วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 25 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2563
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 25 (No.3) September – December 2020 บทความวิจัย

ฤทธิ์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์พืชชายเลนในการยับยั้งราปนเปื้อนบนเมล็ดพันธุ์ข้าวเปลือก

Activity of Crude Extracts from Mangrove Derived Endophytes against Fungi Contaminating on Paddy

เจนจิรา มารมย์, นิสา ไกรรักษ์ และ อภิรดี ปิลันธนภาคย์

Jenjira Marom, Nisa Krairak and Apiradee pilantanapak*

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Microbiology Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 23 July 2019

Revised : 5 December 2019

Accepted : 28 January 2020

บทคัดย่อ

การตรวจคัดกรองสารก่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์พืชชายเลนจำนวน 23 สาร ในการยับยั้งราปนเปื้อนบนข้าวเปลือก 8 ไอโซเลท คือ *Rhizopus* spp. (KCN 4, KHP 1, KHP 2 และ KMK 7) Zygomycete KCN 2, KML 8 และ ราอะนามอร์พ KCN 5, KCN 6 ด้วยวิธี disc diffusion พบสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์พืชชายเลนจำนวน 5 สาร (ร้อยละ 21.7) สามารถยับยั้งการเจริญราปนเปื้อนบนข้าวเปลือกได้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ราที่ถูกยับยั้งได้เกือบทั้งหมดเป็นราชั้นสูงที่เจริญช้า (ราอะนามอร์พ KCN 5 และ KCN 6) พบว่าสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรา mycelia sterilia BUEN 887 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (887EtOAc) และ mycelia sterilia BUEN 938 ที่สกัดด้วยเอทานอล (938EtOH) มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา KCN 6 และ KCN 5 ได้ดีที่สุด ตามลำดับ ด้วยประสิทธิภาพการยับยั้งสูงกว่าร้อยละ 30 (%IE > 30) เมื่อคัดเลือกสารสกัดจากอาหารเลี้ยงรา BUEN 887 และ BUEN 938 อายุ 7 วัน ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของสารสกัดต่อราปนเปื้อน KCN 5 และ KCN 6 บนเมล็ดข้าวเปลือก โดยวิธีแช่เมล็ดข้าวเปลือกในสารสกัดดังกล่าวเป็นเวลา 30 นาที พบสารสกัด 887EtOAc สามารถยับยั้งการเจริญของราทดสอบ KCN 5 และ KCN 6 ได้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง และสารสกัด 938EtOH สามารถยับยั้งการเจริญของราทดสอบ KCN 5 และ KCN 6 ได้อย่างน้อย 48 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

คำสำคัญ : สารสกัด ; ราเอนโดไฟท์ ; พืชชายเลน ; ข้าวเปลือก

*Corresponding author. E-mail : apiradee@buu.ac.th

Abstract

Preliminary screening of 23 crude extracts from culture broths of fungal endophytes isolated from mangrove plants against 8 fungi contaminated on paddy; *Rhizopus* spp. (KCN 4, KHP 1, KHP 2 and KMK 7) Zygomycete KCN 2, KML 8 and anamorphic fungi KCN 5, KCN 6, by disc diffusion revealed five crude extracts (21.7%) inhibited growth of at least one fungal contaminating strain on paddy. Almost all of inhibited strains are slow growing (anamorphic fungi KCN 5 and KCN 6). The ethyl acetate extracts of mycelia sterilia BUEN 887 culture broth (887EtOAc) and ethanol extracts of mycelia sterilia BUEN 938 culture broth (938EtOH) strong inhibited (IE > 30%) KCN 6 and KCN 5, respectively. When two extracts from 7 days PDB cultures of BUEN 887 and BUEN 938 were selected for inhibitory activity testing against fungi contaminating on paddy; KCN 5 and KCN 6, by soaking the paddy in the extracts for 30 minutes. The result showed that 887EtOAc was able to inhibit growth of KCN 5 and KCN 6 for at least 24 hours. Extract 938EtOH could inhibit growth of KCN 6 and KCN 5 on paddy for at least 48 and 24 hours, respectively.

Keywords : crude extracts ; endophytic fungi ; mangrove plant ; paddy

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชสำคัญของประชากรโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย (Wikipedia, 2019) ในประเทศไทยข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่สุดสำหรับการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก ในปี 2014 ประเทศไทยส่งออกข้าวเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นประเทศสำคัญ 1 ใน 5 ของการส่งออกรายใหญ่ของโลก โดยส่งออกทั้งหมด 10.97 ล้านตัน คิดเป็นเงิน 174,852 ล้านบาทหรือเท่ากับ 5,439 ล้านเหรียญสหรัฐฯ (Thai Rice Exporters association, 2016) ปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของเมล็ดข้าว คือ โรคข้าวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย และรา โดยเฉพาะราเป็นสาเหตุที่สำคัญอย่างยิ่ง ตัวอย่างโรคข้าวที่มีสาเหตุจากรา เช่น โรคเมล็ดด่าง โรคไหม้ โรคราสนิม เป็นต้น (Wongcharoen, 2014) สาเหตุสำคัญรองลงมา คือ การปนเปื้อนหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อนที่มีความชื้นในอากาศมาก ส่งผลให้เมล็ดข้าวเปลือกมีความชื้นสูงทำให้มีการปนเปื้อนจากราได้ง่าย การปนเปื้อนจากราหลังการเก็บเกี่ยวส่งผลให้เมล็ดข้าวเปลือกเกิดปัญหาตามมาหลายประการ ตัวอย่างเช่น เมล็ดข้าวเสื่อมคุณภาพและสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ ความสามารถในการงอกเกิดความเสียหายอย่างรุนแรง มีสีเปลี่ยนไป สูญเสียน้ำหนัก และ มีสารพิษจากราบางสายพันธุ์ที่ปนเปื้อนอยู่ (Reddy *et al.,* 2008; Mohapatra *et al.,* 2017) รายงานการปนเปื้อนของราหลายชนิดบนเมล็ดข้าวเปลือกในประเทศไทยมีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Pitt *et al.,* 1994) และเมื่อเร็วๆนี้ Nakkanthong (2017) รายงานไว้ว่าราที่พบปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ข้าวเปลือกของเกษตรกร จังหวัดเพชรบุรี ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. และ *Rhizopus* sp.

การใช้สารเคมีสังเคราะห์กำจัดราเป็นวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้ ในการควบคุมโรคพืชและราที่ปนเปื้อนหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายมีประสิทธิภาพสูง ประหยัดเวลาและต้นทุน อย่างไรก็ตามหากใช้สารเคมีสังเคราะห์ต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน จะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ทำลายระบบนิเวศของนาข้าวและที่สำคัญคือส่งผลกระทบต่อสุขภาพ ของเกษตรกรและผู้บริโภคทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง จึงได้มีการค้นหาแนวทางการควบคุมราโดยใช้วิธีควบคุมทางชีวภาพเป็นทางเลือกใหม่เนื่องจากเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค (Wongcharoen, 2014) วิธีหนึ่งที่มีผู้สนใจกันมากเนื่องจากปลอดภัยและได้ผลดีในการควบคุมราโรคข้าว คือการใช้สารสกัดจากพืชและส่วนต่าง ๆ ของพืชมาใช้ควบคุม (Jayaraj *et al.,* 2018**;** Lee *et al.,* 2018; Durgeshlal *et al.,* 2019) อย่างไรก็ตามในรายงานด้านจุลชีววิทยาการเกษตรหลายรายงานมีการนำสารก่อฤทธิ์ทางชีวภาพจากราและราเอนโดไฟท์มาใช้ประโยชน์ ในการเป็นสารต้านราสาเหตุของโรคพืช (Khrueayu & Pilantanapak, 2012; Wongcharoen, 2014) ปัจจุบันเอนโดไฟท์ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางเกษตรกรรมอย่างแพร่หลายในด้านการใช้เป็นตัวควบคุมโรคพืชทางชีววิธี รวมถึงมีการพัฒนาเป็นหัวเชื้อสำหรับการปลูกข้าวและพืชเศรษฐกิจกลุ่มอื่น ๆ กันอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น ราเอนโดไฟท์ในสกุล *Trichoderma* สามารถนำมาควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้ หรือพัฒนาเป็นหัวเชื้อราในการส่งเสริมการเจริญของข้าวและพืชชนิดอื่น (Insain, 2017) แต่เท่าที่ทราบ การนำสารก่อฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์มาใช้ในการควบคุมราปนเปื้อนของผลผลิตข้าวเปลือกที่เก็บไว้เป็นเมล็ดพันธุ์ ยังไม่พบว่ามีรายงานไว้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้และเพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารก่อฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์พืชชายเลนชนิดต่าง ๆ ในระดับห้องปฏิบัติการที่ยับยั้งราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าว เพื่อเสนอแหล่งทางเลือกใหม่ในการตรวจคัดกรองราและเมตาบอไลท์ เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมราที่ปนเปื้อนอยู่บนเมล็ดพันธุ์ข้าวเปลือกหลังการเก็บเกี่ยวต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. *<u>การคัดแยกราเอนโดไฟท์จากใบพืชชายเลน</u>*

นำใบพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์ไม่มีลักษณะอาการของโรคมาล้างด้วยน้ำประปาและตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้นต่อใบ แช่ในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70% นาน 2 นาที และแช่ในสารละลาย clorox ความเข้มข้น 10% นาน 1 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำมาซับบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ แล้วนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% water agar (WA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน แยกเส้นใยราเดี่ยว เลี้ยงบน potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์ไว้ศึกษาต่อไป

2. *<u>สารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์</u>*

นำราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงโดยการเขย่าให้อากาศความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันในอาหาร potato dextrose broth มากรองแยกเส้นใย แล้วนำอาหาร 100 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต (EtOAc) อัตราส่วน 1:1 ทำการสกัด 2 รอบ นำสารสกัดที่ได้มารวมกัน นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator แบ่งสารสกัดส่วนหนึ่งมาละลายด้วยสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 50% ที่ปลอดเชื้อ (Khrueayu , 2013) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารสกัดอีกครึ่งหนึ่งนำมาละลายและสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนผสมกับกับเอทานอล (EtOH) อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นแยกสารส่วนเอทานอลไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดหยาบละลายด้วยสารละลาย dimethyl sulfoxide ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สุ่มสารทดสอบทั้ง 2 กลุ่ม รวม 23 สาร จากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชต่าง ๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 1 ไปทดสอบการยับยั้งราปนเปื้อนบนข้าวเปลือก

3. *ข้าวเปลือกทดสอบและราทดสอบ*

เมล็ดพันธุ์ข้าวเปลือกที่ใช้ทดสอบเป็นพันธุ์หอมมะลิแดง ได้รับอนุเคราะห์จากเกษตรกรจังหวัดเพชรบุรี สายพันธุ์ราที่ปนเปื้อนในข้าวเปลือก จำนวน 8 ไอโซเลท แยกได้จากเมล็ดข้าวเปลือก 3 สายพันธุ์ ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ม. บูรพา ทำการจัดจำแนกเบื้องต้นด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา (Barnett & Hunter, 2006; Samson *et al.*, 2004) และเก็บไว้เป็น stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ห้องปฏิบัติการรา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา แสดงดังตารางที่ 2

4. *อาหารเลี้ยงเชื้อ*

ประกอบด้วย potato dextrose agar (PDA) (Difco) ที่เตรียมจากน้ำทะเลที่มีความเค็มเข้มข้น 30 part per thousand (ppt) (PDA/SW_{30}) สำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อเอนโดไฟท์ PDA (Difco) ที่เตรียมจากน้ำกลั่นสำหรับเลี้ยงราทดสอบและทดสอบการยับยั้งบนอาหารแข็ง และ potato dextrose broth (PDB) (Difco) ที่เตรียมจากน้ำกลั่นเพื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ก่อนการสกัดสาร

ตารางที่ 1 ชนิดของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์พืชชายเลนที่ศึกษา

ลำดับ	สารสกัดจากราเอนโดไฟท์	แหล่งของราเอนโดไฟท์	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด*	ลำดับ	สารสกัดจากราเอนโดไฟท์	แหล่งของราเอนโดไฟท์	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด*
1	BUEN 880	โพทะเล	EtOH	13	BUEN 904	โกงกางใบเล็ก	EtOH
2	BUEN 852	พังกาหัวสุมดอกแดง	EtOH	14	BUEN 910	โพทะเล	EtOAc
3	BUEN 852		EtOAc	15	BUEN 914	ตะบัน	EtOH
4	BUEN 884	ลำพูทะเล	EtOH	16	BUEN 914		EtOAc
5	BUEN 884		EtOAc	17	BUEN 916	โพทะเล	EtOAc
6	BUEN 856	โพทะเล	EtOAc	18	BUEN 925		EtOAc
7	BUEN 862		EtOAc	19	BUEN 938	โปรงแดง	EtOH
8	BUEN 869	ลำพูทะเล	EtOAc	20	BUEN 938		EtOAc
9	BUEN 874	โกงกางใบเล็ก	EtOAc	21	BUEN 944	โพทะเล	EtOAc
10	BUEN 876	ตะบัน	EtOAc	22	BUEN 950	ตาตุ่มทะเล	EtOH
11	BUEN 887	ปรงทะเล	EtOAc	23	BUEN 950		EtOAc
12	BUEN 896	โพทะเล	EtOAc				

*EtOH คือสารสกัดหยาบราเอนโดไฟท์ที่สกัดด้วยเอทานอล EtOAc คือสารสกัดหยาบราเอนโดไฟท์ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต

ตารางที่ 2 สายพันธุ์ราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือกที่ใช้เป็นราทดสอบ

สายพันธุ์ราปนเปื้อน	การจัดจำแนก*	สายพันธุ์ข้าวเปลือกที่พบรา
KCN 2	unknown Zygomycota	ชัยนาท 1
KCN 4	*Rhizopus* sp.	ชัยนาท 1
KCN 5	mycelia sterilia	ชัยนาท 1
KCN 6	unknown anamorph	ชัยนาท 1
KHP 1	*Rhizopus* sp.	ปทุมธานี 1
KHP 2	*Rhizopus* sp.	ปทุมธานี 1
KML 7	*Rhizopus* sp.	หอมมะลิแดง
KML 8	unknown Zygomycota	หอมมะลิแดง

5. *การเตรียมราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือก (ราทดสอบ)*

ทำการถ่ายโอนราปนเปื้อนที่แยกได้จากเมล็ดข้าวเปลือกในหลอดเก็บเชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เพื่อให้ได้เส้นใยของราที่มีอัตราการเจริญสูง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 วัน สำหรับราชนิดที่เจริญเร็ว และ 5 – 7 วัน สำหรับราชนิดที่เจริญช้า ตรวจสอบยืนยันเชื้อจากลักษณะโคโลนี และลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ ก่อนนำสายพันธุ์ราบริสุทธิ์ไปใช้เป็นราทดสอบต่อไป

6. *การตรวจคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์พืชชายเลนที่มีต่อราปนเปื้อนบนข้าวเปลือกด้วยวิธี disc diffusion* (ดัดแปลงจาก Khrueayu & Pilantanapak, 2012)

นำชิ้นวุ้นราทดสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกว่าโคโลนีราเจริญมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร วางแผ่นดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ชุบสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์พืชชายเลนปริมาตร 20 ไมโครลิตร และรอจนแห้งแล้ว มาวางลงบนฝั่งขวาของอาหารที่มีราทดสอบเจริญให้มีระยะห่างจากโคโลนีราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือก 1 เซนติเมตร และนำแผ่นดิสก์ที่มี 50% DMSO (ชุดควบคุมผลลบ) มาวางบนฝั่งซ้ายของอาหารที่มีราทดสอบ ให้ห่างจากขอบโคโลนี 1 เซนติเมตร เช่นเดียวกัน กดแผ่นดิสก์เบา ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกว่าเส้นใยราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือกเจริญมาถึงขอบแผ่นดิสก์ที่มี 50% DMSO อยู่ (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) บันทึกระยะทางที่ราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือกเจริญเพิ่มขึ้นเข้าหาแผ่นดิสก์สารสกัด (R_2) และระยะที่ราเจริญเพิ่มขึ้นของฝั่งที่เจริญเข้าหาแผ่นดิสก์ที่มี 50% DMSO อยู่ (R_1) ดังภาพที่ 5 และคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญ (% inhibition efficiency, % IE) จากสูตร

$$\% \text{ IE} = [(R_1-R_2) / R_1] \times 100 \qquad (1)$$

7. *การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์พืชชายเลนในการยับยั้งราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือก*

(ดัดแปลงจาก Wongcharoen (2014) และ Nochai & Srichuwong (2007))

ใช้เมล็ดข้าวเปลือก 30 เมล็ดต่อซ้ำ ทำ 3 ซ้ำ ดังนี้

คัดเลือกเมล็ดข้าวเปลือกสายพันธุ์หอมมะลิแดง ที่มีคุณภาพ คือ มีส่วนประกอบของเมล็ดสมบูรณ์ เมล็ดมีน้ำหนักใกล้เคียงกันจำนวน 30 เมล็ด ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดข้าวเปลือกด้วยการแช่ใน 2.5% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ซับให้แห้งบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ เตรียมสปอร์แขวนลอยราทดสอบ KCN 5 และ KCN 6 ที่คัดเลือกไว้ ในสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% ให้มีความเข้มข้นสปอร์สุดท้ายเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เตรียมสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ของพืชชายเลนที่กลั่นระเหยแห้งแล้ว ผสมกับสารละลาย 50% DMSO ใส่ในหลอด microcentifuge ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำเมล็ดข้าวเปลือกปลอดเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาแช่ในสปอร์แขวนลอยราทดสอบ KCN 5 และ KCN 6 ที่เตรียมไว้ นาน 30 นาที ผึ่งให้แห้งหมาดๆ บนกระดาษกรองปลอดเชื้อ ในตู้ชีวนิรภัย แล้วนำไปใส่ในสารสกัดที่เตรียมไว้ โดยใส่ 10 เมล็ดในแต่ละหลอด แช่ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำมาผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรองปลอดเชื้อในตู้ชีวนิรภัย แล้วนำมาวางบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกจำนวนเมล็ดและวันที่ ที่พบราทดสอบเจริญทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน ชุดควบคุมผลบวก (Viable control) ทำการทดลองในลักษณะเดียวกันแต่เปลี่ยนเป็นแช่เมล็ดข้าวเปลือกในสปอร์แขวนลอยราทดสอบ และ ชุดควบคุมผลลบ (Negative control) แช่ในสารละลาย 50% DMSO

ผลการวิจัย

1. *การตรวจคัดกรองสารก่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์พืชชายเลนที่มีฤทธิ์ยับยั้งราปนเปื้อนบนข้าวเปลือกด้วยวิธี disc diffusion*

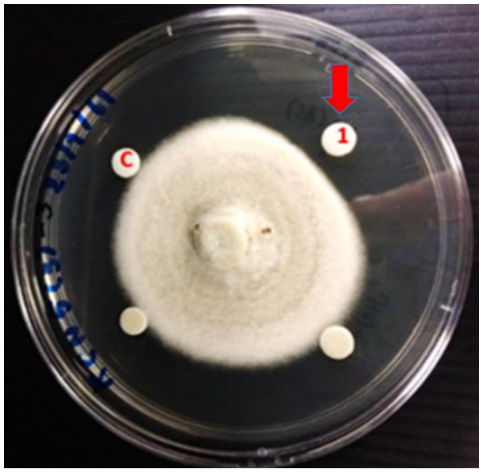
เมื่อนำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ที่สกัดด้วยเอทิลออะซิเตต (EtOAc) และเอทานอล (EtOH) ทั้ง 23 สาร มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราทดสอบที่มีอัตราการเจริญช้า คือ KCN 5 และ KCN 6 ด้วยวิธี disc diffusion บนจานอาหาร PDA พบว่าสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ 4 สายพันธุ์ คือ BUEN 880, BUEN 852 และ BUEN 938 ที่สกัดด้วยเอทานอล รวมทั้ง BUEN 887 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต มีฤทธิ์ยับยั้งราทดสอบแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของราทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์สารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดจาก BUEN 938 ที่สกัดด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งรา KCN 5 mycelia sterilia ได้ดีที่สุด คือมีประสิทธิภาพการยับยั้งร้อยละ 36.7 ± 5.8 (ภาพที่ 1) สารสกัดจาก BUEN 887 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ยับยั้งรา KCN 6 unknown anamorph ได้ดีที่สุด มีประสิทธิภาพการยับยั้งร้อยละ 40.0 ± 10.0 แสดงผลดังตารางที่ 3

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราปนเปื้อนบนข้าวเปลือกกับเชื้อทดสอบที่มีอัตราการเจริญเร็ว คือ KCN 2, KCN 4, KHP 1, KHP 2, KML 7 และ KML 8 ด้วยวิธี disc diffusion บนจานอาหาร PDA ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ทั้ง 23 สาร ให้ผลลบเป็นส่วนใหญ่ พบว่ามีเพียงสกัดจาก BUEN 950 ที่สกัดด้วยเอทานอลเท่านั้นที่มีมีฤทธิ์ยับยั้งราปนเปื้อนบนข้าวเปลือก และยับยั้งได้เฉพาะ รา KCN 2 ด้วย ประสิทธิภาพร้อยละ 20 ± 10.0 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ยับยั้งราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือกที่มีอัตราการเจริญช้าของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์โดยวิธี Disc diffusion

สารสกัดจากรา	*ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือก (%)			สารสกัดจากรา	*ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือก (%)		
		KCN 5	KCN 6	KCN2			KCN 5	KCN 6	KCN2
BUEN 880	EtOH	20.0±10.0	-	-	BUEN 896	EtOAc	-	-	-
BUEN 884	EtOH	-	-	-	BUEN 904	EtOH	-	-	-
	EtOAc	-	-	-	BUEN 910	EtOAc	-	-	-
BUEN 852	EtOH	26.7±5.8	-	-	BUEN 914	EtOH	-	-	-
	EtOAc	-	-	-		EtOAc	-	-	-
BUEN 856	EtOAc	-	-	-	BUEN 916	EtOAc	-	-	-
BUEN 862	EtOAc	-	-	-	BUEN 925	EtOAc	-	-	-
BUEN 869	EtOAc	-	-	-	BUEN 938	EtOH	36.7±5.8	-	-
BUEN 874	EtOAc	-	-	-		EtOAc	-	-	-
BUEN 876	EtOAc	-	-	-	BUEN 944	EtOAc	-	-	-
BUEN 887	EtOAc	-	40.0±10.0	-	BUEN 950	EtOH	-	-	20±10.0

*EtOH สารสกัดหยาบราเอนโดไฟท์ที่สกัดด้วยเอทานอล, EtOAc คือ สารสกัดหยาบราเอนโดไฟท์ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต, - คือ ไม่ยับยั้ง



ภาพที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งรา KCN 5 โดยวิธี disc diffusion 1: สารสกัดจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ BUEN 938 ที่สกัดด้วยเอทานอล, C: ชุดควบคุม (50% DMSO)

2. *<u>การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ของพืชชายเลนในการยับยั้งราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือก</u>*

เมื่อนำสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ 2 ไอโซเลท คือ BUEN 887 (887EtOAc) และ BUEN 938 (938 EtOH) ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุดจากการศึกษาที่ผ่านมา มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราทดสอบ KCN 5 และ KCN 6 บนเมล็ดข้าวเปลือกบนจานอาหาร จากการทดลองพบว่า ทั้งสารสกัด 887EtOAc และ 938EtOH สามารถยับยั้งการเจริญราทดสอบ KCN 5 และ KCN 6 ได้ ดังตารางที่ 4 โดย 887EtOAc ยับยั้งการเจริญของราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือก KCN 5 และ KCN 6 ได้ทั้ง 30 เมล็ด (ร้อยละ100) และยับยั้งได้นานกว่าชุดควบคุมผลบวกที่ไม่ได้เติมสารสกัดอย่างน้อย 24 ชั่วโมง และในวันที่ 2-7 การเจริญของรา KCN 5 ยังถูกยับยั้งได้ด้วยสารสกัด 887EtOAc แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงจาก ร้อยละ 95 ในวันที่ 2 เป็นร้อยละ 56.7 ในวันที่ 7 สารสกัด 938 EtOH สามารถยับยั้งราทดสอบ KCN 5 และKCN 6 ที่ปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือกทั้ง 30 เมล็ดได้นานอย่างน้อย 48 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมงก่อนที่จะพบว่ามีเมล็ดข้าวที่ราเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับ ในวันที่ 2-7 ประสิทธิภาพการยับยั้ง KCN 5 ลดลงจาก ร้อยละ 98.3 ในวันที่ 2 เป็น ร้อยละ 81.7 ในวันที่ 7

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ยับยั้งการงอกของราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือก KCN 5 และ KCN 6 ของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์

วันที่บันทึกผล	ค่าเฉลี่ยปริมาณเมล็ดข้าวเปลือกปนเปื้อนในชุดควบคุม* (%)			ค่าเฉลี่ยปริมาณเมล็ดข้าวเปลือกปนเปื้อนในชุดทดสอบ (%)			
	Control 1	Control 2	Negative control	887EtOAc		938EtOH	
				KCN 5	KCN 6	KCN 5	KCN 6
1	46.66	96.7	-	-	-	-	-
2	86.66	100	-	5	100	-	100
3	100	100	-	22.5	100	1.7	100
4	100	100	-	40.0	100	6.7	100
5	100	100	-	41.7	100	13.7	100
6	100	100	-	42.5	100	17.5	100
7	100	100	-	43.4	100	18.7	100

*Control 1 และ control 2 คือ ชุดควบคุมข้าวเปลือกที่แช่ด้วยราทดสอบ KCN 5 และ KCN 6 ตามลำดับ
Negative control คือชุดควบคุมที่แช่เมล็ดข้าวเปลือกด้วย 50% DMSO - คือ ไม่พบข้าวเปลือกที่มีราเจริญ

วิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือกของสารสกัดเอทิลอะซิเตต (EtOAc) และเอทานอล (EtOH) ด้วยวิธี dual culture พบว่ามีระยะยับยั้ง (Inhibition distance; ID) มากกว่า 2 มิลลิเมตร สอดคล้องกับปฏิสัมพันธ์การหลั่งสารระยะไกลแบบ antibiosis (Dix & Webster, 1995) ซึ่งสารนั้นอาจเป็นสารปฐมภูมิหรือทุติยภูมิก็ได้ ในขณะที่ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ อายุ 7 วัน ซึ่งราเจริญเต็มที่แล้ว ด้วยวิธี disc diffusion น่าจะเกิดจากสารทุติยภูมิเป็นหลัก ซึ่งก่อนนำอาหารเหลวจากการเลี้ยงราไปสกัดสารได้เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์แบบเขย่าให้อากาศในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน Khrueayu (2013) รายงานว่าในสภาวะดังกล่าวราเอนโดไฟท์จะมีการผลิตสารทุติยภูมิออกมา จากการศึกษาอื่น ๆ มีรายงานราหลายชนิดที่แยกจากสิ่งแวดล้อมสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติหลากหลาย เช่น Polyketide, Terpene, Terpenoid, Quinone, Indole และ Alkaloid (Hasan *et al*., 2015; Keller *et al*., 2005; Swathi *et al*., 2013; Vaske & Crews, (2014) เอทิลอะซิเตตเป็นตัวทำละลายที่ใช้กันมากในการสกัดสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราหลากหลาย (Ahsan *et al.,* 2017) และจากรายงานของ Khrueayu (2013) พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากอาหารเหลวเลี้ยงราเอนโดไฟท์ ที่แยกได้จากใบพืชชายเลนในภาคตะวันออกของประเทศไทยเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด สามารถดึงสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ

ตัวทำละลายเฮกเซนและเอทานอล แต่การใช้เอทิลอะซิเตตในการสกัดสารอาจไม่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์บางชนิด คือ สารที่มีขั้วกลาง (Medium polarity compound) เช่น Peptide และสารมีขั้วต่ำ (Low polarity compound) เช่น Terpene, Hydrocabon ที่อยู่ในอาหารเหลวออกมาได้ (Justino *et al.,* 2014) ในขณะที่เอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง สามารถสกัดได้ทั้งสารที่มีขั้วและสารที่ไม่มีขั้ว การเลือกใช้สารสกัดที่สกัดมาจากตัวทำละลายทั้ง 1-2 ชนิดนี้ในการศึกษา จึงทำให้ได้ประเภทของสารที่สกัดออกมาครอบคลุมกว่าการศึกษาสารสกัดจากเอทิลอะซิเตตเพียงอย่างเดียว และจากผลการทดลองส่วนใหญ่สารสกัดที่ยับยั้งราปนเปื้อนได้ มักจะเป็นสารที่สกัดได้จากเอทิลอะซิเตตหรือเอทานอล อย่างใดอย่างหนึ่ง มีแนวโน้มว่าสารสกัดจากเอทานอลจะยับยั้งราปนเปื้อนข้าวเปลือกได้มากกว่า (4 สารจาก 5 สารให้ผลการยับยั้ง) ราที่ถูกยับยั้งได้ดีในการศึกษานี้คือ KCN 5 และ KCN 6 ซึ่งเป็นราชั้นสูงไม่สร้างสปอร์ มีเพียงสารสกัดเดียวคือ 950EtOH ที่สามารถยับยั้งราเจริญเร็ว *Rhizopus* sp. ได้ร้อยละ 20 อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยยังไม่พบรายงานการยับยั้ง *Rhizopus* spp. ด้วยราหรือสารสกัดจากรา ในรายงานส่วนใหญ่การยับยั้ง *Rhizopus* spp.จะเกิดจากฤทธิ์ของแบคทีเรีย ไคโตซาน และสารเคมี Wisniewski *et al.,* 2011; Oliveira *et al.,* 2012. Sparringa, & Owens, 2002)

เมื่อนำสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราปนเปื้อนบนข้าวเปลือก โดยวิธีจุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวเปลือกพันธุ์หอมมะลิแดง ที่แช่ด้วยสปอร์แขวนลอยราทดสอบลงในสารสกัดราเอนโดไฟท์ พบว่าสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ mycelia sterilia BUEN 938 และ mycelia sterilia BUEN 877 ได้ผลดีที่สุด มีฤทธิ์ยับยั้งราทดสอบได้ในระดับหนึ่ง แต่เท่าที่ทราบยังไม่มีผู้ใดรายงานการศึกษาสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ในลักษณะนี้ไว้ รายงานการวิจัยของ Wongcharoen (2014) พบว่าการนำเมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์หอมมะลิแดง มาแช่ในสปอร์แขวนลอยของราเอนโดไฟท์ *Trichoderma harzianum* สามารถควบคุมราสาเหตุโรคกล้าเน่าได้ แต่เนื่องจากในการศึกษานี้ใช้เพียงสารสกัดหยาบที่เตรียมในระดับ mini scale ไม่ทราบความเข้มข้น ต่างจากการทดลองของ Wongcharoen (2014) ที่ทดสอบกับสปอร์ สามารถควบคุมปริมาณสปอร์ที่นำมาควบคุมราก่อโรคและราทดสอบก็เป็นคนละชนิด ในที่นี้จึงยังไม่สามารถบอกประสิทธิภาพให้ชัดเจน อย่างไรก็ตาม การที่พบว่าสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งราปนเปื้อนบนข้าวเปลือกได้ แม้จะยังไม่พบสารที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากสารที่นำมาศึกษายังไม่มาก เป็นเพียงสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงราในสภาวะง่ายๆในห้องปฏิบัติการ แต่ก็สามารถบอกได้ว่าราเอนโดไฟท์จากป่าชายเลนเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาคัดกรองและผลิตสารเมตาบอไลท์เพื่อใช้ควบคุมควบคุมราปนเปื้อนบนข้าวเปลือก

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ Mycelia sterilia BUEN 877 และสารสกัดหยาบเอทานอลจากจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ mycelia sterilia BUEN 938 ที่เตรียมในระดับ mini scale มีความสามารถในการควบคุมราปนเปื้อนบนเมล็ดข้าวเปลือกที่เจริญช้าในกลุ่ม ราไม่สมบูรณ์เพศ (anamorph) ได้ในระดับหนึ่ง โดยสามารถยับยั้งราทดสอบ mycelia sterilia KCN 5 หรือ unknown anamorph KCN 6 ได้ เมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อบนจานอาหารพบประสิทธิภาพร้อยละ 30 ขึ้นไป และการทดสอบการยับยั้งบนเมล็ดข้าวที่แช่ในสปอร์แขวนลอยของราทดสอบ พบว่ายับยั้งการเจริญของรา KCN 5 และ KCN 6 บนเมล็ดข้าว ได้ 24- 48 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

Ahsan, T., Chen, J., Zhao, X., Irfan, M., & Wu, Y. (2017). Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and double dibutyl phthalate) produced by *Streoptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. AMB Express, 7, 54. doi 10.1186/s135687-017-0351-z.

Barnett, H.L., & Hunter, B.B. (2006). *Illustrate genera of imperfect fungi*. New York: Macmillan Publishing Company.

Dix, N.J., & Webester, J. (1995). *Fungal Ecology*. London: Chapman & Hall.

Durgeshlal, C., Khan, M.S., Prabhat, S.A., & Prasad, Y.A. (2019). Antifungal activity of three different ethanolic extract against Isolates from diseased rice plant. *Journal of Analytical Techniques and Research*, 1: 47-63. doi: 10.26502/jatri.007

Hasan, S., Ansari, M.I., Ahmad, A., & Mishra, M. (2015). Major bioactive metabolites from marine fungi: A review. *Bioinformation, 11*, 176-181.

Insain, P. (2017). Bioactive compounds from endophytic fungi. *EAU Heritage Journal Science and Technology*, *11,* 26-39.

Jayaraj, R., Rubin Jose, A.S., &. Kuruchev, V. (2018). In vitro evaluation of antifungal activity of some medicinal plants against *Helminthosporium oryzae*, the incitant of brown spot disease of paddy. *International Journal of Advanced Research. 6*, 743-746.

Justino, C.I.L., Duarte, K., Freitas, A.C., Duarte, A.C., & Rocha-Santos, T. (2014). Classical methodologies for preparation of extracts functions. In D. Barcelo (Ed.), *Analysis of marine samples in search of bioactive compounds* (pp. 35-57). Netherlands: Elsevier.

Keller, N.P., Tumer, G., & Bennett, J.W. (2005). Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology, 3*, 937-947.

Khrueayu, D. (2013). Antimicrobial activities of bioactive compounds from endophytic fungi isolated from leaves of mangrove. Master's Thesis, Department of microbiology Faculty of Science. Burapha University. (in Thai)

Khrueayu, D., & Pilantanapak, A. (2012). Antifungal activity of bioactive compound from endophytic fungi isolated from mangrove leaves. In *Proceeding 1st Mae Fah Luang University International Conference.* http://mfuic2012.mfu.ac.th/.../P-SC-B-22%20Duangnapa%20resubmitted.pdf

Lee, S.C., Muhammad, S.A., Ibrahim, M.H. & Mohamed Nor, N.M.I. (2018). Antifungal properties of *Mimusops elengi* seeds against paddy seed-borne fungi and selected pathogenic fungi *Malaysian Journal of Microbiology, 14 (*Special Issue), 152-158.

Mohapatra, D., Kumar, S., Kotwaliwale, N., & Singh, K.K. (2017). Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-chemical approaches for their control. *Industrial Crops and Products, 108, 162–182.*

Nakkanthong, S. (2017). Activity of crude extracts from marine derived fungal endophyte against fungi contaminating on paddy. Senior Project, Department of microbiology Faculty of Science. Burapha University. (in Thai)

Nochai, S., & Srichiwong, S. (2007). Efficacies of antagonistic fungi from rice seeds cv. KDML 105 for controlling Bakane disease in rice seeding. *Journal of Agriculture, 23,* 59-66. (in Thai)

Oliveira-Jr., E.N., El Gueddari, N.E., Moerschbacher, B.M., & Franco, T.T. (2012). Growth rate inhibition of phytopathogenic fungi by characterized chitosans. *Brazillian Journal of Microbiology, 43*, 800-809.

Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., & Tanboon-Ek, P. (1994). The normal mycoflora of commodities from Thailand; beans, rice small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology, 23,* 35-53.

Reddy, K.R.N., Reddy, C.S., Abbas, H.K., Abel, C.A., & Muralidharan, K. (2008). Mycotoxigenic fungi, mycotoxins, and management of rice grains. *Toxins Reviews, 27,* 287-317.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., & Frisvad, J.C. (2004). Introduction to food and airlborne fungi. 7th Edition**,** Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Sparrianga, R.A., & Owens, J.D. (2002). Inhibition of the tempe mould, *Rhizopus oligosporus*, by ammonia. *Letters in Applied Microbiology,* 29. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00591.x

Swathi, J., Narendra, K., Sowjanya, K.M., & Krishna Satya, A. (2013). Marine fungal metabolites as a rich source of bioactive compounds. *African Journal of Biochemistry Research*, 7, 184-196.

Tanakulpakorn, J., Pilantanapak, A., & Srivibool, R. (2012). Antifungal activity of endophytic fungi TH121 isolated from *Thespesia populnea* against *Alternaria brassicicola*. *Thai Journal of Science and Technology, 1*, 32-41. (in Thai)

Thai Rice Exporters Association. (2016). *Thai Rice Exporters Association News*. Retrieved May 22, 2018, from http://www.thairiceexporters.or.th/Press%20release/2016/TREA%20Press%20Release%20%20January%202016%20-%2029012016.pdf (in Thai)

Vaske, Y.M., & Crews, P. (2014). An update on the biomedical prospects of marine-derived small molecules with fascinating stom and stereochemical diversity. In B. Hernandez-Ledesma, & M. Herrero, (Eds.), *Bioactive compounds from marine foods: plant and animal source.* (pp.1-26). United States: Wiley-Blackwell.

Wisniewski, M., Wilson, C., & Hershberger, W. (2011). Characterization of inhibition of *Rhizopus stolonifer* germination and growth by *Enterobacter cloacae*. *Canadian Journal of Botany 67*, 2317-2323.

Wikipedia (2019). *Rice.* Retrived July 3, 2019, from https://en.wikipedia.org/wiki/Rice

Wongcharoen, A. (2014). Screening of endophytic fungi from rice (*Oryza sativa* L.) against rice pathogenic fungi. *Khon Kaen Agriculture Journal*, *42*, 385-396. (in Thai)