



ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นกันเกรา
Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated From
Fagraea fragrans Roxb.

ประไพพิศ อินเสน^{1*}, ธีระวัฒน์ บุญโสม², กัลยา ภาราไธ², นงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ²

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย ปทุมธานี 12000

²สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย ปทุมธานี 12000

Praphaiphit Insain^{1*}, Teerawat Boonsom², Kalaya Pharadai², Nongluksna Sriubolmas²

¹Division of Cosmetic Science and Health Product, School of Pharmacy, Eastern Asia University,
Pathumthani, 12000

²Division of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Eastern Asia University, Pathumthani, 12000

*Email : praphaiphit@eau.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกราเอนโดไฟต์จากส่วนต่าง ๆ ของต้นกันเกราที่สร้างสารเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราโดยวิธี dual culture agar diffusion และจัดจำแนกรายได้จากฐานวิธานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำส่วนของพืช ได้แก่ เปลือกไม้ แก่นไม้ และใบไม้ มาทำให้พื้นผิวปราศจากเชื้อ และทำคัดแยกหาเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเชื้อ 6 ชนิด ได้แก่ Czapek yeast autolysate agar (CzYA), malt Czapek agar (MCzA), malt extract agar (MEA), potato dextrose agar (PDA), Sabouraud's dextrose agar (SDA) และ yeast extract sucrose agar (YSA) และทดสอบโดยวิธี dual culture agar diffusion เป็นเวลา 14 วัน เพื่อผลการยับยั้งจุลินทรีย์ จากการวิจัยสามารถแยกเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต พบราเอนโดไฟต์ที่ออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ 3 ไอโซเลต (คิดเป็นร้อยละ 12.5) โดยราเอนโดไฟต์ 1 ไอโซเลตมีฤทธิ์ยับยั้ง methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ *Escherichia coli* คือ Ffra L24 และพบราเอนโดไฟต์ 2 ไอโซเลต คือ Ffra B14 และ Ffra B15 มีฤทธิ์เสริมกับ ketoconazole ในการต้าน *Candida albicans* นอกจากนี้ ยังพบว่า อาหารเพาะเชื้อมีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ของราเอนโดไฟต์ โดย CzYA MCzA และ YSA เป็นอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงราเอนโดไฟต์ให้สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การจัดจำแนกรายได้จากฐานวิธานวิทยาได้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า Ffra B14, Ffra B15 และ Ffra L24 เป็นราในกลุ่ม Coelomycetes

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟต์ กันเกรา ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ วิธี dual culture agar diffusion

Abstract

The aim of this study was to isolate endophytic fungi which produced secondary metabolites from any part of *Fagraea fragrans* Roxb. Parts of plants sample (leave, bark and cambium) were surface-sterilized and cultured on 6 mycological media including Czapek yeast autolysate agar (CzYA), malt Czapek agar (MCzA), malt extract agar (MEA), potato dextrose agar (PDA), Sabouraud's dextrose agar (SDA) and yeast extract sucrose agar (YSA) for 14 days. The



endophytic fungi were identified based on the microscopic morphology and screened for anti-bacterial and anti-fungi activities by dual culture agar diffusion assay. A total of 24 endophytic fungal isolates were isolated from leaves, bark and cambium of the plant sample. They demonstrated 3 active isolates (12.5%) which showed antimicrobial activities. The isolate Ffra L24 was found to inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Escherichia coli* (*E.coli*). The Isolates Ffra B14 and Ffra B15 exhibited synergistic activity with ketoconazole against *Candida albicans*. The type of culture media affected the bioactive compounds production of endophytic fungi. CzYA, MCzA and YSA were suitable for endophytic fungi to produce bioactive compounds. Classification of Ffra B14, Ffra B15 and Ffra L24 based on the microscopic morphology suggested that they were Coelomycetes.

Keywords : Endophytic fungi, *Fagraea fragrans* Roxb., antimicrobial activity, dual culture agar diffusion

บทนำ

โรคติดเชื้อยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทยและของโลก^(1, 2) และแนวโน้มของปัญหาทวีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากการเกิดเชื้อดื้อยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันและการเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ดังนั้น การศึกษาเพื่อหาสารใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จึงเป็นสิ่งจำเป็นมากสำหรับวงการแพทย์และสาธารณสุข ราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่สำคัญที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เป็นอย่างดีและนำมาใช้เป็นยารักษาโรค เนื่องจากเป็นแหล่งจากธรรมชาติ และคาดว่าจะได้สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ชนิดใหม่ที่มีประโยชน์ต่อวิทยาศาสตร์และการแพทย์ ปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรายอย่างต่อเนื่อง เชื่อกันว่าราที่เจริญในแหล่งพิเศษมักสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลากหลายชนิด ได้แก่ แอลคาลอยด์ (alkaloids) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านจุลินทรีย์ ต้านมะเร็ง เป็นต้น⁽³⁻⁶⁾ ด้วยเหตุนี้ การศึกษาการแยกรากจากธรรมชาติแหล่งใหม่จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะแยกได้ราที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

เอนโดไฟต์ (endophyte) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ซึ่งอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกส่วน เป็นได้ทั้งแบคทีเรียและรา เอื้อประโยชน์ให้กับพืชเจ้าบ้านที่เอนโดไฟต์อาศัยอยู่ เช่น ราเอนโดไฟต์ *Fusarium redolens* ที่แยกได้จากต้นยิว (*Taxus baccata*)⁽⁷⁾ และราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspora* ที่แยกได้จากต้นยิว (*Taxus wallichiana*) สามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ได้แก่ Taxol (paclitaxel) เป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นประโยชน์ทางการแพทย์⁽⁸⁾ เอนโดไฟต์จำพวกราใน genus *Rhizoctonia* ที่อาศัยอยู่ในรากของกล้วยไม้หลายชนิด ช่วยย่อยสลายเปลือกไม้หรือซัสเตรทอื่น ๆ ให้เป็นสารอาหารให้กับต้นอ่อนของต้นกล้วยไม้ เป็นต้น⁽⁹⁾ เอนโดไฟต์สามารถพบอยู่ทุกหนทุกแห่งอย่างกว้างขวางในพืชเกือบทุกชนิด ทั้งพืชบกและพืชน้ำ รวมถึงพบได้เกือบทุกส่วนของพืช ได้แก่ ลำต้น ใบ ราก เปลือก เป็นต้น^(10, 11) เช่นเดียวกันราเอนโดไฟต์เป็นราประเภทหนึ่งซึ่งเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่มีชีวิตโดยไม่ก่อให้เกิดโรค ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และพืชเจ้าบ้านจะอยู่ในลักษณะอยู่ร่วมกันและเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน และราเอนโดไฟต์เป็นที่รู้จักกันมานาน⁽¹²⁾ แต่เพิ่งได้รับการศึกษาอย่างจริงจังในระยะ 30 ปีมานี้ ราเอนโดไฟต์จึงเป็นอีกหนึ่งแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์หลายชนิด⁽³⁾ เนื่องจากใช้เวลาในการเจริญเติบโต การผลิตสารสำคัญในระยะเวลาสั้นกว่าและได้ในปริมาณที่มาก และจากการที่ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น ต้นไม้ในประเทศไทยจึงมีความหลากหลายทางชีวภาพมาก ต่างจากต้นไม้ในเขตอบอุ่นและเขตหนาว นอกจากนี้ ต้นไม้ในประเทศไทยจำนวนมากมีสรรพคุณในการรักษาโรค จึงมีการศึกษาราเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพร⁽¹³⁾

กันเกรา (Kankrao, Anan) เป็นพืชในวงศ์ Gentianaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Fagraea fragrans* Roxb.⁽¹⁴⁾ (รูปที่ 1) มีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยทั่วไปทุกภาค แต่พบมากทางภาคใต้ ขึ้นเป็นกลุ่มบนพื้นราบต่ำ โลง บน ดินร่วนปนทรายที่ชื้นแฉะในฤดูฝน บริเวณที่มีระดับน้ำใต้ดินค่อนข้างตื้นตลอดปี หรือขึ้นใกล้ลำน้ำในป่าเบญจพรรณขึ้น ทั่วไป ในต่างประเทศพบที่พม่า กัมพูชา เวียดนามตอนใต้ และภูมิภาคมาเลเซีย⁽¹⁵⁾

ในทางเภสัชวิทยา ต้นกันเกราเป็นพืชที่มีสรรพคุณทางยา เป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้รักษามาลาเรีย หิด ไข้ และผื่นผิวหนัง ได้แก่ เปลือกใช้เป็นยาบำรุงโลหิต บรรเทาอาการผื่นหนังพุพอง แก่นมีรสฝาด ใช้เป็นยาบำรุงธาตุ บรรเทาอาการแน่นหน้าอก⁽¹⁵⁾ พืชในวงศ์ Gentianaceae มีสารสำคัญหลายชนิดและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ⁽¹⁶⁾ สารสำคัญที่พบในกันเกรา ได้แก่ secoiridoid^(17, 18), alkaloid⁽¹⁹⁾, lignin⁽²⁰⁾, terpenoid⁽²¹⁾ เป็นต้น โดยสามารถแยกได้จากส่วนต่าง ๆ (ดอก ใบ ลำต้น ราก เปลือกต้น) ของต้นกันเกรา จากงานวิจัยของ Jonville, et al.⁽²²⁾ พบสาร fragraldehyde (secoiridoid glycoside) และ swertiamarin ที่สกัดได้จากเปลือกต้นและใบ มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย *Plasmodium falciparum*⁽¹⁷⁾ และต้านการอักเสบ⁽²²⁾ sweroside ที่สกัดได้จากเปลือกลำต้น ราก ผล และลำต้น มีคุณสมบัติต้าน HSV-1 (Herpes simplex virus type 1)⁽²³⁾ สาร pinoresinol และ naucleal ซึ่งเป็นลิแกนด์คัด แยกได้จากเปลือกรากต้นกันเกรา งานวิจัยพบว่า pinoresinol มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* (สายพันธุ์เค-1) และต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* ส่วนสาร naucleal ยับยั้งการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็งปอดและเชื้อวัณโรค⁽²⁴⁾ เทอร์พีนอยด์ที่พบในดอกกันเกรา มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรม ลบ และยังมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ⁽²¹⁾ นอกจากนี้ ยังพบอนุพันธ์ของอะโรมาติก (aromatic) ได้แก่ (2E)-nonacosyl ester, cinnamaldehyde, vanillin และ syringaldehyde ในเปลือกลำต้นของกันเกรา มีฤทธิ์ต้าน แบคทีเรียและราเช่นกัน^(25, 26)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อแยกราเอนโดไฟต์จากต้นกันเกรา และนำมาคัดแยกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* (E. coli) และยีสต์ *Candida albicans* (C. albicans) จากราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้ รวมถึงการทดสอบการเสริมฤทธิ์ ketoconazole (KTZ) ในการต้านเชื้อรา C. albicans และจัดจำแนกราเอนโดไฟต์จากฐานข้อมูลจุลทรรศน์



รูปที่ 1 ต้นและใบกันเกรา (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Fagraea fragrans* Roxb. วงศ์ Gentianaceae)⁽¹⁴⁾



วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บและเตรียมตัวอย่างพืช เก็บตัวอย่างจากต้นกันเกรา โดยตัดกิ่งไม้และใบไม้ที่สมบูรณ์ ไม่มีรอยโรค นำชิ้นส่วนตัวอย่างพืชล้างน้ำเพื่อทำความสะอาด เลือกใบและกิ่งตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 5 เซนติเมตร

2. การคัดแยกราเอนโดไฟต์ นำตัวอย่างพืชมาทำความสะอาดพื้นผิวให้ปราศจากเชื้อโดยแช่ใน 70% เอทานอล (ethanol) 1 นาที แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) เข้มข้น 6% w/v นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อนาน 1 นาที 3 ครั้ง^(5, 27, 28) ใช้ใบมีดปราศจากเชื้อตัดตัวอย่างพืชเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยตัดชิ้นส่วนของกิ่งห่างจากปลายทั้ง 2 ด้าน ประมาณ 1 เซนติเมตร แยกส่วนของเปลือกไม้และแก่นไม้หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตัดชิ้นส่วนของใบตามแนวเส้นกลางใบ และส่วนอื่น ๆ ของใบ วางชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชลงบน water agar (WA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง การงอกของเชื้อราจากเนื้อเยื่อพืชทุกวันจนกว่าจะเห็นเส้นใยของ ราเอนโดไฟต์งอกออกมาจากชิ้นส่วนของพืช ซึ่งจะเห็นเป็นเส้นใยเล็ก ๆ⁽²⁹⁾

แยกปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืชด้วยเทคนิค hyphal tipping โดย pasture pipette เจาะลงปลายเส้นใย แล้วใช้เข็มเขี่ยนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งราเอนโดไฟต์ที่แยกได้เจริญเต็มที่ ควบคุมบริสุทธิ์ของราเอนโดไฟต์โดยสังเกตจากลักษณะโคโลนี (colony)

แยกราเอนโดไฟต์ที่ได้ให้บริสุทธิ์บนอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 6 ชนิด ได้แก่ Czapek yeast autolysate agar (CzYA), malt Czapek agar (MCZA), malt extract agar (MEA), potato dextrose agar (PDA), Sabouraud's dextrose agar (SDA), yeast extract sucrose agar (YSA) โดยใช้ pasture pipette เจาะบริเวณโคโลนี (ระหว่างกึ่งกลางและขอบ) ตามเข็มนาฬิกา แล้วใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นวางตรงกลางของอาหารเพาะเชื้อแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน สังเกตลักษณะโคโลนีของราบนอาหารเพาะเชื้อแต่ละชนิด

3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและรา ทดสอบฤทธิ์ต้าน MRSA, *E. coli* และ *C. albicans* ของราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 6 ชนิด ด้วยวิธี dual-culture agar diffusion⁽¹³⁾ ดังนี้ นำเชื้อทดสอบ MRSA (ATCC 33591) และ *E. coli* (ATCC 25922) (50% T₅₈₀) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1% ผสมลงในอาหารเหลว Mueller Hinton agar (MHA) และผสม *C. albicans* (ATCC 90028) (50% T₅₈₀) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1% ลงในอาหารเหลว SDA ปิเปตอาหารที่ผสมเชื้อ ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 15x90 มิลลิเมตร ตั้งให้อาหารแข็ง จากนั้นตัดราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเชื้อแต่ละชนิดด้วย cork borer No.4 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร) แล้วเขี่ยชิ้นวุ้นไปวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ วางจานเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบจากโซนใสรอบ ๆ ชิ้นวุ้น แต่ละการทดสอบทำซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลอยู่ในหน่วยค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสรอบ ๆ ชิ้นวุ้น (มิลลิเมตร) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2 การเสริมฤทธิ์โคโคนาโซลในการต้านเชื้อรา สำหรับการทดสอบการเสริมฤทธิ์กับ ketoconazole ให้เตรียมอาหารเช่นเดียวกันกับวิธีข้างต้น โดยเติม ketoconazole ลงใน SDA ก่อนเติมเชื้อทดสอบ *C. albicans* (ATCC 90028) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ^(30, 31) โดยใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นตัวควบคุม ซึ่งจะเติมลงในอาหารเหลว SDA ในปริมาณเท่ากับ ketoconazole ที่เติมในอาหารเหลว นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเขี่ยชิ้นวุ้นวางบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อทดสอบ วางจานเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบจากโซนใสรอบ ๆ ชิ้นวุ้น แต่ละการทดสอบทำซ้ำ 3 ครั้ง รายงานผลอยู่ในหน่วยค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสรอบ ๆ ชิ้นวุ้น (มิลลิเมตร) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4. การจำแนกสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพบน PDA และ WA ที่มีใบตอง บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 – 8 สัปดาห์ แล้วศึกษาสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำ fruiting body (pycnidium) มาวางบนแผ่นสไลด์ แล้วหยดด้วย lactophenol cotton blue พร้อมกบด เพื่อให้ fruiting body แตกออกมา แล้วนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

5. การประเมินผลทางสถิติ วิเคราะห์ผลของอาหารเพาะเชื้อต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์โดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และ Fisher's least significant difference (LSD)

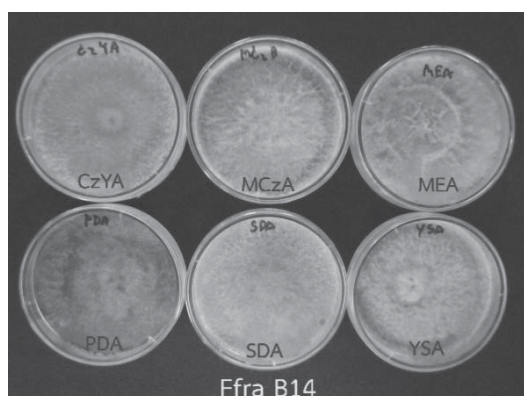
ผลการวิจัย

1. ผลการคัดแยกราเอนโดไฟต์ การแยกราเอนโดไฟต์จากต้นกันเกราโดยวิธี sodium hypochlorite – ethanol surface sterilization techniques บนอาหาร water agar สามารถแยกราเอนโดไฟต์จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต (isolates) ชิ้นส่วนที่แยกราเอนโดไฟต์ได้มากที่สุด คือ ส่วนเปลือกลำต้น จำนวน 22 ไอโซเลต ส่วนราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบ จำนวน 1 ไอโซเลต และจากแคมเบียม (cambium) 1 ไอโซเลต ดังตารางที่ 1 จากการคัดแยก พบว่า ราเอนโดไฟต์ไอโซเลตเดียวกัน เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเชื้อต่างชนิดกันอาจมีลักษณะโคโลนีที่เหมือนกันหรือแตกต่างกัน ดังรูปที่ 2 และเมื่อสังเกตการเจริญของราที่คัดแยกได้บนอาหารทั้ง 6 ชนิด พบว่า ราเอนโดไฟต์เดียวกันเจริญได้ดีบนอาหารแต่ละชนิดได้ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า ราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้สามารถเจริญได้ดีในสภาวะอุณหภูมิห้อง

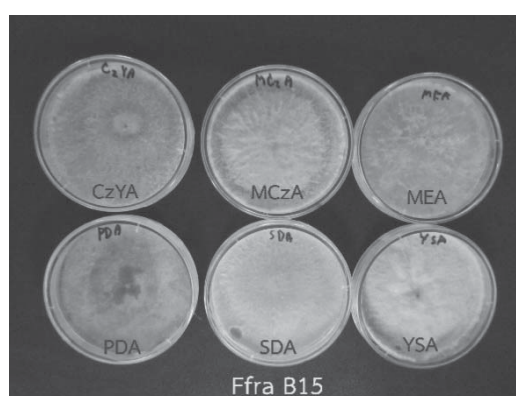
ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลตของราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากต้นกันเกรา

Plant Samples	Part of Plant	Fungal Code	Number of Isolate
<i>Fagraea fragrans</i> Roxb.	Leaves	Ffra L	1
	Bark	Ffra B	22
	Cambium	Ffra C	1

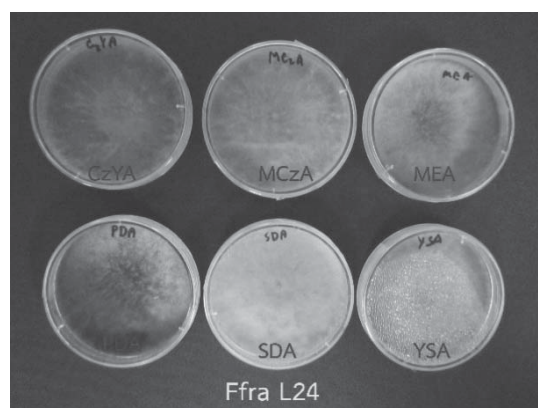
(Ffra, *Fagraea fragrans* Roxb.; B, bark; L, leaves; C, cambium)



(a)



(b)



(c)

รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์ไอโซเลต (a) Ffra B14, (b) Ffra B15 และ (c) Ffra L24 เมื่อเพาะบนอาหารเพาะเชื้อ 6 ชนิด (CzYa, MCzA, MEA, PDA, SDA, และ YSA)

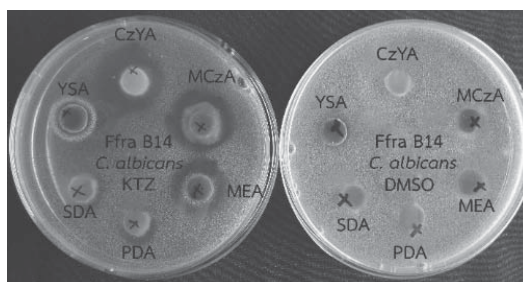
2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เมื่อทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ทั้ง 24 ไอโซเลต โดยวิธี dual culture agar diffusion พบราเอนโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ จำนวน 3 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 12.5 ดังตารางที่ 2 และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบดังรูปที่ 3 และตารางที่ 3 โดยมีราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจำนวน 1 ไอโซเลต คือ Ffra L24 เมื่อเพาะเลี้ยงบน YSA ซึ่งราเอนโดไฟต์ Ffra L24 มีฤทธิ์ต้านทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ MRSA และ *E. coli* ทำให้เกิดโซนยับยั้งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 25.55 ± 0.46 มิลลิเมตร และ 24.56 ± 0.27 มิลลิเมตร (รูปที่ 3 และตารางที่ 3) ตามลำดับ

สำหรับการเสริมฤทธิ์กับ ketoconazole ในการต้าน *C. albicans* นั้น ได้ทำการทดสอบบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีราเอนโดไฟต์และ DMSO เทียบกับจานอาหารเพาะเชื้อที่มีราเอนโดไฟต์และ ketoconazole ซึ่งมีความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ⁽³⁰⁾ จากการทดสอบ พบราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์เสริมกับ ketoconazole ในการต้านเชื้อทดสอบ *C. albicans* จำนวน 2 ไอโซเลต คือ Ffra B14 และ Ffra B15 ที่เสริมฤทธิ์กับ ketoconazole และสารออกฤทธิ์ที่สร้างจากราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* โดยไอโซเลต Ffra B14 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร CzYA, MCzA และ MEA เกิดโซนยับยั้งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 21.25 ± 0.70 , 21.76 ± 0.58 และ 18.00 ± 1.96 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 3) และ Ffra B15 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร CzYA, MCzA, PDA และ YSA เกิดโซนยับยั้งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 15.66 ± 0.54 , 21.34 ± 0.34 , 11.65 ± 0.22 และ 21.16 ± 0.43 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 3)

ตารางที่ 2 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านจุลินทรีย์

Bioactivities	Numbers of Active Isolate	Ffra L Isolate	Ffra B Isolate
Anti-MRSA	1	Ffra L24	N/A
Anti- <i>E.coli</i>	1	Ffra L24	N/A
Anti- <i>C. albicans</i> including synergistic activity with ketoconazole (KTZ)	2	N/A	Ffra B14, Ffra B15

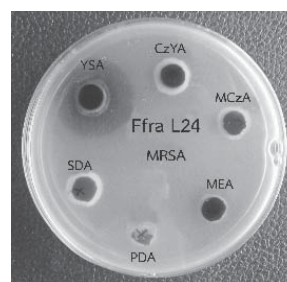
N/A not detectable



(a)



(b)



(c)

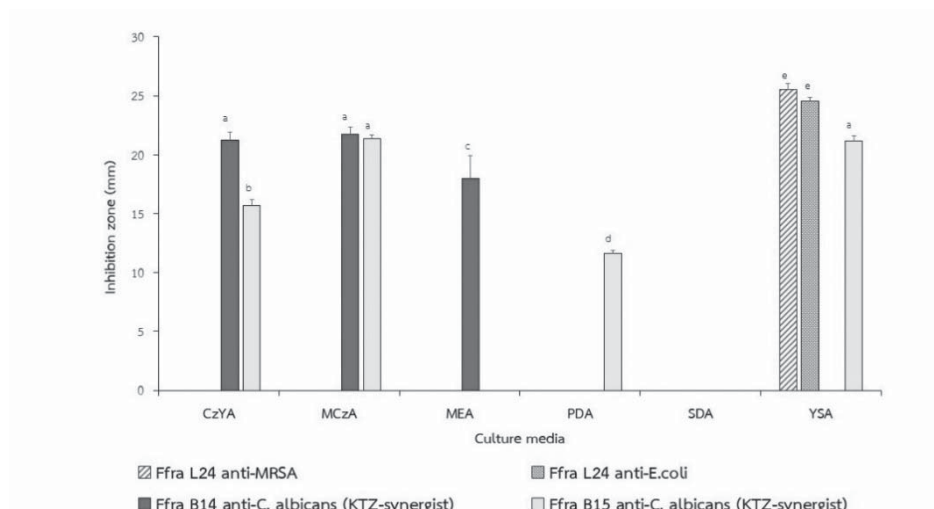
รูปที่ 3 โซนยับยั้งแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราของราเอนโดไฟต์ไอโซเลต (a) Ffra B14, (b) Ffra B15 และ (c) Ffra L24 ที่คัดแยกได้จากต้นกันเกรา และคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน (CzYa, MCZA, MEA, PDA, SDA และ YSA)

ตารางที่ 3 การยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ที่เลี้ยงบนอาหารชนิดต่าง ๆ

Antimicrobial Activities	Active Isolates	Diameter (mm±SD)					
		CzYA	MCZA	MEA	PDA	SDA	YSA
Anti-MRSA	Ffra B14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ffra B15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ffra L24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	25.55±0.46 ^b
Anti- <i>E. coli</i>	Ffra B14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ffra B15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ffra L24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	24.56±0.27 ^b
Anti- <i>C. albicans</i>	Ffra B14	21.25±0.70 ^a	21.76±0.58 ^a	18.00±1.96 ^b	0.00	0.00	0.00
	Ffra B15	15.66±0.54 ^a	21.34±0.34 ^b	0.00	11.65±0.22 ^c	0.00	21.16±0.43 ^b
	Ffra L24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

*Different letters indicate statistically significant different results ($p < 0.05$) in each activity of each endophytic fungus.

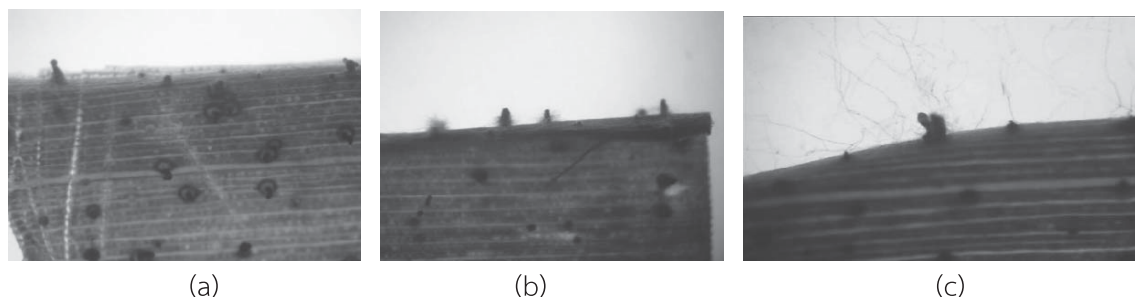
3. ผลของอาหารเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่บริสุทธิ์ในอาหารเพาะเชื้อต่าง ๆ 6 ชนิด เพื่อหาอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสมในการที่ราเอนโดไฟต์จะสร้างเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ พบว่า อาหารเพาะเชื้อที่มีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่า YSA เป็นอาหารเพาะเชื้อที่ทำให้ราเอนโดไฟต์สร้างเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้จำนวนมากที่สุดคือ 3 ไอโซเลต โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA, *E.coli*, และ *C. albicans* ส่วน SDA เป็นอาหารเพาะเชื้อที่ไม่เหมาะต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นกันเกรา และจากการวิจัยพบว่า ราเอนโดไฟต์ Ffra B14 สร้างสารที่เสริมฤทธิ์กับ ketoconazole ในการต้าน *C. albicans* ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร CzYA และ MCZA ส่วน Ffra B15 ออกฤทธิ์ในการต้าน *C. albicans* ได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MCZA และ YSA ตามลำดับ



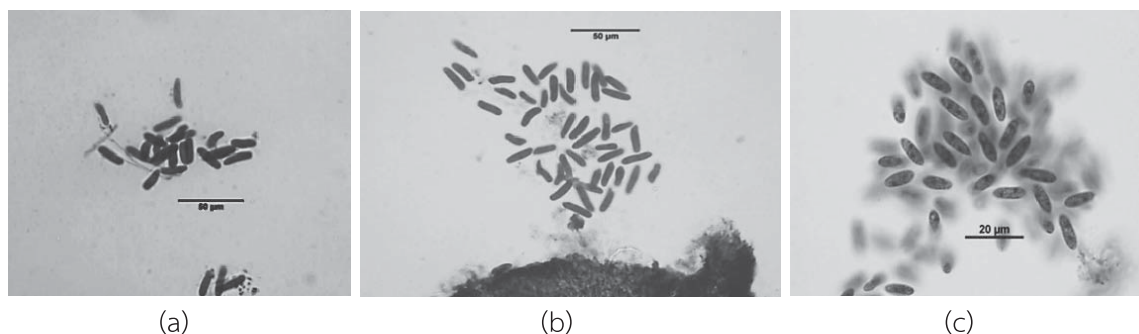
รูปที่ 4 เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร) แสดงผลของอาหารเพาะเชื้อต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ ราเอนโดไฟต์ (CzYA, MCZA, MEA, PDA, SDA และ YSA)

(Different letters indicate statistically significant different results ($p < 0.05$) in each activity of each endophytic fungus)

4. การจำแนกฐานฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ จากการคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ได้แก่ Ffra B14, Ffra B15 และ Ffra L24 เมื่อนำราเอนโดไฟต์ที่ได้มาเพาะบน water agar ที่มีใบตองราสามารถสร้าง pycnidia บนใบตองได้ ดังแสดงในรูปที่ 5 (a-c) ตามลำดับ แสดงว่า ราทั้งสามไอโซเลตนี้เป็นราในกลุ่ม Coelomycetes⁽³²⁾ และเมื่อนำ pycnidium มากดูให้แตกบนสไลด์ และดูลักษณะ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า conidia ของรา Ffra B14 (รูปที่ 6a) และ Ffra B15 (รูปที่ 6b) คล้ายคลึงกัน อาจเป็นราชนิดเดียวกัน ส่วน Ffra L24 (รูปที่ 6c) มีลักษณะ conidia แตกต่างจาก Ffra B14 และ Ffra B15 แสดงว่า เป็นราต่างชนิดกัน ทั้งนี้ต้องทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางโมเลกุลต่อไป เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของราเอนโดไฟต์



รูปที่ 5 Pycnidia ของราเอนโดไฟต์ (a) Ffra B14, (b) Ffra B15 และ (c) Ffra L24 บนใบตองที่วางบน water agar



รูปที่ 6 Conidia ของราเอนโดไฟต์ (a) Ffra B14, (b) Ffra B15 และ (c) Ffra L24 ที่ย้อมด้วย lactophenol cotton blue ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X



อภิปรายผลการวิจัย

การแยกราเอนโดไฟต์จากต้นกันเกราได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต แสดงให้เห็นว่า ในต้นกันเกรามีราเอนโดไฟต์ที่หลากหลาย เมื่อนำราทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเชื้อที่แตกต่างกัน 6 ชนิด และนำมาตรวจกรองฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์พบว่า มีราเอนโดไฟต์ที่มีศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์ จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ Ffra B14, Ffra B15 และ Ffra L24 โดยราเอนโดไฟต์ 1 ไอโซเลตมีฤทธิ์ต้าน MRSA และ *E. coli* คือ Ffra L24 และราเอนโดไฟต์ 2 ไอโซเลตมีฤทธิ์เสริมกับ ketoconazole ในการต้าน *C. albicans* คือ Ffra B14 และ Ffra B15 และสามารถต้านแบคทีเรียและราได้โดยมีขนาดโซนในสีกว้าง แสดงว่า ราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้สามารถสร้างเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และยังสามารถเสริมฤทธิ์กับ ketoconazole ในการต้านเชื้อ *C. albicans* ซึ่งจากงานวิจัยที่มีการศึกษาและวิเคราะห์สารสำคัญจากส่วนต่าง ๆ ของต้นกันเกรา พบว่า เปลือกและใบกันเกรามีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ secoiridoid glycoside, pinosresinol, diterpene เป็นต้น^(17, 21) และจากรายงานวิจัยของ Siler et al. พบว่า สารในกลุ่ม secoiridoid glycoside มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราหลายชนิด⁽³³⁾ เป็นไปได้ที่ ราเอนโดไฟต์อาจสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่เหมือนกับพืชเจ้าบ้าน⁽³⁴⁾ ทั้งนี้เพื่อให้ทราบชนิดของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากราเอนโดไฟต์ควรนำเมตาบอไลต์ไปศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเคมีขั้นสูง และจากการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า ราเอนโดไฟต์เป็นอีกหนึ่งแหล่งธรรมชาติที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาหาสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หรือเชื้อดื้อยา ได้แก่ MRSA, *E. coli* และ *C. albicans* เนื่องจากเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบได้ในร่างกายมนุษย์ และที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านโรคติดเชื้อทางผิวหนังและระบบทางเดินอาหาร

การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์ของราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 6 ชนิด พบว่า อาหารเพาะเชื้อมีผลต่อการสร้างเมตาบอไลต์ทุติยภูมิของราเอนโดไฟต์ (รูปที่ 4) เช่นเดียวกับที่มีการรายงานก่อนหน้านี้^(5, 13, 27) อาหารเพาะเชื้อที่มีผลให้ราสร้างสารออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดคือ YSA, CzYA และ MCZA มีรายงานว่า อาหารทั้งสามชนิดนี้เป็นอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราให้สร้างเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ⁽³⁵⁾ การจัดจำแนกราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านจุลินทรีย์ โดยดูสัญญาณวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X พบว่า ราเอนโดไฟต์ Ffra B14, Ffra B15 และ Ffra L24 สร้าง conidia ใน fruiting body และสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) จึงจัดอยู่ในกลุ่ม Coelomycetes⁽³⁶⁻³⁸⁾ ซึ่งสอดคล้องกับ Wijayawardene et al. ได้จัดรากลุ่ม Coelomycetes เป็นกลุ่มราเทียม (artificial fungi) สามารถสร้าง conidia ภายใน cavity ได้ ราในกลุ่มนี้อาจมีอยู่หลากหลายสายพันธุ์หรือหลายสปีชีส์ (species) ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งเอนโดไฟต์ เชื้อก่อโรค หรือผู้ย่อยสลาย⁽³⁰⁾ และพบว่า Ffra B14 และ Ffra B15 มีลักษณะโคโลนีและสัญญาณวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์คล้ายคลึงกัน อาจเป็นเชื้อราชนิดเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร 6 ชนิด ให้ผลที่ต่างกัน (รูปที่ 2a และ 2b) จึงอาจเป็นราต่างสายพันธุ์กัน ดังนั้นเพื่อให้สามารถแยกสายพันธุ์ของราได้ อาจทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโมเลกุลของราทั้งสามชนิดนี้เพิ่มเติม โดยใช้วิธีการหาลำดับ DNA บริเวณ ITS1 ITS2 และ 5.8S ของยีน rRNA และดูลักษณะสัญญาณวิทยาโดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ร่วมด้วยจึงจะสามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ของราเอนโดไฟต์ได้

สรุปผลการวิจัย

ต้นกันเกราเป็นพืชสมุนไพรที่เป็นแหล่งที่ดีของการแยกราเอนโดไฟต์ มีราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้ 24 ไอโซเลต ซึ่งในจำพวกนี้ มีราที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จำนวน 3 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 12.5 ของไอโซเลตที่คัดแยกได้ทั้งหมด โดยมีราเอนโดไฟต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย MRSA และ *E. coli* ได้แก่ Ffra L24 และราเอนโดไฟต์ที่สร้างสารออกฤทธิ์เสริมกับ ketoconazole ในการต้าน *C. albicans* ได้แก่ Ffra B14 และ Ffra B15 อาหารเพาะเชื้อมีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ของราเอนโดไฟต์ โดยพบว่าอาหารเพาะเชื้อ YSA, CzYA และ MCZA เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ให้สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และการจัดจำแนกรา



ทั้งสามไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงบน water agar ที่มีใบตอง พบว่า ราเหล่านี้เป็นราในกลุ่ม Coelomycetes เนื่องจากพบลักษณะที่สำคัญคือ สามารถสร้าง conidia ได้ใน fruit body และสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ และเมื่อสังเกตลักษณะของโคโคนีและสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อาจกล่าวได้ว่า Ffra B14 และ Ffra B15 อาจเป็นราชนิดเดียวกันเนื่องจากมีลักษณะของ conidia ที่คล้ายคลึงกัน และแตกต่างกันจากราเอนโดไฟต์ Ffra L24

ข้อเสนอแนะ

ราเอนโดไฟต์ Ffra B14, Ffra B15 และ Ffra L24 เป็นราที่มีความสามารถในการฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดี จึงควรนำมาเพาะเลี้ยงในปริมาณมาก เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางโมเลกุลต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451(7181):990-3.
2. Bloom DE, Cadarette D. Infectious disease threats in the twenty-first century: strengthening the global response. *Front Immunol*. 2019;10(549):1-12.
3. Tan RX, Zou WX. Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*. 2001;18(4):448-59.
4. Vandamme EJ. The search for novel microbial fine chemicals, agrochemicals and biopharmaceuticals. *J Biotechnol*. 1994;37(2):89-108.
5. Phitchanuwat P, Wiyakrutta S, Triboun P, Pharadai K, Mondranondra I, Rangkaew N, et al. Anti-MRSA and anti-*candida albicans* activity of endophytic fungi isolated from *Desmodium gangeticum* (L.) DC. and *Ruellia kerrii* Craib. *Proceeding of The 39th Congress on Science and Technology of Thailand* (full paper). Bangkok, October 21-23, 2013.
6. Insain P. Bioactive compounds from endophytic fungi. *EAU Heritage J Science and Technology*. 2017;11(2):26-39.
7. Garyali S, Kumar A, Reddy MS. Taxol production by an endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from Himalayan yew. *J Microbiol Biotechnol*. 2013;23(10):1372-80.
8. Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microb Infect*. 2003;5(6):535-44.
9. de Barros BS, da Silva JP, de Souza Ferro JN, Agra IKR, de Almeida Brito F, Albuquerque ED, et al. Methanol extract from mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia* sp. induces antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. *J Nat Med*. 2011;65(3-4):526-31.
10. Bacon CW, White JF. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In Bacon CW, White JF. *Microbial endophytes*. 1 eds. New York: Marcel Dekker Inc., CRC Press. 2000. pp. 251-76.
11. Borges WS, Borges KB, Bonato PS, Said S, Pupo MT. Endophytic fungi: Natural products, enzymes and biotransformation. *Curr Org Chem*. 2009;13:1137-63.



12. Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves. In Andrews JH, Hirano S. (eds). Microbial ecology of leaves. New York: Springer-Verlag. 1991. pp.179-97.
13. Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Panphut W, Thongon N, Danwisetkanjana K, Reungrungsi N, et al. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. World J Micro Biot. 2004; 20(3):265-72.
14. The Plant List. 2013 version 1.1. [Internet] [cited 2020 April 27]. Available from: <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January)
15. Griffin O, Parnell J. Loganiaceae. In Flora of Thailand 1997; 6(3): 198-199. [Internet] Concise encyclopedia of plants in Thailand [cited 2019 April 15]. Available from: <http://www.dnp.go.th/botany/detail.aspx?wordsLinkno=664&words=%E0%B8%81%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B9%80%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%B2&typeword=word>
16. Singh A. Phytochemicals of Gentianaceae: A review of pharmacological properties. Int J Pharm Sci Nanotechnol. 2008;1(1):33-6.
17. Jonville MC, Capel M, Frédérich M, Angenot L, Dive G, Faure R, et al. Fagraldehyde, a secoiridoid isolated from *Fagraea fragrans*. J Nat Prod. 2008;71(12):2038-40.
18. Bangprapai A, Thongphasuk P, Songsak T. Determination of swertiamarin content by TLC-densitometer in *Fagraea fragrans* Roxb. leaves. BHST. 2016;14(2):13-8.
19. Wan AS, Chow YL. Alkaloids of *Fagraea fragrans* Roxb. J Pharm Pharmacol. 1964;16(7):484-6.
20. Kaikaew K, Mahabusarakam W. Furofuran lignans from the stem bark of *Fagraea fragrans* Roxb. Proceedings of the 7th IMT-GT UNINET and the 3rd International PSU-UNS Conferences on Bioscience, Songkla, October 2010.
21. Pripdeevech P, Saansoomchai J. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil and various extracts of *Fagraea fragrans* Roxb. flowers. Chiang Mai J Sci. 2013;40(2):214-23.
22. Jonville M, Baghdikian B, Ollivier E, Angenot L, Frederich M, Legault J. Anti-inflammatory potency of the traditionally used antimalarial plant *Fagraea fragrans*. Planta Med. 2016;76(12):WSI_6.
23. Apisantiyakom S. Isolation and identification of bioactive chemical constituents of the roots of *Bauhinia saccocalyx* Pierre and *Fagraea fragrans* Roxb. Doctor of Philosophy in Chemistry [Thesis] Nakhon Ratchasima: Suranaree University of Technology, 2014.
24. Apisantiyakom S. Isolation and identification of bioactive chemical constituents of the roots bark of *Fagraea fragrans* Roxb. Journal of Science Ladkrabang. 2013; 22(2):68-83.
25. Madmanang S, Chakthong S. Chemical constituents from the stem bark of *Fagraea fragrans* Roxb. Proceeding of The 5th International Conference on Natural Product for Health and Beauty (NATPRO 5), Hat Yai, Songkhla: Prince of Songkla University, May 6-8, 2014;40-5.



26. Madmanang S, Cheyeng N, Heembenmad S, Mahabusarakam W, Saising J, Seeger M, et al. Constituents of *Fagraea fragrans* with antimycobacterial activity in combination with erythromycin. J Nat Prod. 2016;79(4):767-74.
27. Chomcheon P, Sriubolmas N, Wiyakrutta S, Ngamrojanavanich N, Chaichit N, Mahidol C, , et al. Cyclopentenones, scaffolds for organic syntheses produced by the endophytic fungus *mitosporic dothideomycete* sp. LRUB20. J Nat Prod. 2006;69(9):1351-3.
28. Reissinger A, Vilich V, Sikora RA. Detection of fungi in planta: Effectiveness of surface sterilization methods. Mycol Res. 2001;105(5):563-6.
29. Paterson RRM and Bridge PD. Biochemical techniques for filamentous fungi. Oxon, UK: CAB International; 1994.
30. Chomcheon P, Wiyakrutta S, Aree T, Sriubolmas N, Ngamrojanavanich N, Mahidol C, et al. Curvularides A-E: antifungal hybrid peptide-polyketides from the endophytic fungus *Curvularia geniculata*. Chem Eur. 2010;16(36):11178-85.
31. Adwan GM, Salameh Y, Adwan K. Susceptibility of *Candida albicans* isolates to terbinafine and ketoconazole. IUG J Natural Studies. 2016;20(2):45-53.
32. Wijayawardene NN, Hyde KD, Wanasinghe DN, Papizadeh M, Goonasekara ID, Camporesi E, et al. Taxonomy and phylogeny of dematiaceous coelomycetes. Fungal divers. 2016;77(1):1-316.
33. Šiler B, Mišić D, Nestorović J, Banjanac T, Glamočlija J, Soković M, et al. Antibacterial and antifungal screening of *Centaurium pulchellum* crude extracts and main secoiridoid compounds. Nat Prod Commun. 2010;5(10):1525-30.
34. Schulz B, Römmert AK, Dammann U, Aust HJ, Strack D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. Mycol Res 1999;103(10):1275-83.
35. Sriubolmas N, Tung A, Sawatchupong R, Ruangrunsi N, Wiyakrutta S. Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from selected Thai medicinal plants. p. 228-237. In Hedreyda CT, Zabat MEA (eds.). Proceeding of the 4th Asia-Pacific Biotechnology Congress & 30th Annual Philippine Society for Microbiology, Convention, Cebu City, Philippines, May 2001, 16-18.
36. Bernadovičová S, Ivanová H. Hyphomycetes and Coelomycetes fungi isolated from affected leaves and twigs of cherry laurel trees. Folia Oecologica. 2011;38(2):137-45.
37. Cano J, Guarro J, Gené J. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. J Clin Microbiol. 2004;42(6):2450-4.
38. Sutton BC. The Coelomycetes. Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute; 1980.