# ผลของสารสกัดหยาบจากไลเคนบางชนิดต่อการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราก่อโรคจุดสนิมของกล้วยไม้หวายตัดดอกในประเทศไทย

# *In Vitro* Effect of Some Lichen Extract to Inhibit Growth of Rusty Spot Plant Pathogenic Fungus of *Dendrobium* Cutting Flowers in Thailand

**พชร มงคลสุข[1] วสันต์ เพิงสูงเนิน[1] กวินนาถ บัวเรือง[1] และ ผ่องพรรณ ศิริพงษ์[2]**

**Pachara Mongkolsuk[1], Vasun Poengsungnoen[1], Kawinnat Buaruang[1] and Pongpun Srisipong[2]**

[1]หน่วยวิจัยไลเคน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง หัวหมาก บางกะปิ กรุงเทพฯ 10240

[2]หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10400

[1]Lichen research unit, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Hua Mark, Bang Kapi, Bangkok 10240

[2]Natural products research section, National cancer institute, Bangkok 10400

E-mail address: pm-tamrapap@ru.ac.th

## บทคัดย่อ

เป้าหมายหลักของการศึกษาเรื่องนี้เพื่อประเมินสารสกัดหยาบของไลเคน 16 ตัวอย่าง ด้วยการสกัดจากคลอโรฟอร์มและเมทานอลของไลเคน 8 ชนิด โดยสารทดสอบยับยั้งรา *Curvularia eragrostidis* สาเหตุก่อโรคจุดสนิมบนกล้วยไม้หวายตัดดอก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เปรียบเทียบกับค่า $EC_{50}$ ของยาฆ่าราCAPTAN 50 WP. ผลปรากฏว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มของไลเคน *Cladonia homchantarae* และ *Usnea baileyi* ให้เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเติบโตของโคโลนีเส้นใยราก่อโรคที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm และแสดงค่า $EC_{50}$ ต่อต้านราก่อโรคที่ความเข้มข้น 29.33 และ 77.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

*คำหลัก: ไลเคน, สารสกัดหยาบ, ยับยั้ง, $EC_{50}$, ราก่อโรคจุดสนิม*

## ABSTRACT

The main objective of this investigation is to evaluate of sixteen lichen crude extracts of chloroform and methanol extraction from eight lichen species. They performed to inhibit fungus mycelial growth, *Curvularia eragrostidis* rusty spot disease on flower of *Dendrobium* cutting flower, in the PDA medium, comparing to the $EC_{50}$ value of CAPTAN 50 WP. fungicide. It was manifested that chloroform crude extract of *Cladonia homchantarae* and *Usnea baileyi* gave the percentage of colony inhibition of fungus causal agent at 50 and 100 ppm concentration and distinguish shown the $EC_{50}$ value against rusty spot fungus at 29.33 and 77.28 µg/ml concentration respectively.

*Keywords: lichen, crude extract, inhibition, $EC_{50}$, rusty spot fungus.*

## คำนำ

ราก่อโรคจุดสนิม *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer. ของกล้วยไม้หวายตัดดอกในประเทศไทย ระบาดทำความเสียหายกับกล้วยไม้ลูกผสมที่มีสายพันธุ์มาจากกล้วยไม้หวาย มาดาม ปอมปาดัวร์ (*Dendrobium* Madam Pompadour) และพันธุ์ลูกผสมอื่นอย่างรุนแรง โดยราก่อโรคเข้าทำลายดอกกล้วยไม้ให้เสียหายภายใน 8-24 ชั่วโมง อาการของโรคจะรุนแรงมากเมื่อความชื้นในอากาศสูง โดยเฉพาะช่วงฤดูฝนและต้นฤดูหนาวประมาณเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม (นิยมรัฐ, 2544, พิบูลย์, 2549) ผลกระทบจากการระบาดของราก่อโรคจุดสนิมบนกลีบดอกกล้วยไม้สายพันธุ์ชมพูถึงสีแดง จะแสดงอาการแผลจุดเซลล์ตายสีส้มถึงน้ำตาลแดงคล้ายสีสนิม และพบจุดแผลสีเทาถึงสีน้ำตาลเทาบนกล้วยไม้หวายตัดดอกสายพันธุ์ดอกสีขาว (*Figure* 1) (พิบูลย์, 2549) จุดสนิมหรือจุดแผลสีเทาอาจขยายตัวกว้างและรวมกับแผลข้างเคียง เกิดลักษณะแผลเซลล์ตายเป็นกลุ่ม ทำให้ราคาซื้อขายและคุณภาพของช่อดอกเสียไป ไม่สามารถส่งช่อดอกกล้วยไม้ไปขายแข่งขันกับตลาดภายนอกประเทศ ผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้จึงมีรายได้ลดลง และการฉีดพ่นยาฆ่ารากระทำได้ยาก เนื่องจากยาฆ่ารามีประสิทธิภาพการยับยั้งการก่อโรคมีผลต่อการเคลือบสีดอกกล้วยไม้ให้ปนเปื้อนแตกต่างไปจากธรรมชาติเป็นที่ไม่ต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศ และยาฆ่าราที่ใช้ทั่วไปเป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่สลายตัวได้น้อยก่อปัญหาต่อระบบนิเวศน์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการค้นหาสารธรรมชาติของไลเคนที่ออกทฤธิ์ยับยั้งการเติบโตของเส้นใยราก่อโรคจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้หวายตัดดอกจึงเป็นเรื่องที่ควรศึกษา และนำสู่การพิเคราะห์ความเป็นไปได้ในการที่จะพัฒนาประยุกต์ใช้ควบคุมราก่อโรคสนิมของกล้วยไม้และราสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นต่อไป

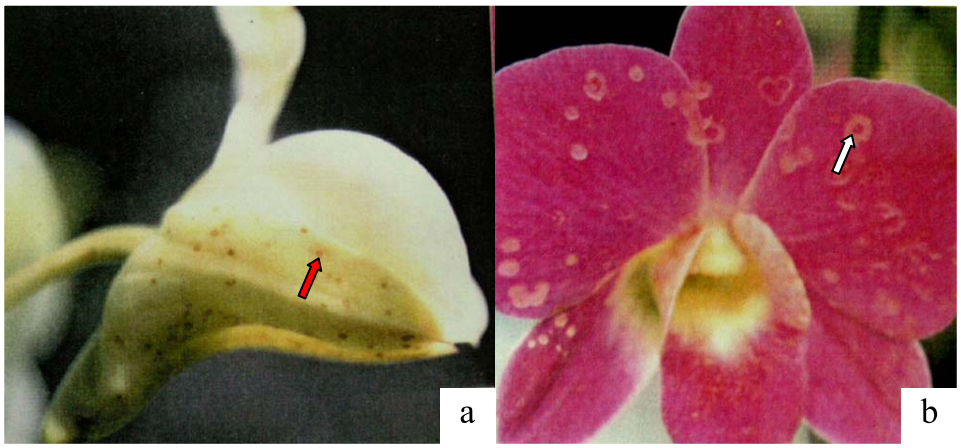



*Figure* 1 Rusty spot symptom on (a) *Dendrobium* Water Ormea x *Dendrobium phalaenopsis,* (b) *Dendrobium* Diamon.

สารธรรมชาติของไลเคนนอกจากใช้บ่งบอกถึงชนิดไลเคนด้านอนุกรมวิธานแล้ว ยังสามารถใช้เป็นสารปฏิชีวนะยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียกรัมบวก (Vartia, 1973) และกรัมลบบางชนิด (Rowe, *et al.*1989) ต่อต้านการกัดกินพืชผัก (antiherbivore) จากหอยทาก *Pallifera varia* (Lawrey, 1980, 1983) หนอนอาร์มีเวิร์มสีเหลือง *Spodoptera ornithogalli* (Slansky, 1979) และด้วง *Lasioderma serricorne* (Nimis & Sker, 2006) ต่อต้านการเติบโตของพืชชนิดต่าง ๆ (allelopathy) เช่นต้นกล้าของสน และพืชตระกูลหญ้า (Hawksworth & Hill, 1984) มอส เฟิร์น ลิเวอร์เวิร์ต (liverwort) ไลเคน และราบางชนิด (Lawrey, 1986) Burslaff (1950) เป็นคนแรกที่รายงานถึงสารสกัดหยาบจากไลเคน *Parmelia molliusculia* ที่สกัดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์มีทฤธิ์ยับยั้งการเติบโตของรา *Penicillium* และ *Rhizopus* สารสกัดจากไลเคนหลายชนิด เช่น *Nephroma arcticum* สามารถสกัดได้ด้วยน้ำและมีทฤธิ์ต่อต้านทำลายราได้อย่างกว้างขวาง (Land & Lundstrom, 1998) รวมถึงราที่ทำให้เนื้อไม้ผุกร่อน (Henningsson & Lundstrom, 1970, Lundstrom & Henningsson, 1973) Hawksworth และ Hill (1984) ยืนยันว่าท่อนไม้ซึ่งมีจำนวนของไลเคนเจริญบนแผ่นผิวหนาแน่นสามารถคงทนต่อการทำลายของราก่อเหตุผุกร่อนได้ดี Shahi และคณะ (2001) สกัดสารจากไลเคน *Heterodermia leucomela* ด้วยน้ำ และนำไปทดสอบระงับการงอกของสปอร์ราก่อโรคพืช และราก่อโรคผิวหนังในมนุษย์ ให้ผลยับยั้งการงอกของราดังกล่าว คำนวณได้เปอร์เซ็นต์สูงเป็นที่น่าสนใจ เช่นเดียวกับ Halama และ Haluwin (2004) ที่นำไลเคน *Evernia prunastri* และ *Cladonia portentosa* สกัดด้วยสารอะซีโตน (acetone) และนำไปทดสอบยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ 8 ชนิด ในสภาพห้องทดลอง พบว่าสารสกัดจาก *E. prunastri* และ *H. physodes* สามารถระงับการเติบโตของเส้นใยรา *Pythium ultimum* สาเหตุโรคเน่าคอดินของพืชผัก *Ustilago maydis* สาเหตุโรคเขม่าดำของข้าวโพด และ *Phytophthora infestans* สาเหตุโรคใบไหม้ของมันฝรั่งได้ดีเป็นเปอร์เซ็นต์สูง เช่นเดียวกับการใช้สารบริสุทธิ์ของกรด evernic และ (-) usnic Hongsachart และคณะ (2006) รายงานถึงการทดสอบสารสกัดจากไลเคน *Canoparmelia owariensis* ที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์บริสุทธิ์มีทฤธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช 6 ชนิด และราก่อโรคจุดสนิมของดอกกล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกในห้องทดลองให้ค่า $EC_{50}$ ค่อนข้างต่ำ และในทำนองเดียวกัน Mongkolsuk และคณะ (2009) รายงานถึงการใช้สารสกัดจากไลเคนเขตร้อน 23 ชนิด ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอลทดสอบยับยั้งราก่อโรคพืชสำคัญ 4 ชนิด พบสารสกัดจากไลเคน *Usnea baileyi* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มให้ผลยับยั้งราดีที่สุด

## อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากไลเคน (Lichen crude extraction)

ตัวอย่างไลเคนจากอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก ที่ผ่านการตรวจสอบชนิดที่ถูกต้อง 8 ชนิด คือ *Cladonia recticaulis* Ahti & Parnmen, sp. nov., *Cladonia homchantarae* Ahti & Parnmen, sp. nov., *Heterodermia lepidota* Swinscow & Krong, *Parmotrema maclayanum* (Müll. Arg.) Hale, *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale, *Pyxine coralligera* Malme, *Ramboldia russula* (Ach.) Kalb, Lumbsch. & Elix. Comb. nov. และ *Usnea baileyi* (Stricton) Zahlbr. ทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก และหั่นเป็นชิ้นเล็กขนาด 3x2 มิลลิเมตร สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ คลอโรฟอร์ม ด้วยวิธีการหมัก (maceration) และเขย่าบนเครื่องเขย่าในแนวระนาบเพื่อเพิ่มการสกัดให้ดีขึ้น 48 ชั่วโมง กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองวอตแมนเบอร์ 1 (Whatman No. 1) นำกากผงไลเคนที่แยกออกมาสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์มจนกว่าสารละลายใสไม่มีสี นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดรวมกัน และระเหยภายใต้ความดันต่ำ (Rotary evaporator, Buchi) ผงที่เหลือจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม นำมาสกัดต่อด้วยสารเมทานอล โดยใช้วิธีเดียวกับสารสกัดด้วยสารคลอโรฟอร์ม สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอลเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น เพื่อให้ตัวทำละลายที่ยังหลงเหลืออยู่ระเหยออกให้หมด และถ้าสารดังกล่าวมีน้ำเจือปนจะทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่อง freeze dryer เมื่อสารสกัดแห้งดีแล้ว ชั่งน้ำหนักหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัด (% yield) ต่อไป วิธีการทั้งหมดปฏิบัติในห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยไลเคน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข เขตพญาไท

2. ทดสอบการออกฤทธิ์ (Toxicity test) ของสารสกัดหยาบต่อราก่อโรคจุดสนิมของดอกกล้วยไม้

ชั่งสารสกัดหยาบของไลเคนที่สกัดได้จากคลอโรฟอร์มหรือเมทานอล ละลายด้วย 0.2 เปอร์เซ็นต์ DMSO (dimethyl sulfoxide) ทำเป็นสารละลายตั้งต้น (stock solution) ที่ 1000 และ 500 ppm ในขวดแก้วทดสอบรูปคณโฑ (flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส pH 5.6 โดยประยุกต์จากวิธีการของ Song และคณะ (2004) และทำการเจือจางตามลำดับขั้น (aseptically serial dilution) ลงในขวดแก้วทดสอบรูปคณโฑขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส pH 5.6 ให้ได้ 100, 50 และ 10 ppm ตามลำดับ สารผสมแต่ละความเข้มข้น 1000, 500, 100, 50 และ 10 ppm เทลงในจานเพาะเชื้อราประมาณ 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยมีอาหาร PDA ผสมยาฆ่ารา CAPTAN 50 WP. (cis-N[(trichloromethyl)thio]-4-cyclohexene-1, 2 dicarboximide) ที่ความเข้มข้น 1000, 500, 100, 50 และ 10 ppm PDA และ PDA ผสม 0.2 เปอร์เซ็นต์ DMSO ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ เป็นสิ่งเปรียบเทียบ ปลูกเชื้อรา *C. eragrostidis* สายพันธุ์ที่ก่อโรคได้รุนแรง (DBB.7) อายุ 5 วัน ลงในสารผสมต่าง ๆ และวัดค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเติบโตของเส้นใย ตามวิธีของ Pandy และคณะ (1982) ซึ่งได้จากสูตร

$$PGI = \frac{DC - Dt}{DC} \times 100$$

PGI = เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตของโคโลนีเชื้อรา

DC = เส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยราที่เติบโตบนอาหาร PDA

Dt = เส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยราที่เติบโตบนอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบของไลเคน

และวัดค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง ($EC_{50}$) เส้นใยราด้วยการใช้ค่า Probit analysis ตามวิธีการของ Finney (1978)

## ผลและวิจารณ์

1. เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบ (Yield percentage)

จากไลเคน 8 ชนิดที่พบเสมอในเขตอุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก นำมาสกัดด้วยสารสกัดคลอโรฟอร์ม และเมทานอลได้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบแตกต่างกัน โดยไลเคน *H. lepidota P. maclayanum* และ *R. russula* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มให้เปอร์เซ็นต์สกัดหยาบ 20.69, 15.27 และ 11.04 ตามลำดับ ขณะที่ *P. tinctorum* ที่สกัดด้วยเมทานอลให้เปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบ 10.81 (Table 1) แสดงให้เห็นว่าไลเคน *H. lepidota, P. maclayanum* และ *R. russula* มีสารเคมีชนิดไม่มีขั้ว (non-porlar) เป็นองค์ประกอบมากกว่าสารเคมีชนิดมีขั้ว (polar) ขณะที่ *P. tinctorum* มีส่วนประกอบของสารเคมีมีขั้วมากกว่าสารเคมีไม่มีขั้ว และค่าเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบเป็นค่าที่บอกถึงความเป็นไปได้ในการนำสารเคมีนั้น ๆ มาใช้ทดลองทางการแพทย์หรือการเกษตรต่อไปในอนาคต (Huneck & Yochimura, 1996)

2. ทดสอบการออกทฤธิ์ (Toxicity test)

เมื่อนำสารสกัดทั้งหมดที่ได้ทดสอบทฤธิ์ต้านการเติบโตของเส้นใยราก่อโรคจุดสนิมของกล้วยไม้หวายตัดดอก *C. eragrostidis* พบสารสกัดหยาบจากไลเคน *C. homchantarae* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และเมทานอลออกทฤธิ์ยับยั้งการเติบโตของเส้นใยราได้ดี ตั้งแต่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm ตามลำดับ (Table 2) และวิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพของความเข้มข้นระงับการเติบโตของเส้นใยราที่ความน่าจะเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ($EC_{50}$) ตามวิธีของ Finney (1978) โดยคำนวณจากค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear relation) ระหว่างความน่าจะเป็นของการยับยั้ง (inhibitory probit) กับค่าล็อกความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเติบโตของเส้นใยรา (concentration logarithm) สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอลให้ค่า $EC_{50}$ มีค่า 29.33 และ 106.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 3) ซึ่งใกล้เคียงกับค่า $EC_{50}$ ของยาฆ่าราCAPTAN 50 WP. ที่ออกทฤธิ์ยับยั้งการเติบโตของเส้นใยราก่อโรคจุดสนิมบนกล้วยไม้หวายตัดดอกที่ 22.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า *C. homchantarae* สร้างทั้งสารเคมีมีขั้วและไม่มีขั้วทำหน้าที่ต่อต้านการเติบโต

ของเส้นใยรา รองลงมาคือสารสกัดจาก *U. baileyi* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มออกทฤธิ์ยับยั้งเส้นใยราก่อโรคจุดสนิมของกล้วยไม้หวายตัดดอกตั้งแต่ความเข้มข้น 100 ppm และให้ค่า $EC_{50}$ 77.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจาก *C. homchantarae* และ *U. baileyi* สร้างกรดดิดายมิค (didymic acid) และ อูสนิค (usnic acid) (*Figure* 2) เป็นสารหลัก ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดจัดอยู่ในกลุ่มไดเบนโซฟูแรน (dibenzofuran) ที่มีสูตรโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกัน (derivative) ออกทฤธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและราได้ดี (Proksa *et al*. 1996) (*Figure* 3) สำหรับสารสกัดจาก *P. maclayanum* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มออกทฤธิ์ต่อต้านราก่อโรคจุดสนิมของกล้วยไม้หวายตัดดอกได้ดีที่ 1000 ppm โดยให้เปอร์เซ็นต์ระงับการเติบโตเส้นใยรา 65.33 เปอร์เซ็นต์ แต่สารที่สกัดจาก *P. tinctorum* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และเมทานอลต่อต้านการเติบโตของเส้นใยราก่อโรคจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้หวายตัดดอกได้ดีที่ 1000 ppm ขึ้นไป โดยสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มออกทฤธิ์ยับยั้งเส้นใยราก่อโรคจุดสนิม 55.7 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดหยาบจากเมทานอลออกทฤธิ์ยับยั้งการเติบโตของราที่ 64.4 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลจากไลเคน *H. lepidota* ออกทฤธิ์ยับยั้งราก่อโรคจุดสนิมที่ 1000 ppm 60 เปอร์เซ็นต์ แต่สารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มออกทฤธิ์ยับยั้งเส้นใยราก่อโรคจุดสนิม

Table 1 Weight and yield percentage of 8 lichen crude extracts from Chloroform ($CHCl_3$) and Methanol (MeOH) extraction

| Lichen species | dry weight (g) | extraction method | crude weight (g) | % yield |
|---|---|---|---|---|
| *Cladonia homchantarae* | 65.5 | $CHCl_3$ | 1.94 | 2.96 |
| | | MeOH | 1.26 | 1.93 |
| *Cladonia recticaulis* | 1336.9 | $CHCl_3$ | 9.58 | 0.72 |
| | | MeOH | 40.18 | 3.01 |
| *Heterodermia lepidota* | 203.3 | $CHCl_3$ | 42.07 | 20.69 |
| | | MeOH | 15.00 | 7.38 |
| *Parmotrema maclayanum* | 250.0 | $CHCl_3$ | 38.17 | 15.27 |
| | | MeOH | 12.40 | 4.96 |
| *Parmotrema tinctorum* | 600.0 | $CHCl_3$ | 7.28 | 1.21 |
| | | MeOH | 64.88 | 10.81 |
| *Pyxine coralligera* | 245.0 | $CHCl_3$ | 13.92 | 5.68 |
| | | MeOH | 4.87 | 1.99 |
| *Ramboldia russula* | 210.2 | $CHCl_3$ | 23.21 | 11.04 |
| | | MeOH | 11.57 | 5.50 |
| *Usnea baileyi* | 6.7 | $CHCl_3$ | 0.33 | 4.94 |
| | | MeOH | 0.40 | 6.05 |

$CHCl_3$ = Chloroform, MeOH = Methanol

Table 2 Effect of lichen extracts from 8 species on the mycelial growth and percentage of inhibition of *Curvularia eragrostidis* at 5 days, 25 ˚C

| Extracts from lichen species | Method of extraction | Mean colony diameter (cm) and percentage of inhibition (in parentheses) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1000 | 500 | 100 | 50 | 10 |
| *Cladonia homchantarae* | $CHCl_3$ | Nd | 2.65 | 2.8 | 3.4 | 5.7 |
| | | (nd) | (70.56) | (68.89) | (62.67) | (36.23) |
| | MeOH | 2.3 | 2.5 | 4.1 | 5.4 | 7.5 |
| | | (74.4) | (72.2) | (54.4) | (40.0) | (16.67) |
| *Cladonia recticaulis* | CHCl3 | 6.16 | 6.6 | 7.3 | 7.9 | 8.1 |
| | | (31.56) | (26.67) | (18.44) | (11.56) | (9.11) |
| | MeOH | 8.14 | 8.2 | 9.0 | 9.0 | 9.0 |
| | | (9.55) | (8.8) | (0) | (0) | (0) |
| *Heterodermia lepidota* | $CHCl_3$ | 5.6 | 5.7 | 8.2 | 8.4 | 9.0 |
| | | (37.7) | (36.0) | (8.6) | (6.2) | (0) |
| | MeOH | 3.6 | 5.0 | 7.5 | 7.5 | 9.0 |
| | | (60.0) | (44.4) | (16.6) | (16.6) | (0) |
| *Parmotrema maclayanum* | $CHCl_3$ | 3.12 | 4.7 | 5.0 | 5.1 | 6.1 |
| | | (65.33) | (47.1) | (44.0) | (42.6) | (31.56) |
| | MeOH | 5.0 | 5.2 | 5.5 | 5.5 | 6.8 |
| | | (43.78) | (42.2) | (38.2) | (38.2) | (23.5) |
| *Parmotrema tinctorum* | $CHCl_3$ | 3.98 | 5.46 | 7.0 | 7.34 | 8.5 |
| | | (55.7) | (39.3) | (22.2) | (18.4) | (5.5) |
| | MeOH | 3.2 | 4.75 | 8.1 | 8.8 | 9.0 |
| | | (64.4) | (47.2) | (10.0) | (2.2) | (0) |
| *Pyxine coralligera* | $CHCl_3$ | 4.4 | 5.1 | 7.0 | 7.1 | 8.5 |
| | | (50.4) | (42.8) | (22.0) | (21.1) | (5.5) |
| | MeOH | 5.2 | 5.7 | 8.0 | 8.3 | 9.0 |
| | | (42.2) | (36.6) | (11.11) | (7.7) | (0) |
| *Ramboldia russula* | $CHCl_3$ | 5.46 | 5.5 | 5.9 | 6.1 | 7.5 |
| | | (39.33) | (38.8) | (33.7) | (31.7) | (15.7) |
| | MeOH | 4.8 | 4.9 | 6.0 | 6.5 | 7.6 |
| | | (46.6) | (45.5) | (33.3) | (27.7) | (15.5) |
| *Usnea baileyi* | $CHCl_3$ | 2.56 | 2.68 | 3.82 | 4.78 | 6.12 |
| | | (71.5) | (70.2) | (57.5) | (46.8) | (32.0) |
| | MeOH | 4.24 | 4.4 | 5.2 | 5.4 | 6.3 |
| | | (52.89) | (51.11) | (42.67) | (40.44) | (29.56) |
| Captan 50 WP. | | 0 | 0 | 0 | 3.7 | 6.7 |
| | | (100) | (100) | (100) | (58.8) | (25.50) |

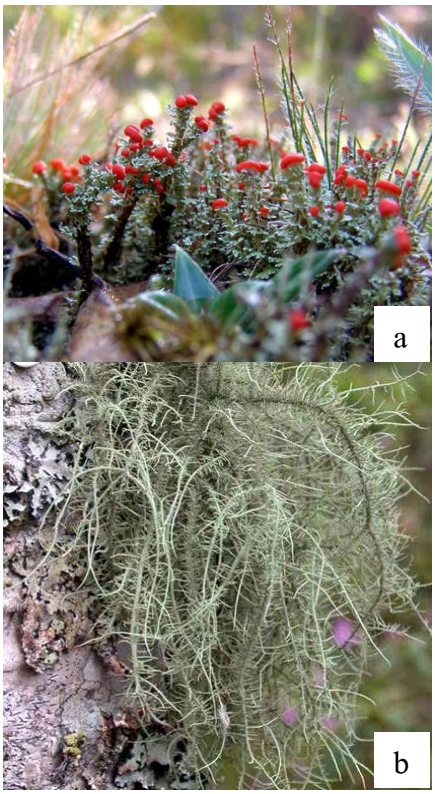
$CHCl_3$ = Chloroform, MeOH = Methanol

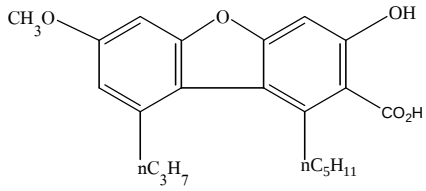
Table 3 Median effective inhibitory concentrations ($EC_{50}$) of lichen crude extracts from chloroform and methanol extraction screened in vitro on rusty spot fungus pathogen of *Dendrobium* cutting flower

| Extracts from lichen species | Method[2] of extraction | Toxicity regression equation (y = a+bx)[1] | Coefficient of determination ($r^2$) | $EC_{50}$ (µm/cc) |
|---|---|---|---|---|
| *Cladonia homchantarae* | $CHCl_3$ | Y = -0.9866+.2920X | .7903 | 29.33 |
| | MeOH | Y = -1.1928+.2557X | .9721 | 106.12 |
| *Cladonia recticaulis* | $CHCl_3$ | Y = -3.2014+.4492X | .8046 | 1244.94 |
| | MeOH | Y = -3.7877+.3583X | .7832 | 38970.88 |
| *Heterodermia lepidota* | $CHCl_3$ | Y = -3.2259+.4311X | .9044 | 1774.7 |
| | MeOH | Y = -3.6648+.5698X | .9101 | 621.29 |
| *Parmotrema maclayanum* | $CHCl_3$ | Y = -2.0495+.4008X | .3352 | 166.24 |
| | MeOH | Y = -2.7798+.4876X | .2125 | 302.27 |
| *Parmotrema tinctorum* | $CHCl_3$ | Y = -2.8388+.4309X | .9486 | 725.92 |
| | MeOH | Y = -4.0749+.6361X | .8779 | 605.35 |
| *Pyxine coralligera* | $CHCl_3$ | Y = -2.4215+.3632X | .9428 | 785.20 |
| | MeOH | Y = -2.5796+.3268X | .9292 | 2676.80 |
| *Ramboldia russula* | $CHCl_3$ | Y = -2.0366+.2715X | . 8353 | 1808.85 |
| | MeOH | Y = -1.8626+.2898X | .9331 | 617.19 |
| *Usnea baileyi* | $CHCl_3$ | Y = -1.5486+.3562X | .9643 | 77.28 |
| | MeOH | Y = -1.7247+.3051X | .9662 | 304.62 |
| Captan 50 W.P. | - | Y = -2.5260+.8060X | .7921 | 22.96 |

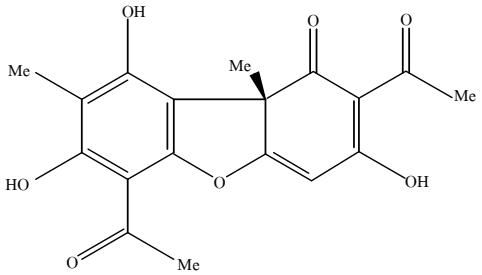
y[1] = a+bx, where y is the inhibitory probit value and X is concentration logarithm of lichen crude extract. $CHCl_3$[2] is chloroform and MeOH[2] is methanol

บนกล้วยไม้หวายตัดดอกเพียง 37.7 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากการออกฤทธิ์ต่อต้านการเติบโตของเส้นใยราก่อโรคผันแปรระหว่างชนิดของไลเคน วิธีการสกัดและความเข้มข้นของสาร เช่นเดียวกับการทดสอบของ Halama & Haluwin (2004) ที่ศึกษาผลของสารสกัดจากไลเคน 3 ชนิดด้วยอะซีโตนต่อการเติบโตของราก่อโรคพืช 8 ชนิด Shahi และคณะ (2001) ใช้สารสกัดจากไลเคน *H. leucomela* ด้วยน้ำทดสอบต่อต้านการงอกของสปอร์ราก่อโรคในพืชและราก่อโรคผิวหนังในมนุษย์ Yamamoto และคณะ (1998) ใช้สารสกัดจากไลเคนด้วยเมทานอลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งราก่อโรคพืช 6 ชนิด




Didymic acid




(+)- Usnic acid

*Figure* 2 Lichen samples from Phu Hin Rongkla National Park. Which gave the good result of inhibitory fungal mycelial growth of *Curvularia eragostidis.* (a) *Cladonia homchantarae*, (b) *Usnea baileyi.*

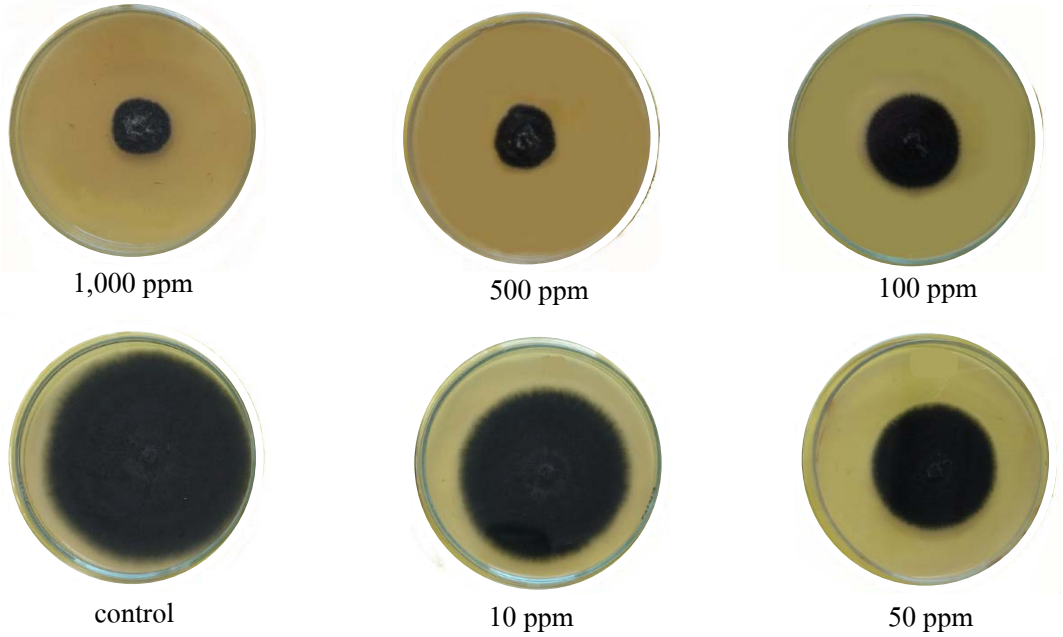



*Figure* 3 Effect of *Cladonia homchantarae* $CHCl_3$ crude extract on *Curvularia eragostidis* mycelial growth.

## สรุปผลการทดลอง

จากไลเคน 8 สายพันธุ์ ที่พบเสมอในเขตอุทยานแห่งชาติแห่งชาติภูหินร่องกล้า เมื่อนำมาสกัดเป็นสารสกัดหยาบด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอล โดยวิธีหมักและระเหยภายใต้ความดันต่ำในห้องปฏิบัติการ พบสารสกัดจากไลเคน *H. lepidota, P. maclayanum* และ *R. russula* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มให้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบที่สูง คือ 20.19, 15.27 และ 11.04 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากไลเคน *P. tinctorum* ที่สกัดด้วยเมทานอลให้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบ 10.8 เปอร์เซนต์ และเมื่อนำสารสกัดหยาบทั้งหมด 16 ตัวอย่างทดสอบการออกทฤธิ์ต่อต้านการเติบโตของเส้นใยราก่อโรคจุดสนิมของกล้วยไม้หวายตัดดอก *C. eragrostidis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สารสกัดจากไลเคน *C. homchantarae* ทั้งที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และเมทานอลออกทฤธิ์ยับยั้งเส้นใยราก่อโรคจุดสนิมบนกล้วยไม้ตัดดอกที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm และคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเติบโตของเส้นใยราได้ 62.67 และ 54.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อคำนวณหาค่า $EC_{50}$ ของสารสกัดหยาบจาก *C. homchantarae* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอล เปรียบเทียบกับค่า $EC_{50}$ ของยาฆ่ารา CAPAN 50 WP. พบว่าค่า $EC_{50}$ ของสารสกัดหยาบจาก *C. homchantarae* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเมทานอลเข้มข้นที่ 29.33 และ 106.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และค่า $EC_{50}$ ของยาฆ่าราCAPTAN 50 WP. เข้มข้นที่ 22.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบจาก *U. baileyi* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มออกทฤธิ์ยับยั้งราก่อโรคจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้หวายตัดดอกที่ความเข้มข้น 100 pmm คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตของเส้นใยราได้ 57.5 เปอร์เซ็นต์ และค่า $EC_{50}$ เข้มข้นที่ 77.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## คำขอบคุณ

งานวิจัยเรื่องนี้เป็นความร่วมมือระหว่างภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และหน่วยวิจัยพืชสมุนไพร สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข ได้รับทุนสนับสนุนวิจัยจากสภาวิจัยแห่งชาติ ขอแสดงความขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

## เอกสารอ้างอิง


นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. **คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด**. โรงพิมพ์คุรุสภา ลาดพร้าว. กรุงเทพฯ

พิบูลย์ มงคลสุข. 2549. ลักษณะอาการของโรคดอกจุดสนิมของหวายมาดาม ปอมปาดัวร์และหวายลูกผสม. **วารสารรามคำแหง 23(2)**: 85-94.

Burslaff, D. F. 1950. The effect of extracts from the lichen *Parmelia molliuscula* upon seed germination and upon the growth rate of fungi. **Journal of the Colorado Wyoming Academy of Science 4**: 56

Finney, S. 1978. **Probit analysis**. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Halama, P. and Haluwin, C. V. 2004. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acid. **Bio. Control 49**: 95-107.

Hawkworth, D. L. and Hill, D. J. 1984. **The lichen forming fungi**. Blackic, Glasgow.

Hennigsson, B. and Lundstrom, H. 1970. The influence of lichen extracts and usnic acid on word destroying fungi. **Material and Organism 5**: 19-31.

Hongsachart, W.; Poengsungnoen, V. and Mongkolsuk, P. 2006. In vitro antifungal against plant pathogenic fungi of crude extracts of some lichens from Phu Hin Rongkla National Park. **Congress on Science and technology of Thailand. (abstract)**.

Huneck, S. and Yoshimura, I. 1996. **Identification of lichen substances**. Springer_verlag_Berlin. Germany.

Land, C. J. and Lundstrom, H. 1998. Inhibition of fungal growth by water extracts from the lichen *Nephroma arcticum*. **Lichenologist 30**: 259-262.

Lawrey, J. D. 1980. Correlations between lichen secondary chemistry and grazing activity by *Pallifera varia*. **The Bryologist 83**: 328-334.

Lawrey, J. D. 1983. Lichen herbivore preference: A test of two hypotheses. **Amer. J. of Bot. 70**: 1188-1194.

Lawrey, J. D. 1986. Biological role of lichen substances. **Bryologist 89**: 111-122.

Lundstrom, H. and Henningsson, B. 1973. The effect of ten lichens on the growth of wood destroying fungi. **Material and Organismen 8**: 233-246.

Mongkolsuk, P.; Manoch, L.; Buaruang, K.; Poengsungnoen, V. and Siripong, P. 2009. The effect of tropical lichen extract to inhibit growth of rice sheath blight and other plant pathogenic fungi. **The Proceeding of 47th Kasetsart University Annual Conference 1**: 571-576.

Nimis, P. L. and Sker, N. 2006. Lichen chemistry and selective grazing by the coleopteran *Lasioderma serricorne.* **Environmental and Experimental Botany 55**: 175-182.

Pandy, D. K.; Tripathi, N. N.; Tripathi, R. D. and Dixit, S. N. 1982. Fungitoxic and Phytotoxic Properties of essential oil of *Hyptis sauveolens*. **Z. Plfkrankh. 89**: 344-349.

Proksa, B.; Sturdikava, M.; Pronayova, N. and Liptaj, T. 1996. (-)-Usnic acid and its derivatives, Their inhibition of fungal growth and enzyme activity, **Phamazie 51**: 195-196.

Rowe, J. G.; Saez, M. T. and Garcia, M. D. 1989. Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de quelques lichen du sud de l' Espagne. **Annales pharmaceutique 47**: 89-94.

Shahi, S. K.; Shukla, A. C.; Dikshit, A. and Uperti, D. K. 2001. Broad spectrum antifungal properties of lichen *Heterodermia leucomela*. **The lichenologist 33**: 177-179.

Slansky, F. Jr. 1979. Effect of the lichen chemicals atranorin and vulpinic acid upon feeding and growth of larvae *Spodoptera ornithogalli*. **Environmental. Entomology.** 8: 865-868.

Song, W.; Zhon, L.; Yang, C.; Cao, X.; Zhang, L. and Liu, X. 2004. Tomato Fusarium and wilt its chemical control strategies in a hydroponic system. **Crop Protection 23**: 243-247.

Vartia, K. O. 1973. Antibiotics in lichens. In: V. Ahmadjian and M.E. Hale. (eda.). **The lichens**. Academic Press, New York.

Yamamoto, Y.; Kinoshita, Y.; Matsubara, H.; Kinoshita, K.; Koyama, K.; Takahashi, K.; Kurokawa, T. and Yoshimura, I. 1998. Screening of biological activities and isolation of biological-active compounds from lichens. **Recent Res. Devel. in Phytochem 2**: 23-34.