 1.5 ไมโครลิตร, 1.25 mM dNTP 1 ไมโครลิตร, 10 µM ITS1 และ ITS4 อย่างละ 3 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อรา 2 ไมโครลิตร, 5 U/µL Taq DNA polymerase 5 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 34 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง PCR ภายใต้สภาวะขั้นตอน initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 30 รอบของ ขั้นตอน denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (Yodsing et al., 2018) เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด ภายใต้แสงยูวี

(3) การหาลำดับดีเอ็นเอ

ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อราเอนโดไฟต์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์สำเร็จรูปยี่ห้อ GeneJET™ PCR Purification kit (Fermentas, Canada) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสอีกครั้ง หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencer) ที่บริษัท 1st BASE DNA ประเทศมาเลเซีย นำลำกับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาตรวจสอบและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) สำหรับการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อใช้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงสุดในการระบุชนิด (Vinayarani & Prakash, 2018)

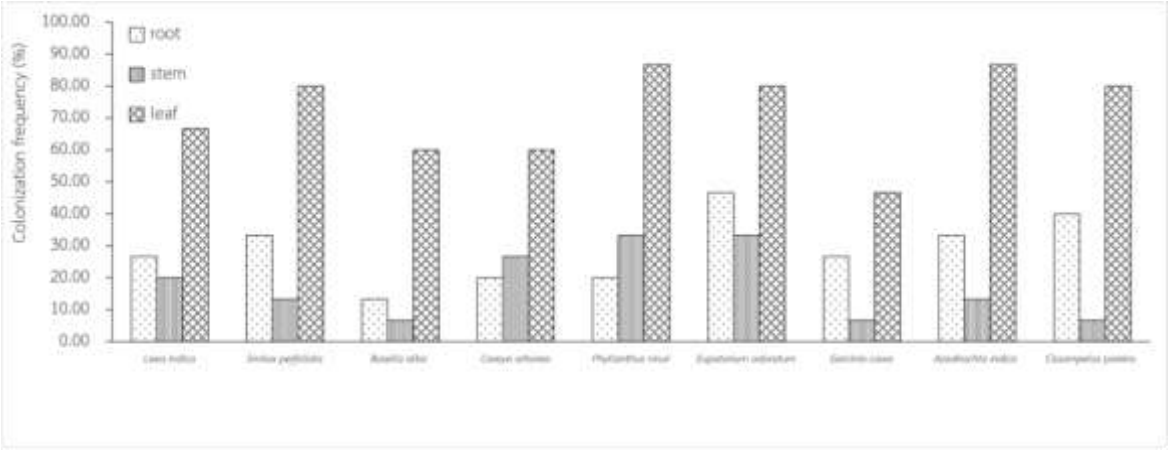
(4) การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Mega-X โดยคำนวณความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Kimura 2-parameter สร้างสายวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี neighbor-joining เพื่อยืนยันชนิดของกล้าเชื้อรา

**ผลการวิจัย**

**การรวบรวมตัวอย่างพืชและแยกเชื้อราเอนโดไฟต์**

เก็บตัวอย่างจากราก ลำต้น และใบของพืชสมุนไพร ได้แก่ *Leea indica.*, *Smilax perfoliate*, *Basella alba*, *Careya arborea*, *Phyllanthus niruri*, *Eupatorium odoratum*, *Garcinai cowa*, *Azadirachta indica* และ *Cissampelos pareira* จากจังหวัดศรีสะเกษ ประเทศไทย จำนวน 405 ตัวอย่าง พบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราเอนโดไฟต์มากที่สุดในส่วนของ ใบ ราก และลำต้น คิดเป็นร้อยละ 71.85 28.89 และ 17.78 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาถึงชนิดของพืชพบว่า *E. odoratum* มีการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราเอนโดไฟต์มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 53.33 และพบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราเอนโดไฟต์น้อยที่สุดใน *B. alba* และ *G. cowa* คิดเป็นร้อยละ 26.67 โดยการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราในส่วนต่างของพืชแต่ละชนิดแสดงในภาพที่ 1 เมื่อคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์โดยใช้เทคนิคการฆ่าเชื้อที่พื้นผิว พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากตัวอย่างราก ลำต้น และใบ ของพืชสมุนไพรได้ทั้งหมด 39 24 และ 97 ไอโซเลต ตามลำดับ รวมทั้งหมด 160 ไอโซเลต

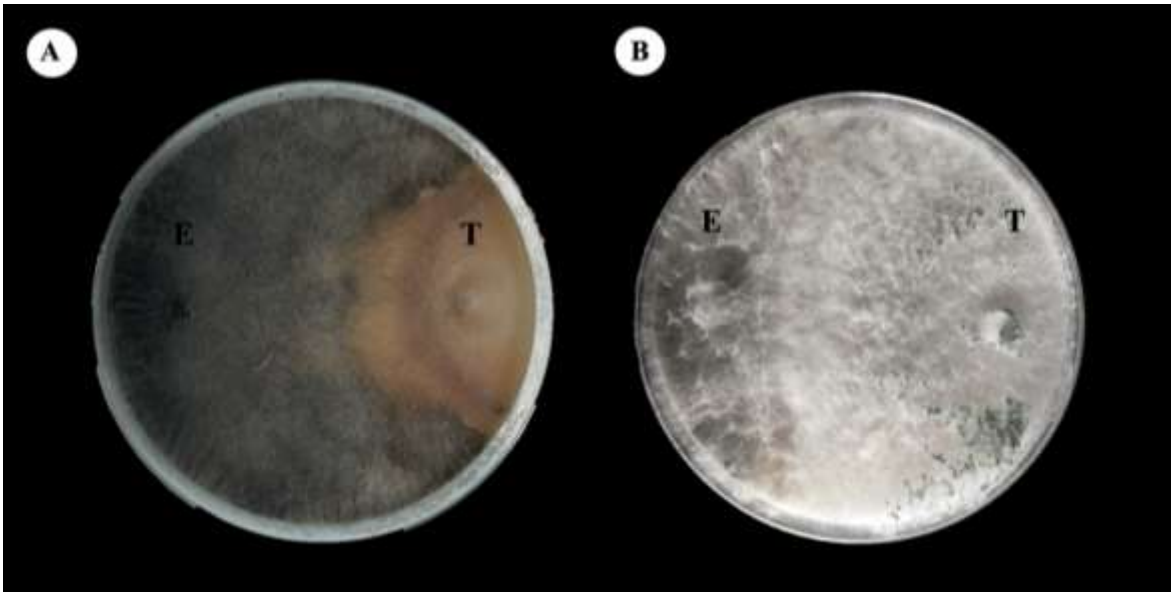



**ภาพที่ 1** การเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราเอนโดไฟต์ในส่วนต่างๆของพืชแต่ละชนิด

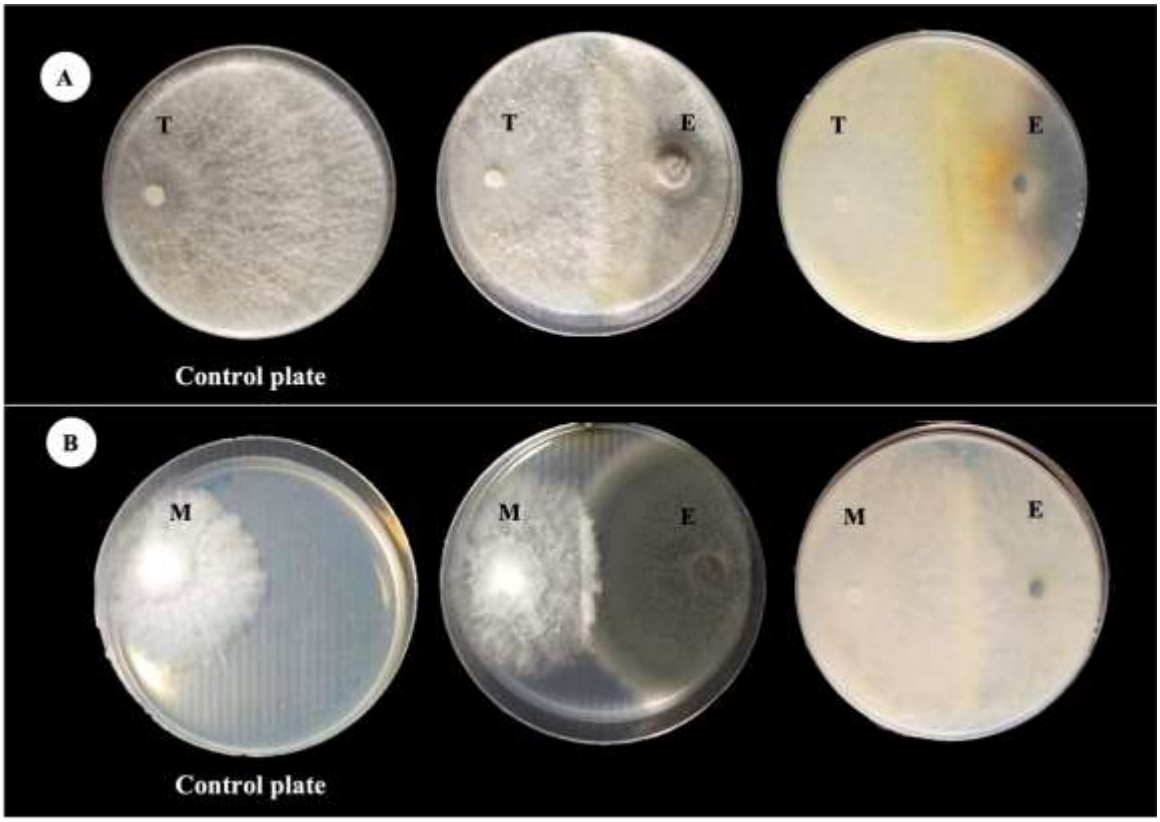
**ผลการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ดของเชื้อราเอนโดไฟต์ด้วยวิธี Dual culture**

เชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร 160 ไอโซเลต ถูกนำมาทดสอบความประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคเห็ด *T. simmonsii* ด้วยวิธี Dual culture พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวน 36 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *T. simmonsii* แสดงให้เห็นการเป็นปฏิปักษ์กันระหว่างเชื้อราเอนโดไฟต์และเชื้อราโรคเห็ด ซึ่งเมื่อปลายเส้นใยของเชื้อราทั้ง 2 เจริญชนกันเส้นใยเชื้อราโรคเห็ดจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตและถูกปกคลุมด้วยเส้นใยจากเชื้อราเอนโดไฟต์ ดังภาพที่ 2 (A)

เมื่อนำเชื้อราทั้ง 36 ไอโซเลตนี้ไปทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับเส้นใยเห็ดนางรม ดังภาพที่ 3 พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลตที่ไม่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม ได้แก่ ไอโซเลต SWLL1, SWLL2, SWLL3, SWLL5, SWLS1, SWLSK2.1, SWLSK2.2, SWBSK1, SWSSK2 และ SWCS1 โดยให้ผลการยับยั้งเส้นใยของเชื้อราโรคเห็ดมากที่สุดในไอโซเลต SWLSK2.2 และน้อยที่สุดใน SWLL2 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่แยกมาจากส่วนของใบของพืชวงศ์ *Leea indica* คิดเป็นร้อยละ 56.72 และ 31.31 ลำดับ ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ดทั้ง 10 ไอโซเลต แสดงในตารางที่ 1 จากนั้นคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SWLSK2.2 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโรคเห็ดนำไปจำแนกชนิดต่อไป




**ภาพที่ 2** การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กันระหว่างเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์ (E) กับเส้นใยเชื้อราโรคเห็ด (T) A : แสดงความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ด และ B : แสดงเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ด




**ภาพที่ 3** การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ด้วยวิธี Dual culture; A : การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กันระหว่างเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์ (E) กับเส้นใยเชื้อราโรคเห็ด (T) และ B : การทดสอบการการเป็นปฏิปักษ์กันระหว่างเส้นใยเห็ดนางรม (M) กับเส้นใยเชื้อราเอนโดไฟต์ (E)

**ตารางที่ 1** ความสามารถของเชื้อราเอนโดไพต์ที่คัดแยกได้จากส่วนต่างๆของพืชแต่ละชนิด ในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราโรคเห็ด และการเป็นปฏิปักษ์กับเส้นใยเห็ดนางรม

| No. | Medicinal plant | Plant tissue | Isolate | Inhibition of mushroom pathogen (%) | Inhibition of mushroom (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *Leea indica* | Leaf | SWLL1 | 50.29% | 0% |
| 2 | | Leaf | SWLL2 | 31.31% | 0% |
| 3 | | Leaf | SWLL3 | 45.82% | 0% |
| 4 | | Leaf | SWLL5 | 52.83% | 0% |
| 5 | | Stem | SWLS1 | 47.76% | 0% |
| 6 | | Root | SWLR1 | 18.76% | 12.82% |
| 7 | | Stem | SWLS2 | 47.31% | 15.29% |
| 8 | | Root | SWLR2 | 20.34% | 14.23% |
| 9 | | Leaf | SWLSK2.1 | 52.23% | 0% |
| 10 | | Leaf | SWLSK2.2 | 56.72% | 0% |

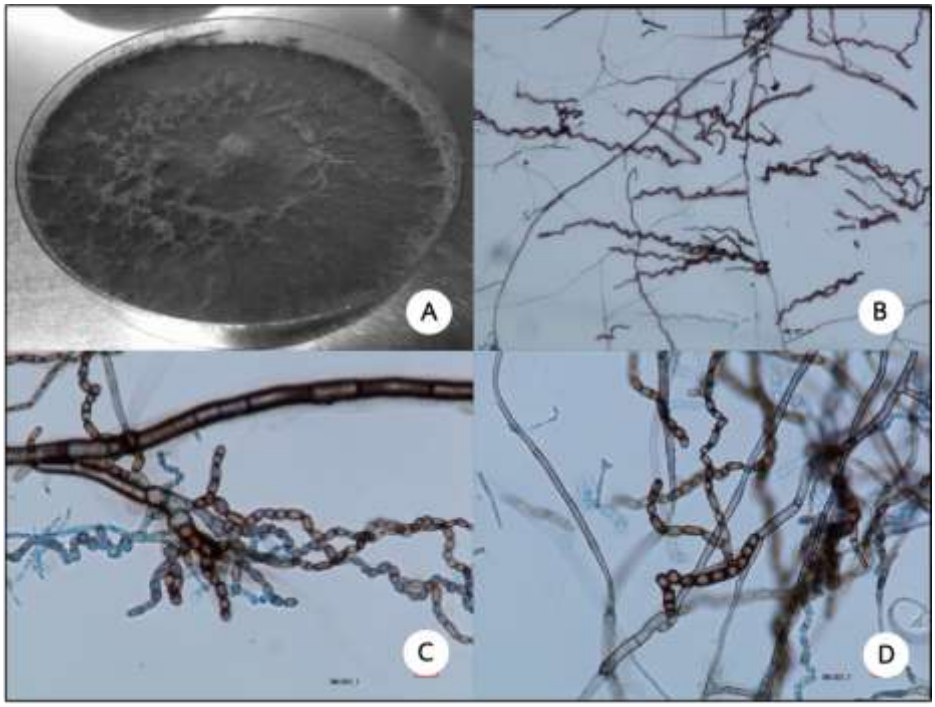
**ตารางที่ 1** ความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากส่วนต่างๆของพืชแต่ละชนิด ในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราโรคเห็ด และการเป็นปฏิปักษ์กับเส้นใยเห็ดนางรม (ต่อ)

| No. | Medicinal plant | Plant tissue | Isolate | Inhibition of mushroom pathogen (%) | Inhibition of mushroom (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 11 | *Basella alba* | Leaf | SWBSK1 | 50.29% | 0% |
| 12 | | Root | SWBR1 | 35.23% | 11.29% |
| 13 | | Root | SWBR2 | 11.29% | 20.31% |
| *14* | *Smilax perfoliata* | Stem | SWSS1 | 35.23% | 21.76% |
| 15 | | Leaf | SWSSK2 | 45.82% | 0% |
| 16 | *Cissampelos pareira* | Root | SWCR1 | 37.31% | 24.83% |
| 17 | | Stem | SWCS2 | 28.23% | 30.31% |
| 18 | | Leaf | SWCL1 | 21.76% | 7.29% |
| 19 | | Leaf | SWCL4 | 31.16% | 19.23% |
| 20 | | Stem | SWCS1 | 47.31% | 0% |
| 21 | *Phyllanthus niruri* | Leaf | SWPL1 | 12.82% | 10.82% |
| 22 | | Stem | SWPS1 | 18.31% | 12.82% |
| 23 | | Stem | SWPS2 | 47.31% | 18.23% |
| 24 | | Leaf | SWPL3.1 | 30.29% | 23.72% |
| 25 | | Leaf | SWPL3.2 | 23.23% | 11.23% |
| 26 | | Leaf | SWPL5 | 15.82% | 35.31% |
| 27 | *Eupatorium odoratum* | Root | SWER2 | 36.76% | 17.23% |
| 28 | | Stem | SWES2.1 | 31.34% | 31.82% |
| 29 | | Stem | SWES2.2 | 38.72% | 23.31% |
| 30 | | Stem | SWES3 | 29.31% | 15.16% |
| 31 | | Leaf | SWEL4 | 29.34% | 22.16% |
| 32 | *Azadirachta indica* | Leaf | SWAL1 | 8.23% | 35.29% |
| 33 | | Leaf | SWAL2 | 11.23% | 21.23% |
| 34 | *Garcinia cowa* | Leaf | SWGL1 | 45.31% | 18.31% |
| 35 | | Stem | SWGS1 | 20.23% | 14.16% |
| 36 | | Stem | SWGS2 | 43.31% | 12.23% |

**การจำเนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์**

**การจำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา**

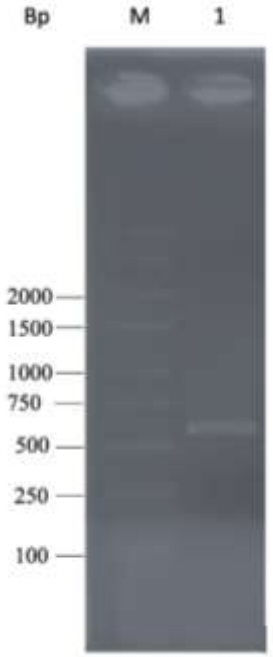
สัณฐานวิทยาของเชื้อราเชื้อราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SWLSK2.2 เส้นใยมีลักษณะเป็นสีเทาและค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเทาดำเมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 3A) เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซียลเซียส เส้นใยมีการสร้างอาร์โทรโคนิเดีย (Arthoconidia) เรียกว่า Scytalidium-like มีลักษณะสปอร์เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่สีน้ำตาล แสดงในภาพที่ 3



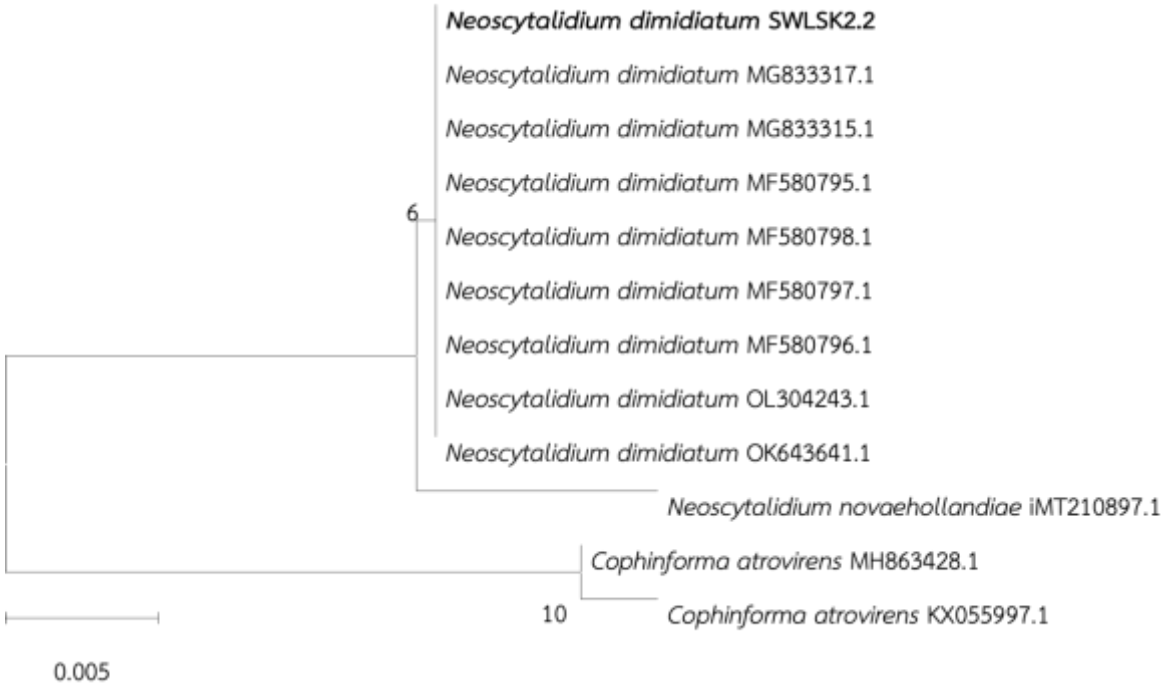

**ภาพที่ 4** ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Neoscytalidium* sp.; A, โคโลนีบนมันฝรั่งเดกซ์โทรสวุ้น (PDA), B-D Scytalidium-like แสดงรูปร่างและระยะการเจริญเติบโตที่หลากหลายของอาร์โทรโคนิเดียที่แบ่งส่วนจากเส้นใย

**การจัดจำแนกเชื้อราเอนโดไฟต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS rDNA**

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่บริเวณ ITS rDNA ด้วยวิธี PCR ได้ผลิตภัณฑ์ PCR เป้าหมาย ขนาดประมาณ 598 bp แสดงในภาพที่ 4 และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีสามารถระบุชนิดของเชื้อราไอโซเลต SWLSK2.2 ได้อย่างชัดเจน ซึ่งมีความเหมือนกับเชื้อรา *Neoscytalidium dimidiatum* (asscession No. MG833317.1) โดยให้เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายวงศ์วานวิวัฒนาการ พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SWLSK2.2 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *N. dimidiatum* ดังแสดงในภาพที่ 5 ดังนั้นจึงตั้งชื่อเชื้อราชนิดนี้เป็น *N. dimidiatum* SWLSK2.2




**ภาพที่ 5** ผล gel electrophoresis ของการเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อราที่บริเวณ ITS rDNA ด้วยวิธี PCR




**ภาพที่ 6** ความสัมพันธ์ของสายวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของ *Neoscytalidium dimidiatum* SWLSK2.2

**อภิปรายและสรุปผลการวิจัย**

จากตัวอย่างพืชสมุนไพร 9 ชนิด ได้แก่ *Leea indica.*, *Smilax perfoliate*, *Basella alba*, *Careya arborea*, *Phyllanthus niruri*, *Eupatorium odoratum*, *Garcinai cowa*, *Azadirachta indica* และ *Cissampelos pareira* แยกเชื้อราเอนโดไฟต์จาก 405 ของตัวอย่างพืช พบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราเอนโดไฟต์มากที่สุดในส่วนของ ใบ ราก และลำต้น คิดเป็นร้อยละ 71.85 28.89 และ 17.78 ตามลำดับ และพบการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อราเอนโดไฟต์ในพืช *E. odoratum* มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 53.33 ในการทดสอบความประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคเห็ด *T. simmonsii* พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์จำนวน 36 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรคเห็ดได้ และเมื่อทดสอบด้วยวิธีเดียวกันกับเส้นใยเห็ดนางรมพบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลตที่ไม่แสดงการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม โดยให้ผลการยับยั้งเส้นใยของเชื้อราโรคเห็ดมากที่สุดในไอโซเลต SWLSK2.2 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่แยกมาจากส่วนของใบของพืชวงศ์ *L. indica* คิดเป็นร้อยละ 56.72 จากนั้นคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SWLSK2.2 เพื่อระบุเชื้อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโมเลกุล พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ไอโซเลต SWLSK2.2 ที่แยกได้มีความคล้ายคลึงกันกับ *N. dimidiatum* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และกำหนดเป็น *N. dimidiatum* SWLSK2.2 ซึ่งมีรายงานว่า *N. dimidiatum* เป็นเชื้อก่อโรคในพืช (Ray et al., 2010)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ *N. dimidiatum* SWLSK2.2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ดเป็นวงกว้างและโดดเด่น ดังนั้นเชื้อราเอนโดไฟต์ *N. dimidiatum* SWLSK2.2 จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเห็ดนางรมและคุณสมบัติในด้านอื่น ๆ เช่น การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อราเอนโดไฟต์ โดยมีรายงานการมีการใช้ D-isoleucine ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเส้นใยของเห็ดมัตสึทาเกะ (Kawagishi et al., 2004) และมีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้

จากเชื้อราเอนโดไฟต์ พบว่ามีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (Yu et al., 2010) ผู้วิจัยคาดหวังว่าสามารถนำเชื้อราเอนโดไฟต์ *N. dimidiatum* SWLSK2.2 จากการศึกษาครั้งนี้มาต่อยอดในการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และคาดหวังว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโรคเห็ดและการเพิ่มผลผลิตให้กับการเพาะเห็ดนางรมในฟาร์มเห็ด หรือมีการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ที่ใช้ควบคุมโรคแทนการใช้สารเคมีในอนาคตได้

**กิตติกรรมประกาศ**

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สาขาวิชาจุลชีววิทยา อย่างสูง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนห้องปฏิบัติการสาขาจุวิชาลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**เอกสารอ้างอิง**

Jayalal, R., Sci), N. A.-C. J. S. Influence of *Trichoderma harzianum* metabolites on the development of green mould disease in the oyster mushroom. Cey. J. Sci. (Bio. Sci.). 2007; 36 (1): 53-60

Kawagishi, H., Hamajima, K., Takanami, R., Nakamura, T., Sato, Y., Akiyama, Y., Sano, M., & Tanaka, O. Growth promotion of mycelia of the matsutake mushroom Tricholoma matsutake by D-isoleucine. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 2004; *68*(11): 2405–2407. https://doi.org/10.1271/bbb.68.2405.

Malakoff, M. T. A technique for the slide culture of fungi. *Science.* 1936;*84*(2187):490. https://doi.org/10.1126/science.84.2187.490.

Raper, K. B., & Thom, C. A manual of the *Penicillia. A Manual of the Penicillia.* 1949.

Ray, J. D., Burgess, T., & Lanoiselet, V. M. First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on Ficus carica in Australia. *Australasian Plant Disease Notes*. 2010; *5*(1): 48–50. https://doi.org/10.1071/DN10018.

Skidmore, A. M., & Dickinson, C. H. Colony interactions and hyphal interference between Septoria nodorum and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 1976; *66*(1): 57–64. https://doi.org/10.1016/s0007-1536(76)80092-7.

Strobel, G., & Daisy, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003; *67*(4): 491–502. https://doi.org/10.1128/mmbr.67.4.491-502.

Vinayarani, G., & Prakash, H. S. Fungal endophytes of turmeric (Curcuma longa L.) and their biocontrol potential against pathogens *Pythium aphanidermatum* and *Rhizoctonia solani*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018; *34*(3): 49. https://doi.org/10.1007/s11274-018-2431-x.

Yodsing, N., Lekphrom, R., Sangsopha, W., Aimi, T., & Boonlue, S. Secondary Metabolites and Their Biological Activity from *Aspergillus aculeatus* KKU-CT2. *Current Microbiology*. 2018; *75*(5): 513–518. https://doi.org/10.1007/s00284-017-1411-y.

Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P., & Qin, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. In *Microbiological Research.* 2010; 165Issue 6: 437–449). https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.009.