

ประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชในถั่วหรั่งด้วยราปฏิปักษ์

The inhibition efficiency of fungal plant pathogens in Bambara groundnut (*Vigna subterranea*)

by antagonistic fungi

กัลยารัตน์ บุญเดช¹ อัมพวา ปินเรือน² สุจินดา สมหมาย²
และ พฤทธิกร ศุภพล^{3*}Kallayarat Boondech¹, Umpawa Pinruan², Sujinda Sommai²
and Preuttiporn Supaphon^{3*}

Received: 25 November 2022

Revised: 21 April 2023

Accepted: 28 April 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของราและสารสกัดจากราในการยับยั้งราก่อโรคพืชและจัดจำแนกรากที่มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล นำราปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลต จัดกลุ่มและจัดจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยา คัดเลือก 8 ไอโซเลต จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชที่แยกได้จากถั่วหรั่ง 10 ไอโซเลต ด้วยวิธี dual culture plate ผลการทดสอบพบว่ารา 7 ไอโซเลต สามารถยับยั้งราก่อโรคได้อย่างน้อยหนึ่งสายพันธุ์ (การยับยั้ง 50-75.56%) นำราที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 3 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) 3 สัปดาห์ จากนั้นสกัดเส้นใยราและน้ำเลี้ยงราด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตต ความเข้มข้น 95% ตามลำดับ นำส่วนสกัดทั้งหมดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าราก่อโรคพืชด้วยวิธี broth microdilution ที่ช่วงความเข้มข้น 1024-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่าสารสกัดจากราไอโซเลต LF02503 แสดงศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งและฆ่า *Epicoccum sorghinum* ให้ค่า MIC และ MFC เท่ากับ 2 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และราก่อโรคถูกจัดจำแนกโดยข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS ได้เป็น *Phomopsis* sp. จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าราปฏิปักษ์เป็นแหล่งของสารเมแทบอลิต์ที่มีศักยภาพสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชและเป็นแหล่งของสารควบคุมทางชีวภาพที่ดี

คำสำคัญ: รา ราเอนโดไฟต์ การควบคุมทางชีวภาพ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ราก่อโรคพืช

¹ คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ สงขลา 90000

¹ Faculty of Education, Thaksin University, Songkhla 90000

² ทีมวิจัยปฏิสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ทางการเกษตร กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพพืชและการจัดการแบบบูรณาการ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

² Plant-Microbe Interaction Research Team (APMT), Integrative Crop Biotechnology and Management Research Group (ACBG), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathum Thani 12120

³ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 93210

³ Department of Basic Science and Mathematics, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung 93210

* ผู้รับผิดชอบประสานงาน (Corresponding author) e-mail: preuttiptom@tsu.ac.th

ABSTRACT

This research aimed to investigate the potential of fungi and their crude extracts to control plant pathogenic fungi that cause plant diseases and to identify the most effective fungi using the molecular technique. A total of 15 antagonistic fungal isolates were classified and identified based on their morphological characteristics. Eight isolates were selected from their morphological appearances on the potato dextrose agar (PDA) and tested for their antagonistic potential against ten strains of plant pathogen in bambara groundnut using the dual culture plate method. Seven fungal isolates showed inhibitory action at least 1 strain of plant pathogenic fungi (inhibitory concentration range 50-75.56%) during the dual culture assay. Then, the three most active isolates were cultured in the potato dextrose broth (PDB) for 3 weeks. Fungal mycelium and fungal culture broth were extracted with 95% ethanol and 95% ethyl acetate, respectively. All extracts of the most potential isolates were also evaluated for antifungal activity against plant pathogens using the broth microdilution method at the final concentration range of 1024 – 2 µg/ml. The results revealed that the extract from the isolate LF02503 exhibited the highest growth inhibition against *Cercospora* sp. with MIC and MFC values of 2 and 64 µg/ml., respectively. The most active isolate (LF02503) was identified based on their nucleotide sequences of ITS region as *Phomopsis* sp. The results could be concluded that the antagonistic fungi exhibited growth inhibition to plant pathogenic fungi and could be a good source of biological control agent.

Keywords: fungi; Endophytic fungi; Biocontrol; bioactive agent; plant pathogenic fungi

บทนำ

ถั่วหรั่ง (Bambara groundnut; *Vigna subterranea*) เป็นพืชไร่เศรษฐกิจของภาคใต้ที่มีการปลูกทั่วไปในหลายจังหวัด นิยมใช้เมล็ดนำประกอบอาหารคาวหวาน ขนมขบเคี้ยว ทำแป้ง หรือใช้เป็นอาหารสัตว์ และเป็นที่ต้องการของตลาด โดยเฉพาะประเทศมาเลเซีย จึงทำให้ราคาสูง ถั่วหรั่งนิยมปลูกแซมในสวนยางพาราและสามารถใช้เป็นพืชคลุมดินของสวนผลไม้ เพราะให้ผลตอบแทนดีกว่าพืชคลุมดินตระกูลถั่วชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้เพาะปลูกถั่วหรั่งมักประสบปัญหาการเข้าทำลายของศัตรูธรรมชาติ โดยปัญหาที่มีความรุนแรงและสร้างความเสียหายอย่างมาก คือโรค ใบไหม้และใบไหม้ที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani*, *Corynespora cassiicola*, *Cercospora canescens*, *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum truncatum*, *C. gloeosporioides*, *Choanephora* sp. เป็นเชื้อสาเหตุ และมีราที่ติดมากับเมล็ดพบ *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *F. semitectum*, *Colletotrichum truncatum* และ *Phoma* sp. ราเหล่านี้สามารถเข้าทำลายถั่วหรั่งได้เกือบทุกส่วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ใบ ส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตลดลง[1] เกษตรกรพยายามควบคุมโรคโดยวิธีการต่าง ๆ แต่วิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ การฉีดพ่น และควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี ซึ่งเป็นการแก้ปัญหาในระยะสั้นเท่านั้น อีกทั้งสารเคมีราคาค่อนข้างสูง บางครั้งก็ไม่สามารถควบคุมโรคได้ และยังก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้ใช้ รวมทั้งเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันนักวิจัยพยายามหาแหล่งของสารออกฤทธิ์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ทั้งจากพืช สัตว์ และโดยเฉพาะจุลินทรีย์ จุลินทรีย์เป็นแหล่งทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วและนอกจากนี้พบว่าจุลินทรีย์มีศักยภาพในการผลิตสารพิษหลายชนิดเหมือนพืช จากรายงานก่อนหน้านี้พบสารเมแทบอไลต์ไม่ต่ำกว่า 200,000 สารจากธรรมชาติ โดย 20,000 สาร ได้จากจุลินทรีย์โดยเฉพาะราประมาณ 15,000 สาร[2] ราเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่พบได้จากตัวอย่างบนบกและแหล่งน้ำ ซึ่งมีความหลากหลายและมีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศวิทยา นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรม การแพทย์และการเกษตร ประมาณการว่ามีราทั้งหมดประมาณ 1.5- 5.1 ล้าน สปีชีส์ แต่มีการศึกษาแล้วเพียง 100,000 สปีชีส์ รากลุ่มหนึ่งที่เจริญร่วมกับพืช คือ ราเอนโดไฟต์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชในช่วงเวลาหนึ่งและไม่ได้ทำให้เกิดโรคหรือแสดงอาการของโรค[3] โดยศักยภาพของราเอนโดไฟต์มีหลากหลายด้านด้วยกัน โดยเฉพาะฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ มีการศึกษาวิธีควบคุมโรคพืชด้วยวิธีโดยใช้ราในการทดสอบ พบว่าราสามารถสร้างสารต่าง ๆ เช่น ยาปฏิชีวนะ

กรด เอนไซม์ และสารทุติยภูมิอื่น ๆ หลากหลายชนิด ดังนั้นจึงมีการนำราที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ มาควบคุมโรคพืช เช่น รา เอนโดไฟต์ และราปฏิปักษ์ ซึ่งเป็นราที่แข่งขันกับราสาเหตุโรคพืชได้ดี ไม่ว่าจะเป็นเรื่องอาหารที่อยู่ หรือสารที่ใช้ในการเจริญ และสามารถเข้าทำลายสาเหตุโรคพืชได้

ก่อนหน้านี้มีรายงานฤทธิ์ของสารสกัดจากโสนในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพบว่าราเอนโดไฟต์ *Talaromyces trachyspermus* ที่ได้จากต้นโสน มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช โดยพบว่าสามารถยับยั้ง การเจริญของรา *Bipolaris maydis* สาเหตุโรคใบไหม้ข้าวโพด และ *Alternaria alternata* สาเหตุโรคผลเน่าของสาลี่ได้ถึง 64.8 % และ 76.7 % ตามลำดับ และราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. สายพันธุ์ 3-212-2 สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผักและผลไม้ได้มากกว่า 70 % ยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และ *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนได้ มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ราเอนโดไฟต์ *Chaetomium globosum* สายพันธุ์ 46-101-2 และ 53-84-5 สามารถยับยั้ง การเจริญของรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคโคนเน่าของถั่วเขียว และ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของ ข้าวโพดได้สูงสุด 65 % และ 58 % ตามลำดับ ส่วนราเอนโดไฟต์ที่พบในต้นโสนชนิดอื่น ๆ สามารถควบคุมราสาเหตุโรคพืชได้ ปานกลาง[4] นอกจากนี้ราปฏิปักษ์ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ *Phomopsis* sp. , *Chaetomium* sp., *Aspergillus* sp. สามารถสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญในการกำจัดราสาเหตุโรคพืชได้[5-6] ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ที่ แยกได้จากต้นโสน (*Sesbania javanica*) ซึ่งเป็นรากลุ่มราเอนโดไฟต์และราปฏิปักษ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุ์ วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 3 โอไฮโอเลต คือ *Phomopsis* sp., *Chaetomium* sp., *Aspergillus* sp. ที่แยกได้ จากดิน ในการยับยั้งราก่อโรคในถั่วหรั่ง โดยคาดหวังว่าจะได้ข้อมูลประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์และสารสกัดจากราในการ ยับยั้งราก่อโรคพืชในถั่วหรั่งเพื่อไปใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ราปฏิปักษ์

ได้รับความอนุเคราะห์ราจำนวน 3 โอไฮโอเลต ได้แก่ *Phomopsis* sp. (ราเอนโดไฟต์) *Chaetomium* sp. (ราแซฟ โพรไฟต์) และ *Aspergillus* sp. (ราจากดิน) จากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และสำหรับราเอนโดไฟต์ จากโสน เก็บตัวอย่างใบต้นโสน (*Sesbania javanica*) ที่มีความสมบูรณ์ ปราศจากรอยโรค ตาบล้าทับ อำเอนล้าทับ จังหวัด กระบี่ จำนวน 15 ต้น โดยเก็บตัวอย่างใบใส่ถุงพลาสติก นำตัวอย่างใบมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ จากนั้นทำความสะอาดตัวอย่าง ด้วยชุดของสารละลายเอทานอลและโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ประกอบด้วย เอทานอล ความเข้มข้น 30 % 3 นาที; โซเดียมไฮโป คลอไรท์ ความเข้มข้น 3 % 1 นาที; เอทานอล ความเข้มข้น 30 % 3 นาที และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 30 วินาที ตามลำดับ นำ ตัวอย่างมาฆ่าด้วยกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อและตัดตัวอย่างให้มีขนาดขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 200 วางตัวอย่าง จำนวน 5 ชิ้น/จาน บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin (ความ เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) สังเกตและแยกราเอนโดไฟต์ทุกวัน เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ หรือจนกว่าจะไม่สามารถแยกราเอนโดไฟต์จากตัวอย่างได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยถ่ายเชื้อลงใน อาหาร PDA ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ จนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นจัดกลุ่มราเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่ได้ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาบน อาหาร PDA[4] เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นถัดไป

2. การแยกราก่อโรคจากถั่วหรั่ง[7]

เก็บรวบรวมลำต้น ใบ และรากถั่วหรั่งที่แสดงอาการของโรคใบไหม้จากแปลงปลูก ศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดสงขลา จากนั้นนำมาล้างเศษดินบนตัวอย่างออก โดยผ่านน้ำไหล 3 นาที แยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี tissues transplanting โดยตัดชิ้น พืชบริเวณแผลให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำไปแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 3 % เป็น เวลา 3 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองหรือกระดาษทิชชูที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นพืชวางลงบน อาหาร PDA ทำตัวอย่างละ 3 ชิ้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-4 วัน หลังจากนั้นตัดปลายเส้นใย (hyphal tip isolation) นำไปวางบนอาหาร PDA อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำราสาเหตุที่แยกได้ไปตรวจสอบลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ เพื่อจำแนกชนิดของราก่อโรค[8]

3. การทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราก่อโรคในห่อปฏิบัติการด้วยวิธี dual-culture plate[9]

ทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในถั้วหรั่ง (10 สายพันธุ์) ด้วยวิธี dual culture plate โดยเลี้ยงราโรคราพืชบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นใช้ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีของราโรคราพืชและนำไปวางบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจานอาหาร ประมาณ 2 ซม. และใช้วิธีเดียวกันตัดขอบโคโลนีของราปฏิปักษ์และนำไปวางด้านตรงข้ามบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมตัดขอบโคโลนีราโรคราพืชวางตรงกลางของจานอาหาร PDA จากนั้นนำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-14 วัน วัดรัศมีของโคโลนีราบนจานทดสอบและจานควบคุม ทุกการทดสอบทำ 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอัตราการเจริญ Percent Inhibition of Radial Growth (PIRG) ดังนี้

$$\text{PIRG หมายถึง } [(R_1 - R_2) / R_2] \times 100$$

โดย R1 คือความยาวรัศมีของโคโลนีราก่อโรคในชุดควบคุม

R2 คือความยาวรัศมีของโคโลนีราก่อโรคในชุดทดสอบ

และนำค่า PIRG ที่ได้มาประเมินความสามารถในการยับยั้งของอัตราการเจริญ ได้ดังนี้

PIRG เท่ากับหรือมากกว่า 70 % หมายถึง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง

PIRG เท่ากับ 51 ถึง 69 % หมายถึง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง

PIRG น้อยกว่า 50 % หมายถึง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

จากนั้นคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่สามารถยับยั้งราโรคราพืชโดยให้ค่า PIRG มากกว่า 70 % ไปทดสอบในขั้นถัดไป

4. การเตรียมสารสกัดจากราปฏิปักษ์

นำราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูง (PIRG มากกว่า 70 %) จากการทดสอบ dual culture plate มาเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาส ต่อรา 1 ไอโซเลต เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นกรองเพื่อแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงราออกจากกัน ส่วนของเส้นใยให้สกัดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 95% ในสัดส่วนของตัวสกัดและตัวอย่าง 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำโซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรส์ (Na_2SO_4) และทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดในส่วนส่วนของเส้นใยที่สกัดด้วยเอทานอล (cell ethanol; CE) และนำน้ำเลี้ยงรามาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ความเข้มข้น 95% ทำเช่นเดียวกับการสกัดเส้นใย จะได้สารสกัดน้ำเลี้ยงราที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (broth ethyl acetate; BE) เตรียมส่วนสกัดด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ความเข้มข้น 10 % ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากราปฏิปักษ์ในการยับยั้งราโรคราพืชด้วยวิธี broth microdilution test[10]

5.1 การเตรียม Conidial suspension

เลี้ยงราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3-5 วัน หรือจนกว่าจะสร้างโคนินทรีย์ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใส่ glass bead ประมาณ 10 เม็ด ลงในจานเพาะเชื้อ หมุนจานไปมาเพื่อให้โคนินทรีย์หลุดออกจากเส้นใย เติมน้ำโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 % ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปิเปต conidial suspension ในจานเพาะเชื้อ นำไปใส่ในหลอดทดลองเพื่อเตรียมตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วย Hemacytometer จากนั้นปรับความเข้มข้นของโคนินทรีย์ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.85 % ให้ได้ความเข้มข้นของของโคนินทรีย์ เท่ากับ 4×10^4 โคนินทรีย์ต่อมิลลิลิตร

5.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration; MICs) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration; MFCs)

ดูอาหารเหลว Sabouraud Dextrose Broth (SDB) ใส่ลงใน sterile 96-well microtiter plates จากนั้นเจือจางสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 1024^{-2} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมสารละลายโคนินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงในจานทดสอบ และนำจานไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน อ่านผลการทดสอบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัด (ราและอาหารเลี้ยงเชื้อ) ค่า MIC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งราได้ 80 % โดยสังเกตผลภายใต้กล้องสเตอริโอไมโคร จากนั้นนำของเหลวในหลุมทดสอบทุกหลุมที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่า MIC ไปสตรีกลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 วัน อ่านค่า MFC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่มีราเจริญบนจานอาหาร ทุกการทดสอบทำ 3 ซ้ำ

6. จัดจำแนกราเอนโดไฟต์โดยวิธีทางชีวโมเลกุลและวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยวิธี maximum likelihood, maximum parsimony และวิธี Bayesian inference

คัดเลือกรวมที่มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งการก่อโรคพืชในถั่วเหลืองจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยเลี้ยงราบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นชุดเส้นใยและลำเส้นใยด้วยน้ำอุ่นปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง บดเส้นใยเพื่อสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB[11] จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยเจลอเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรส ในบัฟเฟอร์ที่เอ ความเข้มข้น 1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่กำลังไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที ย้อมเจลดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร โดยตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซ่ ในการศึกษานี้เลือกศึกษาบริเวณ ITS (internal transcribed spacer) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเนื่องจากบริเวณนี้สามารถจัดจำแนกได้ในระดับจีโนส สปีชีส์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะดังนี้ ITS5/ITS4 (GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG/TCCTCCGCTTATTGATATGC) ส่วนผสมและปริมาตรของปฏิกิริยาถูกลูโซ่ฟลิออเมอร์ส (25 ไมโครลิตร) ประกอบด้วยชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จรูป OnePCR Ultra 12.5 ไมโครลิตร; น้ำนาโนบริสุทธิ์ 9.5 ไมโครลิตร; 10 ไมโครโมล ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด 1.0 ไมโครลิตร; 10 ไมโครโมล ไพรเมอร์รีเวิร์ด 1.0 ไมโครลิตร และ 100-500 นาโนกรัมของดีเอ็นเอต้นแบบ 1.0 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่องของ Bio-Rad MyCycler (Bio-Rad, Hercules, CA) จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาถูกลูโซ่ฟลิออเมอร์ส โดยเจลอเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรส ในบัฟเฟอร์ที่เอ ความเข้มข้น 1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) และทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดปฏิบัติการสำเร็จรูป (QIAquick PCR purification Kits) จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปอ่านลำดับเบสด้วยไพรเมอร์เดียวกับที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยบริษัท Macrogen Inc., ประเทศเกาหลี วิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) และการจัดจำแนกเชื้อราโดยวิธี maximum parsimony ด้วยโปรแกรม MAFFT เวอร์ชัน 7[12] จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสที่จัดเรียงแล้วมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) วิธี Maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม RAxML v.8.2.12[13] ใน CIPRES[14] โดยวิธีของ Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) ใช้โมเดล GTR และพิจารณาค่าบูทสตราปที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50 % นอกจากนี้ยังวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ร่วมกับวิธี Maximum parsimony (MPX และ Bayesian inference (BI) โดยวิธี MP กำหนดให้ค่าทางสถิติต่าง ๆ ประกอบด้วย tree length consistency index (CI), retention index (RI), relative consistency index (RC) และ homoplasy index (HI) และค่าความเชื่อมั่นบูทสตราปที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50 % สำหรับวิธี BI วิเคราะห์ด้วยวิธี Markov chain Monte Carlo (MCMC) โดยใช้โมเดล SYM+I+G ซึ่งได้จากการทดสอบด้วยโปรแกรม MrModeltest 2.2[15] จากนั้นจึงทดสอบด้วย hierarchical likelihood ratios (hLRTs) (วิเคราะห์ 3,000,000 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างข้อมูลทุก ๆ 100 ชั่วโมงที่ 3,000 phylogenetic tree) โดยพิจารณาค่าบูทสตราปที่มากกว่า หรือเท่ากับ 0.95 จากนั้นยังพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์

ผลการวิจัย

1. ระบุพืช

แยกราเอนโดไฟต์ได้จากใบโสน จำนวน 50 ไอโซเลต ซึ่งสามารถจัดกลุ่มของราเอนโดไฟต์โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม (SBN001-SBN005) จัดจำแนกราเอนโดไฟต์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 1 กลุ่ม คือ SBN004 เป็น *Nigrospora* sp. ที่เหลือราไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์บนอาหาร PDA (Unidentified fungi) นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้เป็นตัวแทนในแต่ละกลุ่ม ได้จำนวน 5 ไอโซเลต และราที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (LF001-LF003) จำนวน 3 ไอโซเลต รวมทั้ง 8 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) นำราที่ได้เพาะบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตัดอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณขอบของเส้นใยให้มีขนาด 0.5 × 0.5 ตารางเซนติเมตร และเก็บรักษาไว้ในหลอด cryotubes ที่เติมกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 1 ราบปฏิบัติที่ได้จากแหล่งต่างๆจำนวน 8 ไอโซเลต

ไอโซเลต	รหัส	กลุ่มของรา	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	SBN001	Endophytic fungi	<i>Fusarium</i> sp.
2	SBN002	Endophytic fungi	<i>Fusarium</i> sp.
3	SBN003	Endophytic fungi	<i>Nigrospora</i> sp.
4	SBN004	Endophytic fungi	<i>Nigrospora</i> sp.
5	SBN005	Endophytic fungi	<i>Cladosporium</i> sp.
6	LF02503	Endophytic fungi	<i>Phomopsis</i> sp.
7	LF02500	Saprophytic fungi	<i>Chaetomium</i> sp.
8	LF02507	Soil fungi	<i>Aspergillus</i> sp.

2. ราสาเหตุโรคพืชในถั่วหรั่ง

สามารถแยกได้จากถั่วหรั่งที่แสดงอาการของโรคพืชได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต (BG001-BG010) โดยราที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต สามารถจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 8 สกุล ได้แก่ *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Cercospora*, *Phoma*, *Curvularia*, *Cladosporium* (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ราก่อโรคพืชจากถั่วหรั่ง (*Vigna subterranean*)

ไอโซเลต	รหัส	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	BG001	<i>Phomopsis</i> sp.
2	BG002	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
3	BG003	<i>Fusarium</i> sp.
4	BG004	<i>Epicoccum sorghinum</i>
5	BG005	<i>Cercospora</i> sp.
6	BG006	<i>Phoma</i> sp.
7	BG007	<i>Curvularia</i> sp.
8	BG008	<i>Cladosporium tenuissimum</i>
9	BG009	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
10	BG010	<i>Epicoccum sorghi</i>

3. คัดเลือกราบปฏิบัติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคในถั่วหรั่งโดยวิธี dual culture plate

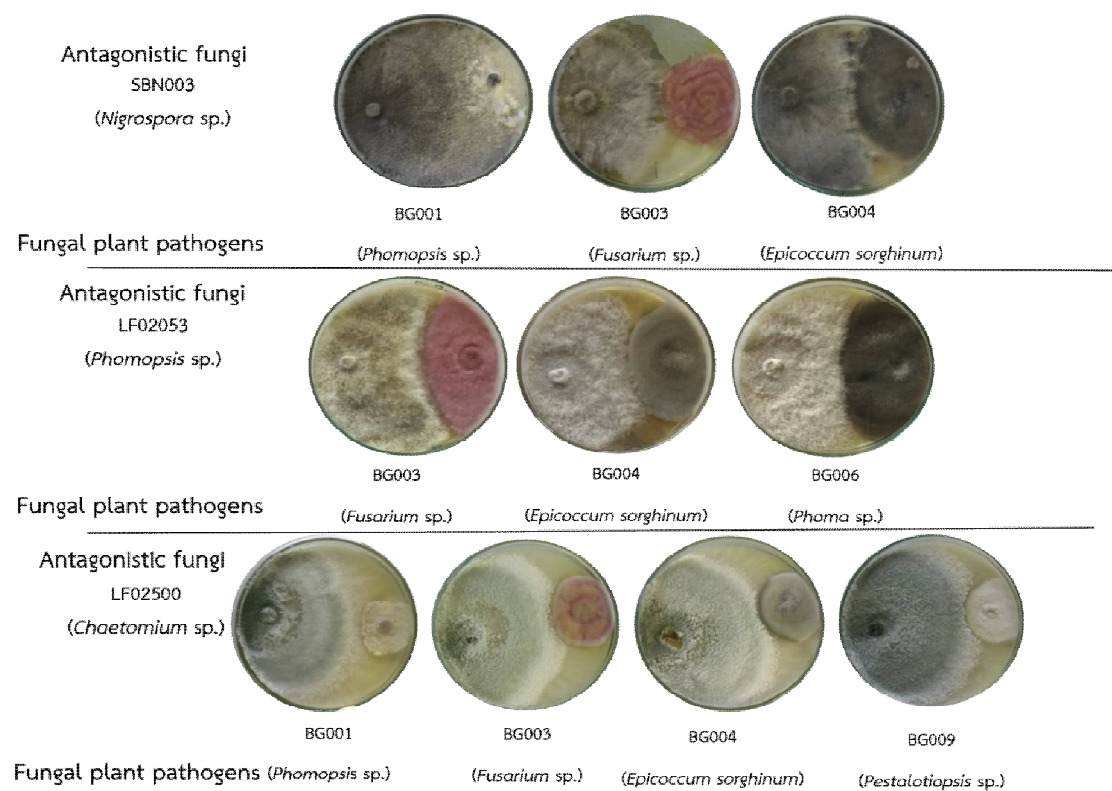
นำราบปฏิบัติที่แยกได้จากโสนและคัดเลือกไว้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ราบปฏิบัติได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จำนวน 3 ไอโซเลต และราก่อโรคพืชที่แยกได้ถั่วหรั่ง จำนวน 10 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน สังเกตและบันทึกอัตราการเจริญทุกวันหรือจนกว่าราโตเต็มจานอาหาร PDA จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพของราบปฏิบัติ ทั้งหมด 8 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชในถั่วหรั่ง จำนวน 10 ไอโซเลต ด้วยวิธี Dual culture technique บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นวัดรัศมีของราก่อโรคในงานทดสอบ และงานควบคุมซึ่งไม่เพาะเลี้ยงราบปฏิบัติ นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยราก่อโรคแต่ละชนิด (Percent inhibition of radial growth หมายถึง PIRG) ได้ผลการทดลอง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในการยับยั้งราโรคพืชที่ทดสอบด้วยวิธี dual culture

ราปฏิปักษ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (PIRG)									
	ราก่อโรคพืช									
	BG001	BG002	BG003	BG004	BG005	BG006	BG007	BG008	BG009	BG010
SBN001	-	52.94	68.88	66.67	-	-	66.67	-	-	-
SBN002	66.67	-	-	66.67	-	-	-	-	66.67	-
SBN003	73.33	61.76	71.11	73.33	-	65.79	68.89	-	-	-
SBN004	-	55.88	66.67	68.89	-	65.79	64.44	-	-	50.00
SBN005	-	52.94	62.22	64.44	-	-	-	-	-	-
LF02503	66.67	55.88	73.33	71.11	-	71.05	64.44	-	-	-
LF02500	75.56	67.65	73.33	75.56	-	-	68.88	-	75.56	57.14
LF02507	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า 50%

จากนั้นเลือกกราฟที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้ปานกลาง-สูงสุด โดยแสดงค่า PIRG ในช่วง 51-69 % และเท่ากับหรือมากกว่า 70% พบว่าราปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลต ได้แก่ SBN003, LF02503 และ LF02500 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ในระดับสูงสุด (ภาพที่ 1) โดยราปฏิปักษ์ ไอโซเลต LF02500 (*Chaetomium* sp.) สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 4 ไอโซเลต โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง BG001 (*Phomopsis* sp.), BG004 (*Epicoccum sorghinum*) และ BG009 (*Pestalotiopsis* sp.) สูงสุด 75.56 % รองลงมา BG003 (*Fusarium* sp.) 73.33 % ตามลำดับ ตามด้วยราปฏิปักษ์ไอโซเลต SBN003 (*Nigrospora* sp.) สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 3 ไอโซเลต โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง BG001 (*Phomopsis* sp.) และ BG004 (*Epicoccum sorghinum*) สูงสุด 73.33 % รองลงมา BG003 (*Fusarium* sp.) 71.11 % และราปฏิปักษ์ ไอโซเลต LF02503 (*Phomopsis* sp.) สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 3 ไอโซเลต โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง BG003 (*Fusarium* sp.) สูงสุด 73.33 % รองลงมา BG004 (*Epicoccum sorghinum*) 71.11 % และ BG006 (*Phoma* sp.) 71.05 % จากนั้นนำราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคสูงสุด 3 อันดับ ไปเลี้ยงในอาหารเหลวและสกัดสารสำหรับการทดสอบในขั้นต่อไป



ภาพที่ 1 ราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งราก่อโรคในถั่วเหลือง

4. ฤทธิ์ของสารสกัดจากราปฏิปักษ์ในการยับยั้งราพืชโดยวิธี Broth microdilution

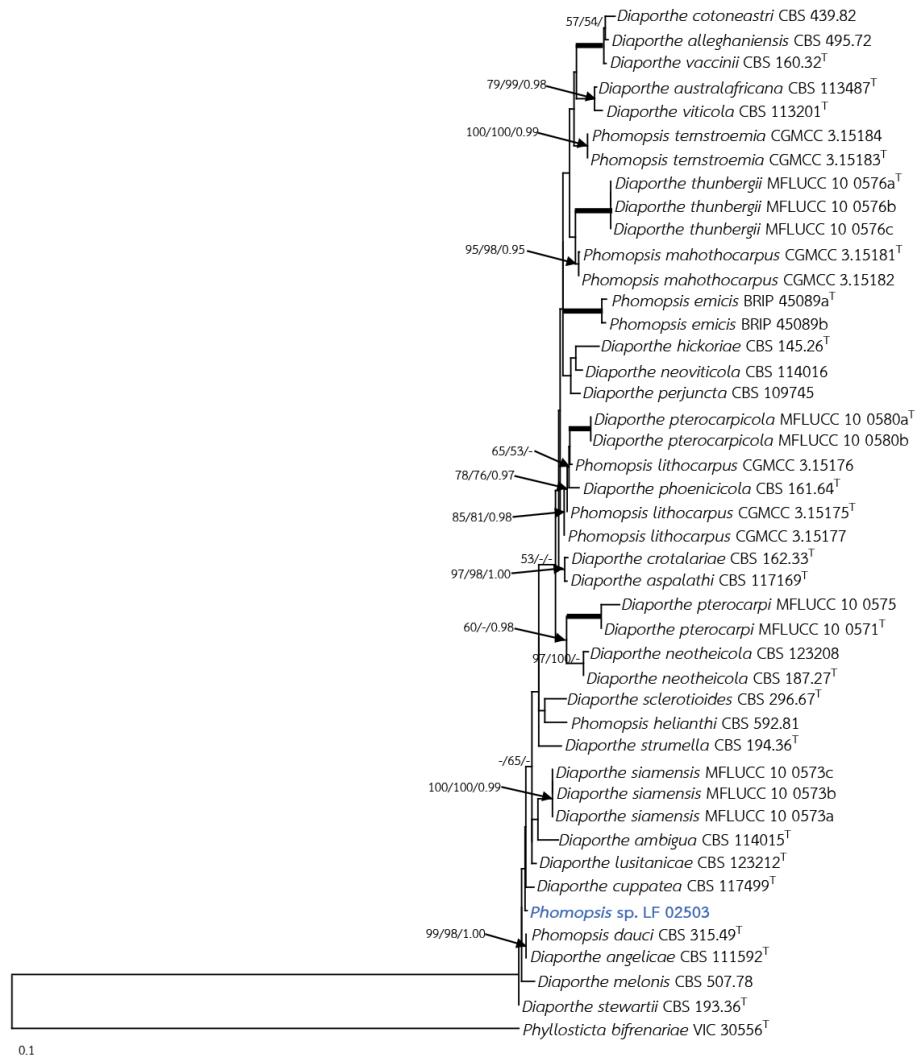
นำสารสกัดทั้งหมดจำนวน 6 สาร ได้แก่ สารสกัด CE จากไอโซเลต LF02500, SBN003, LF02503 จำนวน 3 สาร และสารสกัด BE จากไอโซเลต LF02500, SBN003, LF02503 จำนวน 3 สาร มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งราก่อโรค โดยทดสอบในช่วงความเข้มข้น $1024 - 2$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับสารละลายโคนิเดียที่เตรียมไว้ ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากราปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 2 ไอโซเลต (BG003 และ BG004) ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ และสารสกัดที่มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งราก่อโรค คือสารสกัด BE จากราปฏิปักษ์ (LF02503) สามารถยับยั้งราก่อโรคพืช BG004 ให้ค่า MIC และ MFC เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งราทดสอบ (MICs) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการฆ่าราทดสอบ (MFCs) ของสารสกัดจากราปฏิบัติ

ราปฏิบัติ	ส่วนสกัด	MICs /MFCs (µg/ml)	
		ราก่อโรคพืช	
		BG003 (<i>Fusarium</i> sp.)	BG004 (<i>Epicoccum sorghinum</i>)
LF02500	cell ethanol	128/1024	128/512
(<i>Chaetomium</i> sp.)	Broth ethyl acetate	256/1024	32//1024
SBN003	cell ethanol	256/1024	64/512
(<i>Nigrospora</i> sp.)	broth ethyl acetate	256/1024	16/>1024
LF02503	cell ethanol	256/1024	16/1024
(<i>Phomopsis</i> sp.)	broth ethyl acetate	256/1024	2/64

5. การจัดจำแนกราเอนโดไฟต์โดยวิธีทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) และวิธี Bayesian inference (BI)

การจัดเรียงลำดับเบสของราตัวอย่างกับราที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันด้วยโปรแกรม MAFFT เวอร์ชัน 7 จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสที่จัดเรียงแล้วมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ด้วยโปรแกรม RAxML v.8.2.12[13] ใน CIPRES[14] ในการวิเคราะห์ข้อมูลนั้นได้ใช้ *Phyllosticta bifrenariae* รหัส VIC 30556 เป็น outgroup และแสดงแผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ดีที่สุด โดยมีค่าโอกาสการปรับให้เหมาะสมสุดท้ายเป็น -3903.327818 ชุดข้อมูล MP ประกอบด้วย 789 อักษร โดย 347 เป็นค่าคงที่ 102 เป็น parsimony-uninformative ที่แปรผันได้ และ 340 เป็นข้อมูล parsimony ที่มีความยาว 638 ขั้นตอน (CI = 0.567, RI = 0.713, RC = 0.405 และ HI = 0.433) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree บริเวณ ITS ของราเอนโฟที่ที่มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งราก่อโรคในถั่วหรั่ง (LF02503) โดยใช้ *Phyllosticta bifrenariae* รหัส VIC 30556 เป็น outgroup ค่าความเชื่อมั่นบูทแตรจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) (ซ้าย), maximum parsimony (MP) (กลาง) ซึ่งมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ และค่าความน่าจะเป็นของ BI ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.95 (ขวา) และเส้นทึบคือค่า ML, MP บูทแตรเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์/ค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 1.00 โดยราเอนโดโฟที่ที่ศึกษาตัวหนังสือหนาสีฟ้า

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ราก่อโรคพืชที่แยกได้จากถั่วหรั่งทั้งหมด 10 ไอโซเลต กระจายอยู่ใน 8 สกุล ดังนี้ *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Cercospora*, *Phoma*, *Curvularia*, *Cladosporium* พบว่าราปฏิปักษ์และสารสกัดจากราปฏิปักษ์มีศักยภาพในการยับยั้งราในสกุล *Fusarium* และ *Epicoccum* ได้ดีที่สุด โดย Nafula และคณะในปี ค.ศ. 2021 [16] รายงานการกระจายและการก่อโรคเหี่ยวในถั่วหรั่ง ประเทศเคนยา พบว่าสาเหตุ คือ *Fusarium oxysporum* ซึ่งมีความรุนแรงของการก่อโรคสูงและแสดงอาการของโรคเหี่ยว 45 วันหลังจากเพาะเชื้อในถั่วหรั่ง นอกจากนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ouoba และคณะในปี ค.ศ. 2019[17] รายงานสายพันธุ์ของราที่พบและก่อโรคในถั่วหรั่งในทวีปแอฟริกา โดยราก่อโรคพืชในถั่วหรั่งได้แก่ โรคเหี่ยว โรคใบจุด โรคราแป้ง และโรคใบไหม้ โดยพบสาเหตุ ดังนี้ *Fusarium sp.*, *Cercospora*

sp., *Phoma sorghina*, *Phomopsis sojae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Puccinia* sp., *Collectotrichum* sp., *Collectotrichum capsici*, *Cercospora anescens*, *Erysiphe* sp., *Sclerotium rolfsii*, *Phomopsis* sp., *Alternaria* spp. และ *Aspergillus* spp.

นอกจากนี้จากการทดสอบศักยภาพของราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ในการยับยั้งราก่อโรคที่แยกได้จากถั่วเหลืองการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี dual culture แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้จากใบโสน 5 ไอโซเลต และราปฏิปักษ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 3 ไอโซเลต รวม 8 ไอโซเลต ผลการทดสอบพบว่าราปฏิปักษ์ จำนวน 7 ไอโซเลต มีผลยับยั้งราก่อโรคที่แยกได้จากถั่วเหลืองอย่างน้อย 1 ไอโซเลต จากทั้งหมด 10 ไอโซเลต และคัดเลือกราปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งราก่อโรคได้ดีที่สุด 3 ไอโซเลต ได้แก่ ราปฏิปักษ์ไอโซเลต LF02500 (ราแซฟโทรไฟต์, *Chaetomium* sp.), SBN003 (ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบโสน, *Nigrospora* sp.) และ LF02503 (ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบถั่วเหลือง, *Phomopsis* sp.) สามารถยับยั้งราก่อโรคถั่วเหลืองได้ดีที่สุด เปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการสกัดสารจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของราปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลต ด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตต ได้สารสกัดทั้งหมด 6 สาร นำไปทดสอบหาค่า MIC และ MFC กับราก่อโรค 2 ไอโซเลต คือ BG003 และ BG004 ด้วยวิธี Broth microdilution พบว่าสารสกัด BE จากราปฏิปักษ์ไอโซเลต LF02503 (*Phomopsis* sp.) ซึ่งเป็นราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากถั่วเหลือง มีฤทธิ์ยับยั้งรา BG004 (*Epicoccum sorghinum*) ได้ดีที่สุด มีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 2 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ราปฏิปักษ์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Chaetomium* sp., *Nigrospora* sp. และ *Phomopsis* sp. มีความหลากหลายและมีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่แยกได้จากถั่วเหลือง 2 สายพันธุ์ คือ *Fusarium* sp. และ *Epicoccum sorghinum* โดยราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้ยังเป็นราโรคพืชที่ถูกรายงานครั้งแรกในหลายประเทศ โดยเฉพาะ *E. Sorghinum* ได้แก่ ประเทศจีน มาเลเซีย และอเมริกา โดยพบเป็นสาเหตุโรคใบจุดและโรคกาบใบเน่าของพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวโพด (*Zea mays*) ผักปลัง (*Basella alba*) หญ้า (*Bothriochloa ischaemum*) เฉาก๊วย (*Platostoma palustre*) เบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) และข้าว (*Oryza sativa*)[18-24]

โดยก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาพบว่าราปฏิปักษ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีศักยภาพและนำมาใช้ในการยับยั้งโรคพืชที่หลากหลาย ในปี ค.ศ. 2014 Kaewkrajay และคณะ[4] ศึกษาเอนโดไฟต์ในการยับยั้งราโรคพืชหลายชนิด โดยแยกเอนโดไฟต์จากกิ่งและใบโสน แยกเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 143 สายพันธุ์ จัดจำแนกชนิดได้ 7 สกุล 5 ชนิด ดังนี้ *Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia* spp., *Nigrosporium sphaerica*, *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Talaromyces trachyspermus*, *Zygosporium masoni* และ unidentified spp. เมื่อนำเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช 10 สายพันธุ์ ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA พบว่า *T. trachyspermus* สายพันธุ์ 1-41-4 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช โดยพบว่าสามารถยับยั้งรา *Bipolaris maydis* สาเหตุโรคใบไหม้ข้าวโพด และ *Alternaria alternata* สาเหตุโรคผลเน่าของสาลี่ได้ถึง 64.8 % และ 76.7 % ตามลำดับ และเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. สายพันธุ์ 3-212-2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผักและผลไม้ได้มากกว่า 70 % สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และยับยั้ง *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนได้มากกว่า 60 % ขณะที่เอนโดไฟต์ *C. globosum* สายพันธุ์ 46-101-2 และ 53-84-5 สามารถยับยั้งการเจริญของรา *R. solani* สาเหตุโรคโคนเน่าของถั่วเขียว และ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคกาบใบเน่าของข้าวโพดได้สูงสุด 65 % และ 58 % ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hung และคณะ ในปี ค.ศ. 2015[25] รายงานศักยภาพของราในสกุล *Chaetomium* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Phytophthora nicotianae* สาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าในส้ม ในช่วงความเข้มข้นของสารสกัดจากราในสกุล *Chaetomium* ในช่วง 2.6-101.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Udayanga และคณะ ในปี ค.ศ. 2011[26] รายงานศักยภาพของราในสกุล *Phomopsis* ที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชหลายสปีชีส์ โดยสามารถผลิตสาร *Phomopsichalasin*, *Ethyl 2,4-dihydroxy-5,6-dimethylbenzoate*, *phomopsilactone* เพื่อใช้ในการควบคุมทางชีวภาพโดยมีฤทธิ์ยับยั้งราได้ดี ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าราเป็นแหล่งของสารเมแทบอไลต์ที่ดีและสามารถยับยั้งราโรคพืชได้หลายสายพันธุ์ โดยผลงานวิจัยนี้พบว่าเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบถั่วเหลืองแสดงศักยภาพในการผลิตสารยับยั้งราก่อโรคที่แยกได้จากถั่วเหลืองได้ดี

การศึกษานี้รายงานศักยภาพของราปฏิปักษ์จากหลากหลายแหล่งที่คัดแยกได้จากใบของต้นโสน ใบถั่วหรั่งและราที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ในการยับยั้งราก่อโรคพืชที่แยกได้ในถั่วหรั่ง ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าราปฏิปักษ์และสารสกัดจากราปฏิปักษ์มีศักยภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อราก่อโรคในถั่วหรั่งได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (MIC/MFC เท่ากับ 2 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร) ซึ่งอาจนำไปศึกษาและเป็นฐานข้อมูลสำคัญในการใช้ประโยชน์ด้านการเกษตร เพื่อเพิ่มแหล่งทางเลือกของสารเมแทบอไลต์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

References

- [1] Panitsakpatana, C., et al. (1993). Study on diseases of Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) (Research reports). Bangkok: Department of Agriculture. (in Thai)
- [2] Newman, D. J., et al. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66, 1022-1037.
- [3] Gao, S. S., et al. (2010). Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Marine Drugs*, 9(1), 59-70.
- [4] Kaewkrajay, C., et al. (2014). Efficacy of endophytic fungi isolated from *Sesbania javanica* against plant pathogenic fungi. *Khon Kaen Agricultural Journal*, 43(3), 271-282. (in Thai)
- [5] Brewer, D., et al. (1968). The production of cochliodinol and a related metabolite by *Chaetomium* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 14(1), 861-866.
- [6] El-hawary, S.S., et al. (2020). Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. *RSC Advances*, 10(1), 22058-22079.
- [7] Patanavipart, P., et al. (2011). Biocontrol of northern corn leaf blight. In *The thirty-fifth National Corn and Sorghum Research Conference 2011* (p. 250-256). 24-27 May, 2011, Bangkok, Thailand. (in Thai)
- [8] Dayarathne, M. C., et al. (2020). Diagnosis of fungal plant pathogens using conventional and molecular approaches. In Kurouski, D. (Eds.). *Diadnostics of plant diseases*. London: Intechopen.
- [9] Chuenchan, W., et al. (2019). Inhibition of *Phytophthora parasitica* by antagonistic molds from soil's Kuiburi Subdistrict, Prachuap Khiri Khan Province. *Journal of Science Ladkrabang*, 28(1), 52-64. (in Thai)
- [10] Supaphon, P., et al. (2018). Isolation and antimicrobial activities of fungi derived from *Nymphaea lotus* and *Nymphaea stella*. *Mycoscience*, 59 (5), 415-423.
- [11] O'Donnell, K., et al. (1997). Phylogenetic relationships among *Ascomycetous* truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia*, 89, 48-65
- [12] Katoh, K. & Daron M. Standley. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability Molecular Biology and Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780.
- [13] Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- [14] Miller M., et al. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE 2010)* (p.1-8). 14 November, 2010, New Orleans, Louisiana, USA.
- [15] Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- [16] Nafula, W.C., et al. (2021). Incidence and severity of *Fusarium* wilt on Bambara nut (*Vigna subterranean* L.) landraces in Western Kenya. *African Journal of Biological Sciences*, 3(1), 67-75.
- [17] Ouoba, A., et al. (2019). Molecular characterization of the main fungi associated to Bambara

- groundnut foliar disease in Burkina Faso. *Journal of Applied Biosciences*, 133, 13574-13583.
- [18] Chen, Q. H., et al. (2021). First report of leaf spot on white chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) caused by *Epicoccum sorghinum* in Hubei province, China. *Plant Disease*, 105(4), 1212.
- [19] Chen, T.-M., et al. (2021). First report of *Epicoccum sorghinum* causing leaf sheath and leaf spot on Maize in China. *Plant Disease*, 105(11), 3741.
- [20] Imran, M., et al. (2022). First report of leaf spot of rice caused by *Epicoccum sorghinum* in the United States. *Plant Disease*, 106(10), 2758.
- [21] Imran, M., et al. (2022). First report of *Fusarium* sheath rot of rice caused by *Fusarium incarnatum-equiseti* complex in the United States. *Plant Disease*, 106(12), 3206.
- [22] Khoo, Y. W., et al. (2023). First report of *Epicoccum sorghinum* causing leaf spot on *Basella alba* in Malaysia. *Plant Disease*, 107(3), 939.
- [23] Khoo, Y. W., et al. (2022). First report of *Epicoccum sorghinum* causing leaf spot on *Botriochloa ischaemum* in Malaysia. *Plant Disease*, 107(2), 559.
- [24] Khoo, Y. W., et al. (2022). First report of *Epicoccum sorghinum* causing leaf spot on *Platostoma palustre* in Malaysia. *Plant Disease*, 107(1), 228.
- [25] Hung, P. M., et al. (2015). Efficacy of *Chaetomium* species as biological control agents against *Phytophthora nicotianae* root rot in citrus. *Mycobiology*, 43(3), 288-296.
- [26] Udayanga, D., et al. (2011). The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*, 50, 189-225.