Research Article

Received: September 12, 2019; Accepted: October 19, 2020

ประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวในการยับยั้งรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งข้าว

Efficacy of Endophytic Fungi Isolated from Rice Plants against *Rhizoctonia solani*, Causing of Rice Sheath Blight Disease

ชุติมา แก้วกระจาย* และจันทร์เพ็ญ มะลิพันธ์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

ถนนปรีดีพนมยงค์ ตำบลประตูชัย อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000

ธิดา เดชฮวบ

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Chutima Kaewkrajay* and Chanphen Malipant

Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University,

Pridi Banomyong Road, Pratuchai, Phra Nakhon Si Ayutthaya, 13000

Tida Dethoup

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen Campus,

Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวในการควบคุมโรคกาบใบแห้งข้าวที่มีรา *Rhizoctonia solani* เป็นเชื้อสาเหตุ การทดลองแบบ *in vitro* ที่นำราเอนโดไฟต์ 102 ไอโซเลท ที่แยกได้จากใบและต้นข้าว และจัดเก็บไว้ที่สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับรา *R. solani* ด้วยวิธี dual culture โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีราเอนโดไฟต์ 3 ไอโซเลท คือ AT18-1, AT19-3 และ AY31 แสดงโซนใสในการยับยั้งรา *R. solani* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 31.61, 33.33 และ 31.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบริเวณ internal transcript spacer (ITS) พบว่าราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท จัดจำแนกเป็น *Penicillium oxalicum* และเมื่อทำการทดลองการเป็นปฏิปักษ์ต่อรา *R. solani* แบบ *in vivo* โดยทำภายใต้สภาพเรือนทดลอง

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** kchutima@aru.ac.th

doi: 10.14456/tstj.2021.49

กับข้าวพันธุ์ กข47 พบว่าอาการกาบใบแห้งของข้าวหายไปหลังจากการพ่นสปอร์ราเอนโดไฟต์ 21 วัน ขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ได้พ่นสปอร์ราเอนโดไฟต์ยังแสดงอาการของโรค

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟต์; ข้าว; การควบคุมศัตรูพืชแบบชีววิธี; *Rhizoctonia solani*

Abstract

This research aimed to evaluate the efficacy of endophytic fungi to control rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. The *in vitro* study, 102 endophytic fungi, which were isolated from leaves and stems of rice and preserved in the Division of Microbiology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University, were screened for antifungal activity against *R. solani* according to the dual culture method. The inhibition zone was exhibited from the three isolates, namely AT18-1, AT19-3, and AY31, under incubation at 30 °C for 7 days. The percentages of growth inhibition were 31.61, 33.33, and 31.11 %, respectively. The sequence analysis of these three isolates was performed at the internal transcribed spacer (ITS) region and they were identified as *Penicillium oxalicum*. The *in vivo* antagonistic was done in the greenhouse condition by infection of *R. solani* on the stem of RD47 rice variety. The results showed that completely inhibited disease by endophytic fungi was observed after 21 days, whereas the negative control was still observed rice sheath blight disease.

Keywords: endophytic fungi; rice; biological control; *Rhizoctonia solani*

1. บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจอันดับหนึ่งของประเทศไทยที่มีการส่งออกไปยังประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2563/2564 ประเทศไทยกำหนดเป้าหมายการผลิตข้าว 30.522 ล้านตัน [1] จังหวัดพระนครศรีอยุธยาและอ่างทองมีพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นเกษตรกรรม เกษตรกรปลูกข้าวเป็นหลัก และเนื่องจากอยู่ในเขตพื้นที่ที่มีระบบชลประทานดี จึงทำนาได้ปีละ 2 ครั้ง หรือมากกว่า แต่การทำนาปรังเกษตรกรต้องประสบกับปัญหาเรื่องโรคและแมลงศัตรูพืชทำให้ต้องใช้สารเคมี ซึ่งแนวนโยบายของรัฐบาลที่เน้นการผลิตข้าวที่มีคุณภาพ ได้มาตรฐาน ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้การผลิตข้าวโดยอาศัยชีววิธีเข้ามามีบทบาทสำคัญ และการสนทนากับเกษตรกรในพื้นที่พบว่าโรคกาบใบแห้งข้าวที่มีรา *Rhizoctonia solani* เป็นเชื้อสาเหตุ ทำให้ข้าวเสียหายค่อนข้างมากหากควบคุมโรคไม่ทัน โดยพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคนี้ คือ ข้าวพันธุ์ กข47 ซึ่งเป็นข้าวเจ้าที่เกิดจากการผสมกันระหว่างข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับ CNT86074-25-9-1 มีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 104-107 วัน กรณีหว่านน้ำตม และ 112 วัน กรณีปักดำ ลักษณะเด่นของข้าวพันธุ์นี้ คือ ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แต่ข้อควรระวัง คือ อ่อนแอต่อโรคกาบใบแห้ง [2] ด้วยข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นโจทย์สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

Rhizoctonia solani (anamorphic stage) หรือ *Thanatephorus cucumeris* (teleomorphic stage) เป็นราสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคกาบใบแห้ง

ข้าว พบมากในนาที่ใช้ระบบชลประทาน ซึ่งอยู่ในเขตภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคใต้ ราชนิดนี้สามารถอาศัยในตอซัง วัชพืช และตามดินนา สามารถมีชีวิตอยู่ข้ามฤดูกาล จึงสามารถเข้าทำลายข้าวได้ตลอดฤดูกาลทำนา ส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลง 6-20 เปอร์เซ็นต์ และอาจลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่พันธุ์ข้าวนั้นอ่อนแอต่อโรค [3-5] เกษตรกรส่วนใหญ่จึงกำจัดราสาเหตุด้วยสารป้องกันกำจัดรา ได้แก่ วาลิดามัยซิน เบโนมิล รอฟรัล โพรพิโคนาโซล และเพนโซคูรอน เป็นต้น [6] การใช้สารเคมีในช่วงที่ข้าวออกรวงอาจก่อให้เกิดสารพิษตกค้างสูง เพราะอีกไม่นานก็จะเก็บเกี่ยว ซึ่งอาจส่งผลต่อคุณภาพของข้าว ความปลอดภัยของผู้บริโภคข้าว การศึกษาวิธีกำจัดแบบชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะเป็นการยกระดับคุณภาพข้าวไทยให้เป็นไปตามมาตรฐาน เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคและตลาดโลกมากขึ้น

ราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) หมายถึงราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้พืชแสดงอาการของโรค และราบางชนิดยังช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช ทำให้พืชอาศัยทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ บางชนิดอาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบภาวะพึ่งพา [7,8] ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจศึกษาราเอนโดไฟต์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชจำนวนมาก เช่น การค้นพบราเอนโดไฟต์จากโสน (*Sesbania javanica*) ที่มีความสามารถยับยั้งรา *Bipolaris maydis* สาเหตุโรคไหม้ของข้าวโพด *Alternaria alternata* สาเหตุโรคผลเน่าของสาลี *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งของข้าวโพด และ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคโคนเน่าของถั่วเขียว [7] และยังมีการรายงานการแยกราเอนโดไฟต์จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อใช้ยับยั้งรา *Magnaporthe oryzae* สาเหตุโรคไหม้ข้าว [9] ในปี ค.ศ. 2018 Pripdeevech และคณะ ได้แยกราเอนโดไฟต์ 66 ไอโซเลท จากใบทำมังหรือทำมังยอดขาว แมงดาไม้หรือแมงดาต้น (*Litsea petiolata* Hook) ในจังหวัดเชียงราย ประเทศไทย พบว่าสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟต์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Magnaporthe oryzea* สายพันธุ์ THL084 และ THL861 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 61.96 และ 31.74 เปอร์เซ็นต์ [10] นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากโสมจีนมาใช้ในการควบคุมโรคของโสมจีน โดยการสกัดสารเมแทบอไลต์จากราเอนโดไฟต์ที่แยกได้แล้วนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคในโสมจีน ได้แก่ *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum panacicola*, *Cylindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani* และ *Phoma terrestris* ซึ่งพบว่ามีราเอนโดไฟต์ 6 ชนิด ที่สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคของโสมจีน [11] ซึ่งจะเห็นได้ว่าราเอนโดไฟต์มีสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืช และสามารถนำมาใช้ควบคุมราสาเหตุโรคพืชแบบชีววิธี

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงนำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าว 102 ไอโซเลท ที่จัดเก็บในสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งข้าว ที่ได้แยกและจัดเก็บที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ราเอนโดไฟต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อรา *R. solani* ถูกจัดจำแนกชนิดของราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวอณูโมเลกุลบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และทดสอบการยับยั้งรา *R. solani* ในเรือนปลูกพืชทดลองเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาในระดับที่สูงขึ้นต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากใบและลำต้นข้าว ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ใช้ปลูกทำนาปรังในพื้นที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยาและอ่างทอง โดยเก็บตัวอย่างข้าวเมื่อเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 และแยกราตามวิธีของ Strobel [12] จัดเก็บราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ 102 ไอโซเลท บนอาหารแข็งเอียง potato dextrose agar (PDA) ณ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา และราสาเหตุโรคกาบใบแห้งข้าว (*R. solani*) ที่แยกจากข้าว จัดเก็บไว้ ณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน)

2.2 ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับรา *Rhizoctonia solani*

นำราเอนโดไฟต์มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งข้าวด้วยวิธี dual culture บนอาหารแข็ง PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยราเอนโดไฟต์และราโรคพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ตัดได้ไปวางบนอาหารแข็ง PDA โดยวางตรงข้ามกันและให้ห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 2 เซนติเมตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเส้นใยมาชิดกัน ส่วนชุดควบคุมทำโดยวางรา *R. solani* ให้ห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 2 เซนติเมตร ส่วนด้านตรงกันข้ามไม่ต้องวางราเอนโดไฟต์ บันทึกผลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช [7] จากสูตร % ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช = (C-T) ÷ C x 100 เมื่อ C คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา *R. solani* (control); T คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา *R. solani* ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ร่วมกับราเอนโดไฟต์

2.3 จัดจำแนกราเอนโดไฟต์

2.3.1 การจัดจำแนกชนิดราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ตามวิธีของ เลขา และคณะ [13] โดยเพาะเลี้ยงราบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกลักษณะการเจริญ สีของโคโลนีและลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยมีรายงานไว้

2.3.2 การจัดจำแนกโดยอาศัยวิธีชีวอณูโมเลกุล

ราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *R. solani* จัดจำแนกชนิดโดยวิธีชีวอณูโมเลกุลบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) และ ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) โดยเพาะเลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเส้นใยรามาเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) บ่มไว้บนเครื่องเขย่าที่ใช้ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน นำส่วนของเส้นใยไปบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง แล้วย้ายเส้นใยที่บดละเอียดลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สกัดดีเอ็นเอของราตามวิธีที่ดัดแปลงจาก George และคณะ [14] โดยเติม homogenization buffer (0.1 M NaCl, 0. 2 M sucrose, 0. 01 M EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ที่เติม β-mercaptoethanol 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าให้เข้ากัน และเติม lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 2.5 % SDS, pH 8.0) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม precipitation buffer (5

M potassium acetate, 3 M acetic acid) ปริมาตร 192 ไมโครลิตร และ chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ปริมาตรเท่ากับส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ตรวจสอบดีเอ็นเอบน 1 % agarose gel electrophoresis เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ 10x PCR buffer (3 ไมโครลิตร) 25 mM $MgCl_2$ (2.4 ไมโครลิตร) 2.5 mM dNTP (2.4 ไมโครลิตร) 10 pmol ITS1 (0.9 ไมโครลิตร) 10 pmol ITS4 (0.9 ไมโครลิตร) *Taq* DNA polymerase (0.15 ไมโครลิตร) DNA template (3 ไมโครลิตร) และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (17.25 ไมโครลิตร) โดยมี PCR condition ดังนี้ pre-denaturation อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที denaturation อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เวลา 0.10 นาที annealing อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 0.15 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ จากนั้นคงไว้ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที และคงไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกจากเครื่อง PCR นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบบน 1 % agarose gel และทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (TIANquick Midi Purification kit, TIANGEN, China) ตามวิธีที่แนะนำใน protocol และตรวจสอบ purified PCR product อีกครั้งบน 1 % agarose gel ก่อนส่งไปหาลำดับเบสที่ First Base (Malaysia) นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายไปทำ pairwise ด้วยโปรแกรม MUSCLE ใน MEGA software version 7.0 แล้วจึงนำไป blast เพื่อเทียบกับราที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank

2.4 ทดสอบการยับยั้งราโรคพืชในเรือนปลูกพืชทดลอง

นำเมล็ดพันธุ์ข้าว กข47 ที่เมล็ดมีลักษณะสมบูรณ์มาแช่ในสารละลาย 5 % Clorox® เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ reverse osmosis (RO) ที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง นำเมล็ดข้าวไปเพาะในกระบะเพาะที่มีกาบมะพร้าวชุ่มน้ำอยู่เป็นเวลา 1 คืน เมล็ดข้าวที่มีรากงอกจะถูกนำมาปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ดินที่นำมาปลูกข้าวเป็นดินเหนียวที่ได้รับความอนุเคราะห์จากแปลงนาของเกษตรกร โดยปลูกข้าวไว้ในกระถาง 5 ต้นต่อกระถาง

นำราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *R. solani* ได้ดีจากการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการมาทดสอบในเรือนปลูกข้าวทดลอง โดยเตรียมสารละลายสปอร์ราเอนโดไฟต์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^6 สปอร์ พ่นลงบนต้นข้าว (กข47) ขณะที่ข้าวมีอายุ 42 วัน โดยใช้ถุงพลาสติกคลุมขณะพ่นสปอร์รา หลังจากนั้นเตรียมกล้าเชื้อ *R. solani* สำหรับปลูกลงในข้าวเมื่อข้าวมีอายุ 45 วัน โดยเพาะเลี้ยงรา *R. solani* บนอาหารแข็ง PDA แล้วใช้ cork borer ขนาด 5 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยและสปอร์รา แล้วนำไปวางบนต้นข้าวที่ทำให้เกิดแผล โดยให้แผลสูงจากระดับน้ำหรือดินขึ้นมา 2 เซนติเมตร วัดความสูงของต้นข้าว ความสูงของแผลที่แสดงอาการกาบใบแห้ง ใช้สารป้องกันกำจัดรา 50 % carbendazim ที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร และชุดทดลองที่ไม่ใช้ราเอนโดไฟต์เป็นชุดควบคุม ซึ่งดัดแปลงจาก Kumar และคณะ [15] โดยทดลอง 5 ซ้ำ ต่อราเอนโดไฟต์ 1 สายพันธุ์ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (% relative lesion height, %RLH) ตามวิธีของ Anh และคณะ [16] ตามสูตร เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (%RLH) = (ความสูงของแผล ÷ ความสูงของต้นข้าว) x 100

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้วิธี multiple ANOVA และ post hoc test-Duncan ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรม SPSS statistic version 21

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับรา *R. solani*

นำราเอนโดไฟต์ 102 ไอโซเลท มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งข้าวที่มีรา *R. solani* เป็นเชื้อสาเหตุ พบว่ามี 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ AT18-1, AT19-3 และ AY31 (รูปที่ 1)

เมื่อวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งพบว่าราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งใกล้เคียงกัน โดยไอโซเลท AT19-3 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด คือ 33.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ AT18-1 และ AY31 ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 31.61 และ 31.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การศึกษาการควบคุมราสาเหตุโรคพืชแบบชีววิธี โดยใช้ราเอนโดไฟต์ควบคุมโรคใบไหม้ข้าวของ Jitsuwannarak และ Wongcharoen [9] พบว่าราเอนโดไฟต์ FL11 ซึ่งมีความเหมือนกับเชื้อ *Daldinia eschscholtzii* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Magnaporthe oryzae* ได้อย่างสมบูรณ์ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมการยับยั้ง (antagonistic activitie) เป็นแบบ mycoparasite ส่วนสายพันธุ์ FL02, FL19 และ FR55 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแบบ competition 71, 58 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสายพันธุ์ FR46 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแบบ inhibition zone 56 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ราเอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคที่เกิดจากรา *R. solani* ในโสมจีน พบว่าราเอนโดไฟต์ *Phoma terrestris*, *Ascomycete* sp. (unknown 1), *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, Fungal sp. (unknown 2) และ *Collectorichum pisi* มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *R. solani* 96.8, 93.7, 89.2, 91.8, 76.0 และ 44.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [11] ในปี ค.ศ. 2018 Yu และคณะ [17] ได้แยกราเอนโดไฟต์ 81 ไอโซเลทจากใบ เปลือกไม้ และผลของต้นชาน้ำมัน (*Camellia oleifera*) ในพื้นที่มณฑลหูหนาน ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน เพื่อใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของชาน้ำมัน โดยราเอนโดไฟล์ที่แยกได้จัดจำแนกอยู่ใน 14 สกุล โดยสกุลที่พบมาก ได้แก่ *Pestalotiopsis* sp., *Penicillium* sp. และ *Fusarium* sp. และพบว่าสกุล *Oidium* sp. (ty-64) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของชาน้ำมันได้ดีที่สุด และในปีเดียวกันนี้ Chowdhary และ Kaushik [18] ได้แยกราเอนโดไฟต์จากสะระแหน่ (*Mentha piperita*) 63 ไอโซเลท เพื่อยับยั้งรา *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* และ *Sclerotinia sclerotiorum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค chickpea rot ผลการทดลองพบว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ยับยั้งเชื้อ *S. sclerotiorum* ได้มากสุด ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานการแยกราเอนโดไฟต์จากใบของพืชตระกูลแค (*Markhamia tomentosa*) เพื่อยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* และ *B. cinerea* โดยวิธี dual culture ผลการทดลองพบว่าราเอนโดไฟต์ 4 ไอโซเลท แสดงผลการยับยั้งต่อราสาเหตุโรคพืช โดยราเอนโดไฟต์ MF1, MF3, MF5 และ MF6 แสดงผลการยับยั้งต่อรา *F. oxysporum* และราเอนโดไฟต์ MF1 และ MF5 ยังแสดงผลการยับยั้งต่อรา *S. sclerotiorum* และ *R. solani* อีกด้วย ขณะที่ราเอนโดไฟต์ทั้ง 4

ไอโซเลท ไม่แสดงผลการยับยังรา *B. cinerea* [19] ในปี ค.ศ. 2015 Luo และคณะ [20] รายงานการแยกราเอนโดไฟต์ 61 ไอโซเลท จากใบ ลำต้น และรากของครามป่า (*Tephrosia purpurea*) เพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *S. sclerotiorum*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, *Phytopthora melonis*, *B. cinerea*, *Collectotrichum gloeosporioides* และ *R. solani* จาก dual culture พบว่าราเอนโดไฟต์ *Penicillium griseofulvum* TPL25, *Aspergillus oryzae* TPL35, *Purpureocillium lilacinum* TPL04, *Periconia* sp. TPR04, *Aspergillus fumigatus* TPL15 และ *Fusarium* sp. TPR05 แสดงโซนยับยั้งราสาเหตุโรคพืชดังกล่าวได้ นอกจากนี้ Paul และคณะ [21] ได้รายงานการแยกราเอนโดไฟต์ 72 ไอโซเลท จากใบและรากของพืชแดนดิไลอัน (*Taraxacum coreanum*) เมื่อทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับราสาเหตุโรคพืช (*Alternaria panax*, *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum* และ *R. solani*) พบว่ามีราเอนโดไฟต์ 10 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราโรคพืช ซึ่งผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้นเห็นได้ว่าราเอนโดไฟต์มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้ในการควบคุมราโรคพืชชนิดต่าง ๆ

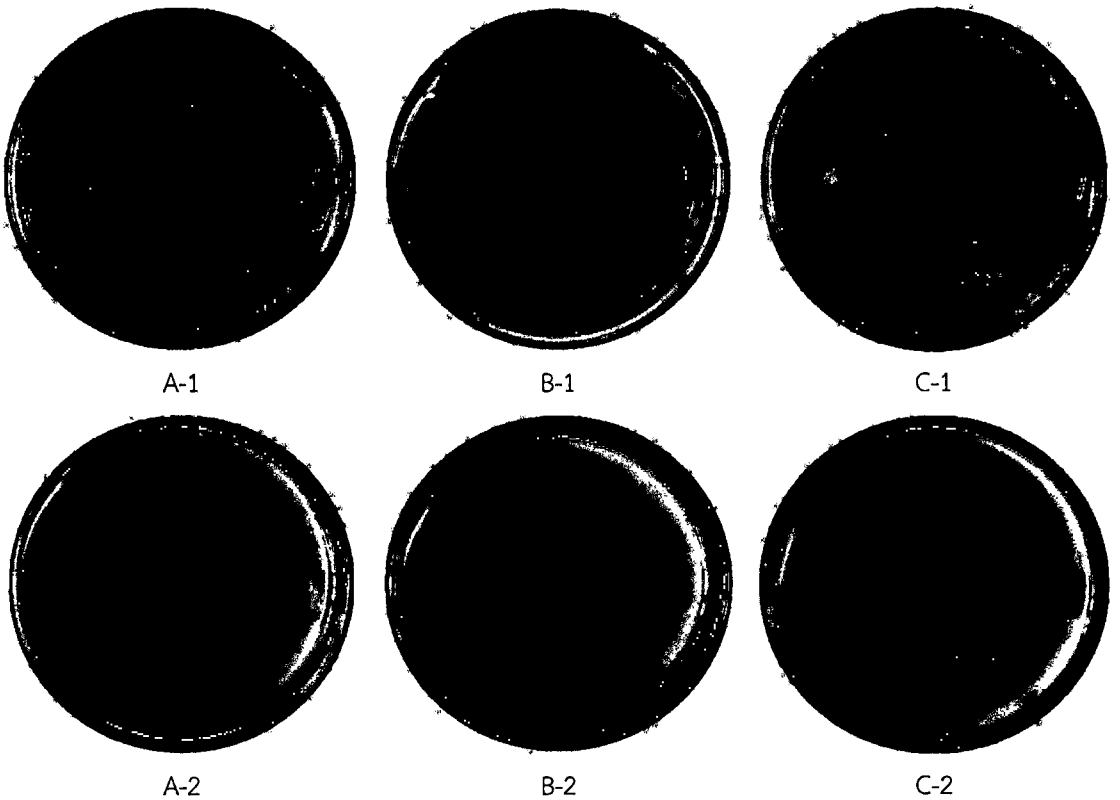

Figure 1 Endophytic fungi (A) AT18-1, (B) AT19-3, and (C) AY31 against *R. solani*, after incubated at 30 °C for 7 days. The photos (A-1, B-1 and C-1) were taken on the top of the Petri dish; while the photos (A-2, B-2 and C-2) were taken on the back of the Petri dish.

3.2 การจัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้

การพิจารณาลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท บนอาหารแข็ง PDA พบว่าโคโลนีมีลักษณะสีเขียวถึงเขียวแก่ การเจริญช้า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยโคโลนีของรา AT18-1 มีสีเขียวเข้ม เส้นใยไม่ฟู เจริญช้า สร้างสปอร์จำนวนมาก เมื่อพิจารณาด้านล่างพบว่าโคโลนีมีสีเหลือง ขณะที่ AT19-3 โคโลนีมีสีเขียวขี้ม้า เส้นใยไม่ฟู เจริญช้า สร้างสปอร์จำนวนมาก ด้านล่างโคโลนีมีสีเหลืองอมส้ม ส่วน AY31 โคโลนีสีเขียวอมเทา เส้นใยไม่ฟู เจริญช้า ด้านล่างโคโลนีมีสีเหลืองอมส้มแดง (รูปที่ 2) เมื่อจัดจำแนกด้วยวิธีชีวอณูโมเลกุลบริเวณ ITS พบว่าราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท จัดจำแนกเป็น *Penicillium oxalicum* โดยมีความเหมือนกับ *P. oxalicum* NRRL 787^{T} (NR 121232) 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3)

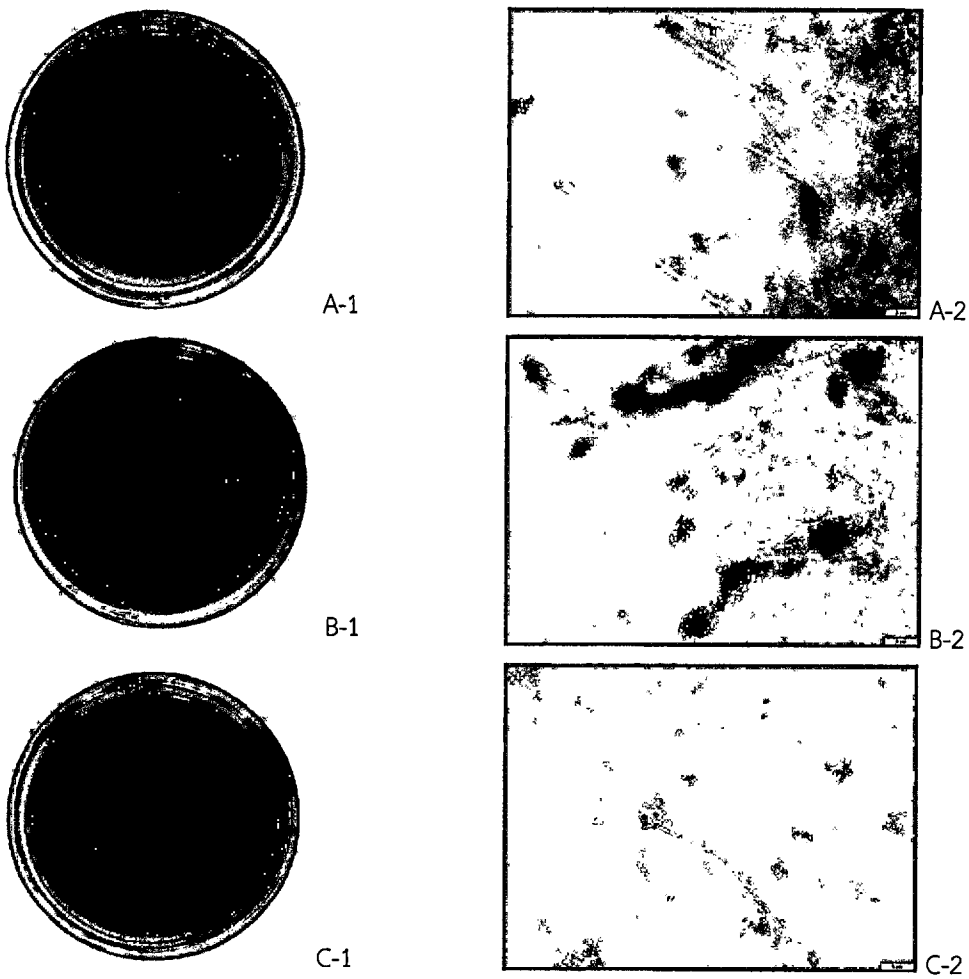

Figure 2 Colonies of endophytic fungi (A-1) AT18-1, (B-1) AT19-3, and (C-1) AY31 on PDA plates incubated at 30 °C for 15 days, and cell structure under bright field microscope at the magnification image 400x, after incubation at 30 °C for 3 days (A-2) AT18-1, (B-2) AT19-3 and (C-2) AY31.

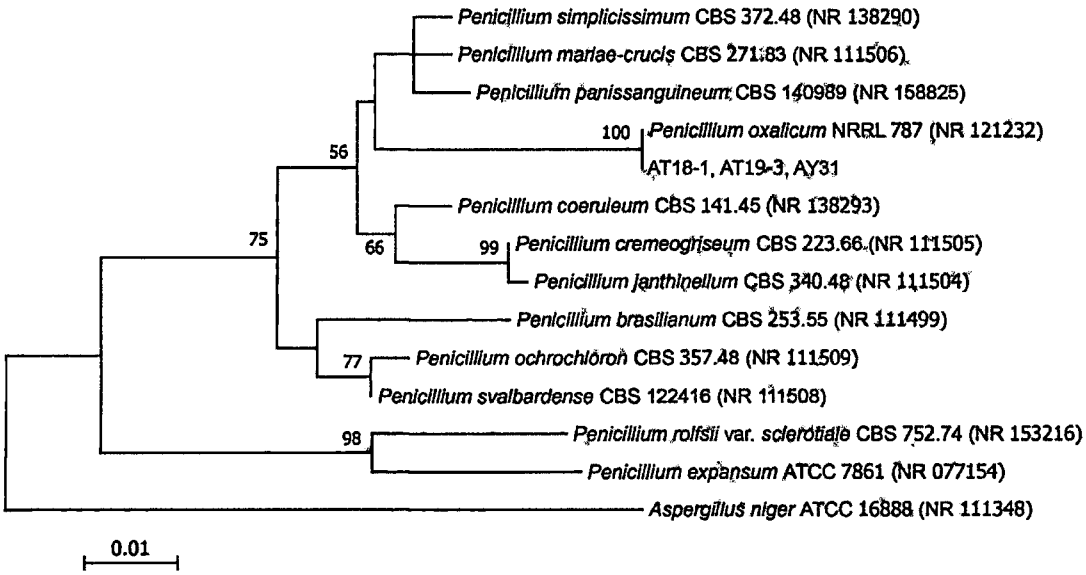

Figure 3 Phylogenetic tree base on the sequence of ITS region showing position of AT18-1, AT19-3, and AY31 with respect to closely related species. The phylogenetic tree was reconstructed from evolutionary distance data using maximum-likelihood analysis by MEGA 7.0. Numbers at nodes represent the bootstrap percentage (> 50 %) derived from 1,000 datasets. *Aspergillus niger* ATCC 16888 (NR 111348) was used as the outgroup. The scale bar indicates an evolutionary distance of 0.01 K_{nuc}.

รา *P. oxalicum* มีสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชแบบชีววิธี มีการใช้ควบคุมราสาเหตุโรคพืช เช่น ใช้ควบคุมรา *Verticillium* spp., *F. oxysporum* และ *Alternaria alternata* [22,23] อีกทั้งมีรายงานการนำไปใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวในมะเขือเทศในสภาพ glasshouse และแปลงปลูก โดยทำให้อยู่ในรูป formulated ที่ต่างกัน 8 แบบ และทุกแบบถูกนำไปใช้โดยการจุ่มเมล็ดลงใน formulation แบบต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนปลูก ส่วนการตรวจสอบการอยู่รอดชีวิตของสปอร์ทำโดยประเมินจากการงอกของสปอร์ [24] มีรายงานการใช้ *P. oxalicum* ในการควบคุมราสาเหตุโรคข้าว *Alternaria alternata* ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ water activity และอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน การศึกษาแบบ dual growth พบว่า *P. oxalicum* มีศักยภาพในการแข่งขันกับ *A. Alternata* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ผลการศึกษายังชี้ให้เห็นว่า *P. oxalicum* มีลักษณะการเป็นปฏิปักษ์แบบ mycoparasite ต่อ *A. Alternata* ภายใต้สภาพการทดลองนี้ โดย *P. oxalicum* จะใช้เส้นใยแทงเข้าไปใน *A. alternata* แล้วสร้างก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) และโคนิเดีย ซึ่งการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า *P. oxalicum* น่าจะมีบทบาทต่อการควบคุมโรคแบบชีววิธีต่อการควบคุมโรคข้าวในอนาคต [25] ปี ค.ศ. 2019 Ren และคณะ รายงานการผลิตสารโพลีคีไทด์ (polyketide) ใหม่ 2 ชนิด คือ penicilloxalone A (1) และ B (2) จากรา *P. oxalicum*

MHZ153 [26] นอกจากนี้ยังมีรายงานการแยกสาร isocoumarin ชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ terrecoumarines A-C (1-3) จากราเอนโดไฟต์ *P. oxalicum* ซึ่งสาร isocoumarin นี้มีสมบัติในการต้านแบคทีเรียและรา [27] สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ *P. oxalicum* สร้างได้จะต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์นั้น ๆ โดยสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่สร้างจากรา *P. oxalicum* ได้แก่ meroterpenoid, phenolic enamide, isocouma-rin, alkaloid และอนุพันธ์ของ butyrolactone [27-30] อย่างไรก็ตาม การนำรา *P. oxalicum* มาใช้ประโยชน์ในแปลงปลูกเกษตรกรจำเป็นต้องศึกษาวิจัยเพิ่มเติมถึงสมบัติของราสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

3.3 การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของราเอนโดไฟต์ต่อรา *R. solani* ในข้าว

การปลูกรา *R. solani* ลงบนต้นข้าวอายุ 45 วัน แล้วนำราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท ไปทดสอบการยับยั้งรา *R. solani* พบว่าราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *R. solani* ได้ แม้ว่าช่วงแรกข้าวจะแสดงอาการกาบใบแห้ง (รูปที่ 4) แต่อาการดังกล่าวจะเริ่มหายไป ขอบใบแห้งเริ่มหลุดออก ไม่มีการลุกลาม หลังจากการทดสอบผ่านไป 21 วัน ขณะที่ชุดควบคุม คือ ต้นข้าวที่ไม่ได้พ่นสปอร์ราเอนโดไฟต์ อาการกาบใบแห้งยังคงมีอยู่แม้ว่าเวลาผ่านไปถึง 28 วัน ส่วนต้นข้าวที่พ่นสารเคมี carbendazim พบว่าไม่มีอาการกาบใบแห้งเกิดขึ้น (รูปที่ 5)

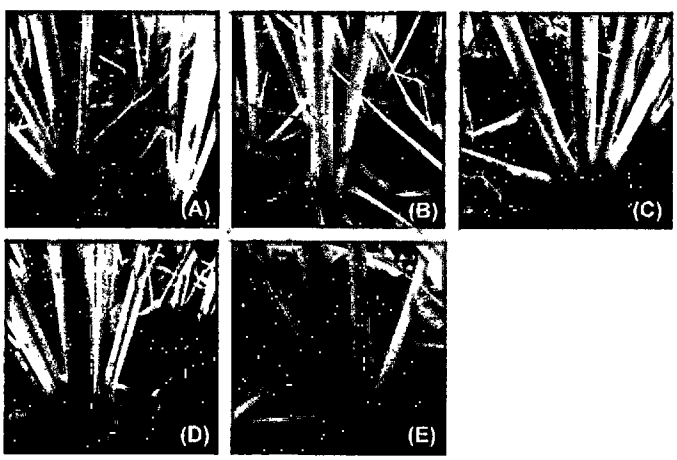

Figure 4 Rice sheath blight symptom after 7 days (A) control (B) 50 % carbendazim (C) endophytic fungi AT18-1 (D) endophytic fungi AT19- 3, and (E) endophytic fungi AY31

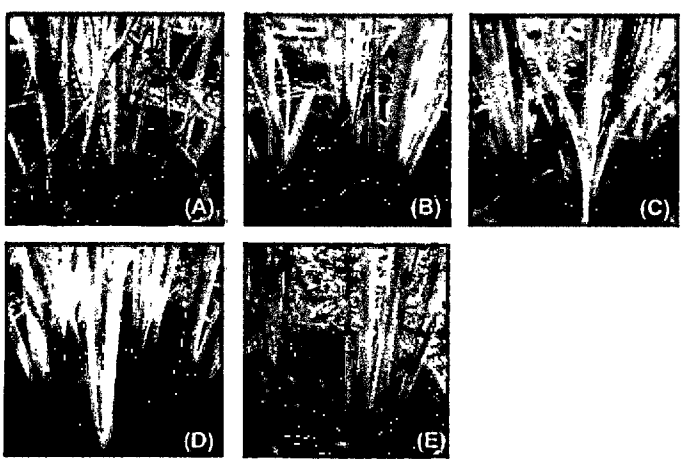

Figure 5 Rice sheath blight symptom after 28 days (A) control (B) 50 % carbendazim (C) endophytic fungi AT18-1 (D) endophytic fungi AT19- 3, and (E) endophytic fungi AY31

เมื่อนำมาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (%RLH) และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี multiple ANOVA และ post hoc test-Duncan ที่ระยะเวลา 7 และ 14 วันหลังจากปลูกรา *R. solani* ลงบนต้นข้าว และควบคุมการเกิดโรคด้วย 50 % carbendazim และราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท แล้วพบว่าการใช้สารเคมี 50 % carbendazim สามารถยับยั้งโรค 100 เปอร์เซ็นต์ คือ ไม่พบอาการกาบใบแห้งบนต้นข้าว ส่วนการใช้ราเอนโดไฟต์ที่เวลา 7 วัน พบว่า AT18-1 และ AY31 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (%RLH) ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า %RLH มากกว่า AT19-3 อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่เวลา 14 วัน ความรุนแรงของโรคลดลงเมื่อใช้ราเอนโดไฟต์ AT19-3 ในการควบคุมรา *R. solani* อย่างไรก็ตาม ราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถควบคุมการเกิดโรคกาบใบแห้งได้ดีกว่าชุดควบคุม โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเกิดขึ้นน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

Table 1 Efficacy of antagonistic endophytic fungi on severity of *R. solani* of rice sheath blight in pot test

Treatments	7 (Days)			14 (Days)		
	Height stem (cm)	Height wound (cm)	Severity (%RLH)	Height stem (cm)	Height wound (cm)	Severity (%RLH)
Control	53.28±2.47	1.77±0.29	3.33^{a}	61.68±2.29	5.22±0.60	8.46^{a}
Carbendazim	51.68±1.83	0.00±0.00	0.00^{d}	62.52±0.81	0.00±0.00	0.00^{d}
AT18-1	53.40±2.38	1.44±0.05	2.69^{b}	62.32±2.89	2.13±0.78	3.39^{b}
AT19-3	53.56±0.77	1.14±0.06	2.13^{c}	63.60±0.33	1.18±0.33	1.84^{c}
AY31	52.32±0.70	1.37±0.11	2.62^{b}	63.64±0.77	2.86±1.13	4.49^{b}

ในปี ค.ศ. 2014 Wongcharoen [31] ได้รายงานประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ *Trichoderma harzianum* GR03 และ *T. ghanense* GR06 ว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ และในปีเดียวกัน Guo และ Liao ได้คัดเลือกราที่เป็นปฏิปักษ์กับรา *R. solani* พบว่ารา *Paenibacillus kribbensis* PS04 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *R. solani* ทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* [32] อีกทั้งมีรายงานการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ No. 16 ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6 โดยพบว่าการพ่นชีวภัณฑ์ *B. megaterium* ในสภาพเรือนทดลอง สามารถลดความรุนแรงของโรคกาบใบแห้งได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ [6] ในปี ค.ศ. 2018 Chamswang และคณะ [33] ได้รายงานการใช้ชีวภัณฑ์ *Bacillus siamensis* RRK1-Rif ในการลดการเกิดโรคกาบใบแห้งของข้าว โดยพบว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้ชีวภัณฑ์แช่เมล็ดและพ่นต้นข้าว 3 ครั้ง หรือใส่ขณะเตรียมดินสามารถลดความรุนแรงและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคกาบใบแห้งของข้าวที่เกิดจากรา *R. solani* อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยสามารถลดการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่

14 และ 21 วัน นอกจากนี้ยังมีการใช้รา *Trichoderma asperellum* T12 ควบคุมโรคกาบใบแห้งข้าวที่มีรา *R. solani* เป็นเชื้อสาเหตุ จากการใช้เปลือกข้าวเป็น carrier เพื่อให้รา *T. asperllum* T12 ลอยน้ำได้และป้องกันแสง UV เมื่อนำไปทดลองบนต้นข้าวพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมแบบชีววิธีถึง 90 เปอร์เซ็นต์ [34].

4. สรุป

ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าราเอนโดไฟต์ AT18-1, AT19-3 และ AY31 ที่แยกได้จากข้าวภายหลังจัดจำแนกด้วยวิธีชีวอณูโมเลกุลบริเวณ internal transcript spacer (ITS) พบว่าเป็น *Penicillium oxalicum* โดยมีความเหมือนกับ *Penicillium oxalicum* NRRL 787^{T} (NR 121232) ซึ่งเป็น type strain 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *R. solani* สาเหตุโรคกาบใบแห้งข้าว มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 31.61, 33.33 และ 31.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำมาทดสอบกับต้นข้าวในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่าราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค ความรุนแรงของโรคลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยเฉพาะไอโซเลท AT19-3 ที่ช่วยลดความรุนแรงของโรคได้มากกว่าไอโซเลท AT18-1 และ AY31 อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการศึกษาในสภาพแปลงปลูกข้าวและความปลอดภัยของการใช้ราชนิดนี้จะเป็นการยืนยันการนำราเอนโดไฟต์ *P. oxalicum* ไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยาที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

6. References

[1] Bureau of Rice Policy and Strategy, Rice department, Demand and Supply Thai rice, Year 2020-2021, Available Source: http://www.ricethailand.go.th/web/images/ manual_rice63- 17- 3- 63. pdf, May 8, 2020. (in Thai)

[2] Rice Department, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Rice Knowledge Bank Available Source: http: / / www. ricethailand.go.th/rkb, June 27, 2020. (in Thai)

[3] Ou, S. H., 1985, Rice Diseases, 2nd Ed., Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, 380 p.

[4] Teng, P. S., Torres, C. Q., Nuque, F. L. and Calvero, S.B., 1990, Current Knowledge on Crop Losses in Tropical Rice, pp. 39-53, In IRRI, Crop Loss Assessment in Rice, International Rice Research institute, Manila.

[5] Savary, S., Willocquet, L., Elazegui, F. A., Teng, P.S., Du, V., Zhu, D., Tang, S., Huang, X., Lin, H., Singh, M. and Srivastava, R. K., 2000, Rice pest constraints in tropical Asia: Characterization of injury profiles in relation to production situations, Plant Dis. 84: 341-356.

[6] Thapanapongworakul, P. and Saimongkol, S., 2015, Efficiency of antagonistic bacterium *Bacillus megaterium* strain No. 16 for controlling sheath blight disease of RD6 rice variety, J. Agric. 31(3): 301-310. (in Thai)

[7] Kaewkrajay, C., Dethoup, T. and Sathitpa

nawong, L., 2014, Efficacy of endophytic fungi isolated from *Sesbania javanica* against plant pathogenic fungi, Khon Kaen Agric. J. 42(3): 271-282. (in Thai)

[8] Latz, M.A.C., Jensen, B., Collinge, D.B. and Jorgensen H.J.L., 2018, Endophytic fungi as biocontrol agents: Elucidating mechanisms in disease suppression, Plant Ecol. Divers. 11: 555-567.

[9] Jitsuwannarak, K. and Wongcharoen, A., 2016, Efficiency of endophytic fungi to control rice blast disease (*Oryza sativa* L.), Khon Kaen Agric. J. 44(Suppl. 1): 232-237. (in Thai)

[10] Pripdeevech, P., Tanapichatsakul, C., Chimthai, S., Phormmard, W. and Brooks, S., 2018, Antagonistic effect of endophytic fungal, *Fusarium* sp. MFLUCC16- 1462, against *Magnaporthe oryzae*, Thai J. Sci. Technol. 7(Suppl. 6): 581-591.

[11] Park, Y.H., Chung, J.Y., Ahn, D.J., Kwon, T.R., Lee, S.K., Bae, I., Yun, H.K. and Bae, H., 2015, Screening and characterization of endophytic fungi of *Panax ginseng* Meyer for biocontrol activity against ginseng pathogens, Biol. Control 91: 71-81.

[12] Strobel, G.A., 2006, *Muscodor albus* and its biological promise, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 33: 514-522.

[13] Manoch, L., Athipunyakom, P., Jaroenthai, K., Busarakam, K., Jeamjitt, O., Dethoup, T., Kokaew, J. and Poochinya, P., 2004, Plant parasitic fungi on fruits & vetget ables and soil fungi from termite mounds, pp. 544- 552, In Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference: Plants, Kasetsart University, Bangkok.

[14] George, M.L.C., Nelson, R.J., Zeigler, R.S. and Leung, H., 1998, Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences, Phytopathology 88: 223-229.

[15] Kumar, K.V.K., Yellareddygari, S.K.R., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Lawrence, K.S., Zhou, X.G., Sudini, H., Groth, D.E., Raju, S.K. and Miller, M.E., 2012, Efficacy of *Bacillus subtilis* MBI 600 against sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* and on growth and yield of rice, Rice Sci. 19: 55-63.

[16] Anh, S.W., Pena, R.L., Candole, B.L. and Mew, T.W., 1986, A new scale for rice sheath blight disease assessment, IRRI 11(6): 17.

[17] Yu, J., Wu, Y., He, Z., Li, M., Zhu, K. and Gao, B., 2018, Diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with *Camellia oleifera*, Mycobiology 46: 85-91.

[18] Chowdhary, K. and Kaushik, N., 2018, Biodiversity study and potential of fungal endophytes of peppermint and effect of their extract on chickpea rot pathogens, Arch. Phytopathol. Plant Protect. 51: 139-155.

[19] Ibrahim, M., Kaushik, N., Sowemimo, A.,

Chhipa, H., Koekemoer, T., van de Venter M. and Odukoya, O.A., 2017, Antifungal and antiproliferative activities of endophytic fungi isolated from the leaves of *Markhamia tomentosa*, Pharm. Biol. 55: 590-595.

[20] Luo, Z.P., Lin, H.Y., Ding, W.B., He, H.L. and Li, Y.Z., 2015, Phylogenetic diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with *Tephrosia purpurea*, Mycobiology 43: 435-443.

[21] Paul, N.C., Kim, W.K., Woo, S.K., Park, M.S. and Yu, S.H., 2006, Diversity of endophytic fungi associated with *Taraxacum coreanum* and their antifungal activity, Mycobiology 34: 185-190.

[22] Martinez- Beringola, M.L., Salto, T., Vázquez, G., Larena, I., Melgarejo, P. and de Cal, A., 2013, *Penicillium oxalicum* reduces the number of cysts and juveniles of potato cyst nematodes, J. Appl. Microbiol. 115: 199-206.

[23] Ahmad, A., Shafique, Shafique, S. and Akram, W., 2014, *Penicillium oxalicum* directed systemic resistance in tomato against *Alternaria alternata*, Acta Physiol. Plant 36: 1231-1240.

[24] Sabuquillo, P., Cal, A.D. and Melgarejo, P., 2006, Biocontrol of tomato wilt by *Penicillium oxalicum* formulations in different crop conditions, Biol. Control 37: 256-265.

[25] Sempere, F. and Santamarina, M.P., 2010, Study of the interactions between *Penicillium oxalicum* Currie & Thom and *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. Braz., J. Microbiol. 41: 700-706.

[26] Ren, Y., Chao, L.H., Sun, J., Chen X.N., Yao, H.N., Zhu, Z.X., Dong, D., Liu, T., Tu, P.F. and Li, J., 2019, Two new polyketides from the fungus *Penicillium oxalicum* MHZ153, Nat. Prod. Res. 33: 347-353.

[27] Li, Q.Q., Dang, L.Z., Zhang, Y.P., Jiang, J.X., Zhang, C.M., Xiang, N.J., Yang, H.Y., Du, G. and Duan, Y.Q., 2015, Isocoumarins from the fermentation products of a plant entophytic fungus *Penicillium oxalicum*, J. Asian Nat. Prod. Res. 17: 876-881.

[28] Li, X., Li, X.M., Zhang, P., Wang, B.G., 2015, A new phenolic enamide and a new meroterpenoid from marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium oxalicum* EN-290, J. Asian Nat. Prod. Res. 17: 1204-1212.

[29] Zhang, P., Li, X.M., Liu, H., Li, X. and Wang, B.G., 2015, Two new alkaloids from *Penicillium oxalicum* EN-201, an endophytic fungus derived from the marine mangrove plant *Rhizophora stylosa*, Phytochem. Lett. 13: 160-164.

[30] Yuan, L., Huang, W.Z., Zhou K., Wang, Y.D., Dong, W., Du, G., Gao, X.M., Ma, Y.H. and Hu, Q.F., 2015, Butyrolactones derivatives from the fermentation products of a plant endophytic fungus *Penicillium oxalicum*, Nat. Prod. Res. 29: 1914-1919.

[31] Wongcharoen, A., 2014, Screening of endophytic fungi from rice (*Oryza sativa* L.) against rice pathogenic fungi, Khon Kaen Agric. J. 42(3): 385-396. (in Thai)

[32] Guo, T. and Liao, M., 2014, Suppression of *Rhizoctonia solani* and induction of host plant resistance by *Paenibacillus kribbensis* PS04 towards controlling of rice sheath blight, Biocontrol Sci. Technol. 24: 116-121.

[33] Chamswarng, C., Intanoo, W. and Noisai, B., 2018, Efficacy of biological products of *Bacillus siamensis* RRK1-Rif for reducing sheath blight and dirty panicle of rice, Agric. Sci. J. 49: 1-14.

[34] Chen, L.H., Zhang, J., Shao, X.H., Wang, S.S., Miao, Q.S., Mao, X.Y., Zhai, Y.M. and She, D.L., 2015, Development and evaluation of *Trichoderma asperellum* preparation for control of sheath blight of rice (*Oryza sativa* L.) Biocontrol Sci. Technol. 25: 316-328.