

ประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืช *Phytophthora palmivora* และ *Phytophthora botryosa*

The Efficacy of Endophytic fungi Against the Growth of Fungal Plant Pathogens, *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora botryosa*

พฤทธิกร ศุภพล^{1*}
Preuttiorn Supaphon^{1*}

Received: 31 August 2023

Revised: 18 October 2023

Accepted: 24 October 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) บัวสาย (*Nymphaea lotus*) ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช 2 สายพันธุ์ (*Phytophthora palmivora* และ *Phytophthora botryosa*) ด้วยวิธี dual culture plate จากนั้นคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราและประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งราโรคพืชในขณะเดียวกันราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพถูกนำมาประเมินความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ผลการทดสอบพบว่า ราเอนโดไฟต์จำนวน 11 ไอโซเลต มีฤทธิ์ยับยั้งรา *P. palmivora* และ *P. botryosa* แต่พบเพียง 4 ไอโซเลต ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดีที่สุดอย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ให้ค่า PGIR ≥ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำรามานำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และนำส่วนอาหารเลี้ยงรามาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท พบว่าสารสกัดจากรา *Fusarium verticillioides* (FL033) สามารถยับยั้งราก่อโรคทั้ง *P. palmivora* และ *P. botryosa* ได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัด 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 91.56 และ 87.50 ตามลำดับ ในขณะที่ราเอนโดไฟต์ดังกล่าว

¹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมดิจิทัล มหาวิทยาลัยทักษิณ พัทลุง 90000

¹ Department of Basic Science and Mathematic, Faculty of Science and Digital Innovation, Thaksin University, Phatthalung, Thailand 90000

*ผู้ติดต่อประสานงาน (Corresponding author) e-mail: preuttiorn@tsu.ac.th

สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง carboxy methyl cellulose agar (CMC agar) มีค่า Hydrolysis capacity (HC) เท่ากับ 1.85 จากนั้นประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ทุก 3 วัน เป็นเวลาทั้งหมด 18 วัน พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุดในวันที่ 12 เท่ากับ 0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์จากบัวหลวงและบัวสายเป็นแหล่งของสารยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดี

คำสำคัญ: ราเอนโดไฟต์ การควบคุมโดยชีววิธี ราก่อโรคพืช

ABSTRACT

This research aims to evaluate the capability of fungal endophyte from *Nelumbo nucifera* and *Nymphaea lotus* for anti-plant pathogenic fungi (*Phytophthora palmivora* and *Phytophthora botryosa*) by dual culture plate method. The active isolates of endophytic fungi were selected by percent inhibition of radial growth and their extracts were evaluated for antifungal activity. Meanwhile, the best active isolate was evaluated on the cellulase production and cellulase activity. The results revealed that eleven isolates of endophytic fungi showed the antifungal activity against *P. palmivora* and *P. botryosa* but only four isolates exhibited strong activity against at least one fungal plant pathogen with PGIR $\geq$ 70%. After that, four active isolates of endophytic fungi were cultured in potato dextrose broth (PDB) for 3 weeks and fungal culture broth were extracted with ethyl acetate. The extract of fungus *Fusarium verticillioides* (FL033) gave the strongest activity against both *P. palmivora* (91.56%) and *P. botryosa* (87.50%) with final concentration of extract 5 mg/ml. On the other hand, this isolate exhibited high cellulose producing activity with hydrolytic capacity (1.85) on carboxy methyl cellulose agar (CMC agar). Furthermore, it was analyzed for cellulase activity every 3 days for 18 days. The highest cellulase activity was found on 12 days at 0.05 Unit/ml. These results indicated that endophytic fungi from aquatic plants (*N. nucifera* and *N. lotus*) are a good source of antifungal activity against fungal plant pathogens.

Keywords: Endophytic fungi; Biocontrol; Plant pathogenic fungi

บทนำ

ราเอนโดไฟต์กลุ่มแรกถูกศึกษาโดย Freeman ในปี ค.ศ. 1904 [1] ราเอนโดไฟต์ชนิดแรกที่พบ คือ *Neotyphodium coenophialum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค “fescue toxicosis” ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง พบราเอนโดไฟต์ในหญ้า *Festuca arundinacea* นอกจากนี้ ราเอนโดไฟต์เป็นแหล่งของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ชนิดต่าง ๆ ที่มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ โดยผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิมากกว่า 4,000 สาร ในปี ค.ศ. 1993 Stierle และคณะ [2] ค้นพบสาร taxol ที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์ *Taxomyces andreanae* ที่แยกจากเปลือกของสนแปซิฟิก *Taxus brevifolia* โดยสารชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาราเอนโดไฟต์จนถึงปัจจุบัน หากแบ่งพืชที่นิยมนำมาศึกษาความหลากหลายหรือแยกราเอนโดไฟต์ พบว่าพืชส่วนใหญ่เป็นกลุ่มพืชสมุนไพร 35 เปอร์เซ็นต์ พืชทาง

การเกษตร 29 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พืชกลุ่มอื่นๆ 18 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งพืชในบริเวณที่จำเพาะ 18 เปอร์เซ็นต์ เมื่อรวมพืชอื่น ๆ และพืชในบริเวณที่จำเพาะแล้วมีเพียง 36 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาราดินไรต์ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในพืชบก (terrestrial plants) เมื่อดูภาพรวมการศึกษาราดินไรต์ในประเทศไทยพบว่ายังมีการศึกษาไม่มากนัก จากการศึกษาดินไรต์ พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราดินไรต์ที่แยกได้ทั้งฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง [3-6] จนปัจจุบันนักวิจัยพยายามหาแหล่งพื้นที่และกลุ่มพืชใหม่ๆ ที่ยังไม่มีมีการสำรวจหรือยังมีการรายงานน้อย ซึ่งคาดหวังว่าจะเป็นแหล่งของราดินไรต์หลากหลายสปีชีส์ และพบราดินไรต์ที่มีศักยภาพในการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่น่าสนใจ

ราดินไรต์หลายสกุลสามารถต้านทานจุลินทรีย์ก่อโรคพืช *Phytophthora*, *Puccinia*, *Fusarium* และ *Colletotrichum* เช่น *Pyrocladines* A, B ผลิตจากราดินไรต์ *Acremonium zeae* สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชหลายสปีชีส์ ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* และ *Pyricularia oryzae* [7-11] นอกจากนี้ *Botryosphaeria quercuum* และ *Trichoderma viride* ราดินไรต์ที่แยกได้จากโกโก้ *Theobroma cacao* L. สามารถยับยั้งราโรคพืชได้ดี โดย *B. quercuum* สามารถยับยั้ง *Phytophthora palmivora* และ *Moniliophthora roreri* ได้โดยให้ค่าการยับยั้งที่ 82.3 เปอร์เซ็นต์และ 80.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งราสองสปีชีส์นี้เป็นสาเหตุของโรคที่พบบ่อยในโกโก้ คือ *P. palmivora* ก่อโรค black pod และ *M. roreri* ก่อโรค frosty pod rot [12]

นอกจากนี้จากผลการศึกษาของ พงษ์ฤทธิ์ และอุมมี ในปี พ.ศ. 2561 [13] ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากราดินไรต์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคไหม้ของข้าว *Magnaporthe oryzae* โดยนำราดินไรต์ที่แยกได้จากบัวสายมาเลี้ยงในอาหารเหลว จากนั้นสกัดสารจากส่วนของอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงราด้วยเอทิลอะซิเตท พบว่าสารสกัดจากราดินไรต์ *Exerohilum* sp. สามารถยับยั้ง *M. oryzae* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Silveira และคณะ ในปี 2020 [14] พบว่าราดินไรต์ *Botryobambusa fusicoccum* ที่แยกจาก *Bambusa aldamii* สามารถยับยั้งราก่อโรคพืช *Pyricularia oryzae* (ระยะ Telemomorph ของ *M. oryzae*) ได้ดี โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งถึง 96 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่คัดแยกราดินไรต์จากข้าว *Oryza sativa* L. และนำมาทดสอบเพื่อดูการยับยั้งราสาเหตุโรคข้าว 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Magnaporthe grisea*, *Fusarium* sp. FSK1, *Fusarium* sp. FSK2, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lutana* และ *Rhizoctonia solani* พบว่าราดินไรต์ *Trichoderma harzianum* สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคข้าวได้ทุกชนิด มีค่าการยับยั้งมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่า *T. harzianum* สามารถผลิตเอนไซม์ chitinase ย่อยไคติน (chitin) protease ย่อยโปรตีน (protein) และ cellulase ย่อยเซลลูโลส (cellulose) ยับยั้งราก่อโรคได้ และผลิต indole-3-acetic acid เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชซึ่งเป็นกลไกทางอ้อมได้อีกด้วย[15]

จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีรูปแบบการศึกษาและการค้นหาศักยภาพของราดินไรต์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืชทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและแปลงปลูก หรือที่เรียกว่าการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) เพื่อลดการใช้สารเคมีซึ่งเป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภค โดยนิยามความหมายของการป้องกันโรคพืชโดยชีววิธี คือ การใช้จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตทำให้โรคพืชลดลง และสามารถลดความรุนแรงของโรคพืชได้ในสภาพแวดล้อมนั้น ดังนั้นราดินไรต์สามารถลดปริมาณของโรคพืชหรือปริมาณของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชได้ ซึ่งอาจเป็นผลทางตรงหรือทางอ้อม โดยการชักนำจุลินทรีย์หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดเข้าไปยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช อย่างไรก็ตามการควบคุมโรคพืชไม่สามารถกำจัดเชื้อให้หมดลงได้แต่ช่วยลด

ปริมาณของจุลินทรีย์ไม่ให้อัตราการเติบโตที่ก่อให้เกิดความเสียหายได้ ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศที่มีสภาพอากาศร้อนชื้นเหมาะแก่การทำการเกษตร เช่น ปลูกข้าว ยางพารา ผักและผลไม้ เป็นต้น ซึ่งอาชีพเกษตรกรรมเป็นอาชีพของคนไทย นอกจากมีการจำหน่ายเพื่อการบริโภคภายในประเทศแล้ว ยังมีการส่งออกไปยังต่างประเทศ แต่พบว่าปัจจุบันมีปัญหาเรื่องโรคพืช ทำให้เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีในการฉีดพ่นในปริมาณมาก ซึ่งปัจจุบันเห็นว่าผู้บริโภคหันมาให้ความสนใจกับผลผลิตทางการเกษตรที่ปลอดภัยและมีคุณภาพมากขึ้น นักวิจัยจึงให้ความสนใจในการแสวงหาแหล่งทางเลือกในการลดการใช้สารเคมี โดยสามารถจำกัดหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาศักยภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชน้ำ (บัวหลวงและบัวสาย) และยังมีรายงานไม่มากนักในการยับยั้งราก่อโรคพืช 2 สายพันธุ์ คือ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ซึ่งเป็นราก่อโรคพืชในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด โดยผลจากการศึกษานี้จะสามารถใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการศึกษาต่อเพื่อกำจัดราก่อโรคพืชและลดการใช้สารเคมี และหลีกเลี่ยงอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภคตลอดจนสิ่งแวดล้อมต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ราเอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ได้จากงานวิจัยก่อนหน้าของคณะผู้ทำการวิจัยราเอนโดไฟต์จากบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) และ บัวสาย (*Nymphaea lotus*) [16-17] ซึ่งเก็บตัวอย่างจากพื้นที่จังหวัดพัทลุง และแยกราเอนโดไฟต์โดยนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาและกำจัดจุลินทรีย์อื่นๆ ด้วยชุดสารละลายเอทานอล โซเดียมไฮโปคลอไรท์ เอทานอล และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ตามลำดับ โดยงานวิจัยนี้คัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่สามารถจัดจำแนกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือวิธีทางชีวโมเลกุล จำนวนทั้งหมด 11 ไอโซเลต ดังนี้ ราเอนโดไฟต์จากบัวหลวงจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Curvularia* sp. (FL014), *Curvularia geniculata* (FL020), *Fusarium verticillioides* (FL033) และ *Penicillium sclerotiorum* (FL048) ราเอนโดไฟต์จากบัวสายจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ *Nigrospora* sp. 5 ไอโซเลต (TSU-WPF023, TSU-WPFS025, TSU-WPFS043, TSU-WWF016 และ TSU-WWF018), *Curvularia* sp. (TSU-WPF014) และ *Pestalotiopsis* sp. (TSU-WWLS022) จากนั้นนำตัวอย่างราทั้งหมดมาเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) สังเกตการเจริญของราบนจานอาหารทุกวันภายใต้กล้องสเตอริโอไมครอสโคป และบันทึกผลการเจริญของราโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีจนราเจริญเต็มจานอาหารและบันทึกผล

2. การคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora* spp. โดยวิธี dual culture plate

นำราเอนโดไฟต์ที่ได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลต มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืช 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการการวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. palmivora* และ *P. botryosa* โดยวิธี dual culture plate โดยเลี้ยงราบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะรอบโคโลนีของราก่อโรคพืชนำไปวางบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร และด้านตรงข้ามวางราเอนโดไฟต์ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะรอบโคโลนีของราเอนโดไฟต์ นำไปวางบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตรเช่นกัน ส่วนชุดควบคุมวางขึ้นตัวอย่างราก่อโรคพืชบริเวณตรงกลางของจานอาหาร นำจานทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วัดรัศมีมีการเจริญของโคโลนีรา และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Percent Inhibition of Radial Growth (PIRG) ดังนี้

PIRG เท่ากับ $[(R1 - R2) / R2] \times 100$

โดย R1 คือ ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม

R2 คือ ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดทดสอบ

จากนั้นนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคพืช โดยประเมินความสามารถในการยับยั้งดังนี้

PIRG เท่ากับหรือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ หมายถึง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง

PIRG เท่ากับ 51 ถึง 69 เปอร์เซ็นต์ หมายถึง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง

PIRG น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หมายถึง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

จากนั้นคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่สามารถยับยั้งราก่อโรคพืช โดยให้ค่า PIRG มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปทดสอบในขั้นต่อไป

3. การเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหารเหลวเพื่อสกัดสาร

นำราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงจากการทดสอบก่อนหน้า โดยเตรียมอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อโดยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และใช้มีดผ่าตัด จุ่ม 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ และผ่านไฟ จากนั้นตัดตัวอย่างราเอนโดไฟต์บนจานอาหาร PDA ให้มีขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร ใช้เข็มเย็บชิ้นตัวอย่างราลงในฟลาสก์จำนวน 5 ชิ้นต่อฟลาสก์ จากนั้นนำฟลาสก์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นนำตัวอย่างรามารองเพื่อเก็บส่วนของน้ำเลี้ยงราในฟลาสก์ และสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทในสัดส่วนตัวอย่างและตัวสกัด 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมนโซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรส์ (Na_2SO_4) และทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ของเหลวหนืด จะได้สารสกัดจากส่วนน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ (broth ethyl acetate; BE)

4. การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายมาละลายด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเก็บเป็นสต็อกของสารสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นเจือจางต่อด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับราทดสอบต่อไป

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งราโรคพืช

นำสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่เตรียมไว้ มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และเทในจานอาหารปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัด 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุมเชิงบวกจะใช้สารเคมีสำหรับกำจัดราโรคพืช Propiconazole ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารเคมี Cabendazim ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชุดควบคุมเชิงลบ ใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO โดยนำอาหาร 5 มิลลิลิตร ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO จากนั้นใช้ cork borer เจาะขอบโคโลนีของราโรคพืชมาวางตรงกลางของจานอาหารที่เตรียมไว้ และนำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

7 วัน เมื่อครบกำหนดวัดขนาดรัศมีของโคโลนีราโรคพืช เทียบกับจานอาหารที่มีราก่อโรคพืชบนอาหาร PDA ที่ไม่ผสมยาหรือสารสกัด และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ [18] ดังนี้

Percentage growth inhibition เท่ากับ $100 - [(R^2/r^2) \times 100]$

R หมายถึง ความยาวรัศมีของโคโลนีราในชุดทดสอบ

r หมายถึง ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารใด ๆ

6. การศึกษาความสามารถของราเอนโดไฟต์ในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์
เลี้ยงราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งราก่อโรคพืชบนอาหาร PDA จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะปลายเส้นใยของราบนอาหาร PDA จากนั้นใช้เข็มเขี่ยขึ้นตัวอย่างวางบนอาหาร Carboxy Methyl Cellulose Agar (CMC) และนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการย่อยเซลลูเลสโดยเทสารละลาย Congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วมอาหารทิ้งไว้ 30 นาที และเทสารละลาย Congo red ออก จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ตามด้วยเทสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออีกครั้ง สังเกตวงใสรอบ ๆ โคโลนีของราเอนโดไฟต์ จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณวงใสที่เกิดขึ้นและบันทึกผล เพื่อหาค่า Hydrolysis capacity (HC) ดังนี้ $HC = \text{ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)} / \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราเอนโดไฟต์ (เซนติเมตร)}$

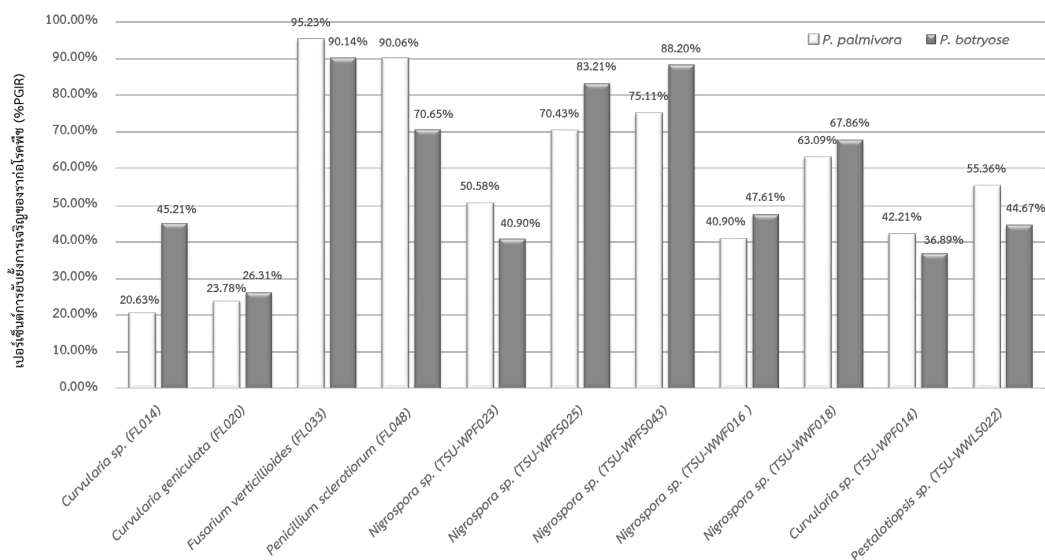
นำราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว carboxy Methyl Cellulose broth (CMC broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงราทุก 3 วัน จนครบ 18 วัน ทั้งหมด 6 ครั้ง โดยดูดน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดและนำไปปั่นที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) นำส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำในสารละลาย CMC ที่ละลายใน Sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเติม DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยา โดยแช่ในน้ำเย็นทันที ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส จากนั้นนำค่า OD ที่วัดได้ไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ที่มีในหนึ่งหน่วยต่อมิลลิลิตร โดยใช้สูตรดังนี้ กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร) เท่ากับ $[\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เทียบได้กับกราฟมาตรฐาน} \times 10^{-3}] / \text{เวลาในการบ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาณสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}$

ผลการวิจัย

1. ศักยภาพของราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชด้วยวิธี dual culture plate

จากผลการศึกษาศักยภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากบัวหลวงและบัวสายทั้งหมด 11 ไอโซเลต ในการยับยั้งราก่อโรคพืชจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *P. palmivora* และ *P. botryosa* พบว่าราเอนโดไฟต์ทั้ง 11 ไอโซเลต สามารถยับยั้งราก่อโรคได้ทั้ง 2 ไอโซเลต โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง PIRG ซึ่งสามารถจัดกลุ่มของราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ 3 กลุ่ม ดังนี้ ราเอนโดไฟต์ที่สามารถยับยั้งทั้ง *P. palmivora* และ *P. botryosa* ได้ในระดับต่ำ แสดงค่า PIRG น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่

Curvularia sp. (FL014), *Curvularia geniculata* (FL020), *Nigrospora* sp. (TSU-WWF016) และ *Curvularia* sp. (TSU-WPF014) และราเอนโดไฟต์ *Nigrospora* sp. 1 ไอโซเลต (TSU-WWF018) ยับยั้งทั้ง *P. palmivora* และ *P. botryosa* ได้ในระดับปานกลาง แสดงค่า PIRG น้อยกว่าหรือเท่ากับ 50-69 เปอร์เซ็นต์ และราเอนโดไฟต์จำนวน 2 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งทั้ง *P. palmivora* และ *P. botryosa* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *F. verticillioides* (FL033) และ *Penicillium sclerotiorum* (FL048), *Nigrospora* sp. (TSU-WPFS025) และ *Nigrospora* sp. (TSU-WPFS043) แสดงค่า PIRG มากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ศักยภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากบัวหลวงและบัวสายในการยับยั้ง *P. palmivora* และ *P. botryosa* ที่ทดสอบด้วยวิธี dual culture

2.ฤทธิ์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

จากผลการทดสอบศักยภาพของราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชเบื้องต้น พบว่าราเอนโดไฟต์จำนวน 4 ไอโซเลต จากทั้งหมด 11 ไอโซเลต คิดเป็น 36.36 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง ดังนั้นจึงศึกษาสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลต โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต *F. verticillioides* (FL033) สามารถยับยั้งราก่อโรคพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 91.56 และ 87.50 ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากราเอนโดไฟต์อีก 3 ไอโซเลตที่เหลือยับยั้งได้เพียง 1 ไอโซเลต โดยไอโซเลต *P. sclerotiorum* (FL048) สามารถยับยั้งได้เพียง *P. palmivora* ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 88.84 และราเอนโดไฟต์ ไอโซเลต TSU_WPF025 และ TSU_WPF043 สามารถยับยั้ง *P. botryosa* ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 80.36 และ 85.21 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

Research Article

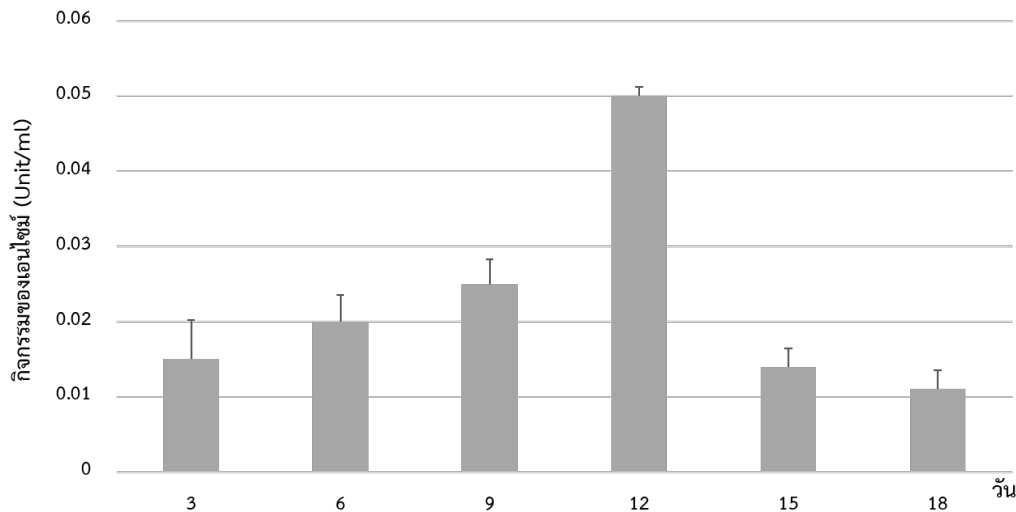
Journal of Vocational Education in Agriculture Vol. 8 ● No. 1 • January – June 2024

ตารางที่ 1ฤทธิ์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งราก่อโรคพืช

สารสกัด	ราก่อโรคพืช	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
		5 mg/ml	1 mg/ml	200 µg/ml
FL033 (<i>F. verticillioide</i> s)	<i>P. palmivora</i>	91.56	<50	-
	<i>P. botryose</i>	87.50	<50	<50
FL048 (<i>P. sclerotiorum</i>)	<i>P. palmivora</i>	88.84	<50	<50
	<i>P. botryose</i>	<50	<50	<50
TSU_WPF025 (<i>Nigrospora</i> sp.)	<i>P. palmivora</i>	<50	<50	<50
	<i>P. botryose</i>	80.36	<50	<50
TSU_WPF043 (<i>Nigrospora</i> sp.)	<i>P. palmivora</i>	<50	<50	-
	<i>P. botryose</i>	85.21	<50	<50
สารเคมี	ราก่อโรคพืช	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
Propiconazole (25 mg/ml)	<i>P. palmivora</i>	100		
	<i>P. botryose</i>	100		
Cardendazim (50 mg/ml)	<i>P. palmivora</i>	100		
	<i>P. botryose</i>	99.36		
1 เปอร์เซ็นต์ DMSO	<i>P. palmivora</i>	-	-	-
	<i>P. botryose</i>	-	-	-

3. ความสามารถของราเอนโดไฟต์ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและกิจกรรมของเอนไซม์

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของราเอนโดไฟท์ทั้ง 4 ไอโซเลต พบว่าราเอนโดไฟท์เพียง 1 ไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ บนอาหาร CMC agar พบว่ามีค่า HC เท่ากับ 1.85 จากนั้นวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยเลี้ยงราในอาหาร CMC broth และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ทุก 3 วัน จนครบ 18 วัน ได้แก่วันที่ 3 6 9 12 และ 18 ผลการวิเคราะห์พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 12 เท่ากับ 0.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 กิจกรรมของเอนโดไซม์เซลล์จากราเอนโดไฟต์ไอโซเลต FL033 *Fusarium verticillioides*

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยศึกษาภาพของราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งราโรคพืชได้รับความสนใจและมีการศึกษาจำนวนมาก ซึ่งกระบวนการยับยั้งราโรคพืช เช่น การแย่งอาหารและพื้นที่ของราโรคพืช การหลั่งสารเมแทบอลิต์ออกมาทำลายราโรคพืช การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อราโรคพืช และการสร้างเส้นใยพันรัดราโรคพืชและปล่อยเอนโดไซม์ออกมาย่อยสลายผนังเส้นใยราโรคพืช เป็นต้น

มีรายงานการทดสอบศักยภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชหลายแหล่งทั้งพืชบกและพืชน้ำเบื้องต้นโดยวิธีการเพาะเลี้ยง โดยจิตรา และคณะในปี พ.ศ. 2550 [19] ศึกษาราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากสมุนไพรจำนวน 13 วงศ์ 15 ชนิด ได้แก่ กระวาน กระชายขาว ราชพฤกษ์ ไคร้เกรง ค้อนตีหมา เตยหนาม นาวน้ำ โกรฐจุฬาลำพา ทับทิม ตะขบป็น ก้วย ผักหวานใหญ่ ผ่างส้ม ชะเอมเถา เถาตดหมุดตดหมา และส้มกุ่ม ผลการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของราโรคพืชจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้โดยการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Alternaria alternate*, *Bipolaris maydis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *P. palmivora* และ *Sclerotium rolfsii* จากผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ที่พบว่าราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis* sp. (TSU-WWLS022) สามารถยับยั้ง *P. palmivora* ได้ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 55.36 แต่อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบในงานวิจัยนี้ใช้วิธี dual culture โดยมีราเอนโดไฟต์และราก่อโรคพืชอย่างละ 1 จุดบนอาหาร ขณะที่งานวิจัยก่อนหน้านี้ทดสอบบนอาหาร PDA และวางราเอนโดไฟต์ 1 จุดที่มุมด้านหนึ่งของจาน และวางราก่อโรคพืชจำนวน 3 จุด โดยแต่ละจุดห่างจากราเอนโดไฟต์ 0.5 1.0 และ 1.5 เซนติเมตร วิธีการทดสอบที่ต่างกันอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้ง นอกจากนี้ยังมีรายงานศักยภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเนื้อไม้ยางพาราในการยับยั้ง *P. palmivora* และ *P. botryosa* โดย กาญจนา ในปี พ.ศ. 2557 [20] พบว่าราเอนโดไฟต์ *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* ได้ตั้งแต่ 70.36 – 90.71 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้ง *P. botryosa* ได้ 72.14–85.71 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าราเอนโดไฟต์ *Trichoderma* spp. สามารถผลิตเอนโดไซม์เซลล์

บนอาหาร CMC agar ซึ่งวัดค่าวงใสได้ 21.00-24.25 มิลลิเมตร โดยเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในงานวิจัยนี้พบว่า ราเอนโดไฟต์ *F. verticilliioides* (FL033) สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC agar ซึ่งวัดค่าวงใสได้ 50 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบการผลิตเอนไซม์บนอาหาร CMC agar เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น ประกอบกับราเอนโดไฟต์ที่ทดสอบเป็นราต่างสายพันธุ์และแยกได้จากพืชต่างชนิดกัน จึงมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ได้แตกต่างกัน

นอกจากนี้มียางงานการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ โดย กมลวรรณ และคณะ ในปี พ.ศ. 2557 [21] ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทั้งหมด 10 ชนิด ด้วยวิธี dilution plate ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ *Talaromyces trachyspermus* (KUFA35) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งราก่อโรคพืช โดยสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* และ *C. gloeosporioides* ได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 1,000 ppm ขณะที่ราเอนโดไฟต์ *Nigrospora* sp. (KUFA51) ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันสามารถยับยั้ง *P. palmivora* ได้เพียง 42.96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลการทดสอบเห็นได้ว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟต์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้ดีและสอดคล้องกับผลงานวิจัยนี้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ ชูติมา และคณะ ในปี พ.ศ. 2557 [22] ศึกษาประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์จากโสนในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ผลการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟต์ *Phomopsis* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์

นอกจากราเอนโดไฟต์สามารถผลิตสารเมแทบอลิไต์ในการยับยั้งราก่อโรคพืชแล้ว หนึ่งในกลไกการยับยั้งที่สำคัญของราเอนโดไฟต์คือการผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยราสาเหตุโรคพืช มีการรวบรวมรายงานความสามารถของราเอนโดไฟต์ในการผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์ xylanase, engoglucanase, lipase, amaylase, protease, phytase, amylase และ cellulase เป็นต้น โดยองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์ราคือ cellulose ซึ่งเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรต ดังนั้นในงานวิจัยนี้นอกจากทดสอบประสิทธิภาพของสารเมแทบอลิไต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์แล้วยังทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ cellulase ด้วยซึ่งอาจเป็นหนึ่งกลไกในการยับยั้งราก่อโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ Liu และคณะ ในปี ค.ศ. 2021 [23] รายงานว่าราเอนโดไฟต์ในจีนัส *Fusarium* สามารถผลิตเอนไซม์ cellulase ได้ดี ได้แก่ *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. striatum* และ *F. solanai* สอดคล้องกับรายงานรวบรวมงานวิจัยล่าสุดของ Bhadra และคณะในปี ค.ศ. 2022 [24] รายงานว่าราเอนโดไฟต์ *F. oxysporum* สามารถผลิตเอนไซม์ cellulase ได้ และในปี ค.ศ. 2022 Helai และคณะ [25] รายงานว่ารา *F. verticilliioides* (AUMC 14361) เป็นรา 1 ใน 3 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ cellulase ได้สูง สอดคล้องกับผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ที่พบว่าราเอนโดไฟต์ *F. verticilliioides* (FL033) สามารถผลิตเอนไซม์ cellulase ได้

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์มีศักยภาพในการยับยั้งราโรคพืชได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ อนันต์ วงเจริญ ในปี พ.ศ. 2557 [15] เกี่ยวกับบทบาทของราเอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากราสาเหตุ โดยกลไกในการควบคุมได้แก่ การกระตุ้นความต้านทานโรคของพืชโดยราเอนโดไฟต์ การครอบครองพื้นที่หรือแย่งชิงพื้นที่ของราสาเหตุโรคพืช การเป็นปรสิตต่อราสาเหตุโรคพืชโดยเส้นใยพันรัดหรือเกาะราสาเหตุโรคและปล่อยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยผนังเซลล์ของราสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้อีกหนึ่งกลไกคือการสร้างสารเมแทบอลิไต์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช เห็นได้ว่าราเอนโดไฟต์อาจสามารถยับยั้งราก่อโรคพืชได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งในอนาคตอาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นสารที่ใช้ทางการเกษตรเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี มีการประมาณการว่ามีราประมาณ 300 สปีชีส์ เป็นสมาชิกใน 113 จีนัส เป็นราควบคุมโรคพืช (fungal biocontrol agents) สามารถใช้ควบคุมราโรคพืช (plant fungal pathogens) ได้

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคพืชที่มีจำหน่ายทางการค้าซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากรา เช่น ผลิตภัณฑ์ควบคุมโรครากเน่า (root rot disease) ผลิตได้จากรา *Phlebiopsis gigantea* (ชื่อทางการค้า Rotstop®), *Trichoderma harzianum* (ชื่อทางการค้า RootShield®) และ *Trichoderma polysporum* (ชื่อทางการค้า Binab T) และผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคราแป้ง (powdery mildew disease) ผลิตจากรา *Ampelomyces quisqualis* (ชื่อทางการค้า AQ10® Bio Fungicide) และ *Anthracozytis flocculosa* (ชื่อทางการค้า Sporodex L) เป็นต้น [26] ดังนั้นผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลสำคัญและเป็นแนวทางในการศึกษาหรือการใช้ประโยชน์จากราเอนโดไฟต์ โดยราเอนโดไฟต์เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชต่อไป

References

- [1] Freeman, E. M. (1904). The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L., the darnel. *Proceeding of the royal society of London*, 71, 467–476.
- [2] Stierle, A., et al. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260(5105), 214-216.
- [3] Sakayaroj, J., et al. (2010). Phylogenetic diversity of endophyte assemblages associated with the tropical seagrass *Enhalus acoroides* in Thailand. *Fungal diversity*, 42(1), 27-45.
- [4] Supaphon, P., et al. (2013). Antimicrobial potential of endophytic fungi derived from three seagrass species: *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii*, *Plos One*, 8(8):e72520.
- [5] Supaphon, P., et al. (2014). Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from the seagrass *Enhalus acoroides*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 43(5), 785-797.
- [6] Supaphon, P., et al. (2018). Isolation and antimicrobial activities of fungi derived from *Nymphaea lotus* and *Nymphaea stellata*. *Mycoscience*, 59(5), 415- 423.
- [7] Zabalgoitia, I. (2008). Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6, 138-146.
- [8] Gao, F., et al. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4(1), 1346-1351.
- [9] Comby, M., et al. (2016). Spatial and temporal variation of cultivable communities of co-occurring endophytes and pathogens in wheat. *Frontiers in Microbiology*, 7, 403.
- [10] Murphy, B. R., et al. (2018). From concept to commerce: developing a successful fungal endophyte inoculant for agricultural crops. *Journal of Fungi*, 4 (24), 1-11,
- [11] De Silva, N. I., et al. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33, 133-148.
- [12] Villamizar-Gallardo, R. A., et al. (2017). Symbiotic and endophytic fungi as biocontrols against cocoa (*Theobroma cacao* L.) phytopathogens. *Summa Phytopathologica*, 43(3), 87-93.

- [13] Supaphon, P. & Kwaengbu, U. (2018). Efficiency of fungal endophyte to inhibit rice blast pathogen. *Thai Science and Technology Journal*, 26(2), 266-278. (in Thai)
- [14] Silveira, A. A. C., et al. (2020). Isolation, identification and characterization of endophytic fungi of *Bambusa oldhamii munro* applied as antagonists to *Pyricularia oryzae*. *Revista ceres*, 67(4), 296-305.
- [15] Wongcharoen, A. (2014). Roles of endophytic fungi in plant disease control. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 42(4), 623-634. (in Thai)
- [16] Supaphon, P. (2014). *Distribution and antimicrobial potential of endophytic fungi associated with Nymphaea spp. (waterlily) in Thale noi, Phattalung, Thailand*. Phattalung: Faculty of Science, Thaksin University. (in Thai)
- [17] Supaphon, P., et al. (2018). Antimicrobial and antioxidant activities of extracts from fungal endophytes and their host plant (*Nelumbo nucifera*). *Thai Science and Technology Journal*, 26(1), 136-154. (in Thai)
- [18] Plodpai, P., et al. (2013). *Desmo chinensis*: A new candidate as natural antifungicide to control rice disease. *Industrial Crops and Products*, 42, 324-331.
- [19] Kokaew, J., et al. (2007). Endophytic fungi in medicinal plant and studies on antagonistic effect against plant pathogenic fungi *in vitro*. In *The 45th Kasetsart University Annual Conference* (p. 571 – 578). 30 January – 2 February, 2007, Bangkok, Thailand. (in Thai)
- [20] Maneesri, K. (2014). Screening of endophytic *Trichoderma* spp. From sapwood of rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) for biological control of *Phytophthora palmivora* (Butler) and *P. botryosa* (Chee). (Master thesis, Prince of Songkla University). (in Thai)
- [21] Sreeta, K. et al. (2014). Antifungal activities of the crude extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants against phytopathogenic fungi *in vitro*. In *The 52th Kasetsart University Annual Conference* (p. 372 - 379). 4-7 February, 2014, Bangkok, Thailand. (in Thai)
- [22] Kaewkrajay, C., et al. (2014). Efficacy of endophytic fungi isolated from *Sesbania javanica* against plant pathogenic fungi, *Khon Kaen Agriculture Journal*, 42(3), 271-282. (in Thai)
- [23] Liu, X., et al. (2021). Biotransformation ability of endophytic fungi: from evolution to industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 7095-7113.
- [24] Bhadra, F., et al. (2022). Endophytic fungi: a potential source of industrial enzyme producers. *Biotech*, 12(86), 1-17.
- [25] Helal, G. A., et al. (2022). Studies on cellulases of some cellulose-degrading soil fungi. *Archives of Microbiology*, 204(65), 1-16.

- [26] Thambugala, K. M., et al. (2020). Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10, 604923.