

การประเมินฤทธิ์สารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืชของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากกาฝากและพืชอาศัยของกาฝาก

Evaluation of Antiphytopathogenic Activity of Endophytic Fungi Isolated from Parasitic Plants and their Hosts

ภัทราพรรณ พรหมแก้ว^{1*} สายสมร ล้ายอง^{1/} และบุญสม บุษบรรณ^{1/}
Phattrapan Promkaew^{1*}, Saisamorn Lumyong^{1/} and Boonsom Bussaban^{1/}

^{1/}ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

^{1/}Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: phattrapan.pk@gmail.com

(Received: 1 September 2015; Accepted: 29 January 2016)

Abstract: The present study was aimed to screen for antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from parasitic plants and their hosts (*Bouea macrophylla*, *Manilkara zapota* and *Morus alba*) and to identify the selected potent strains. Forty seven endophytic fungi were grown in five fermentation media, potato dextrose broth PDB, glucose soybean meal broth GSB, malt extract broth MEB, yeast extract sucrose broth YES and Sabouraud broth SBB and incubated on a reciprocal shaker at room temperature (27-30 °C) for 14 days. The ethyl acetate crude extracts from fermentation broths were tested for antibacterial and antifungal activity against 7 phytopathogenic strains (*Ralstonia solanacearum* TNCC003291, *Xanthomonas citri* BS356, *Botrytis* sp. BS298, *Colletotrichum* sp. BS351, *Fusarium* sp. BS288, *Phytophthora botryosa* BS349 and *Pyricularia oryzae* BS265) by agar well diffusion method. Dimethylsulfoxide (10%), streptomycin (1 mg/ml) and benomyl (20 mg/ml) were used as control. Crude extracts obtained from endophytic fungi cultured in PDB displayed activity against phytopathogenic bacteria and fungi. While crude extracts obtained from endophytic fungi cultured in GSB, MEB, YES and SBB displayed activity against only phytopathogenic bacteria. The Crude extract of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* MoS5 cultured in GSB and YES showed the most inhibition of *R. solanacearum* TNCC003291 (12 mm diameter) and *X. citri* BS356 (22 mm diameter) with minimum inhibitory concentration (MIC) 2.5 and 5 mg/ml, respectively. While crude extracts of the two endophytes, *Colletotrichum* sp. MoPIV2 and *Phomopsis* sp. MoS3/1 cultured in PDB greatest inhibited growth of *Fusarium* sp. BS288 with 18 and 15 mm inhibition zone diameter and the MIC was 1.25 mg/ml. The MIC of the two extracts that prevented growth of *Fusarium* sp. BS288 was 8 times lower than the MIC of fungicide benomyl (10 mg/ml). These results indicated that endophytic fungi from parasitic plants and their hosts is a potential source of bioactive compounds that may useful in agriculture.

Keywords: Antimicrobial, endophytic fungi, mistletoe

บทคัดย่อ: ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชกาฝาก 3 ชนิด (*Dendrophthoe pentandra*, *Dendrophthoe* sp. และ *Loranthus parasiticus*) และพืชอาศัย 3 ชนิด คือมะปราง (*Bouea macrophylla*) ละมุด (*Manilkara zapota*) และหม่อน (*Morus alba*) ในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์โดยเฉพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์จำนวน 47 ไอโซเลท ในอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ potato dextrose broth PDB, glucose soybean meal broth GSB, malt extract broth MEB, yeast extract sucrose broth YES และ Sabouraud broth SBB บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวา ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 °C) 14 วัน จากนั้นกรองแยกส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วย ethyl acetate และเตรียมสารสกัดหยาบโดยละลายใน 10% DMSO จากนั้นทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราสาเหตุโรคพืช 7 ชนิด ได้แก่ *Ralstonia solanacearum* TNCC003291, *Xanthomonas citri* BS356, *Botrytis* sp. BS298, *Colletotrichum* sp. BS351, *Fusarium* sp. BS288, *Phytophthora botryosa* BS349 และ *Pyricularia oryzae* BS265 ด้วยวิธี agar well diffusion ใช้ dimethylsulfoxide (10%), streptomycin (1 mg/ml) และ benomyl (20 mg/ml) เป็นสารควบคุม พบว่าราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหาร F1 ยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียและราก่อโรคพืช สำหรับราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหาร GSB, MEB, YES และ SBB ยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียก่อโรคพืชเท่านั้น และพบว่าสารสกัดหยาบของน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟต์ *Lasiodiplodia pseudotheobromae* MoS5 ที่เลี้ยงใน GSB สามารถยับยั้ง *R. solanacearum* TNCC003291 ได้ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 12 mm) ส่วนราเอนโดไฟต์ไอโซเลทเดียวกันนี้ที่เลี้ยงใน YES สามารถยับยั้ง *X. citri* BS356 ได้ดีที่สุด (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 22 mm) โดยมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืช (MIC) เท่ากับ 2.5 mg/ml และ 5 mg/ml ตามลำดับ และสารสกัดหยาบของ *Colletotrichum* sp. MoPIV2 และ *Phomopsis* sp. MoS3/1 ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ยับยั้ง *Fusarium* sp. BS288 ได้โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 18 และ 15 mm ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบทั้งสองมีค่า MIC เท่ากับ 1.25 mg/ml ซึ่งต่ำกว่า MIC ของสารฆ่ารา benomyl (10 mg/ml) ถึง 8 เท่า ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์จากพืชกาฝาก และพืชอาศัยเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีศักยภาพซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรได้

คำสำคัญ: สารต้านจุลินทรีย์ ราเอนโดไฟต์ พืชกาฝาก

คำนำ

ราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่มีช่วงหนึ่งของชีวิตอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชโดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรค (Wilson, 2000) และพบได้ในพืชทุกชนิด เช่น หญ้า กัญชง ไม้ และไม้ยืนต้น พบได้ทั้งบริเวณลำต้น ราก ใบ และกิ่งของพืช (Tao *et al.*, 2008; Crawford *et al.*, 2010; Suwannarach *et al.*, 2010) โดยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยราเอนโดไฟต์ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชอาศัย เช่น ดูดซับแร่ธาตุอาหารบางอย่างจากดิน เช่น ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ราเอนโดไฟต์บางชนิดสร้างเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ราสาเหตุโรคพืชได้ เช่น chitinase และ β -1,3-glucanases (Bacon and White, 2000; Druzhinina *et al.*, 2011) เป็นแหล่งฮอร์โมนแก่ต้นพืช สร้างกลไกบางอย่างที่กระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกัน

และส่งผลให้พืชต้านทานต่อแมลงศัตรูหรือเชื้อก่อโรคได้ (Ting *et al.*, 2008; Rogers *et al.*, 2011; García Parisi *et al.*, 2014)

กาฝาก (parasitic plants/ mistletoe) เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ใบเรียงเดี่ยวแบบตรงข้าม ขอบเรียบ เนื้อใบหนา เป็นไม้พุ่มที่มีกิ่งก้านสาขามากมาย ดอกของกาฝากมีสีแดง สีส้ม หรือสีเหลือง เป็นพืชที่อาศัยเกาะดูดน้ำ แร่ธาตุ หรือสารอาหารที่สังเคราะห์แล้วจากพืชชนิดอื่น มักเรียกชื่อของกาฝากตามพืชอาศัยที่เกาะอยู่ เช่น กาฝากมะม่วง กาฝากมะปราง กาฝากละมุด กาฝากหม่อน เป็นต้น กาฝากเป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด และสามารถต้านไวรัสได้ (คิดคม, 2541; บุษณีย์ และประภาสินี, 2550; Devehath *et al.*, 2002) มีผู้ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกาฝากหลายชนิด เช่น กาฝากก่อ

(*Loranthus pentandrus*) และกาฝากมะม่วง (*Dendrophthoe pentandra*) พบว่าสร้างสารเคมีในกลุ่ม quercetin และ quercitrin ซึ่งมีคุณสมบัติในการลดความดันโลหิต คลายกล้ามเนื้อเรียบ (คิดคม, 2541; Chantarasomboon *et al.*, 1974; Phruekphakphom and Muunsan, 1979) สำหรับการศึกษาราเอนโดไฟต์ในกาฝากยังมีไม่มากนัก de Abreu *et al.* (2010) ศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์จากใบและกิ่งของกาฝากและพืชอาศัยในวงศ์มะม่วง โดยทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization บดตัวอย่างเตรียมเป็น suspension และใช้วิธี spread plate technique ในการแยกราเอนโดไฟต์ โดยพบราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 1,615 สายพันธุ์ กวีนาดและคณะ (2552) ทำการแยกราเอนโดไฟต์จากกาฝากกอดำ (*Dufrenoya sessilis*) พบว่าราเอนโดไฟต์ที่สร้าง synnemata จากกิ่งของกาฝากชนิดนี้ที่เจริญในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย สามารถยับยั้งการเจริญของราโรคพืชหลายชนิด (*Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora palmivora*, *P. parasitica* และ *Sclerotium rolfsii*) ได้ในระดับห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกาฝากนี้เป็นที่น่าสนใจอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองราเอนโดไฟต์จากพืชกาฝาก และพืชให้อาศัยบางชนิดที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียก่อโรคพืชได้ รวมถึงบ่งบอกชนิดของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากพืชกาฝากและพืชอาศัยบางชนิด

นำตัวอย่างใบ (เส้นใบ และเนื้อใบ) กิ่ง และดอก อย่างละ 5 ตัวอย่างจากมะปราง (*Bouea macrophylla*) ละมุด (*Manilkara zapota*) หม่อน (*Morus alba*) กาฝากมะปราง (*Dendrophthoe pentandra*) กาฝากละมุด (*Dendrophthoe* sp.) และกาฝากหม่อน (*Loranthus*

parasiticus) ที่เก็บจากจังหวัดนครสวรรค์และเชียงใหม่ มาล้างโดยการผ่านน้ำประปาประมาณ 15 นาที และตัดส่วนของใบให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 2×2 cm ตัดกิ่งให้มี ความยาวประมาณ 2 cm นำตัวอย่างไปฆ่าเชื้อที่ผิว (triple surface sterilization) โดยแช่ใน 75% ethanol นาน 30 วินาที ตามด้วย 2% sodium hypochlorite นาน 3 นาที และ 95% ethanol นาน 30 วินาที (Suwannarach *et al.*, 2010) จากนั้นตัดชิ้นพืชในสภาพปลอดเชื้อให้มีขนาด 0.5×0.5 cm สำหรับกิ่งตัดเป็นท่อนยาว 1 cm นำตัวอย่างมาวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่เติม 2% malt extract แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °C) จนสังเกตพบราเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช ทำการแยกราให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาไว้ใน PDA slant นับจำนวนราที่พบและคำนวณร้อยละความชุกของรา (isolate prevalence) (Bussaban *et al.*, 2001) ดังสมการ

$$\text{ร้อยละความชุกของรา} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่มีราเจริญ}}{\text{จำนวนตัวอย่างที่ทำการแยกรา}} \times 100$$

2. การคัดกรองราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกาฝากและพืชให้อาศัย จำนวน 47 ไอโซเลทบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °C) เป็นเวลา 7 วัน เพื่อเตรียมเป็น inoculum นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ชนิด ได้แก่ potato dextrose broth (PDB), glucose soybean meal broth (GSB), malt extract broth (MEB), yeast extract sucrose broth (YES) และ Sabouraud broth (SBB) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อตัดบริเวณปลายเส้นใยให้มีขนาดประมาณ 0.3×0.3 cm นำไปใส่ในอาหาร 5 ml ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 18×180 mm หลอดละ 2 ชิ้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °C) นาน 14 วันบนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวาที่ความเร็ว 120 rpm กรองเอาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ ไปสกัดด้วย ethyl acetate ระเหยแห้งด้วย rotary evaporator และเตรียมสารสกัดหยาบของราแต่ละไอโซเลทใน dimethyl sulfoxide

(10% DMSO) เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคพืช 2 ชนิดคือ *Ralstonia solanacearum* TNCC003291 และ *Xanthomonas citri* BS356 บนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง และเตรียมแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดด้วยวิธี direct colony suspension โดยแต่ละโคโลนีใสในน้ำเกลือ 0.85 % ที่ไร้เชื้อและเทียบความเข้มข้นกับ *McFarland Standard* No. 0.5 (Koneman *et al.*, 1983) จากนั้นใช้ก้านสำลีเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานอาหาร NA และใช้ปลายด้านกว้างของ Pasteur pipette (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm) เจาะหลุมเตรียมไว้เป็นจานทดสอบ

เพาะเลี้ยงราก่อโรคพืช 4 ชนิด ได้แก่ *Botrytis* sp. BS298, *Colletotrichum* sp. BS351, *Fusarium* sp. BS288 และ *Pyricularia oryzae* BS265 รวมถึงเชื้อ *Phytophthora botryosa* BS349 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วใช้ปลายด้านกว้างของ Pasteur pipette ตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อแต่ละชนิด นำไปปลูกเชื้อตรงกลางจานอาหาร PDA ที่เจาะหลุมเช่นเดียวกับการเตรียมแบคทีเรียทดสอบ ยกเว้น *Colletotrichum* sp. BS351 และ *Fusarium* sp. BS288 เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้นประมาณ 10^6 spore/ml จากนั้นใช้ก้านสำลีเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานอาหาร PDA และใช้ปลายด้านกว้างของ Pasteur pipette (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm) เจาะหลุมเตรียมไว้เป็นจานทดสอบ

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืชด้วยวิธี agar well diffusion โดยหยดสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟต์ที่เตรียมได้ปริมาตร 35 μ l ลงในแต่ละหลุมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm ซึ่งเจาะเตรียมไว้ในจานอาหาร NA หรือ PDA ที่มีเชื้อทดสอบ สำหรับชุดควบคุมใช้ 10% DMSO เป็นชุดควบคุมเชิงลบ ใช้ 1 mg/ml streptomycin หรือ 20 mg/ml benomyl เป็นชุดควบคุมเชิงบวก นำจานทดสอบดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง สำหรับแบคทีเรียบ่ม 24-48 ชั่วโมง และสำหรับจุลินทรีย์อื่นบ่มจนโคโลนีในจานควบคุมเชิงลบเจริญถึงระยะทางเท่ากับหลุมที่เจาะไว้ บันทึกความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียและราสองชนิดคือ

Colletotrichum sp. BS351 และ *Fusarium* sp. BS288 โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส สำหรับการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ คำนวณร้อยละการยับยั้งตามสมการ (อภาพร และเกวลิณ, 2557)

$$\text{ร้อยละการยับยั้งการเจริญ} = \frac{\begin{array}{l} \text{(ความยาวรัศมีของโคโลนี} \\ \text{จุลินทรีย์ก่อโรคในชุดควบคุม} \\ \text{เชิงลบ - ความยาวรัศมีของ} \\ \text{โคโลนีจุลินทรีย์ก่อโรคทดสอบ)} \\ \text{ความยาวรัศมีของโคโลนี} \\ \text{จุลินทรีย์ก่อโรคในชุดควบคุม} \\ \text{เชิงลบ} \end{array}}{\times 100}$$

3. การบ่งบอกชนิดของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือก

บ่งบอกชนิดของราเอนโดไฟต์จำนวน 3 ไอโซเลทที่คัดเลือกจากผลการยับยั้งสูงสุด และสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้หลายชนิด คือ MoS5, MoPIV2 และ MoS3/1 โดยใช้ลักษณะสัณฐาน และใช้วิธีทางอณูชีววิทยาโดยสกัด DNA ของราแต่ละไอโซเลทด้วย SDS-CTAB (sodium dodecyl sulfate-cetyl methyl ammonium) ตามวิธีการของ Bussaban *et al.* (2005) จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum parsimony หรือ distance ที่มีในโปรแกรม PAUP* versions 4.0 b10 (Swofford, 2002)

4. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

นำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟต์จำนวน 3 ไอโซเลท ที่คัดเลือกจากผลการยับยั้งสูงสุด และสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้หลายชนิด คือ MoS5 ที่เลี้ยงใน YES, MoPIV2 และ MoS3/1 ที่เลี้ยงใน PDB มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibitory concentration, MIC) ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ตามวิธีของ Duraipandiyana and Ignacimuthu (2007) เตรียมสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกโดยเชื้อ

จากลำดับส่วนแบบสองเท่าให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 0-40 mg/ml ทำการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion โดยเตรียมจุลินทรีย์ก่อโรคพืชเช่นเดียวกับการคัดกรองในข้อ 2

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกราเอนโดไฟต์จากพืชกาฝากและพืชอาศัยบางชนิด

จากการแยกราเอนโดไฟต์จากพืชกาฝาก (กาฝากมะปราง, กาฝากละมุด และกาฝากหม่อน) และพืชอาศัย (มะปราง ละมุด และหม่อน) แต่ละชนิดมีความชุกของเชื้อราค่อนข้างผันแปรคือร้อยละ 13.3-75.0 (ตารางที่ 1) และพบว่าความชุกของราเอนโดไฟต์ในกาฝาก (*Dendrophthoe pentandra* และ *Dendrophthoe* sp.) ที่มีพืชอาศัยเป็นไม้ยืนต้น (*Bouea macrophylla* และ *Manilkara zapota*) มากกว่าที่พบในกาฝากหม่อน และในพืชอาศัยแต่ละชนิดด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้จำนวนตัวอย่างค่อนข้างน้อย ควรมีการศึกษาโดยใช้จำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น เพื่อยืนยันข้อสรุปดังกล่าว ดังเช่นการศึกษาในพืชอื่น ๆ ได้แก่ พืชวงศ์ขิง 2 ชนิด พบราเอนโดไฟต์สูงร้อยละ 70.0-83.0 (Bussaban *et al.*, 2001) และในพืชสกุลอบเชย 3 ชนิด มีราเอนโดไฟต์สูงถึงร้อยละ 94.8-99.7 (Suwannarach *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตาม การศึกษาในพืชกาฝากและพืชอาศัยนี้พบราเอนโดไฟต์ เช่น *Colletotrichum* spp. และ *Phomopsis*

spp. ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้บ่อยในพืชทั้งสองสกุลข้างต้น รวมถึงพืชกาฝาก และพืชอื่น ๆ (Prihastuti *et al.*, 2009; de Abreu *et al.*, 2010; Powthong *et al.*, 2012) อีกทั้งพบรา *Lasiodiplodia* ในพืชกาฝากและพืชอาศัยทั้ง 6 ชนิดที่ศึกษา ซึ่งไม่พบราในรายงานของ de Abreu *et al.* (2010) ที่ศึกษาราเอนโดไฟต์ของกาฝาก *Phoradendron perrottettii* และพืชอาศัย *Tapirira guianensis* ในการศึกษาครั้งนี้แยกราได้จำนวน 53 ไอโซเลท และเก็บรักษาไว้ใน PDA slant สำหรับใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2. การคัดกรองราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

จากการคัดกรองราเอนโดไฟต์จำนวน 47 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร PDB, GSB, MEB, YES และ SBB ในการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืชจำนวน 7 ชนิด พบว่าราเอนโดไฟต์สร้างสารออกฤทธิ์ในอาหารแต่ละชนิด โดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้แตกต่างกัน ซึ่งชุดควบคุมเชิงลบ 10% DMSO ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคพืช แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ได้เกิดจาก 10% DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดหยาบ ซึ่งราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหาร PDB สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียและรา โดยจำนวนราเอนโดไฟต์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้คือ 2-4 ไอโซเลท แต่ราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหาร

Table 1 Total of isolate prevalence and number of endophytic fungi isolated from three parasitic plants and their hosts

Plants	Number of isolate of endophytic fungi			
	Stalk	Leaf	Flower	Total of isolate prevalence (%)
Parasitic plants				
<i>Dendrophthoe pentandra</i>	3	5	5	60.0
<i>Dendrophthoe</i> sp.	4	9	4	75.0
<i>Loranthus parasiticus</i>	0	5	0	25.0
Host plants				
<i>Bouea macrophylla</i>	3	0	nt	13.3
<i>Manilkara zapota</i>	3	2	nt	20.0
<i>Morus alba</i>	7	3	nt	46.7

nt: no flowers of given plant for fungal isolation

GSB, MEB, YES และ SBB ยับยั้งการเจริญได้เฉพาะแบคทีเรียเท่านั้น โดยจำนวนราเอนโดไฟต์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ คือ 3-5 ไอโซเลท 3 ไอโซเลท 2-4 ไอโซเลท และ 5-7 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งความเข้มข้นและชนิดของสารอาหารเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญและการสร้างสารทุติยภูมิของราแต่ละชนิด (Griffin, 1994) ในการศึกษาครั้งนี้จะเห็นว่าอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ซึ่งผสมกับแหล่งไนโตรเจนในอัตราส่วนที่ต่างกันมีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ของราเอนโดไฟต์โดยเฉพาะ MoPIV2, MoS3/1 และ MoS5 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร PDB และ YES ซึ่งมีแหล่งของคาร์บอนเป็นน้ำตาล dextrose และ sucrose ในปริมาณมากพอที่ราสามารถนำไปใช้ได้โดยตรง Tanakulpakorn *et al.* (2012) รายงานว่าความสมบูรณ์ของอาหารมีความสำคัญอย่างมากต่อการสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟต์ TH121 โดยพบว่าสารอาหารที่มีอย่างสมบูรณ์ในอาหาร PDB, YES และ SBB ช่วยให้ราเอนโดไฟต์ TH121 นั้นสร้างสารยับยั้ง *Alternaria brassicicola* ได้ดี อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่าการคัดกรองโดยการเลี้ยงราเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลทในอาหารทั้ง 5 ชนิดนั้น ทำให้เพิ่มโอกาสของเชื้อในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้ เช่น ราไอโซเลท MoS5 ที่เลี้ยงใน GSB และ YES สามารถยับยั้ง *R. solanacearum* TNCC003291 และ *X. citri* BS356 ได้ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 12 และ 22 mm ตามลำดับ (ภาพที่ 1 a, b และ c, d) สำหรับราไอโซเลท MoPIV2 และ MoS3/1 ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ยับยั้ง *Fusarium* sp. BS288 ได้ดีที่สุดเป็นสองลำดับแรก โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส 18 และ 15 mm ตามลำดับ (ภาพที่ 1 e-g) เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของราพบว่าราเอนโดไฟต์ทั้งสองไอโซเลทนี้มีน้ำหนักแห้งของเส้นใยมากกว่าราเอนโดไฟต์ไอโซเลทอื่น ๆ ด้วย (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความแตกต่างขององค์ประกอบของอาหารที่ต่างกันเป็นตัวกระตุ้นให้ราแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตและสร้างสารออกฤทธิ์ได้แตกต่างกันด้วย (Calvo *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007; Gerke and Braus, 2014)

3. การบ่งบอกชนิดของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือก

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานของราเอนโดไฟต์สามไอโซเลทได้แก่ ราไอโซเลท MoS3/1 และ MoS5 ที่แยกได้จากก้านของต้นหม่อน และ MoPIV2 ที่แยกได้จากใบของกาฝากหม่อน ซึ่งเป็นไอโซเลทที่คัดเลือกเนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชที่ทำการทดสอบได้ดีที่สุดเป็นสามลำดับแรก พบว่าราไอโซเลท MoS3/1 สร้างโคนิเดียเซลล์เดี่ยว สองแบบ คือ ขนาดสั้นรูปวงรี ($2.5-5.0 \times 3.0-12.0 \mu\text{m}$) และขนาดยาวกว่า ลักษณะเป็นเส้นโค้งงอตรงปลายคล้ายสร้อย (1.4-1.6 $\times$ 24-25 μm) ภายใน fruiting body ซึ่งเป็นลักษณะของราในจีนัส *Phomopsis* (Sutton, 1980) ส่วนราไอโซเลท MoS5 สร้างโคนิเดียเมื่ออ่อนจะมีเซลล์เดี่ยว สีใส เมื่อแก่จะมีผนังกันตามขวาง และมีหลอดยาว โคโคนิเดียมีขนาด 13-15 $\times$ 23-24 μm ภายใน fruiting body ซึ่งตรงกับลักษณะของ *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Sutton, 1980; Alves *et al.*, 2008) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ยืนยันว่าเป็นราดังกล่าว ซึ่งจัดอยู่ใน Class Sordariomycetes และ Dothideomycetes ตามลำดับ (ภาพที่ 2) สำหรับราไอโซเลท MoPIV2 นั้นสร้างเฉพาะเส้นใยสีขาว ไม่สร้างสปอร์บนอาหาร แม้ว่าจะชักนำด้วยหลายวิธีการ และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 แล้วพบว่าจัดอยู่ในจีนัส *Colletotrichum* Order Glomerellales (ภาพที่ 2) แต่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้เนื่องจากข้อมูลของ ITS sequence ยังไม่เพียงพอในการระบุสปีชีส์ของ *Colletotrichum* sp. สปีชีส์ต่าง ๆ ได้ อย่างไรก็ตามหากใช้ข้อมูลของยีนส์ ACT และ GAPDH ในการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วย โดยเฉพาะเมื่อราไม่สร้างสปอร์ก็สามารถระบุถึงสปีชีส์ได้ (Xie *et al.*, 2010; Weir *et al.*, 2012) นอกจากนี้ขนาดของ conidia และ ascospore ของราจีนัสนี้ยังใกล้เคียงกันมาก (Weir *et al.*, 2012) แม้ว่าราทั้งสามจีนัสนี้จะเคยมีรายงานว่าเป็นราก่อโรคในพืช (Slippers and Wingfield, 2007; Begoude *et al.*, 2010) ซึ่งอาจทำให้เกิดโรคกับพืชได้หากพืชอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมหรืออ่อนแอ (Begoude *et al.*, 2011)

Table 2 Qualitative antifungal activity of 47 endophytic fungi cultured in five media inhibiting growth of phytopathogens

Potential antifungal activity ^a	Number of isolate of endophytic fungi inhibiting growth of test organisms		
	Xc BS356 ^b	Rs TNCC003291 ^b	Fu BS288 ^c
PDB			
+++	0	0	0
++	2	0	2
+	2	2	0
-	43	45	45
GSB			
+++	1	0	0
++	3	3	0
+	1	0	0
-	42	44	47
MEB			
+++	1	0	0
++	1	0	0
+	1	0	0
-	44	47	47
YES			
+++	1	0	0
++	1	1	0
+	2	1	0
-	43	45	47
SBB			
+++	0	0	0
++	6	2	0
+	1	3	0
-	40	42	47

^a +++ : inhibition zone diameter (X) $\geq$ 20 mm

++ : 10-19 mm

+ : 6-9 mm

- : X = 5 mm

^b positive control = 1 mg/ml streptomycin (*Xanthomonas citri* BS356 = 10 mm, *Ralstonia solanacearum* TNCC003291 = 10 mm)

^c positive control = 20 mg/ml benomyl (*Fusarium* sp. BS288 = 18 mm)

Xc = *Xanthomonas citri* BS356, Rs = *Ralstonia solanacearum* TNCC003291, Co = *Colletotrichum* sp. BS351, Fu = *Fusarium* sp. BS288

PDB: potato dextrose broth, GSB: glucose soybean meal broth, MEB: malt extract broth, YES: yeast extract sucrose broth, SBB: Sabouraud broth

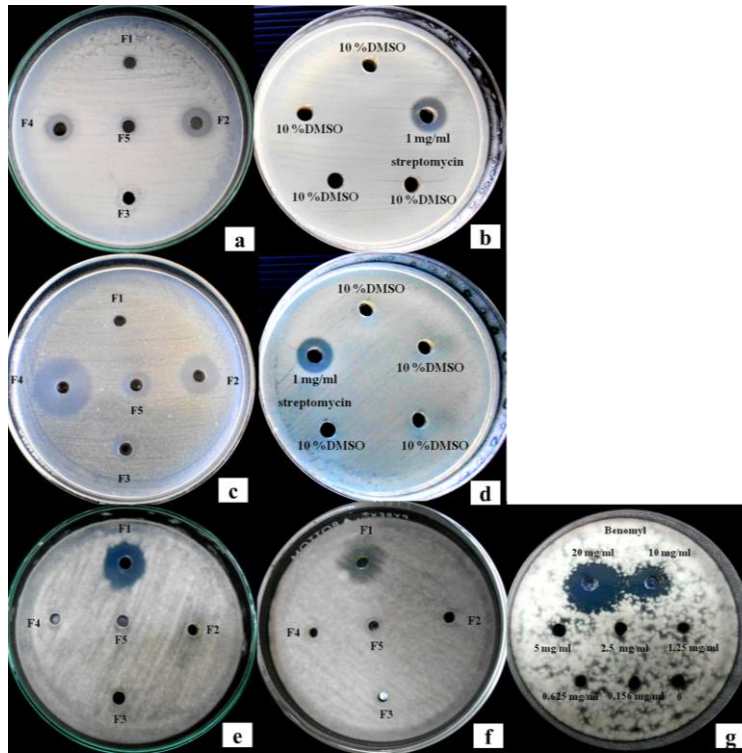


Figure 1 The inhibition zones of crude extract obtained from *Lasiodiplodia pseudotheobromae* MoS5 cultured in five media, 10% DMSO and streptomycin 1 mg/ml against growth of *Ralstonia solanacearum* TNCC003291 (a, b), *L. pseudotheobromae* MoS5 cultured in media F1-F5, 10% DMSO and streptomycin 1 mg/ml against growth of *Xanthomonas citri* BS356 (c, d), *Colletotrichum* sp. MoPIV2 and *Phomopsis* sp. MoS3/1 cultured in media F1-F5, and 0-20 mg/ml benomyl against *Fusarium* sp. BS288 (e, f, g)

แต่พบว่าเป็นราเอนโดไฟต์กลุ่มที่พบบ่อยในพืชหลายชนิด เช่น แค กาแฟ และอบเชย (Prihastuti *et al.*, 2009; Suwannarach *et al.*, 2010; Powthong *et al.*, 2012)

4. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดยับยั้งการเจริญของราเอนโดไฟต์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราก่อโรคพืช

จากการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดยับยั้งการเจริญของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช (MIC) พบว่าสารสกัดยับยั้งการเจริญของราเอนโดไฟต์ *L. pseudotheobromae* MoS5 ที่เลี้ยงใน YES ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* TNCC003291 และ *X. citri* BS356 ได้ด้วย MIC 2.5 mg/ml และ 5 mg/ml ตามลำดับ ส่วนสารสกัดยับยั้งการเจริญของราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงใน PDB ยับยั้งการเจริญของรา *Colletotrichum* sp. MoPIV2 และ *Phomopsis* sp. MoS3/1 ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* TNCC003291 และ *X. citri* BS356 ได้ด้วย MIC 10 และ 40 mg/ml ตามลำดับ แม้ว่าจะใช้ปริมาณสารมากกว่า streptomycin ก็ตาม แต่สารสกัดยับยั้งการเจริญของราเอนโดไฟต์ทั้งสองชนิดนี้สามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. BS288 ได้ดีมากด้วยค่า MIC เพียง 1.25 mg/ml ซึ่งใช้สารน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ benomyl (MIC 10 mg/ml) ถึง 8 เท่า (ตารางที่ 3) ซึ่ง benomyl เป็นสารฆ่าราชนิดดูดซึมที่ใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากราหลายชนิด เช่น *Curvularia lunata* และ *Fusarium oxysporum* (วิพรพรรณ และพิมพ์พร, 2549)

Colletotrichum sp. MoPIV2 และ *Phomopsis* sp. MoS3/1 ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ยับยั้งการเจริญของ *R. solanacearum* TNCC003291 และ *X. citri* BS356 ได้ด้วย MIC 10 และ 40 mg/ml ตามลำดับ แม้ว่าจะใช้ปริมาณสารมากกว่า streptomycin ก็ตาม แต่สารสกัดยับยั้งการเจริญของราเอนโดไฟต์ทั้งสองชนิดนี้สามารถยับยั้ง *Fusarium* sp. BS288 ได้ดีมากด้วยค่า MIC เพียง 1.25 mg/ml ซึ่งใช้สารน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ benomyl (MIC 10 mg/ml) ถึง 8 เท่า (ตารางที่ 3) ซึ่ง benomyl เป็นสารฆ่าราชนิดดูดซึมที่ใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากราหลายชนิด เช่น *Curvularia lunata* และ *Fusarium oxysporum* (วิพรพรรณ และพิมพ์พร, 2549)

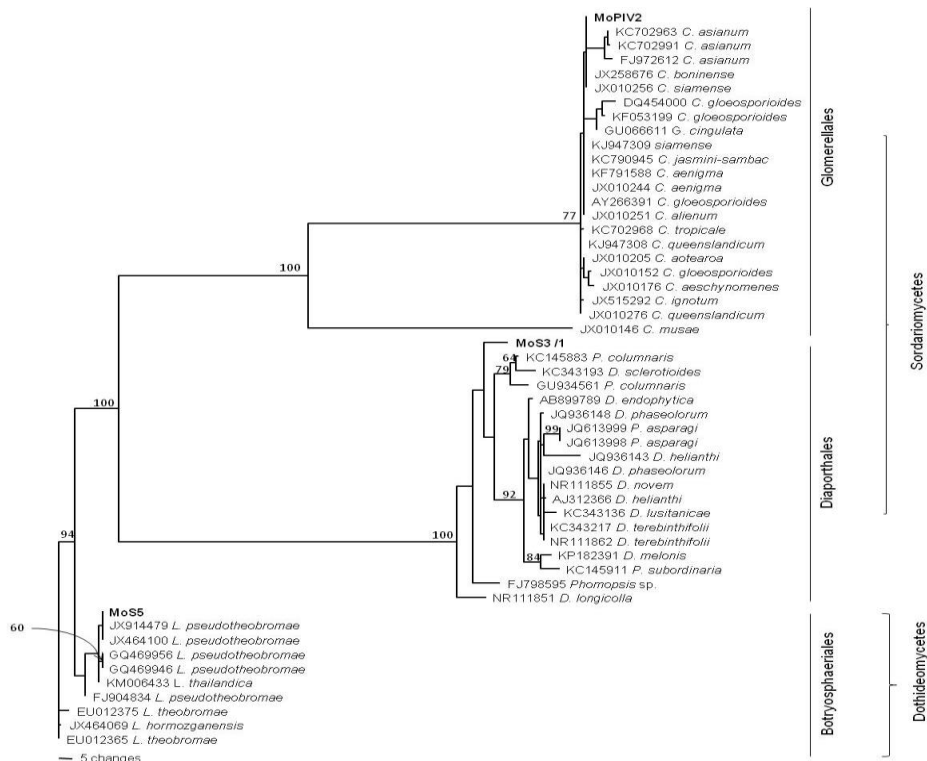


Figure 2 One of maximum parsimony tree inferred from a heuristic search of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequences alignment of 53 isolates of *Colletotrichum* sp. MoPIV2, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* MoS5, *Phomopsis* sp. MoS3/1 and related genera. The size of the branches is indicated with a scale bar. The bootstrap values representing 1000 bootstrap replications are given (when more than 50%) above the branches

Table 3 The minimum inhibitory concentration (MIC) of the crude ethyl acetate metabolites produced by endophytic fungi

Crude extracts	MIC (mg/ml) ^a		
	<i>Raltonia solanacearum</i> TNCC003291	<i>Xanthomonas citri</i> BS356	<i>Fusarium</i> sp. BS288
<i>Colletotrichum</i> sp. MoPIV2	10	10 ^b	1.25
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> MoS5	2.5	5	5
<i>Phomopsis</i> sp. MoS3/1	40	40	1.25
Streptomycin	0.062	0.125	nt
Benomyl	nt	nt	10

^a MIC from 3 replicates

^b hazy zone

nt = not test

สรุป

จากการแยกราเอนโดไฟต์จากพืชกาฝาก (กาฝากมะปราง กาฝากละมุด และกาฝากหม่อน) และพืชอาศัย (มะปราง ละมุด และหม่อน) พบราจำนวน 53 ไอโซเลท โดยแยกจากกิ่งได้จำนวน 20 ไอโซเลท ใบ 24 ไอโซเลท และดอก 9 ไอโซเลท เมื่อทดสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคพืชจำนวน 7 ชนิด พบว่าราเอนโดไฟต์สร้างสารออกฤทธิ์ในอาหารแต่ละชนิดต่างกัน ซึ่งราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหาร PDB สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรียและราก่อโรค สำหรับราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงในอาหาร GSB, MEB, YES และ SBB ยับยั้งการเจริญได้เฉพาะแบคทีเรียเท่านั้น และการคัดกรองโดยการเลี้ยงราเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลทในอาหารทั้ง 5 ชนิด พบว่าเพิ่มโอกาสของการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้ โดยราเอนโดไฟต์สามชนิด คือ *L. pseudotheobromae* MoS5 ที่เลี้ยงใน GSB และ YES สามารถยับยั้ง *R. solanacearum* TNCC003291 และ *X. citri* BS356 ได้ดีที่สุด ราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* sp. MoPIV2 และ *Phomopsis* sp. MoS3/1 ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ยับยั้ง *Fusarium* sp. BS288 ได้ดีที่สุด เมื่อระบุชนิดของราเอนโดไฟต์ทั้งสามดังกล่าวด้วยลักษณะสัณฐานและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 พบว่าราไอโซเลท MoS3/1 และ MoS5 มีความสัมพันธ์กับ *Phomopsis* ชนิดอื่นๆ และ *L. pseudotheobromae* ตามลำดับ สำหรับราไอโซเลท MoPIV2 ซึ่งไม่สร้างสปอร์ พบว่าจัดอยู่ในจีนัส *Colletotrichum* Order Glomerellales นอกจากนี้เมื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟต์ทั้งสามชนิด พบว่าราเอนโดไฟต์ *Colletotrichum* sp. MoPIV2 และ *Phomopsis* sp. MoS3/1 มีค่า MIC ในการยับยั้ง *Fusarium* sp. BS288 เท่ากับ 1.25 mg/ml ซึ่งต่ำกว่า MIC ของสารฆ่ารา benomyl (10 mg/ml) ถึง 8 เท่า จึงอาจนำสารสกัดหยาบนี้มาใช้ในการควบคุมราสาเหตุโรคดังกล่าวได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ. ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และกรมวิชาการเกษตร สำหรับการอนุเคราะห์ *Phytophthora botryosa* และ *Ralstonia solanacearum* TNCC003291 ตามลำดับ ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และทุนมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ (NRU) สำหรับการสนับสนุนเงินทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กวินนาถ บัวเรือง พชร มงคลสุข และเลขา มาโนช. 2552. ความหลากหลายทางชีวภาพและสารทุติยภูมิของไลเคน ในวงศ์พาร์มีเลีย ณ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. (17-20 มีนาคม 2552) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 521-527.
- คิดคม สเลลันนท์. 2541. ฤทธิ์ลดความดันเลือดของสารสกัดกาฝากมะม่วง (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) ในหนูขาวความดันเลือดสูง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น. 130 หน้า.
- บุษณีย์ เอี่ยมสิดา และประภาสินี วงษ์ชนะสิทธิ์. 2550. สัณฐานวิทยาและความสามารถของกาฝากต้นหว้าในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิด. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา. นครราชสีมา. 64 หน้า.
- วิพรพรรณ โพธิตา และพิมพ์พร สุยาว. 2549. การศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคขิงและการป้องกันกำจัดโดยใช้สารเคมี. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. (30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2549) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 497-501.

- อภาพร โพธิ์ยอด และเกวณีน คุณาศักดากุล. 2557. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรครากเน่าไฟทอปธอราในสตรอว์เบอร์รีที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเชื้อแบคทีเรียไมซีสโตเอนโดไฟต์. วารสารเกษตร 30(3): 213-222.
- de Abreu, L. M., A. R. Almeida, M. Salgado and L. H. Pfenning. 2010. Fungal endophytes associated with the mistletoe *Phoradendron perrottetii* and its host tree *Tapirira guianensis*. Mycological Progress 9(4): 559-566.
- Alves, A., P. W. Crous, A. Correia and A. J. L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Diversity 28(1): 1-13.
- Bacon, C. W. and J. F. White. 2000. Microbial Endophytes. Marcel Dekker, New York. 88 p.
- Begoude, B. D., B. Slippers, M. J. Wingfield and J. Roux. 2010. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. Mycological Progress 9(1): 101-123.
- Begoude, B. D., B. Slippers, M. J. Wingfield and J. Roux. 2011. The pathogenic potential of endophytic Botryosphaeriaceous fungi on *Terminalia* species in Cameroon. Forest Pathology 41: 281-292.
- Bussaban, B., S. Lumyong, P. Lumyong, E. H. C. McKenzie and K. D. Hyde. 2001. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. Canadian Journal of Microbiology 47(10): 943-948.
- Bussaban, B., S. Lumyong, P. Lumyong, T. Seelanan, D. C. Park, E. H. C. McKenzie and K. D. Hyde. 2005. Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. Mycologia 97(5): 1002-1011.
- Calvo, A. M., R. A. Wilson, J. W. Bok and N. P. Keller. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66(3): 447-459.
- Chantarasomboon, P., K. Yoshihira, W. K. Natoris, U. Goto and M. Kugo. 1974. Thai medicinal plants. VII. Chemical and pharmacological studies on the constituents of *Loranthus pentandrus*. Shoyakugoku Zasshi 28: 7-14.
- Crawford, K. M., J. M. Land and J. A. Rudger. 2010. Fungal endophytes of native grasses decrease insect herbivore preference and performance. Oecologia 164(2): 431-444.
- Devehat, F. L., S. Tomasi, D. Fontanel and J. Boustie. 2002. Flavonols from *Scurrula ferruginea* Danser (*Loranthaceae*). Zeitschrift für Naturforschung 57: 1092-1095.
- Druzhinina, I. S., V. Seidi-Seiboth, A. Herrera-Estrella, B. A. Horwitz, C. M. Kenerley, E. Monte, P. K. Mukherjee, S. Zeilinger, I. V. Grigoriev and C. P. Kubicek. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nature Reviews Microbiol 9(10): 749-759.
- Duraipandian, V. and S. Ignacimuthu. 2007. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. Journal of Ethnopharmacology 112(3): 590-594.
- García Parisi, P. A., A. A. Grimoldi and M. Omacini. 2014. Endophytic fungi of grasses protect other plants from aphid herbivory. Fungal Ecology 9: 61-64.
- Gerke, J. and G. H. Braus. 2014. Manipulation of fungal development as source of novel secondary metabolites for biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology 98(20): 8443-8455.

- Griffin, D. H. 1994. Fungal Physiology, 2nd edition. Wiley, New York. 80 p.
- Koneman, E. W., S. D. A. Stephens, Jr. V. R. Dowell and H. M. Sommer 1983. Gram positive cocci. *Enterococcus*-selective mediums. pp. 750-782. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 2nd ed. J.B. Lippincott, Washington, DC.
- Li, L., B. Qiao and Y. Yuan. 2007. Nitrogen sources affect Streptolydigin production and related secondary metabolites distribution of *Streptomyces lydicus* AS4. 2501. Chinese Journal of Engineering 15(3): 403-410.
- Phruekphakphom, A. and S. Muunsan. 1979. Phytochemical Study of *Dendrophthoe pentandra* Miq. Undergraduate Special Project Report, Mahidol University 54 p.
- Powthong, P., B. Jantrapanukorn, A. Thongmee and P. Suntornthiticharoen. 2012. Evaluation of endophytic fungi extract for their antimicrobial activity from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research 3(2): 132-136.
- Prihastuti, H., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie and K. D. Hyde. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. Fungal Diversity 39: 89-109.
- Rogers, J. K., B. C. Morton and J. Mosali. 2011. Plant and endophyte effect on fiber, N and P concentrations in tall fescue. International Journal of Agronomy 1: 1-7.
- Slippers, B. and M. J. Wingfield. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. Fungal Biology Reviews 21(2): 90-106.
- Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 696 p.
- Suwannarach, N., B. Bussaban, K. D. Hyde and S. Lumyong. 2010. *Muscodora cinnamomi*, a new endophytic species from *Cinnamomum bejolghota*. Mycotaxon 114(1): 15-23.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts. 65 p.
- Tanakulpakorn, J., A. Pilantanapak and R. Srivibool. 2012. Antifungal activity of endophytic fungi TH121 Isolated from *Thespesia populnea* against *Alternaria brassicicola*. Thai Journal of Science and Technology 1: 32-41.
- Tao, G., Z. Y. Liu, K. D. Hyde, X. Z. Lui and Z. N. Yu. 2008. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). Fungal Diversity 33: 101-122.
- Ting, A. S. Y., S. Meon, J. Kadir, S. Radu and G. Singh. 2008. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. BioControl 53: 541-553.
- Weir, B., P. R. Johnston and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology 73: 115-180.
- Wilson, D. 2000. Ecology of woody plant endophytes. pp. 389-420. In: Bacon, C. W. and White, J. F. (eds.), Microbial Endophytes. Marcel Dekker, New York.
- Xie, L., J. Z. Zhang, Y. Wan and D. W. Hu. 2010. Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang province and Shanghai city, China. Journal of Zhejiang University Science B (Biomedicine & Biotechnology) 11(1): 61-70.