

ประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าว

Efficiency of Fungal Endophyte to Inhibit Rice Blast Pathogen

พฤทธิกร ศุภพล* และอุมมี แวงงบุ

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110

Preuttiporn Supaphon* and Ummee kwaengbu

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung Campus,

Ban Phrao, Pa Payom, Phatthalung 93110

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจศักยภาพของราเอนโดไฟท์จากบัวสาย และสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ในการควบคุม *M. oryzae* ราก่อโรคไหม้ของข้าว และจัดจำแนกราที่มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล แยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 40 ไอโซเลท จากบัวสายจำนวน 300 ชิ้นตัวอย่าง และจัดจำแนกราเอนโดไฟท์โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากนั้นคัดเลือกราเอนโดไฟท์ 17 ไอโซเลท จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา บนอาหาร potato dextrose agar และทดสอบฤทธิ์ต้าน *M. oryzae* 8 สายพันธุ์ โดยวิธี dual culture plate พบราเอนโดไฟท์ 4 ไอโซเลท (LW_FS055, LW_L027, LP_LS026 และ LW_L002) มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *M. oryzae* สายพันธุ์ 33 (มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นเลี้ยงราเอนโดไฟท์ทั้ง 4 ไอโซเลท ในอาหาร potato dextrose broth เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และสกัดสารด้วยเอทิลอะซิเตท นำสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่แสดงศักยภาพในการยับยั้งมาประเมินฤทธิ์ต้านราก่อโรคพืชด้วยวิธี agar dilution plate ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 5, 1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าที่ความเข้มข้น 5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากไอโซเลท LP_LS026 สามารถยับยั้ง *M. oryzae* 33 สาเหตุโรคไหม้ของข้าวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และราไอโซเลทนี้ ถูกจัดจำแนกโดยข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS ได้เป็น *Exserohilum* sp. (รหัสนิวคลีโอไทด์ KY024593) จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกจากบัวสายสามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคไหม้ของข้าวและเป็นแหล่งของสารควบคุมทางชีวภาพที่ดี

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟท์; โรคไหม้ของข้าว; *Magnaporthe oryzae*

Abstract

This research aimed to investigate the potential of fungal endophytes from *Nymphaea lotus* and their crude extracts to control *M. oryzae*, the pathogen that cause rice blast disease and

identified the most effective of these fungi by using molecular technique. A total of 40 fungal isolates were obtained from 300 segments of *N. lotus* and identified based on their morphological characteristics. Seventeen isolates were selected from their morphological appearance on potato dextrose agar and tested for their antagonistic potential against eight strains of *M. oryzae* by dual culture plate method. Four fungal isolates (LW_FS055, LW_L027, LP_LS026 and LW_L002) showed very strong inhibitory action (> 85 % inhibition) over the growth of *M. oryzae* 33 during dual culture assay. Then, these active isolates were cultured in potato dextrose broth for 3 weeks and extracted with ethyl acetate. The extracts of the most potential isolates were also evaluated for antifungal activity against plant pathogens by using agar dilution plate method at final concentration of 5, 1 and 0.2 mg/ml, respectively. At 5 and 1 mg/ml, extract from isolate LP_LS026 exhibited 100 % growth inhibition against *M. oryzae* 33. The most active isolate (LP_LS026) was identified based on their nucleotide sequences of ITS region as *Exserohilum* sp. (accession number KY024593). The result could be concluded that endophytic fungi isolated from *N. lotus* exhibited growth inhibition to rice blast fungus and could be a good source of biocontrol agent.

Keywords: endophytic fungi; rice blast disease; *Magnaporthe oryzae*

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม เกษตรกรไทยปลูกข้าวเป็นอาชีพหลักและมีปริมาณการส่งออกข้าวถึง 7.5 ล้านตันต่อปี แต่ปริมาณการส่งออก ลดลงและผลผลิตเสียหายโดยมีสาเหตุหลายประการ และหนึ่งในสาเหตุที่สำคัญ คือ โรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ [1,2] โรคไหม้ของข้าวมีการระบาดทั่วทุกภาคของ ประเทศไทยโดยมีรา *Magnaporthe oryzae* เป็นเชื้อ สาเหตุ เกษตรกรพยายามควบคุมโรคโดยวิธีการต่าง ๆ แต่วิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ การฉีดพ่นและ กำจัดเชื้อสาเหตุด้วยสารเคมี มีรายงานการนำเข้า สารเคมีเพื่อกำจัดโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะรา กว่า 10,000 ตัน รวมมูลค่าถึง 3,839 ล้านบาทต่อปี [3] โดยอัตราการใช้สารเคมีมีเพิ่มมากขึ้นในแต่ละปี สารเคมีเหล่านี้ส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรและ ผู้บริโภค นอกจากนี้ยังตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดย ปริมาณสารเคมีตกค้างมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจและ

ภาพลักษณ์ของประเทศไทย ซึ่งเป็นผู้ส่งออกผลิตผล ทางเกษตรรายใหญ่ของโลก จากปัญหาดังกล่าว หลาย ๆ หน่วยงานจึงได้แสวงหาทางเลือกใหม่เพื่อลด การใช้สารเคมีและแก้ปัญหาอันตรายที่เกิดจากการใช้ สารเคมีทั้งทางตรงและทางอ้อม ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (พืช สัตว์ และจุลินทรีย์) เป็นหนึ่งในทางเลือกที่ น่าสนใจ โดยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้มีความ ปลอดภัยต่อผู้ใช้และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์ เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายและพบได้ทั่วไปใน ธรรมชาติ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่าง รวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีรายงานการนำจุลินทรีย์มา ใช้ประโยชน์ในหลายด้านด้วยกัน โดยเฉพาะด้าน การเกษตร [4-5] ราเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการ ผลิตสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายกลุ่ม โดย การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาราท่ออาศัยอยู่ในดิน โดยราที่แยกได้ส่วนใหญ่ คือ *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. *Fusarium* sp. *Trichoderma* sp.

และ *Rhizopus* sp. นอกจากนี้สารที่แยกได้จากราเหล่านี้ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี [6-10] ดังนั้นนักวิจัยจึงมองหาแหล่งใหม่ของเชื้อที่ยังมีการศึกษาน้อยอยู่หรือยังไม่พบการนำมาใช้ประโยชน์หรือไม่พบการศึกษามาก่อน เพื่อเพิ่มโอกาสในการเจอสารออกฤทธิ์ใหม่ ๆ ที่แยกได้จากรา ปัจจุบันได้มีการศึกษารากลุ่มหนึ่งซึ่งมีความสัมพันธ์และอาศัยภายในเนื้อเยื่อของพืช เรียกว่า ราเอนโดไฟท์ พบว่าสัดส่วนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่มีจำนวนสูงถึง 51 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารออกฤทธิ์ที่แยกจากราในดินมีเพียง 31 เปอร์เซ็นต์ [11] มีการนำราเอนโดไฟท์มาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะนำมาควบคุมโรคพืช พบว่าราเอนโดไฟท์ *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum* และ *Cladosporium cladosporioides* มีสมบัติด้านการเจริญของราก่อโรคพืชหลายสายพันธุ์ (*Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Nigrospora oryzae*, *Phoma sorghina* และ *Alternaria alternata* [12] Park และคณะ [13] ศึกษาราเอนโดไฟท์ในการควบคุม *Magnaporthe* sp. สาเหตุโรคไหม้และ *Corticium sasakii* สาเหตุโรคกาบใบไหม้ของข้าว พบว่าราเอนโดไฟท์ 3 ไอโซเลท (*Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. และ *Paecilomyces* sp.) สามารถยับยั้งการเจริญของราโรคพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้เห็นว่าราเอนโดไฟท์ มีศักยภาพในการยับยั้งราโรคพืชได้ดี ในงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาราเอนโดไฟท์และสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากข้าวสาลี ซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อนเพื่อเป็นแหล่งทางเลือกใหม่ในการยับยั้ง *M. oryzae* ราสาเหตุโรคไหม้ของข้าว โดยผลการศึกษาสามารถใช้เป็นแนวทางในการลดการใช้สารเคมีและอันตรายที่อาจเกิดจากสารเคมี นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาและเพิ่มคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศอีกด้วย

2. วัตถุประสงค์

เพื่อสำรวจศักยภาพของราเอนโดไฟท์และสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากข้าวสาลีในการผลิตสารต้านราโรคไหม้ของข้าวโดย *Magnaporthe oryzae*

3. วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1. ราเอนโดไฟท์และราก่อโรคไหม้ของข้าว

3.1.1 ราเอนโดไฟท์

เก็บตัวอย่างข้าวสาลีแบบสุ่มในเขตพื้นที่จังหวัดพัทลุง จำนวน 20 ต้น นำตัวอย่างใบมาล้างด้วยน้ำสะอาด และตัดตัวอย่างใบขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 300 ชิ้น จากนั้นทำความสะอาดพื้นผิวด้วยชุดของสารละลายเอทานอลและโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (เอทานอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ 3 นาที; โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที; เอทานอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ 3 นาที และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 30 วินาที ตามลำดับ) นำตัวอย่างใบมาซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อวางขึ้นตัวอย่างจำนวน 5 ชิ้น บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) สังเกตและแยกราเอนโดไฟท์ทุกวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยถ่ายเชื้อลงในอาหาร PDA ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ จนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นจัดกลุ่มราเอนโดไฟท์ทั้งหมดที่ได้ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร PDA เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นถัดไป

3.1.2 ราก่อโรคไหม้ของข้าว (*Magnaporthe oryzae*)

ได้รับความอนุเคราะห์ *M. oryzae* จำนวน 8 สายพันธุ์ (*M. oryzae* 17, *Moryzae* 30, *M.oryzae* 32, *M. oryzae* 33, *M. oryzae* 35, *M.*

oryzae 43, *M. oryzae* 50 และ *M. oryzae* 61) จากห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่แยกได้จากโรคไหม้ของข้าวหอมมะลิ

3.2. คัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *M. oryzae* โดยวิธี dual culture plate

ทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของ *M. oryzae* (8 สายพันธุ์) ด้วยวิธี dual culture plate โดยเลี้ยงรา *M. oryzae* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นใช้ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีของราโรคพืชและนำไปวางบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจานอาหาร ประมาณ 2 เซนติเมตร และใช้วิธีเดียวกันตัดขอบโคโลนีของราเอนโดไฟท์และนำไปวางด้านตรงข้ามบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมตัดขอบโคโลนี *M. oryzae* วางตรงกลางของจานอาหาร PDA จากนั้นนำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-14 วัน วัดรัศมีของโคโลนีราบจานทดสอบและจานควบคุม จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอัตราการเจริญ Percent Inhibition of Radial Growth (PIRG) ดังนี้

$$PIRG = [(R_1 - R_2) / R_2] \times 100$$

โดย R_1 คือ ความยาวรัศมีของโคโลนีราก่อโรคในชุดควบคุม; R_2 คือ ความยาวรัศมีของโคโลนีราก่อโรคในชุดทดสอบ และนำค่า PIRG ที่ได้มาประเมินความสามารถในการยับยั้งของอัตราการเจริญ ได้ดังนี้ PIRG มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง PIRG 51 ถึง 74 เปอร์เซ็นต์ = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง และ PIRG น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ จากนั้นคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้ง *M. oryzae* โดย

ให้ค่า PIRG มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ ไปทดสอบในขั้นถัดไป

3.3. การเตรียมสารสกัดจากราเอนโดไฟท์

นำราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพสูง (PIRG มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์) จากการทดสอบ dual culture plate มาเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 พลาสติกต่อราเอนโดไฟท์ 1 ไอโซเลท เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นนำน้ำเลี้ยงรามาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ในสัดส่วนของตัวสกัดและตัวอย่าง 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮไดรส์ (Na_2SO_4) และทำให้แห้งโดยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดน้ำเลี้ยงราที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (broth ethyl acetate, BE) เตรียมส่วนสกัดด้วยไดเมทิลซัลโฟลออกไซด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ในการยับยั้ง *M. oryzae* โดยวิธี agar dilution plate

นำสารสกัดจากราเอนโดไฟท์มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในจานอาหารปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดที่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นใช้ที่เจาะจุกคอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีของ *M. oryzae* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน วางตรงกลางของจานอาหาร PDA ที่เติมสารสกัดและไม่เติมสารสกัด โดยแต่ละชุดการทดลองจะทดลอง 3 ซ้ำ

สำหรับชุดควบคุมเชิงบวกจะใช้โปรพิโคนาโซล (propiconazole) และคาร์เบนดาซิม (cabendazim) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้กำจัดราโรคพืชผสมกับอาหาร PDA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเดียวกับ สารสกัด สำหรับชุดควบคุมเชิงลบ คือ อาหาร PDA ที่ ผสมโดเมทิลซัลฟอกไซด์ ให้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำจานอาหารทั้งหมด ไปต้มที่ อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน วัดปริมาณของโคโลนีบนจานอาหารและคำนวณ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของอัตราการเจริญ (PIRG) ของ สารสกัดและสารเคมีที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลอง dual culture plate

3.5. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *M. oryzae* โดยสารสกัดจากราเอนโดไฟท์และสารเคมี ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variances, ANOVA) และเปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Bonferroni's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม graphpad prism เวอร์ชัน 5.0

3.6. จัดจำแนกราเอนโดไฟท์โดยวิธีทาง ชีวโมเลกุลและวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยวิธี maximum parsimony และวิธี Bayesian inference

คัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพสูงสุด ในการยับยั้ง *M. oryzae* มาจัดจำแนกโดยวิธีทาง ชีวโมเลกุล โดยเลี้ยงราในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองแยก เส้นใยและล้างเส้นใยด้วยน้ำอุ่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนำเส้นใยเก็บในโถงบดยาปราศจากเชื้อที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อ ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี CTAB [14] จากนั้น

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยเจลอิลีกโทรโฟรีซิส แบบอะกาโรส ในบัฟเฟอร์ทีอีเอ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่กำลังไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที ย้อมเจลดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ที่ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดย ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับแถบ ดี เอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซ ในการศึกษานี้เลือกศึกษาบริเวณ ITS (internal transcribed spacer) เพื่อเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเนื่องจากบริเวณนี้สามารถจัดจำแนกได้ใน ระดับจีโนม สปีชีส์ และสายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์สากล และไพรเมอร์จำเพาะ 4 คู่ ประกอบด้วย ITS1F/ITS4 (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA/TCCTCCGCTTAT TGATATGC) ITS5/ITS4 (GGAAGTAAAAGTCGTAAC AAGG/TCCTCCGCTTATTGATATGC) ITS3/ITS4 (G CATCGATGAAGAACGCAGC/TCCTCCGCTTATTGA TATGC) ITS1/ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG/T CCTCCGCTTATTGATATGC) ส่วนผสมและปริมาตร ของปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอร์ส (50 ไมโครลิตร) ประกอบด้วยน้ำนาโนบริสุทธิ์ 38 ไมโครลิตร, 50 มิลลิ-โมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 ไมโครลิตร; บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 เท่า 2.5 ไมโครลิตร; 10 มิลลิโมลาร์ ไดออกซีโรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตทั้ง 4 ชนิด 1.0 ไมโครลิตร; 10 ไมโครโมล ไพร์เมอร์ฟอร์เวิร์ด 1.0 ไมโครลิตร; 10 ไมโครโมล ไพร์เมอร์รีเวิร์ด 1.0 ไมโครลิตร 2 หน่วยต่อไมโครลิตร; แท็ค ดีเอ็นเอพอลิ-เมอร์ส 0.5 ไมโครลิตร และ 100-500 นาโนกรัมของ ดีเอ็นเอแม่แบบ 1.0 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่องของ Bio-Rad MyCycler (Bio-Rad, Hercules, CA) จากนั้น ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาถูกลูโซพอลิเมอร์ส โดยเจลอิลีกโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรส ในบัฟเฟอร์ทีอี อี ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดปฏิบัติการ

สำเร็จรูป (QIAquick PCR purification Kits) จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ที่ซื้อมาไปอ่านลำดับเบสด้วยไพร์เมอร์เดียวกับที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยบริษัท MacroGen Inc., ประเทศเกาหลี วิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) และการจัดจำแนกโดยวิธี maximum parsimony ด้วยโปรแกรม PAUP* 4.0b10 [15] คำนวณค่าทางสถิติต่าง ๆ ประกอบด้วย tree length consistency index (CI) retention index (RI) relative consistency index (RC) homoplasy index (HI) และค่าความเชื่อมั่นบูทสตราป ตามลำดับ และเลือก MPTs (most parsimonious trees) ที่แสดงโทพอโลยี (topology) ที่ดีที่สุด ด้วยวิธีทางสถิติ K-H tests [16] โดยพิจารณาที่ค่าบูทสตราป ซึ่งมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์ ส่วนวิธี Bayesian inference (BI) วิเคราะห์ด้วยวิธี Markov chain Monte Carlo (MCMC) โดยใช้โมเดล (GTR + I + G) ซึ่งได้จากการทดสอบด้วยโปรแกรม MrModeltest 2.2 [17] จากนั้นทดสอบด้วย hierarchical likelihood ratios (hLRTs) (วิเคราะห์ 3,000,000 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างข้อมูล ทุก ๆ 100 ชั่วโมง ที่ 3,000 phylogenetic tree) พิจารณาค่าบูทสตราปที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.95 นอกจากนี้ยังพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์ นำข้อมูลลำดับเบสของราฝากไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อเพิ่มฐานข้อมูลและเป็นประโยชน์ในการศึกษาอื่นในอนาคต

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1. ราเอนโดไฟท์

แยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 40 ไอโซเลทจากจำนวนตัวอย่างใบ 300 ชิ้นตัวอย่าง จัดจำแนกและคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร PDA ได้ราทั้งหมด 17 กลุ่ม

จากนั้นนำตัวแทนของราในแต่ละกลุ่ม จำนวน 17 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) และบันทึกการเจริญของราแต่ละสายพันธุ์ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบนอาหาร PDA ทุกวัน จนกว่าจะเจริญเต็มจานอาหารเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืชโดยวิธี dual culture plate

4.2. คัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *M. oryzae* โดยวิธี dual culture plate

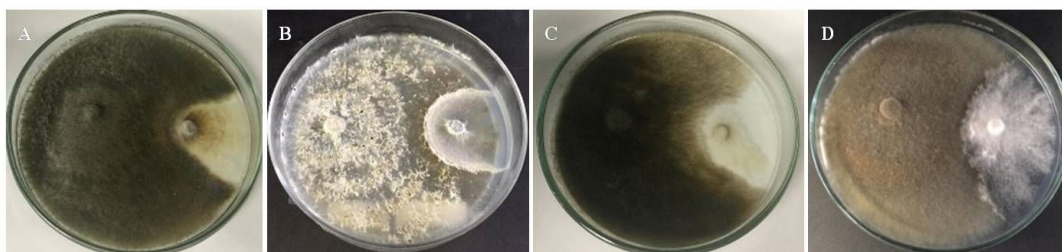
การทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์จำนวน 17 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของ *M. oryzae* จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยวิธี dual culture plate พบว่าราเอนโดไฟท์ จำนวน 4 ไอโซเลท (LW_FS055, LW_L027, LP_LS026 และ LW_L002) มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *M. oryzae* 33 ได้ดีที่สุด โดยให้ค่า PIRG ในช่วง 86.04 ถึง 93.02 เปอร์เซนต์ โดยกิจกรรมการยับยั้ง (antagonistic activities) ของราเอนโดไฟท์ต่อราโรคไหม้ของข้าวเป็นแบบการแข่งขันครอบครองพื้นที่ (competition) โดยเส้นใยของเชื้อทั้งสองชนิดเจริญชนกัน (รูปที่ 1)

4.3. ฤทธิ์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ในการยับยั้ง *M. oryzae* โดยวิธี agar dilution plate

นำราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพสูงสุดจำนวน 4 ไอโซเลท (LW_FS055, LW_L027, LP_LS026 และ LW_L002) ที่ยับยั้ง *M. oryzae* 33 มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB และสกัดสารด้วยเอทิลอะซิเตท ได้สารสกัด (BE) จำนวน 4 สาร นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M. oryzae* 33 ด้วยวิธี agar dilution plate ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 5, 1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 10 เปอร์เซนต์ DMSO เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และสารเคมี 2 ชนิด คือ คาร์เบนดาซิมและโพทิโคนาโซลเป็นชุดควบคุมเชิงบวก ผล

การทดสอบพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดหยาบทั้ง 4 สาร สามารถยับยั้ง *M. oryzae* 33 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($P > 0.05$) และมีเพียงสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ไอโซเลท LP_LS026 ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *M. oryzae* 33 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ไอโซเลท LP_LS002, LW_L027 และ LW_FS055 ให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 84.64, 48.16 และ 37.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการทดสอบค่าทางสถิติ (P -value) ของสารสกัดทั้ง 4 สาร เทียบกับชุดควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจาก LP_LS026 ให้ค่าการยับยั้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม ($P > 0.05$) ขณะที่สารสกัดที่

เหลือให้ค่าการยับยั้งลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และผลการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดทั้ง 4 สาร พบว่าราไอโซเลท LP_LS026 ให้ค่าการยับยั้งสูงที่สุด (64 เปอร์เซ็นต์) โดยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ของสารสกัดจากราไอโซเลทนี้ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($P > 0.05$) ขณะที่สารสกัดที่เหลือให้ค่าการยับยั้งต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ กับ *M. oryzae* 33 (รูปที่ 2) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม ($P < 0.05$) จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 5, 1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของราไอโซเลท LP_LS026 ให้ผลการยับยั้งเทียบเท่ากับสารเคมีทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน



รูปที่ 1 ประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์ในการยับยั้ง *M. oryzae* 33 โดยวิธี dual culture plate (A: ราเอนโดไฟท์ไอโซเลท LW_FS055 ให้ค่า PIRG 93.02 เปอร์เซ็นต์, B: ราเอนโดไฟท์ไอโซเลท LW_L027 ให้ค่า PIRG 88.37 เปอร์เซ็นต์, C: ราเอนโดไฟท์ไอโซเลท LP_LS026 ให้ค่า PIRG 88.34 เปอร์เซ็นต์ และ D: ราเอนโดไฟท์ไอโซเลท LW_L002 ให้ค่า PIRG 86.04 เปอร์เซ็นต์)

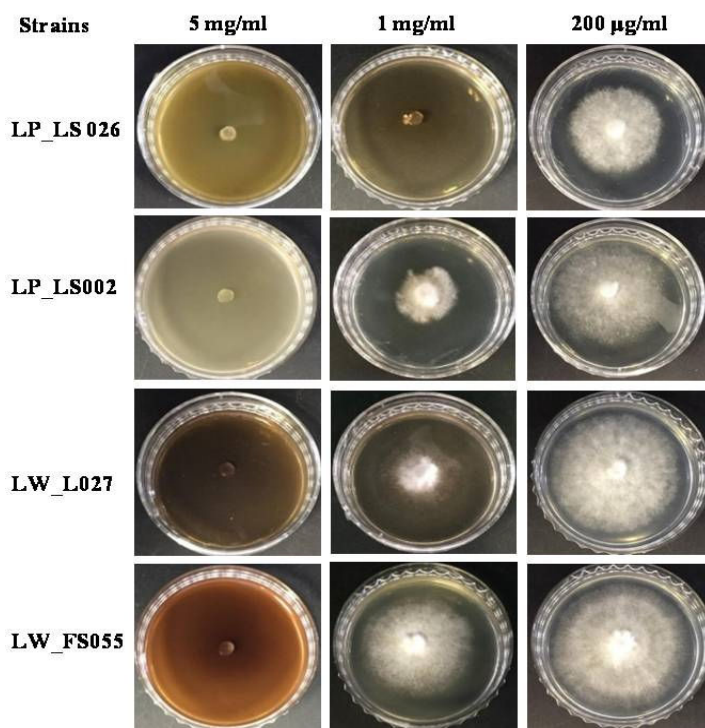
4.4. การจัดจำแนกราเอนโดไฟท์โดยวิธีทางชีวโมเลกุลด้วยวิธี maximum parsimony และวิธี Bayesian inference

ผลการทดสอบศักยภาพในการยับยั้งราก่อโรคไหม้ของข้าวพบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ไอโซเลท LP_LS026 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *M. oryzae* 33 ดังนั้นจึงนำมาจัดจำแนกชนิดโดยศึกษา

สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ผลการศึกษาพบว่าราไอโซเลทนี้จัดจำแนกอยู่ในไฟลัมแอสโคไมโคตา เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum parsimony พบว่า LP_LS026 มีตำแหน่งอยู่ในคลาส Dothideomycetes อันดับ Pleosporales มีความสัมพันธ์กับสมาชิกในวงศ์ Pleosporaceae โดย LP_LS026 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ

หลายสปีชีส์ของจีนัส *Exserohilum* ที่ความเข้มข้นบูทสแทรกของ MP เท่ากับ 100 และมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงจัดจำแนกราก LP_LS026 ได้แค่ระดับจีนัสคือ *Exsero-*

hilum sp. (รูปที่ 3) และนำฝากข้อมูลลำดับเบสของราไอโซเลทนี้ในฐานข้อมูล GenBank ได้รหัสข้อมูลนิวคลีโอไทด์ คือ KY024593



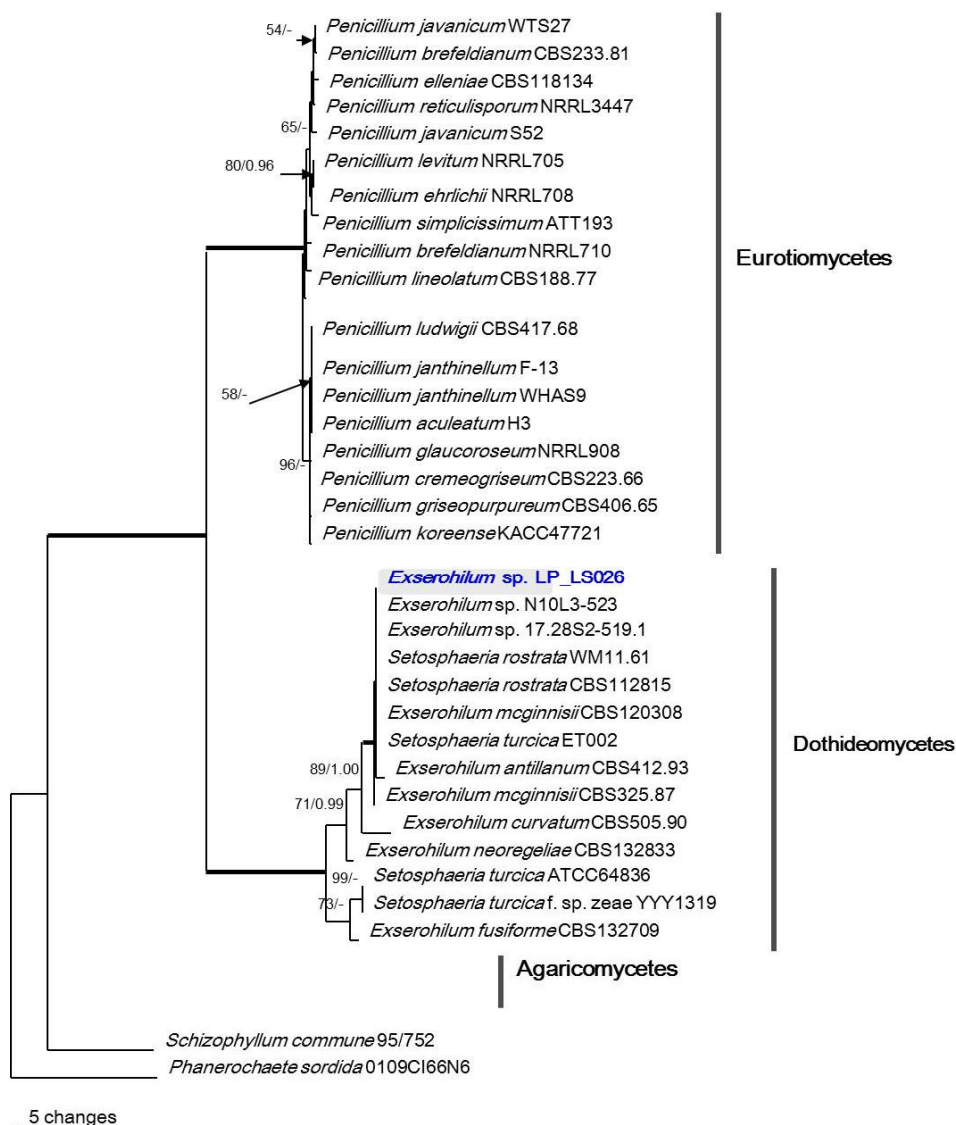
รูปที่ 2 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่ระดับความเข้มข้น 5, 1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ในการยับยั้ง *M. oryzae* 33 ด้วยวิธี agar dilution plate

การทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์จำนวน 17 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของ *M. oryzae* จำนวน 8 สายพันธุ์ ด้วยวิธี dual culture plate พบราเอนโดไฟท์ 4 ไอโซเลท ได้แก่ LW_FS055, LW_L027, LP_LS026 และ LW_L002 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *M. oryzae* 33 ได้ดีที่สุด มีค่า PIRG 93.02 เปอร์เซ็นต์ 88.37 เปอร์เซ็นต์ 88.34 เปอร์เซ็นต์ และ 86.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ [18] พบว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกจากข้าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการ

เจริญของ *M. grisea* ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ สายทอง [19] คัดแยกราเอนโดไฟท์จากใบข้าวหอมกระดังงาและทดสอบการยับยั้ง *M. oryzae* พบว่าราเอนโดไฟท์ 2 ไอโซเลท คือ NHS021 และ NHS02 (*Trichoderma* sp.) สามารถยับยั้ง *M. oryzae* ได้ถึง 95.4 และ 91.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับต่อมา กานต์ และอนันต์ [20] ได้ศึกษาความสามารถของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากข้าวในการควบคุม *M. oryzae* พบว่าราเอนโดไฟท์ไอโซเลท FL11 (*Daldinia eschscholtzii*) สามารถยับยั้ง *M. oryzae* ได้ 100

เปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษาก่อนหน้าและผล การศึกษานี้ยืนยันได้ว่าราเอนโดไฟท์ มีประสิทธิภาพใน การยับยั้งราสาเหตุโรคใบไหม้ของข้าวได้ดี นอกจากนี้ ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากราเอนโด- ไฟท์ในการยับยั้ง *M. oryzae* ที่ระดับความเข้มข้น 5, 1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดที่ความ เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากราเอนโดไฟท์ทั้ง 4 ไอโซเลท (LP_LS026, LWL027, LW_L002 และ LW_FS055) ในการศึกษานี้สามารถยับยั้ง *M. oryzae* 33 ได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ เทียบเท่ากับสารเคมีใน ชุดควบคุมที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน และพบว่าที่ ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสาร สกัดจากไอโซเลท LP_LS026 (*Exserohilum* sp.) สามารถยับยั้ง *M. oryzae* 33 ได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดที่เหลืออีก 3 สาร ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *M. oryzae* 33 ได้ 84.64 เปอร์เซ็นต์ (LW_L002) 48.16 เปอร์เซ็นต์ (LW_L027) และ 37.28 เปอร์เซ็นต์ (LW_FS055) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากไอโซเลท LP_LS026 ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ทดสอบ (0.2 มิลลิโมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้ง *M. oryzae* 33 ได้ดี คิดเป็น 64 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดที่เหลือ ยับยั้ง *M. oryzae* ได้ที่ระดับต่ำกว่า 41 เปอร์เซ็นต์ มี รายงานการทดสอบสารสกัดจากลูกเนียงนก ที่สกัด ด้วยไตรโคลโรมีเทนและเอทานอล ในการยับยั้ง *Pyricularia oryzae* ซึ่งเป็นราในระยะอาศัยเพศของ *M. oryzae* โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับ ความเข้มข้น 5, 4, 3, 2 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับสารเคมีคาร์เบนดาร์ซิม ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดจากไตรโคลโรมีเทนที่ระดับ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง การเจริญของ *P. oryzae* ได้สูงสุด 75.61 เปอร์เซ็นต์

และคาร์เบนดาร์ซิม ยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ได้ 51.52 เปอร์เซ็นต์ [21] จากผลการทดสอบฤทธิ์ของรา เอนโดไฟท์และสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ในการศึกษา นี้ ชี้ให้เห็นว่ารากเอนโดไฟท์และสารสกัดจากรากเอนโด- ไฟท์ที่แยกจากใบของบัวสายมีศักยภาพในการยับยั้งรา โรคพืช *M. oryzae* ในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ได้ดี ซึ่งประสิทธิภาพของรากเอนโดไฟท์และสารสกัด จากรากเอนโดไฟท์ในการยับยั้งราโรคพืช ขึ้นกับหลาย ปัจจัยด้วยกัน ได้แก่ สายพันธุ์รากเอนโดไฟท์ที่ทดสอบ แหล่งของตัวอย่างพืช วิธีการทดสอบ วิธีการสกัดสาร และตัวทำลายอินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ [12,22, 24-26] โดยจากผลการศึกษานี้ยืนยันได้ว่ารากเอนโด- ไฟท์ที่แยกจากบัวสายเป็นแหล่งทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากพบว่ารากเอนโดไฟท์หลายไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งรากโรคพืชได้ดีเมื่อเทียบกับสารเคมี ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยเฉพาะ ผลของสารสกัดจากรากเอนโดไฟท์ (LP_LS026) ใน การศึกษานี้แสดงศักยภาพในการยับยั้งราโรคไหม้ของ ข้าวได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ และรากไอโซเลท LP_LS026 สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Exserohilum* sp. โดยราจีส *Exserohilum* พบเป็นรากเอนโดไฟท์ที่ ถูกแยกได้จากพืชหลายสายพันธุ์และพบว่าสารสกัด จากรากจีสนี้มีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์หลาย กลุ่ม [22] โดยเฉพาะรากโรคพืช Li และคณะ [23] แยกรากเอนโดไฟท์ *Exserohilum* sp. จาก *Acer truncatum* ในประเทศจีน พบว่ารากเอนโดไฟท์สาย พันธุ์นี้มีศักยภาพในการผลิตสารไอโซคูมาริน (isocoumarin) และเอ็กเซอร์โรไลด์ส (exerolides A-F) ซึ่งสารกลุ่มนี้มีศักยภาพในการยับยั้งราโรคพืช *Fusarium oxysporum* ได้ดี ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถยับยั้งเชื้อได้เท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร



รูปที่ 3 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) บริเวณ ITS ของราเอนโดไฟท์ ไอโซเลท LP_LS026 โดยสามารถจัดจำแนกได้ในคลาส Dothideomycetes อันดับ Pleosporales โดยระบุค่าความเชื่อมั่นบูทสแตรจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum parsimony (MP) ซึ่งมากกว่าหรือเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์ (ซ้าย) และค่าความน่าจะเป็นของ BI ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.95 (ขวา) และเส้นทึบ คือค่า MP บูทสแตรเท่ากับ 100 เปอร์เซนต์/ค่าความน่าจะเป็นของ BI เท่ากับ 1.00

5. สรุป

การศึกษาประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์ จำนวน 17 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของ *M. oryzae* จำนวน 8 สายพันธุ์ พบว่าราเอนโดไฟท์ 4

ไอโซเลท ได้แก่ LW_FS055, LW_L027, LP_LS026 และ LW_L002 สามารถยับยั้ง *M. oryzae* 33 ได้ดีที่สุด ให้ค่า PIRG 93.02, 88.37, 88.34 และ 86.04 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และผลการทดสอบฤทธิ์ของสาร

สกัดจากราเอนโดไฟท์ 4 ไอโซเลท ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ทั้ง 4 สาร สามารถยับยั้ง *M. oryzae* 33 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดทั้ง 4 สารที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับสารเคมี (คาร์เบนดาซิมและโพพิโคนาโซล) โดยสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ LP_LS026 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *M. oryzae* 33 สามารถยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และ 64 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับคาร์เบนดาซิมและโพพิโคนาโซล ที่ใช้ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว โดยผลการทดสอบทางสถิติพบว่าค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าราเอนโดไฟท์จากข้าวมีศักยภาพในการควบคุมราโรคไหม้ของข้าว (*M. oryzae*) ได้ดี นอกจากนี้ยังไม่พบการศึกษาประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากข้าวในการควบคุมราโรคไหม้ของข้าวมาก่อน ซึ่งยืนยันได้ว่าการศึกษาราเอนโดไฟท์จากแหล่งใหม่ ๆ ช่วยเพิ่มโอกาสการเจอเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

6. ข้อเสนอแนะ

6.1 ควรทดสอบการควบคุมโรคไหม้ของกล้าข้าวโดยราเอนโดไฟท์ในสภาพโรงเรือน โดยนำราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราโรคพืช มาทดสอบการยับยั้งโรคข้าวไหม้เทียบกับสารเคมีที่ใช้ในการควบคุม

6.2 เนื่องจากสารสกัดที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสาร

สกัดหยาบควรแยกสารหรือหาคู่ประกอบของสารสกัดหยาบและนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราโรคพืชอีกครั้ง

6.3 ควรเพิ่มการทดสอบราเอนโดไฟท์และสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งราก่อโรคในข้าวสายพันธุ์อื่น เพื่อรายงานศักยภาพของราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งราก่อโรคข้าว

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ดร.ชุติมา แก้วพิบูลย์ มหาวิทยาลัยทักษิณ และศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำหรับความช่วยเหลือและการสนับสนุนตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

รายการอ้างอิง

- [1] Law, J.W.F., Ser, H.L., Khan, T.M., Chuah, L.H., Pusparajah, P., Chan, K.G., Goh, B.H. and Lee, L.H., 2017, The potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*), Front. Microbiol. 8(3): doi: 10.3389/fmicb.2017.00003.
- [2] Mousa, W.K. and Raizada, M.N., 2013, The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: An interdisciplinary perspective, Front Microbiol. 4: 1-18.
- [3] สาคร ศรีมุข, 2556, ผลกระทบจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรของประเทศไทย, รายงานการวิจัย, สำนักงานเลขาธิการวุฒิสภา, กรุงเทพฯ, 25 น.

- [4] Ellouze, W., Taheri, A.E., Bainard, L.D., Yang, C., Bazghaleh, N., Navarro-Borrell, A., Hanson, K. and Hamel, C., 2014, Soil fungal resources in annual cropping systems and their potential for management, Biomed. Res. Int. 531824: doi: 10.1155/2014/531824.
- [5] Makovitzki, A., Viterbo, A., Brotman, Y., Chet, I. and Shai, Y., 2007, Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens in vitro and in planta with ultrashort cationic lipopeptides, Appl. Environ. Microbiol. 73: 6629-6636.
- [6] Arora, D.S. and Chandra, P., 2011, *In vitro* antioxidant potential of some soil fungi: screening of functional compounds and their purification from *Penicillium citrinum*, Appl. Biochem. Biotechnol. 165: 639-651.
- [7] Freire, E.S., Campos, V.P., Pinho, R.S.C., Oliveira, D.F., Faria, M.R., Pohlit, A.M., Noberto, N.P., Rezende, E.L., Pfenning, L.H. and Silva, J.R.C., 2012, Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*, J. Nematol. 44: 321-328.
- [8] Kaur, H., Onsare, J.G., Sharma, V. and Arora, D.S., 2015, Isolation, purification and characterization of novel antimicrobial compound 7-methoxy-2,2-dimethyl-4-octa-4',6'-dienyl-2 H-naphthalene-1-one from *Penicillium* sp. and its cytotoxicity studies, AMB Express 5(40): doi: 10.1186/s13568-015-0120-9.
- [9] Nadumane, V.K., Venkat, P., Pal, A., Dharod, H., Shukla, M. and Prashanthi, K., 2013, A novel metabolite from *Aspergillus ochraceus* JGI 25 showing cytotoxicity to hela cells, IJPS 75: 507-514.
- [10] Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Mazzei, P., Piccolo, A., Pascale, A., Ruocco, M., Marra, R., Lombardi, N., Lanzuise, S., Varlese, R., Cavallo, P., Lorito, M. and Woo, S.L., 2014, A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications, Molecules 19: 9760-9772.
- [11] Nisa, H., Azra N.K., Irshad, A.N., Sana, S., Nowsheen, S. and Suhaib, A.B., 2015, Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review, Microb. Pathog. 82: 50-59.
- [12] Naik, B.S., Shashikala, J. and Krishnamurthy, Y.L., 2006, Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*, Microbiol. Res. 164: 290-296.
- [13] Park, J.H., Park, H.J., Choi, J.G., Lee, S.W., Jang, K.S., Choi, Y.H., Cho, K.Y. and Kim, J.C., 2003, Screening for antifungal endophytic fungi against six pathogenic fungi, Mycobiology 31: 179-182.

- [14] O'Donnell, K., Cigelnik, E., Weber, N.S. and Trappe, J.M., 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.
- [15] Swofford, D.L., 2002, PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- [16] Kishino, H. and Hasegawa, M., 1989, Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea, *J. Mol. Evol.* 29: 170-179.
- [17] Nylander, J.A.A., 2004, MrModeltest v. 2.0, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University: Program distributed by the author.
- [18] อนันต์ วงเจริญ, 2557, บทบาทของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการควบคุมโรคพืช, *แก่นเกษตร* 42: 643-654.
- [19] สายทอง แก้วฉาย, 2557, การศึกษาเชื้อราเอนโดไฟต์จากใบข้าวหอมกระดังงาและคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์, *ว. มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์* 6: 112-120.
- [20] กานต์ จิตสุวรรณรักษ์ และอนันต์ วงเจริญ, 2559, ผลของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการควบคุมโรคไหม้ของข้าว (*Oryza sativa* L.), *ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเกษตรกรรม* 44: 232-237.
- [21] ปิยพร สิงขรัตน์, น้อมจิตต์ แก้วไทย, สุภาจิต ชูกลิน และพรศิลป์ สีเผือก, 2559, ผลของสารสกัดยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ในข้าว, *แก่นเกษตร* 44: 966-971.
- [22] Pinheiro, E.A.A., Pina, J.R.S., Feitosa, A.O., Carvalho, J.M., Borges, F.C., Marinho, P.S.B. and Marinho, A.M.R., 2017, Bioprospecting of antimicrobial activity of extracts of endophytic fungi from *Bauhinia guianensis*, *Rev. Argent Microbiol.* 49: 3-6.
- [23] Li, R. Chen, S., Niu, S., Guo, L., Yin, J. and Che, Y.. 2014. Exerolides A-F, new isocoumarin derivatives from the plant endophytic fungus *Exerohilum* sp., *Fitoterapia* 96: 88-94.
- [24] Thi, G.N., Lemtukei, D., Kihara, J. and Ueno, M., 2016, Efficacy of plant extracts against the rice blast fungus *M. oryzae*, *Bull. Fac. Life Env. Sci. Shimane Univ.* 21: 13-16.
- [25] Yasuda, M., Isawa, T., Shinozaki, S., Minamisawa, K. and Nakashita, H., 2009, Effects of colonization of bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 2595-2599.
- [26] Zhao, J., Mou, Y., Shan, T., Li, Y., Zhou, L., Wang, M. and Wang, J., 2010, Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, *Molecules* 15: 7961-7970.