



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (*Pyricularia* spp.)
และการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคไหม้ของข้าว
จากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

Diversity of Blast Fungi (*Pyricularia* spp.) and Antifungal Production from
Endophytic Fungi Isolated from Some Monocots

โดย บุญสม บุษบรรณ และสายสมร ลำยอง

ตุลาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (*Pyricularia* spp.) และการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

Diversity of Blast Fungi (*Pyricularia* spp.) and Antifungal Production from Endophytic Fungi Isolated from Some Monocots

บุญสม บุษบรรณ และสายสมร ลำยอง
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2552 โครงการความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (*Pyricularia* spp.) และการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว สัญญาเลขที่ TRG5280003 คณะผู้รับทุนขอขอบคุณเป็นอย่างสูง ขอขอบคุณ Dr. Eric H.C. McKenzie จาก Landcare Research, Auckland, New Zealand ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการตรวจทานต้นฉบับงานตีพิมพ์ที่ส่งในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ศรัณยู ไคลคลาย อ.ดร. เยาวภา สุขพรมมา และ ศ.ดร. วชิรินทร์ รุกขไชยสิริกุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในการแยกสารออกฤทธิ์ชีวภาพ การทำให้สารบริสุทธิ์ และการระบุชนิดของสารออกฤทธิ์ ศราวุฒิ ฌ เชียงใหม่ และ ผศ.ดร. วีระ วงศ์คำ สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ และขอขอบคุณ ดร. ศุทธิเชษฐ ทองกล้า ดร. สุธีรา ทองกันทา และครอบครัว วชิษฐา ตั้งกองเกียรติ และครอบครัว อิศรา สิงห์โตทอง อมรรัตน์ ใจยะเสน จตุรงค์ คำหล้า และนครินทร์ สุวรรณราช สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างตลอดจนการสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่าง

คณะผู้วิจัย

รหัสโครงการ: TRG5280003

ชื่อโครงการ: ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (*Pyricularia* spp.) และการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

ชื่อนักวิจัย: บุญสม บุษบรรณ และสายสมร ลำยอง
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: bussaban@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาความหลากหลายของราสาเหตุโรคไหม้ในข้าวและพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่นๆ โดยการเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการไหม้ 33 ตัวอย่าง จากพืชเศรษฐกิจและวัชพืช (ข้าว ผักปลาบ พืชวงศ์ขิง พืชวงศ์คล้า หนุ่ยแฉ่งโกล่า กกและหญ้าวัชพืช) ที่ปลูกหรือเจริญในบริเวณภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำปาง ลำพูน และนครสวรรค์ และภาคตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ จังหวัดนครนายก หลังจากพิสูจน์โรคตาม Koch's postulates และบ่งบอกชนิดของราสาเหตุโรคโดยใช้ลักษณะสัณฐานและวิธีทางอนุชีววิทยา พบว่าราสาเหตุโรคไหม้ทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Pyricularia* ซึ่งมีลักษณะสัณฐานของโคนิเดียที่หลากหลายขึ้นอยู่กับกลุ่มพืชอาศัย และบ่งบอกชนิดได้ถึงระดับสปีชีส์ (*P. caricis* พบในกกวัชพืช *P. costina*, *P. zingiberis* และ *Pyricularia* sp. พบในพืชวงศ์ขิง *P. sphaerulata* พบในผักปลาบ *Pyricularia* sp. พบในพืชวงศ์คล้า) ยกเว้น *P. grisea* และ *P. oryzae* ที่พบในข้าว หนุ่ยแฉ่งโกล่า และหญ้าวัชพืชต่างๆ ที่อยู่ในบริเวณนาข้าวหรือบริเวณอื่นมีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกันมาก เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ rDNA-ITS, actin, β -tubulin และ calmodulin โดยใช้ *Dactylaria* sp. BS296 เป็น outgroup และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วย maximum parsimony (MP, heuristic search options: tree-bisection-reconnection-branch swapping, random stepwise sequences addition) และ distance (NJ, neighbor-joining: Kimura two-parameter distance measurement) พบว่า *P. grisea* และ *P. oryzae* เป็นราที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดโดยมีบรรพบุรุษร่วมกัน (bootstrap support 100%) และการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลจากทั้งสี่ยีนส์นี้สามารถระบุสปีชีส์ของราที่แยกได้จากข้าว (BS305, BS314) หญ้าวัชพืชในนาข้าว (BS310, BS311) และหนุ่ยแฉ่งโกล่าที่ปลูกใกล้บริเวณนาข้าว (BS290) ว่าเป็น *P. oryzae* และราที่แยกได้จากหญ้าวัชพืชในสวนอนุบาลพันธุ์ไม้ (BS316) และบริเวณข้างทาง (BS279, BS281) คือ *P. grisea* และ *Pyricularia* sp. (CE) ตามลำดับ สำหรับ *Pyricularia* สปีชีส์อื่นๆ ที่มีความแตกต่างของลักษณะสัณฐานอย่างชัดเจนไปจากราที่พบในข้าว เช่นที่พบในกกวัชพืชและพืชวงศ์ขิง มีความสัมพันธ์ที่ห่างไกลจาก *P. grisea* และ *P. oryzae* โดยใน phylogenetic trees ที่สร้างจากยีนส์ทั้งสี่ในการศึกษาครั้งนี้โดยวิธี MP และ NJ มีค่า bootstrap support แต่ละ clade สูงถึง 100% สอดคล้องกับการระบุชนิดของ *Pyricularia* ดังกล่าวโดยใช้ลักษณะสัณฐาน

จากการคัดกรองราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (กระเจียว: *Curcuma ecomata*, กระเจียวขาว: *Cu. parviflora*, กระชาย: *Boesenbergia pandurata*, กระทือ: *Zingiber zerumbet*, กุก: *Amomum siamense*, ขมิ้นขาว: *Cu. mangga*, ข่า: *Alpinia galanga*, ข่าป่า: *Al. malaccensis*, บันไดสวรรค์ดอกสีส้ม: *Costus curvibracteatus*, ปุดคางคก: *Etingera litteralis*, ไม้: *Bambusa* sp., ไพล: *Z. cassumunar*, พืชสกุลกระชาย: *Boesenbergia* sp., พืชสกุลข่า: *Alpinia* sp., และมหาหงส์: *Hedychium coronarium*) จำนวน 51 ไอโซเลท โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ glucose soybean meal broth (F1), malt extract corn starch broth (F2), glucose soybean oil peptone (F3), potato dextrose galangal powder broth (F4) และ potato dextrose broth (F5) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวา ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน จากนั้นกรองแยกส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำแห้งและละลายด้วย 10% DMSO เตรียมเป็นสารสกัดหยาบ และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pyricularia costina* BS193, *P. oryzae* BS265, *P. oryzae* BS267, *P. oryzae* BS285, *P. sphaerulata* BS151, *Pyricularia* sp. BS191, *Pyricularia* sp. BS279 และ *Pyricularia* sp. BS286 ด้วยวิธี agar well diffusion และใช้ 10% DMSO และ 20 mg/ml benomyl เป็นสารควบคุม พบว่าราเอนโดไฟท์ 82% และ 35% ของจำนวนที่คัดกรองสร้างสารต้าน *Pyricularia* ได้อย่างน้อยหนึ่งสายพันธุ์ โดยยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคได้มากกว่า 15% และ 30% ตามลำดับ และการคัดกรองด้วยการเลี้ยงราเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลทในอาหารทั้ง 5 ชนิดนั้นทำให้เพิ่มโอกาสในการสร้างสารต้านเชื้อราได้ ดังเช่น *Pestalotiopsis maculiformans* PDB151 ที่เลี้ยงใน F2 (17–65%) และ F4 (26–39%) สร้างสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคไหม้ได้ดีกว่าที่เลี้ยงในอาหารชนิดอื่น (13–39%) และสารสกัดหยาบที่ได้จาก F2 (113 mg/ml) และ F4 (161 mg/ml) ยังพบสัญญาณโปรตรอนของกลุ่มสารที่น่าสนใจมากกว่าการเลี้ยงในอาหารชนิดอื่น ดังนั้นจึงเลือกราเอนโดไฟท์ชนิดนี้มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณใน F2 และ F4 เพื่อสกัดแยกและระบุชนิดของสารด้วยวิธี chromatography และ spectroscopy ต่างๆ พบว่าแยกสารได้ 6 ชนิด ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ phenol 1 ชนิด (tyrosol) และสารอนุพันธ์ของ lactones 5 ชนิด (pestalotin, dehydropestalotin, hydroxypestalotin, oxysporone และอนุพันธ์ของ lactones ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างมาก่อน) โดยสารหลักที่พบคือ pestalotin (22–39% yield) ซึ่งยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ได้และมีความเป็นพิษต่ำต่อไรแดงซึ่งเป็นแมลงศัตรูต้นข้าว นอกจากนี้ pestalotin มีแนวโน้มในการยับยั้งการเข้าสู่กระบวนการแบ่งตัวของเซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดมนุษย์ NCI-H1299 โดยที่ 72 ชั่วโมงหลังการทดสอบ เซลล์ที่ได้รับสารนี้มีค่าดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์แบบไมโทซิส (3.01%) ต่ำกว่าในเซลล์กลุ่มควบคุม (7.66%) และนิวเคลียสของเซลล์ที่ได้รับสารนี้มีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม จากผลการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเป็นแหล่งที่มีศักยภาพของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์และเกษตรกรรม

คำหลัก : เอนโดไฟท์, สารออกฤทธิ์ชีวภาพ, *Pyricularia*, โรคไหม้ของข้าว

Project Code : TRG5280003

Project Title : Diversity of Blast Fungi (*Pyricularia* spp.) and Antifungal Production from Endophytic Fungi Isolated from Some Monocots

Investigator : Boonsom Bussaban and Saisamorn Lumyong
Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

E-mail Address : bussaban@hotmail.com

Project Period : 2 years

Abstract

The present study was aimed to investigate the biodiversity of blast fungi in rice and other monocots. Thirty three samples with blast symptoms were collected from economic plants and weeds (commelina, rice, grass weeds, Maranthaceae, pangola grass, sedges and Zingiberaceae) growing in northern (Chiang Rai, Chiang Mai, Payao, Lampang, Lumphun and Nakhon Sawan provinces) and eastern (Nakhonnayok province) Thailand and diagnosis of the causal agents were carried according to Koch's potulates. Blast fungi of various hosts collected in the present study were identified as *Pyricularia* which diverse in morphological characteristic of conidia (*P. caricis*: sedges, *P. costina*, *P. zingiberis* and *Pyricularia* sp.: Zingiberaceae, *P. sphaerulata*: commelina, *Pyricularia* sp.: Maranthaceae). *Pyricularia grisea* and *P. oryzae* (rice, pangola and other grasses) were very similar in conidial characteristics and multilocus phylogenetic analysis based on rDNA-ITS, actin, β -tubulin and calmodulin genes performing with *Dactylaria* sp. BS296 as outgroup, parsimony (MP, heuristic search options: tree-bisection-reconnection-branch swapping, random stepwise sequences addition) and distance (NJ, neighbor-joining: Kimura two-parameter distance measurement) criteria, disclosed a monophyletic group (bootstrap support 100%). The combined analysis of the four gene regions also showed that blast fungi isolated from rice (BS305, BS314), grass weeds in rice field (BS310, BS311) and pangola growing close to rice field (BS290) are *P. oryzae*, while fungal strains isolated from grass weeds in plant nursery (BS316) and road-side (BS279, BS281) are *P. grisea* and *Pyricularia* sp. (CE), respectively. The group consisting of other *Pyricularia* species (e.g., found in sedges and Zingiberaceae) were related distantly to the monophyletic group of *P. grisea* and *P. oryzae*. The phylogenetic trees constructed from the four genes again correlated the groups of each morphologically identified *Pyricularia* species with 100% bootstrap support in MP and NJ analyses.

The present study was also aimed to screen for antifungal activity of endophytic fungi isolated from some monocots (*Alpinia galanga*, *Al. malaccensis*, *Alpinia* sp., *Amomum siamense*, *Bambusa* sp., *Boesenbergia pandurata*, *Boesenbergia* sp., *Costus curvibracteatus*, *Curcuma ecomata*, *Cu. mangga*, *Cu. parviflora*, *Etingera litteralis*, *Hedychium coronarium*, *Zingiber cassumunar* and *Z. zerumbet*) and to evaluate active compounds isolated from the selected potent strains. Fifty one endophytic fungi were grown in five fermentation media (glucose soybean meal broth: F1, malt extract corn starch broth: F2, glucose soybean oil peptone: F3, potato dextrose galangal powder broth: F4 and potato dextrose broth: F5) and incubated on a reciprocal shaker at room temperature for 7 days. The crude extracts from fermentation broths were tested for antifungal activity against 8 strains of blast fungi, *Pyricularia costina* BS193, *P. oryzae* BS265, *P. oryzae* BS267, *P. oryzae* BS285, *P. sphaerulata* BS151, *Pyricularia* sp. BS191, *Pyricularia* sp. BS279 and *Pyricularia* sp. BS286, by the agar well diffusion method (10% DMSO and 20 mg/ml benomyl were used as negative and positive control, respectively). Up to 82% and 35% of crude extracts obtained from endophytic fungi displayed more than 15% and 30% inhibition at least one strains of *Pyricularia*. Culture of each endophytic fungal strain in different fermentation media increased production of active compounds against tested *Pyricularia*, e.g., *Pestalotiopsis maculiformans* PDB151 cultured in F2 (17–65%) and F4 (26–39%) produced active compounds to inhibit growth of blast fungi better than cultured in other media (13–39%). The results revealed that crude extracts of endophytic fungi *P. maculiformans* PDB151 from F2 and F4 were most inhibited blast fungi and showed interesting ¹H NMR spectra. Therefore, bioactive compounds produced by this strain in both media were then extracted, purified and identified using chromatography and spectroscopy. The crude extracts of *P. maculiformans* PDB151 upon chromatographic separation, afforded six compounds, 1 phenol derivative (tyrosol) and 5 lactone derivatives pestalotin, dehydro-pestalotin, hydroxypestalotin, oxysporone and unknown structure of lactone derivative). Pestalotin was the major compound (22–39% yield) which displayed antifungal activity against *P. oryzae*, with a weak cytotoxicity against zooplankton *Moina macrocopa*. This compound also tended to inhibit cell division process of human lung cancer cell line, NCI-H1299, as the evidences of cells treated with this compound (3.01%) had lower mitotic index than cells in control (7.66%) and abnormal (bean-shape) nuclei in treated cells. These results indicated that endophytic fungi from monocotyledonous plants are a potential source of bioactive compounds that may useful in pharmaceuticals and agriculture.

Keywords : Endophytes, bioactive compounds, *Pyricularia*, rice blast

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ไทย)	ข
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	ง
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	3
ผลการทดลอง	11
สรุปและวิจารณ์	22
เอกสารอ้างอิง	26
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	33
ภาคผนวก	34

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นธัญพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยและโลก เนื่องจากข้าวเป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญของประชากร โดยเฉพาะในประเทศแถบทวีปเอเชีย สำหรับประเทศไทย มีผลผลิตข้าวในแต่ละปีเป็นจำนวนมากเพื่อการบริโภคภายในประเทศ และเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ ในปี พ.ศ. 2551–2554 ประเทศไทยส่งออกข้าวมากที่สุดในโลก อยู่ระหว่าง 8.59–10.01 ล้านตัน ซึ่งสามารถสร้างรายได้และทำเงินเข้าประเทศสูงถึง 168,634–200,892 ล้านบาท (สำนักมาตรฐานสินค้านำเข้าส่งออก, 2554) แต่การผลิตข้าวยังคงประสบปัญหาซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต

ปัญหาเรื่องโรคเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงโดยเฉพาะโรคไหม้ซึ่งมีเชื้อสาเหตุ คือ *Pyricularia oryzae* หรือ *P. grisea* เชื้อสามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกส่วนและทำความเสียหายให้พืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโต โดยพบการระบาดมากในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้ของไทย นอกจากนี้ราสาเหตุโรคไหม้ยังมีพืชอาศัยกว้าง สามารถเข้าทำลายพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดอื่น เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ชิง ข่า เป็นต้น โดยเชื้อสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้ทั่วบริเวณเพาะปลูก และอาจจะสามารถอาศัยในพืชทางเลือกชนิดอื่นได้ เช่น หญ้าวัชพืชรากวัชพืชราก (พัฒนาและคณะ, 2537; กรมการข้าว, 2551; Hashioka, 1973; Couch and Kohn, 2002; Sirithunya *et al.*, 2008; Rathaiyah, 1980; Ou, 1987; Sarbajna, 1990; Purchio and Muchovej, 1993) สำหรับในภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าหญ้าเลี้ยงสัตว์ เช่น หญ้าแพงโกล่า ที่ปลูกใกล้แปลงปลูกข้าวนั้นมีการระบาดของโรคไหม้อย่างรุนแรงซึ่งราสาเหตุอาจจะเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างสายพันธุ์กัน นอกจากนี้ ในแต่ละภาคของประเทศไทย จะมีพันธุ์ข้าวปลูกของตัวเอง ข้าวจึงเป็นพืชที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง รวมถึงราสาเหตุโรคไหม้ก็มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงเช่นกัน (Asuyama, 1965; Borromeo *et al.*, 1993; Shull and Hamer, 1994; Kato *et al.*, 2000; Dean *et al.*, 2005; Sirithunya *et al.*, 2008) หากมีการศึกษาความหลากหลายของราสาเหตุโรคไหม้ในข้าว พืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดอื่น และพืชทางเลือกที่พบในประเทศไทย น่าจะช่วยในการวางแผนการป้องกันพืชและการตัดสินใจเลือกวิธีการป้องกันกำจัดราสาเหตุโรคไหม้ได้ดียิ่งขึ้น ดังเช่นในหลายประเทศที่มีการเพาะปลูกข้าว และธัญพืชอื่นๆ เช่น จีน ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินเดีย และบราซิล ได้ศึกษาความหลากหลายของราสาเหตุโรคไหม้ โดยใช้เทคนิคต่างๆ ร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุล (เช่น การวิเคราะห์หลายพิมพ์ DNA จาก rep-PCR/PCR-RFLP, การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA ITS และยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเข้าทำลายพืชของเชื้อรา actin/ β -tubulin/calmodulin genes) ในการป้องกันและควบคุมราสาเหตุโรคร่วมกับการจัดการโดยวิธีอื่น (Chen *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2006; Hirata *et al.*, 2007; Prabhu *et al.*, 2007; Yamagashira *et al.*, 2008)

การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคแม้ว่าจะให้ผลดี แต่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น จึงขาดความสามารถในการแข่งขันกับประเทศคู่แข่งทางด้านราคา และยังมีพืชตกค้างจนก่อให้เกิดอันตรายต่อคุณภาพชีวิตและสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจเกิดจากการใช้สารเคมีในปริมาณที่มากเกินไป หรือใช้ผิดวิธี

สารเคมีอาจไปทำลายจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์แก่พืชในดิน แมลงศัตรูธรรมชาติ หรืออาจทำให้เชื้อราสาเหตุเกิดความต้านทาน (ทัศนีย์, 2540; กรมการข้าว, 2551; Tharreau *et al.*, 2000; Noenplab *et al.*, 2006) ประกอบกับปัจจุบันการส่งออกสินค้าเกษตรที่มุ่งเน้นความปลอดภัยทางด้านอาหารและการเกษตรแบบยั่งยืน เช่น เกษตรอินทรีย์ เกษตรธรรมชาติ เกษตรปลอดภัยจากสารพิษเป็นที่ต้องการมากขึ้น ดังนั้นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีด้วยการใช้จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ เช่น ราเอนโดไฟท์ ซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีศักยภาพในการได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งอาจเป็นสารต้านเชื้อราในกลุ่มใหม่ๆ และเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่สามารถใช้ในการควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมีที่ต้องนำเข้าได้ (Dingle and McGee, 2003; Rubini *et al.*, 2005; Paterson, 2006; Huang *et al.*, 2008; Adelin *et al.*, 2011a,b; Pimentel *et al.*, 2011) ก็จะเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต เพิ่มศักยภาพในการแข่งขันกับประเทศคู่แข่ง และจัดการความเสี่ยงจากสารพิษตกค้าง อันจะนำไปสู่การเกษตรแบบยั่งยืน การพัฒนาเศรษฐกิจการค้าที่ยั่งยืน และอาหารปลอดภัย

โครงการนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายของราสาเหตุโรคใหม่ของข้าว พืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดอื่น และวัชพืชรากที่พบในประเทศไทย และการคัดเลือกราเอนโดไฟท์จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่สามารถสร้างสารต้านราสาเหตุโรคใหม่ได้ ซึ่งราเอนโดไฟท์จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ ข้าว หนุ่ย กัลวย ชิง ข่า นั้นเป็นพืชที่มีการศึกษาทางด้านราเอนโดไฟท์มาบ้างแล้ว โดยพบว่ามีราหลากหลายชนิด และมีราชนิดใหม่ๆ ด้วย (Bussaban *et al.*, 2001a,b,c, 2002, 2003a,b; Photita, 2003; Bhilabutra, 2009) ราเหล่านี้จึงน่าสนใจที่จะนำมาคัดกรองหาสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารต้านราสาเหตุโรคใหม่ซึ่งก่อโรคในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ข้าว และเก็บรักษาเชื้อสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดกรองแล้วไว้เป็นแหล่งชีวภาพสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ

- 1.) ศึกษาความหลากหลายของราสาเหตุโรคใหม่ในข้าวและพืชชนิดอื่นโดยวิธีทางอนุชีววิทยา (เช่น วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nuclear large subunit rDNA/rDNA ITS/actin/ β -tubulin/ calmodulin genes) ร่วมกับลักษณะสัณฐาน
- 2.) คัดกรองราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคใหม่ *Pyricularia* spp.
- 3.) สกัดแยกและศึกษาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากราที่คัดเลือก
- 4.) จัดทำฐานข้อมูลและรวบรวมสายพันธุ์บริสุทธิ์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยเก็บระยะยาวในรูปแบบที่มีชีวิตสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นในอนาคต

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ *Pyricularia*

การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราสาเหตุ

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการไหม้ (blast) มีแผลจุดสีน้ำตาลส่วนใหญ่คล้ายรูปตาที่ใบ มีสีเทาหรือน้ำตาลอมเทาอยู่ตรงกลางแผล ขอบแผลสีม่วงหรือน้ำตาลเข้ม ส่วนใหญ่บริเวณรอบขอบแผลจะมีสีเหลือง (yellow halo) แผลสามารถขยายลุกลามและกระจายทั่วบริเวณใบหรือส่วนอื่นของพืช อาการคล้ายถูกไฟไหม้ (Figure 1) โดยเก็บจากทั้งพืชเศรษฐกิจและวัชพืช ได้แก่ ข้าว ผักปลาบ พืชวงศ์ขิง พืชวงศ์คล้า หญ้าแพงโกลา หญ้าขน กกและหญ้าวัชพืชนานาชนิดที่ปลูกหรือเจริญในบริเวณภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำปาง ลำพูน และนครสวรรค์ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ จังหวัดนครนายก นำตัวอย่างพืชมาตรวจลักษณะเชื้อสาเหตุโรคไหม้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำตัวอย่างพืชบ่มในกล่องหรือถุงพลาสติกที่มีสำลีชุบน้ำเพื่อเพิ่มความชื้น เมื่อราเจริญจึงทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดย single spore methods ตามวิธีของ Choi *et al.* (1999) เลี้ยงราที่ได้ในอาหาร potato dextrose agar (PDA) หรือ malt extract agar (MEA) บ่งบอกชนิดและทดสอบความสามารถในการก่อโรคของราสาเหตุโรคไหม้แต่ละชนิดตาม Koch's potulates บนใบที่ปกติของพืชอาศัยแต่ละชนิด (Figure 2)

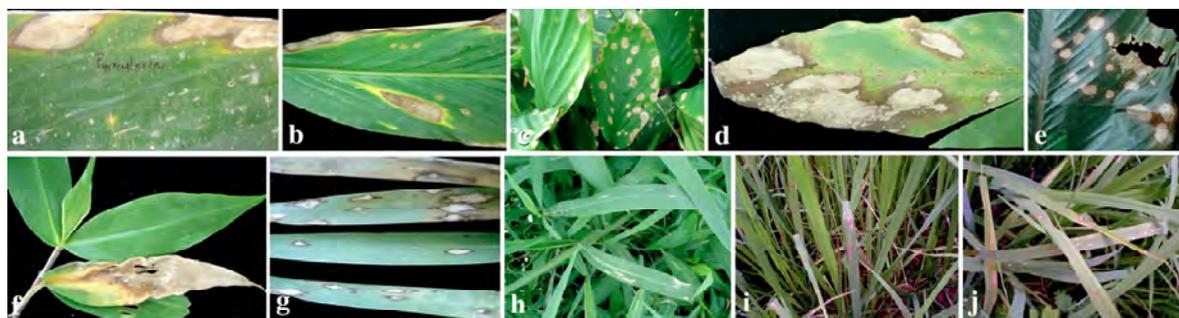


Figure 1. Blast disease symptoms on various hosts. a, b. *Amomum siamense*, c. *Boesenbergia pandurata*, d. *Etlintera littoralis*, e. Maranthaceae, f. *Commenlina* sp., g. *Stenotaphrum* sp., h. *Brachiaria muticus*, i, j. *Oryza sativa*.



Figure 2. Pathogenicity test of *Pyricularia* on detached leaves of individual host following Koch's postulates. a. Blast symptoms collected from the field, b. *Pyricularia* isolated from blast symptoms, c. Occurring of blast symptoms after inoculation of *Pyricularia* isolated for 72 h, d. *Pyricularia* re-isolated from the symptoms of the detached leaves.

การบ่งบอกชนิดเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางอณูชีววิทยา

บ่งบอกชนิดเชื้อรา โดยใช้ลักษณะสัณฐาน เช่น ลักษณะโคโลนี ลักษณะสัณฐานของสปอร์ อันได้แก่ขนาดและรูปร่างของสปอร์ รวมถึงลักษณะอื่นๆ พิจารณาเปรียบเทียบกับหนังสือและงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ เช่น Ellis (1971, 1976), von Arx (1981), Bussaban *et al.* (2003b), Park and Shin (2009) และ McKenzie *et al.* (2010) และใช้วิธีทางอณูชีววิทยา

สกัด DNA ด้วยวิธี SDS-CTAB (sodium dodecyl sulfate-cetyltrimethylammonium, Bussaban *et al.*, 2005) ชูดเส้นใยและสปอร์ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7–10 วัน นำมาทำให้แห้ง (freeze-dried) และบดใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml จนเส้นใยละเอียด ด้วยการผสม quartz sand และเติม lysis buffer ที่เย็นจัด 0.75 ml จากนั้นเติม SDS ให้สารละลายมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2% เขย่าให้เข้ากัน และบ่มที่ 65 °C นาน 30–45 นาที แล้วจึงนำมาปั่นให้ตกตะกอนที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ใช้ไปเปิดดูด supernatant ใส่ในหลอดใหม่ เติม NaCl โดยปรับให้สารละลายมีความเข้มข้นเป็น 1.4 M และเติม 10% CTAB buffer ในปริมาณ 1/10 ของปริมาตรของสารละลายในหลอด เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 65 °C นาน 10 นาที นำมาทำให้เย็นลงที่ 15 °C เป็นเวลา 2 นาที เติม chloroform isoamyl alcohol 24:1 (v/v) ในปริมาตรที่เท่ากับสารละลายที่มีอยู่เดิมในหลอด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาปั่นให้ตกตะกอนที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที สกัด supernatant ซ้ำด้วย chloroform isoamyl alcohol จนกระทั่งชั้นที่กั้นกลางใส จากนั้นใช้ไปเปิดดูด supernatant ใส่ในหลอดใหม่ เพื่อตกตะกอน DNA โดยเติม 100% ethanol (เก็บที่ -20 °C) ปริมาตร 2 เท่า นำมาปั่นให้ตกตะกอนที่ 13,000 รอบ/นาที ที่ 4°C นาน 15 นาที ใช้ไปเปิดดูดส่วน supernatant ทิ้งและล้าง pellet ด้วย 70% ethanol โดยการเขย่าแล้วนำไปปั่นที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดส่วน supernatant ทิ้งแล้วล้างด้วย 70% ethanol อีกครั้งหนึ่ง ทำเช่นเดิมเหมือนการล้างครั้งแรก หลังจากดูด supernatant ทิ้งแล้ว ส่วนที่เหลือในหลอดคือ DNA จากนั้นทำให้ DNA แห่งที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปละลายใน 0.002% RNase (5 µg/ml) ใน TE buffer ปริมาตร 50 µl แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อทำลาย RNA ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 1kb DNA ladder เป็น marker จากนั้นนำไปเก็บ ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้

เพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายของเชื้อรา (nuclear small subunit rDNA/nuclear large subunit rDNA/rDNA-ITS/actin/ β -tubulin/calmodulin genes) ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ primer ต่างๆ (Table 1) เตรียม PCR ปริมาตร 20 µl ซึ่งประกอบด้วย DNA เจือจาง 5–10 เท่า 1 µl, 2X PCR Master mix solution (*i*-Taq) (Intron Biotechnology) หรือ Phusion Flash High Fidelity PCR master mix solution (Intron Biotechnology) 10 µl, primer แต่ละตัว (10 pmol/µl sense, anti-sense) 1 µl และเติม ddH₂O เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 20 µl ปฏิบัติการที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ DNA ใน GeneAmp 9700 thermo cycler (Applied Biosystems) คือ denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 4 นาที และทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ โดยเวลาและอุณหภูมิแต่ละรอบทำตามที่มีในรายงานการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer ต่างๆ กับรากลุ่มนี้ (Couch and Kohn, 2002; Bussaban *et al.*, 2005; Thongkantha *et al.*, 2008)

เมื่อปฏิกิริยาครบ 30 รอบแล้วปล่อยให้ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 7 นาที จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 90 โวลต์ บน 1 % agarose gel ใน TAE buffer แล้วย้อมแถบ DNA ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจดูภายใต้ UV transilluminator จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) ตามวิธีการในคู่มือ ก่อนนำผลผลิต PCR ที่ได้ส่ง sequencing ที่ 1st BASE Laboratories (Malaysia) เมื่อได้รับ sequences นำมายืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ complementary ของ DNA ทั้งสาย sense และ anti-sense ด้วยโปรแกรม SEQUENCHER version 3.1.1 for Macintosh (Applied Biosystems) หรือ SEQUENCHER version 4.1.4 for Windows (Gene Codes Corporation) เพื่อใช้ sequences เหล่านี้ในขั้นตอนวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ค้นหา sequences ของเชื้อราที่สนใจจาก GenBank และ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ (multiple sequences alignment) โดยโปรแกรม CLUSTAL W version 1.82 (Thompson *et al.*, 1994) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราสกุล *Pyricularia* (Table 2) ในงานวิจัยนี้ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราจากรายงานของ Hirata *et al.* (2007) โดยโปรแกรม PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) และสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี maximum parsimony (MP, heuristic search options: tree-bisection-reconnection-branch swapping, random stepwise sequences addition) และวิธี distance (NJ, neighbor-joining: Kimura two-parameter distance measurement) สำหรับ DNA sequence alignments และ trees ส่งไปเก็บที่ TreeBASE (<http://www.treebase.org/treebase/index.html>)

Table 1. Primers used for PCR amplification and sequencing in the present study.

Primer sequences 5' to 3'		Number of base pair	References
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	22	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	White <i>et al.</i> , 1990
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	19	White <i>et al.</i> , 1990
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	20	White <i>et al.</i> , 1990
LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC	17	Vilgalys & Hester, 1990
LR5	TCCTGAGGGAACTTCG	17	Vilgalys & Hester, 1990
ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	20	Carbone & Kohn, 1999
ACT-738R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	20	Carbone & Kohn, 1999
Bt1a	TTCCCCGTCTCCACTTCTTCATG	24	Glass & Donaldson, 1995
Bt1b	GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC	24	Glass & Donaldson, 1995
CAL-228F	GAGTTCAAGGAGGCCCTTCTCCC	22	Carbone & Kohn, 1999
CAL-737R	CATCTTTCTGGCCATCATGG	20	Carbone & Kohn, 1999

Table 2. The sources of *Pyricularia* isolates and allied genera used for nuclear small subunit rDNA, nuclear large subunit rDNA, ITS1-5.8S-ITS2 rDNA, actin, β -tubulin and calmodulin genes sequence analysis.

Taxon	Strain No. (Genotype*)	Host	Geographic origin
<i>Dactylria</i> sp. ^a	BS296	<i>Digitaria didactyla</i>	Nakhonnayok
<i>Pyricularia caricis</i> ^a	BS198	<i>Cyperus</i> sp.	Chiang Mai
<i>P. caricis</i> ^a	BS199	<i>Cyperus</i> sp.	Chiang Mai
<i>P. costina</i> ^a	BS134	<i>Amomum siamense</i>	Chiang Mai
<i>P. costina</i> ^a	BS193	Zingiberaceae	Chiang Mai
<i>P. grisea</i> ^a	BS316	<i>Digitaria</i> sp.	Nakhonnayok
<i>P. oryzae</i> ^a	BS290	<i>D. eriantha</i> ^c	Lampang
<i>P. oryzae</i> ^a	BS314	<i>Oryza sativa</i>	Nakhonnayok
<i>P. oryzae</i> ^a	BS305	<i>O. sativa</i> var. <i>japonica</i>	Chiang Rai
<i>P. oryzae</i> ^a	BS310	<i>Eleusine</i> sp. ^c	Chiang Rai
<i>P. oryzae</i> ^a	BS311	<i>Brachiaria</i> sp. ^c	Chiang Rai
<i>Pyricularia</i> sp. (CE) ^a	BS279	<i>Stenotaphrum</i> sp.	Chiang Mai
<i>Pyricularia</i> sp. (CE) ^a	BS281	<i>Stenotaphrum</i> sp.	Chiang Mai
<i>Pyricularia</i> sp. ^a	BS191	<i>Boesenbergia pandurata</i>	Chiang Mai
<i>Pyricularia</i> sp. ^a	BS286	<i>Boesenbergia</i> sp.	Chiang Mai
<i>P. zingiberis</i> ^a	BS130	Zingiberaceae	Chiang Mai
<i>P. grisea</i> ^b	Dig41 (Dssh1)	<i>D. sanguinalis</i>	Japan
<i>P. grisea</i> ^b	NI907 (Dssh2)	<i>D. sanguinalis</i>	Japan
<i>P. grisea</i> ^b	Br33 (Dssh3)	<i>D. horizontalis</i>	Brazil
<i>P. higginsii</i> ^b	HYCI201-1-1 (Ci)	<i>C. iria</i>	Japan
<i>P. oryzae</i> ^b	Ken 54-04 (Os2)	<i>O. sativa</i>	Japan
<i>P. oryzae</i> ^b	Ken 54-20 (Os1)	<i>O. sativa</i>	Japan
<i>P. oryzae</i> ^b	Ina 72 (Os3)	<i>O. sativa</i>	Japan
<i>P. oryzae</i> ^b	PO-02-7306 (Os4)	<i>O. sativa</i>	Indonesia
<i>P. oryzae</i> ^b	GFSI1-7-2 (SP)	<i>Setaria italica</i>	Japan
<i>P. oryzae</i> ^b	G10-1 (TELE1)	<i>E. coracana</i>	Japan
<i>P. oryzae</i> ^b	SZEC1-1-1 (TELE2)	<i>E. coracana</i>	Japan
<i>P. oryzae</i> ^b	Br58 (As)	<i>Avena sativa</i>	Brazil
<i>P. oryzae</i> ^b	Br3 (TELE3)	<i>Triticum aestivum</i>	Brazil

Taxon	Strain No. (Genotype*)	Host	Geographic origin
<i>P. oryzae</i> ^b	Br35 (Bp1)	<i>Br. plantaginea</i>	Brazil
<i>P. oryzae</i> ^b	Bp3a (Bp2)	<i>Br. plantaginea</i>	Brazil
<i>Pyricularia</i> sp. (CE) ^b	NI981 (CE1)	<i>Cenchrus ciliaris</i>	Japan
<i>Pyricularia</i> sp. (CE) ^b	Br36 (CE2)	<i>C. echinatus</i>	Brazil
<i>Pyricularia</i> sp. (Kb) ^b	HYKB202-1-2 (Kb1)	<i>Kyllinga brevifolia</i>	Japan
<i>Pyricularia</i> sp. (Kb) ^b	FKKB201-1-5 (Kb2)	<i>K. brevifolia</i>	Japan
<i>Pyricularia</i> sp. (LS) ^b	NI919 (Lo)	<i>Leersia oryzoides</i>	Japan
<i>Pyricularia</i> sp. (LS) ^b	Br37 (Sg)	<i>Se. geniculata</i>	Brazil
<i>Pyricularia</i> sp. (SsPb) ^b	INA-B-92-45 (Ss)	<i>Sasa</i> sp.	Japan
<i>Pyricularia</i> sp. (SsPb) ^b	INA-B-93-19 (Pb)	<i>Phyllostachys bambusoides</i>	Japan
<i>P. zingiberis</i> ^b	HYZiM101-1-1-1 (Zm1)	<i>Zingiber mioga</i>	Japan
<i>P. zingiberis</i> ^b	HYZiM201-0-1 (Zm2)	<i>Z. mioga</i>	Japan
<i>P. zingiberis</i> ^b	HYZiM202-1-2 (Zm3)	<i>Z. mioga</i>	Japan
<i>P. zingiberis</i> ^b	HYZiM201-1-1 (Zm4)	<i>Z. mioga</i>	Japan
<i>P. zizaniicola</i> ^b	IBZL3-1-1 (ZI1)	<i>Zizania latifolia</i>	Japan
<i>P. zizaniicola</i> ^b	KYZL201-1-1 (ZI2)	<i>Z. latifolia</i>	Japan

* Unique multilocus genotypes (4 genes loci) of fungal strains classified in Hirata *et al.* (2007)

^a Fungal strains isolated in the present study

^b Fungal strains from public culture collections (Hirata *et al.*, 2007)

^c Hosts were grown near or in rice fields

2. การคัดกรองราเอนโดไฟท์จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคไหม้ *Pyricularia*

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (กระเจียว: *Curcuma ecomata*, กระเจียวขาว: *Cu. parviflora*, กระชาย: *Boesenbergia pandurata*, กระทือ: *Zingiber zerumbet*, กุ๊ก: *Amomum siamense*, ขมิ้นขาว: *Cu. mangga*, ข่า: *Alpinia galanga*, ข่าป่า: *Alpinia malaccensis*, บันไดสวรรค์ดอกสีส้ม: *Costus curvibracteatus*, ปุดคางคก: *Etingera littoralis*, ไม้: *Bambusa* sp., ไพล: *Zingiber cassumunar*, พืชสกุลกระชาย: *Boesenbergia* sp., พืชสกุลข่า: *Alpinia* sp., และมหาหงส์: *Hedychium coronarium*) จำนวน 51 ไอโซเลท บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °C) นาน 7 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร 5 ชนิด (ภาคผนวก) คือ glucose soybean meal broth (F1), malt extract corn starch broth (F2), glucose soybean oil peptone (F3), potato dextrose galangal powder broth (F4) และ potato dextrose broth (F5) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อตัดบริเวณปลายเส้นใยให้มีขนาดประมาณ 0.3 cm × 0.3 cm นำไปใส่ในอาหาร 5 ml ที่บรรจุในหลอดทดลอง ขนาด 18 mm × 180 mm หลอดละ 2 ชิ้น แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน บนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวาที่อัตราเร็ว 120 รอบ/นาที กรองเอาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปสกัดด้วย ethyl acetate ระเหยแห้งด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ จากนั้นละลายสารสกัดหยาบของแต่ละไอโซเลทใน dimethyl sulfoxide (10% DMSO) 1 ml และนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pyricularia costina* BS193, *P. oryzae* BS265, *P. oryzae* BS267, *P. oryzae* BS285, *P. sphaerulata* BS151, *Pyricularia* sp. BS191, *Pyricularia* sp. BS279 และ *Pyricularia* sp. BS286 ด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยหยดสารสกัดหยาบที่ได้ 35 μ l ลงในแต่ละ well ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm ซึ่งเจาะเตรียมไว้ในจานอาหาร PDA ที่ปลูกเชื้อ *Pyricularia* แต่ละสายพันธุ์ไว้ก่อนแล้ว 3 วัน สำหรับ control ใช้ 10% DMSO และ 20 mg/ml benomyl ในปริมาณที่เท่ากันหยดลงใน well และนำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C 7 วัน วัดรัศมีโคโลนีของ *Pyricularia* ในจานทดสอบและจานควบคุมที่ใช้ 10% DMSO แล้วนำมาคำนวณร้อยละของการยับยั้งตามสูตรด้านล่าง

$$\frac{\text{รัศมีโคโลนีของ } Pyricularia \text{ ในจานควบคุม} - \text{รัศมีโคโลนีของ } Pyricularia \text{ ในจานทดสอบ}}{\text{รัศมีโคโลนีของ } Pyricularia \text{ ในจานควบคุม}} \times 100$$

$$\text{รัศมีโคโลนีของ } Pyricularia \text{ ในจานควบคุม}$$

3. การสกัดแยกและศึกษาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากราที่คัดเลือก

คัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้มากกว่า 15% จำนวน 42 ไอโซเลท มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่บรรจุอาหารปริมาณ 50 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °C) นาน 7 วัน บนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวา ที่อัตราเร็ว 120 รอบ/นาที จากนั้นกรองเอาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปสกัดด้วย ethyl acetate ระเหยแห้งด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ นำส่วนสกัดหยาบตัวอย่างละประมาณ 5 mg ไปบันทึก ^1H NMR สเปกตรัม

หากพบสัญญาณโปรตรอนของกลุ่มสารที่น่าสนใจ จากนั้นคัดเลือกมาบ่งบอกชนิดของราเอนโดไฟท์ในระดับสกุลหรือสปีชีส์ โดยใช้ลักษณะสัณฐาน ได้แก่ ขนาดและรูปร่างของสปอร์ โครงสร้างที่ให้กับาเนดสปอร์ ร่วมกับเทคนิคทางอณูชีววิทยา ได้แก่ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ribosomal RNA genes (ITS1-5.8S-ITS2 หรือ LSU) และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank ตามวิธีที่เคยมีรายงาน (Bussaban *et al.*, 2005; Thongkantha *et al.*, 2008) และนำราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกลักษณะมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 ml ที่บรรจุอาหารปริมาตร 150 ml โดยตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราชนิดนั้น 2 cm² ให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ลงไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °C) นาน 7 วัน เขย่าที่ 120 รอบ/นาที จากนั้นกรองแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อ 3000 ml ไปสกัดด้วย ethyl acetate ซึ่งนำหนักสารสกัดที่ได้ แล้วจึงทำการสกัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย chromatography เช่น TLC และ column chromatography พร้อมทั้งติดตามผลการแยกในแต่ละส่วนด้วยการบันทึก ¹H NMR สเปกตรัม เมื่อได้สารบริสุทธิ์จึงนำไปอ่านโครงสร้างโดยอาศัยข้อมูล 1D, 2D NMR สเปกโทรสโกปี และเปรียบเทียบกับสารที่มีรายงานในฐานข้อมูล SciFinder จากนั้นศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารออกฤทธิ์ (MIC) ในการยับยั้งการเจริญของ *Pyricularia* เปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อราโรคพืช benomyl และทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันปฏิบัติตามวิธีของ Villarroel *et al.* (2003) โดยเตรียมสารให้มีความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 และ 320 µg/ml ใส่ใน 24 well plate หลุมละ 2 ml ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำตัวอ่อนไรแดง (*Moina macrocopa*) อายุ 24 ชั่วโมง หลังออกจากตัวแม่ มาเลี้ยงใน 24 well plate ที่เตรียมไว้ หลุมละ 10 ตัว เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนไรแดงที่ตาย เพื่อวิเคราะห์การตาย (LC₅₀) ด้วยวิธี probit analysis และทดสอบความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ในการต่อต้านเซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดมนุษย์ NCI-H1299 โดยวิธี sulforhodamine B assay ประเมินค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งเซลล์รอยละ 50 (IC₅₀) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานควบคุมเชิงบวก cisplatin (ศราวดี 2555)

4. การจัดทำฐานข้อมูลและรวบรวมสายพันธุ์บริสุทธิ์ของราที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

จัดทำฐานข้อมูลสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อราที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว โดยบันทึกข้อมูล ได้แก่ รหัสเชื้อ ชนิดเชื้อ ลักษณะเชื้อ และภาพถ่ายของเชื้อบนอาหารลงในโปรแกรม Microsoft Excel และรวบรวมสายพันธุ์บริสุทธิ์ของราดังกล่าวแบบเก็บระยะยาวในรูปที่มีชีวิต โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหาร half PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 สัปดาห์ แล้วใช้มีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อตัดเส้นใยให้มีขนาดประมาณ 0.5 cm × 0.5 cm แล้วถ่ายเชื้อ 10–15 ชิ้น ลงในหลอดแก้วขนาด 15 mm × 100 mm ที่บรรจุ mineral oil 4 ml และถ่ายเชื้อ 6–8 ชิ้น ลงในหลอดพลาสติกขนาด 2 ml ที่บรรจุ 15% glycerol นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ –20 °C ตามลำดับ

ผลการทดลอง

1. การศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ *Pyricularia*

จากการเก็บตัวอย่างข้าวและพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่นที่แสดงอาการไหม้ 33 ตัวอย่าง ซึ่งมีลักษณะแผลจุดสีน้ำตาลบนใบ ส่วนใหญ่คล้ายรูปตา มีสีเทาหรือน้ำตาลอมเทาอยู่ตรงกลางแผล ขอบแผลสีน้ำตาลเข้ม บริเวณรอบขอบแผลจะมีสีเหลือง (yellow halo) แผลสามารถขยายลุกลาม และกระจายทั่วบริเวณใบหรือส่วนอื่นของพืช อาการคล้ายถูกไฟไหม้ พบว่าเป็นราสกุล *Pyricularia* โดยจำแนกได้ 7 ชนิด (Table 3) ตามลักษณะของโคนินเดียที่แตกต่างกันและกลุ่มพืชอาศัย ได้แก่ *P. caricis* พบในกกวัชพืช *P. costina*, *P. zingiberis* และ *Pyricularia* sp. พบในพืชวงศ์ขิง *P. sphaerulata* พบในผักปลาบ *Pyricularia* sp. พบในพืชวงศ์คัลล่า และ *P. oryzae* (ลักษณะสัณฐานของโคนินเดียทั้งรูปร่างและขนาดรวมถึงจำนวนผนังกันเซลล์ใกล้เคียงกับ *P. grisea*) พบในข้าว หญ้าแพงโกลา และหญ้าวัชพืชต่างๆ และหลังจากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคตาม Koch's postulates พบว่า *Pyricularia* แต่ละชนิดทำให้พืชอาศัยเดิมแต่ละชนิดแสดงอาการไหม้ได้ โดยมีอาการเริ่มต้นที่ปรากฏเช่นเดียวกับอาการไหม้ของพืชที่เก็บมา และเมื่อทำการแยกเชื้ออีกครั้งพบว่าเป็นราชนิดเดิม

Table 3. Number of blast fungi isolated from monocotyledonous hosts.

Blast fungi (7 species)	No. of fungal isolates (33)	No. of host species (18)	Host taxa
<i>Pyricularia caricis</i>	3	3	<i>Cyperus</i> spp., <i>Fimbristulis</i> sp.
<i>P. costina</i>	4	2	<i>Amomum siamense</i> , Zingiberaceae
<i>P. oryzae</i> (= <i>P. grisea</i>)	19	8	<i>Brachiaria muticus</i> , <i>Brachiaria</i> sp., <i>Digitaria eriantha</i> , <i>Digitaria</i> sp., <i>Eleusine</i> sp., <i>Oryza sativa</i> , Poaceae, <i>Stenotaphrum</i> sp.
<i>Pyricularia</i> sp.	3	2	<i>Boesenbergia pandurata</i> , <i>Boesenbergia</i> sp.
<i>Pyricularia</i> sp.	1	1	Maranthaceae
<i>P. sphaerulata</i>	2	1	<i>Commenlina</i> sp.
<i>P. zingiberis</i>	1	1	Zingiberaceae

จากการนำเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 16 ไอโซเลท และเชื้อสกุลเดียวกันจากการศึกษาของ Hirata *et al.* (2007) จำนวน 21 ไอโซเลท (Table 2) มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ rDNA-ITS, actin, β -tubulin และ calmodulin genes โดยใช้ *Dactylaria* sp. BS296 ซึ่งแยกได้จากอาการใบจุดของหญ้าวัชพืช (*Digitaria didactyla*) บริเวณสวนอนุบาลพันธุ์ไม้ จังหวัด

นครนายกเป็น outgroup ในการเปรียบเทียบ (Table 2) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราสกุล *Pyricularia* โดยวิธี MP และ NJ พบว่า phylogenetic trees ที่สร้างจากยีนส์ทั้งสี่ตำแหน่งซึ่งมีจำนวน 1954 aligned sites และ 814 (41.7%) informative sites แสดงให้เห็นว่า ราก่อโรคไหม้ในข้าว ธัญพืช หญ้าแพงโกล่า และวัชพืชอื่นๆ ที่มีลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกัน (*P. grisea* และ *P. oryzae*) เป็นราที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดโดยมีบรรพบุรุษร่วมกัน (monophyletic group, bootstrap support = 100%, Figure 3) และการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลจากทั้งสี่ยีนส์นี้สามารถระบุชนิดราที่แยกได้จากข้าว (BS305, BS314) หญ้าวัชพืชในนาข้าว (BS310, BS311) และแปลงหญ้าแพงโกล่าที่ปลูกใกล้บริเวณนาข้าว (BS290) คือ *P. oryzae* และราที่แยกได้จากหญ้าวัชพืชในสวนอนุบาลพันธุ์ไม้ (BS316) และบริเวณข้างทาง (BS279, BS281) คือ *P. grisea* และ *Pyricularia* sp. (CE) ตามลำดับ สำหรับ *Pyricularia* ชนิดอื่นที่มีความแตกต่างของลักษณะสัณฐานอย่างชัดเจนในพืชอาศัยแต่ละกลุ่มจะมีความสัมพันธ์ที่ห่างออกไปจาก *P. oryzae* และ *P. grisea* และยังไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ชัดเจนของ *Pyricularia* เหล่านี้ได้เนื่องจากใน MP trees ที่สร้างจากทั้งสี่ยีนส์ (Figure 3A) และสร้างจากแต่ละยีนพบว่าบาง nodes และ internodes ของราเหล่านี้ไม่มี bootstrap support อย่างไรก็ตาม phylogenetic trees ที่สร้างจากยีนส์ทั้งสี่ในการศึกษา ครั้งนี้โดยวิธี MP (Figure 3A) และ NJ (Figure 3B) มีค่า bootstrap support แต่ละ clade ที่ 100% สอดคล้องกับการระบุปีซีส์ของ *Pyricularia* ดังกล่าวโดยใช้ลักษณะสัณฐาน ดังนี้ ราในกวัชพืช (BS198, BS199) คือ *P. caricis* ซึ่งโคนิเดียมีผนังกัน 2 อัน และความยาวใกล้เคียงกับ *P. higginsii* (Ci) แต่ *P. caricis* มีความกว้างของโคนิเดียมากกว่า และรูปร่างตรงปลายโคนิเดียไม่เรียวอย่างชัดเจนเช่นใน *P. higginsii* สำหรับราในพืชวงศ์ขิงที่ไม่ทราบชนิด (BS193) และกุ๊ก (BS134) คือ *P. costina* ในขณะที่ราในพืชวงศ์ขิงที่ไม่ทราบชนิดอีกชนิดหนึ่ง (BS130) และกระชาย (BS191, BS286) คือ *P. zingiberis* และ *Pyricularia* sp. ตามลำดับ

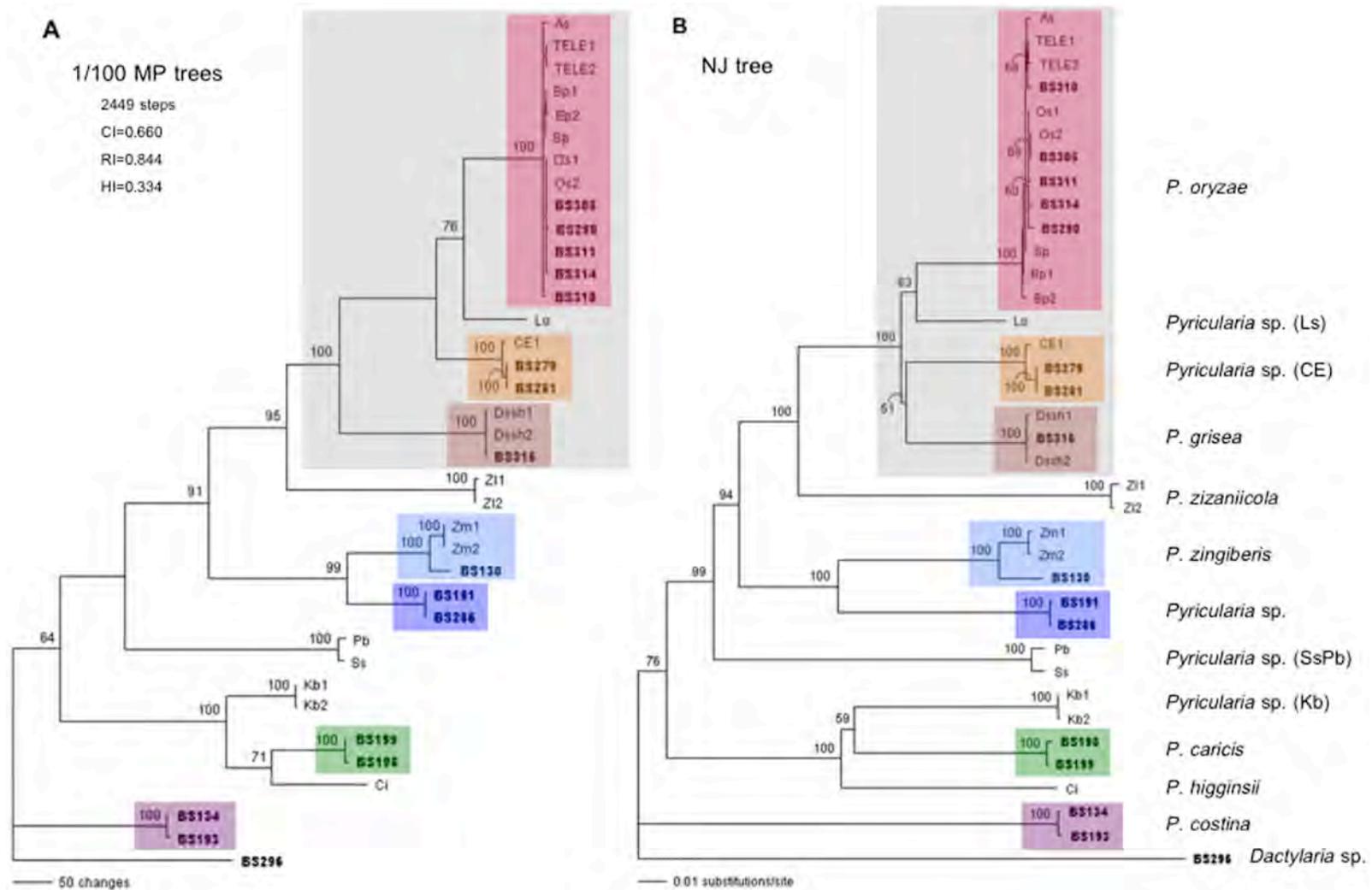


Figure 3. Phylogenetic relationships of *Pyricularia* inferred from combined rDNA (ITS1, 5.8S, ITS2), actin (exons and introns), β -tubulin (exons and introns) and calmodulin (exons and introns) sequences. A. One of 100 MP trees, B. An NJ tree. *Dactylaria* sp. BS296 was used to root the trees. The bootstrap values representing 1000 bootstrap replications are given when more than 50%.

2. การคัดกรองราเอนโดไฟท์จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านราสาเหตุโรคไหม้ *Pyricularia*

จากการคัดกรองราเอนโดไฟท์จำนวน 51 ไอโซเลท ในการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ *Pyricularia* spp. โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร F1, F2, F3, F4 และ F5 หลังจากทำการทดสอบกับ *Pyricularia* จำนวน 8 สายพันธุ์ พบว่าราเอนโดไฟท์ จำนวน 42 และ 18 ไอโซเลท สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคไหม้ได้อย่างน้อยหนึ่งสายพันธุ์ โดยยับยั้งได้มากกว่า 15% และ 30% ตามลำดับ ราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารออกฤทธิ์ในอาหารแต่ละชนิดได้นั้นมีจำนวนแตกต่างกัน และยับยั้งการเจริญของราก่อโรคสายพันธุ์ต่างๆ ได้ไม่เท่ากัน โดยพบว่าราเอนโดไฟท์จำนวนมากที่สุดถึง 8 ไอโซเลท ที่เลี้ยงในอาหาร F1 และ F5 สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้มากกว่า 30% และราจำนวนถึง 21 ไอโซเลท ที่เลี้ยงในอาหาร F1 ยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้มากกว่า 15% (Table 4) อย่างไรก็ตาม การคัดกรองโดยการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ แต่ละไอโซเลทในอาหารทั้ง 5 ชนิดนั้น ทำให้เพิ่มโอกาสของเชื้อในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้ เช่น *Pestalotopsis maculiformans* PDB151 ที่เลี้ยงใน F1 สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* BS265, *P. oryzae* BS285, *Pyricularia* sp. BS191 และ *Pyricularia* sp. (CE) BS279 ได้ 13–26% แต่ที่เลี้ยงใน F2 สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ดีขึ้น 17–65% เป็นต้น (Table 5) นอกจากนี้ สารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate ของน้ำเลี้ยงของราเอนโดไฟท์ 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคไหม้แต่ละสายพันธุ์ได้ดีที่สุด (38–75%) สารสกัดหยาบของ unidentified fungus PDB21 ที่เลี้ยงใน F4 และ unidentified fungus PDB24 ที่เลี้ยงใน F2 ยับยั้ง *P. oryzae* BS267 ได้ดีที่สุด 75% แต่ไม่ยับยั้ง *Pyricularia* สายพันธุ์อื่นๆ ที่ทดสอบ ในขณะที่ สารสกัดหยาบของ *P. maculiformans* PDB151 ที่เลี้ยงใน F1 และ F2 และ *Favolaschia* sp. PDB187 ที่เลี้ยงใน F2 และ F3 ยับยั้งราสาเหตุโรคไหม้ได้ 4–7 สายพันธุ์ (Table 5)

Table 4. Qualitative antifungal activity of 51 endophytic fungi cultured in F1–F5 inhibiting growth of blast fungi.

Potential antifungal activity ^a	Number of isolates of endophytic fungi inhibiting growth of test organisms							
	BS151	BS191	BS193	BS265	BS267	BS279	BS285	BS286
F1								
+++	0	0	0	0	8	0	0	1
++	3	6	2	2	6	21	3	2
+	2	2	3	0	2	5	1	1
–	46	43	46	49	35	25	47	47
F2								
+++	1	2	1	1	7	3	2	1
++	1	2	0	1	5	11	0	0
+	0	2	1	0	2	3	3	0
–	49	45	49	49	37	34	46	50
F3								
+++	1	1	0	0	7	3	0	0
++	3	4	2	0	5	6	3	3
+	0	3	1	2	4	5	0	1
–	47	43	48	49	35	37	48	47
F4								
+++	0	0	0	1	4	1	1	0
++	1	1	0	0	6	9	0	0
+	1	3	0	0	3	6	0	1
–	49	47	51	50	38	35	50	50
F5								
+++	0	0	0	0	8	1	0	0
++	3	3	2	0	5	10	2	2
+	1	2	2	0	1	1	2	1
–	47	46	47	51	37	39	47	48

^a+++ : > 30% inhibition

++ : 16–30% inhibition

+ : 1–15% inhibition

– : no inhibition

BS151 = *Pyricularia sphaerulata*, BS191 = *Pyricularia* sp., BS193 = *P. costina*, BS265 = *P. oryzae*, BS267 = *P. oryzae*, BS279 = *Pyricularia* sp. (CE), BS285 = *P. oryzae*, BS286 = *Pyricularia* sp.

F1: Glucose soybean meal broth, F2: Malt extract corn starch broth, F3: Glucose soybean oil peptone broth, F4: Potato dextrose galangal powder broth, F5: Potato dextrose broth

Table 5. Inhibition percentage of blast fungi by extracts of six isolates of fungal endophytes cultured in fermentation media (F1–F5).

Test organisms	Inhibition percentage (%)														
	Unidentified fungus PDB21					Unidentified fungus PDB24					<i>Fusarium</i> sp. PDB113				
	F1	F2	F3	F4	F5	F1	F2	F3	F4	F5	F1	F2	F3	F4	F5
<i>Pyricularia costina</i> BS193	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. oryzae</i> BS265	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. oryzae</i> BS267	50	42	17	75	50	50	75	50	8.3	8.3	-	-	-	-	-
<i>P. oryzae</i> BS285	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pyricularia</i> sp. BS191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-
<i>Pyricularia</i> sp. BS286	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pyricularia</i> sp. (CE) BS279	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-
<i>P. sphaerulata</i> BS151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38	-	-
	Unidentified fungus PDB137					<i>Phomopsis maculiformans</i> PDB151					<i>Favolaschia</i> sp. PDB187				
<i>Pyricularia costina</i> BS193	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42	26	-	-
<i>P. oryzae</i> BS265	-	-	-	-	-	25	38	-	31	-	-	28	11	-	-
<i>P. oryzae</i> BS267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. oryzae</i> BS285	-	-	-	-	-	26	65	26	39	26	-	39	-	-	-
<i>Pyricularia</i> sp. BS191	-	-	-	-	-	13	17	13	-	-	-	50	40	-	-
<i>Pyricularia</i> sp. BS286	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42	-	-	-
<i>Pyricularia</i> sp. (CE) BS279	26	40	40	-	-	26	30	39	26	36	-	33	16	-	-
<i>P. sphaerulata</i> BS151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34	19	-	-

F1: Glucose soybean meal broth, F2: Malt extract corn starch broth, F3: Glucose soybean oil peptone broth, F4: Potato dextrose galangal powder broth, F5: Potato dextrose broth

3. การสกัดแยกและศึกษาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากราที่คัดเลือก

ราเอนโดไฟท์ PDB151 ซึ่งแยกได้จากลำต้นเหนือดินของกุ๊ก (*Amomum siamense*) เป็นไอโซเลทที่คัดเลือกเพื่อการสกัดแยกและศึกษาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใหม่ได้หลายสายพันธุ์และเมื่อบันทึก ^1H NMR สเปกตรัมแล้วแสดงสัญญาณโปรตรอนของกลุ่มสารที่น่าสนใจ จากการศึกษาลักษณะสัณฐาน พบว่าราเอนโดไฟท์นี้สร้างโคนิเดียขนาด $22\text{--}29 \times 8\text{--}9 \mu\text{m}$ รูปกระสวย ตรง มี 5 เซลล์ และมีรอยคอดเล็กน้อยบริเวณผนังกัน ด้านโคนของโคนิเดียมีระยะ 1 เส้น ส่วนด้านปลายของโคนิเดียมีระยะ 3 เส้น นานๆ ครั้งอาจพบ 2 หรือ 4 เส้น (Figure 4) ซึ่งคล้ายกับลักษณะของ *Pestalotiopsis maculiformans* (Guba & Zeller) Steyaert (Guba, 1932) และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS rDNA และ nuclear large subunit rDNA พบว่า ใกล้เคียงกับ *P. maculiformans* (accession number EU552147) 98% และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี distance (neighbor-joining: Kimura two-parameter distance measurement) พบว่า *P. maculiformans* PDB151 มีความสัมพันธ์ ใกล้เคียงกับ *P. maculiformans* (accession number EU552147, bootstrap support 89%) ซึ่งรวมกันอยู่ใน clade เดียวกับราสกุลอื่นที่จัดอยู่ในวงศ์ Amphisphaeriaceae (Figure 5)



Figure 4. *Pestalotiopsis maculiformans* PDB151. a. Colonies on potato dextrose agar, b. Conidia. Bars, a = 1 cm, b = 20 μm .

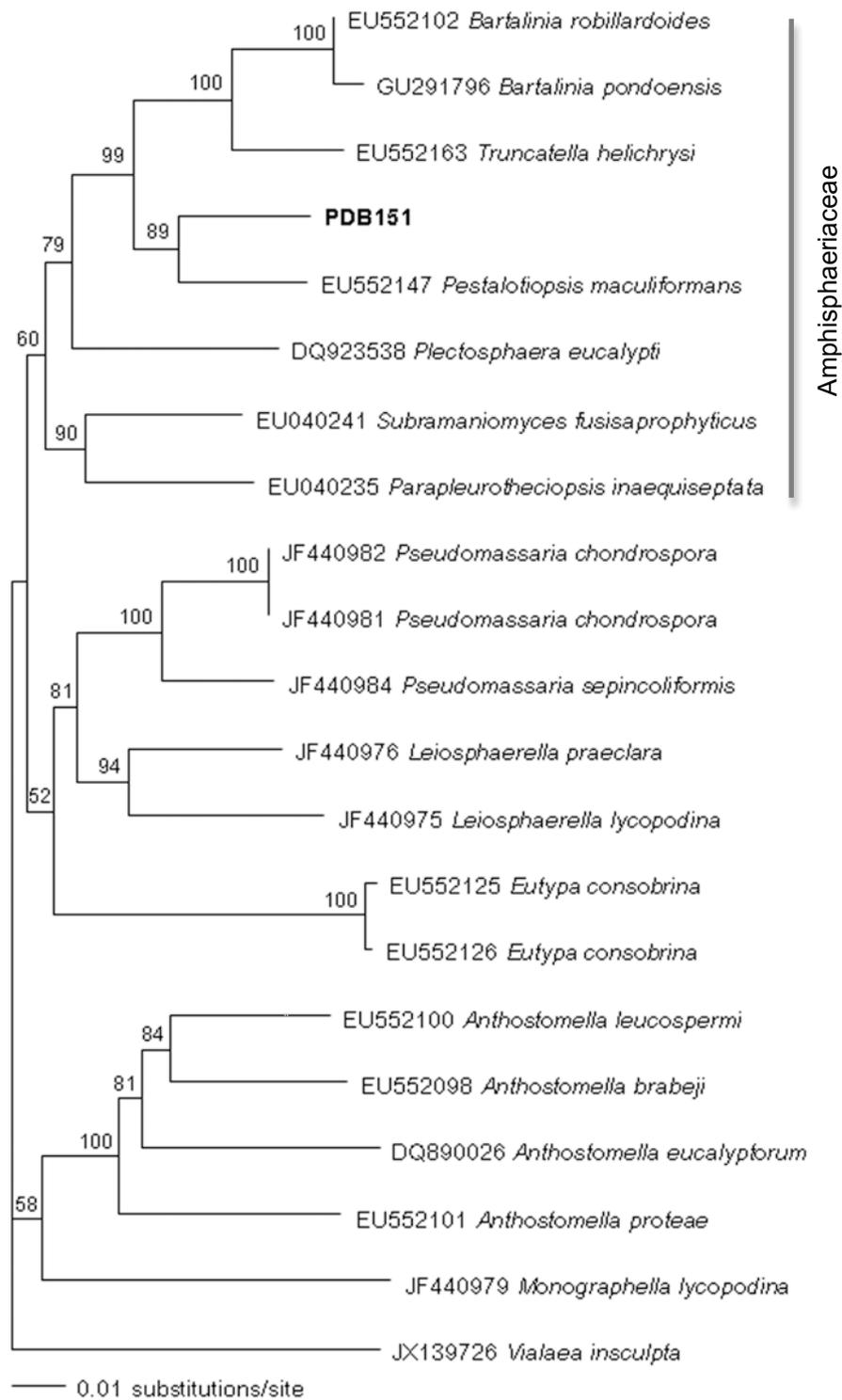


Figure 5. Tree inferred from neighbor-joining of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA and nuclear large subunit rDNA sequence alignment of *Pestalotiopsis maculiformans* PDB151 and related genera. The bootstrap values representing 1000 bootstrap replications are given when more than 50%.

จากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ *P. maculiformans* PDB151 ในการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* BS285 พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) เป็น 64 mg/ml (Figure 6) ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ benomyl ที่ความเข้มข้นเพียง 20 mg/ml ก็แสดงผลการยับยั้งได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบที่ผลิตได้ในอาหาร F2 และ F4 คือ 113 และ 161 mg/l ของอาหาร ตามลำดับ เมื่อสกัดแยกสารออกฤทธิ์ด้วย chromatography พร้อมทั้งติดตามผลการแยกในแต่ละส่วนด้วยการบันทึก ^1H NMR สเปกตรัม ศึกษาสูตรโครงสร้างของสารโดยอาศัยข้อมูล 1D, 2D NMR สเปกโทรสโกปี และเปรียบเทียบกับสารที่มีรายงานในฐานข้อมูล SciFinder Scholar พบว่าแยกได้สารอนุพันธ์ของ phenol 1 ชนิด ได้แก่ tyrosol และสารอนุพันธ์ของ lactones 5 ชนิด ได้แก่ pestalotin, dehydropestalotin, hydroxypestalotin, oxysporone และสารอนุพันธ์ของ lactones ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างมาก่อน (Figure 7, Table 6) สำหรับสารหลักที่พบคือ pestalotin (22–39% yield, Table 6) และเมื่อนำ pestalotin มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* พบว่ามีค่า MIC 35 $\mu\text{g/ml}$ และเมื่อทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน พบว่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ไรแดงตายไปร้อยละ 50 (LD_{50}) หลังการทดสอบ 24 ชั่วโมง คือ 208.12 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ในการยับยั้ง *P. oryzae* ประมาณ 6 เท่า นอกจากนี้ในการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของ pestalotin ต่อเซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดมนุษย์ NCI-H1299 พบว่าในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยวิธี sulforhodamine B assay ได้ค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งเซลล์ร้อยละ 50 (IC_{50}) เป็น 13.30 และ 4.06 mM ตามลำดับ (สารมาตรฐานควบคุมเชิงบวกที่ใช้คือ cisplatin, IC_{50} = 42.99 และ 15.70 μM) แสดงให้เห็นว่าสารนี้ไม่แสดงพิษแบบเฉียบพลันต่อเซลล์มะเร็งชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม มีแนวโน้มในการยับยั้งการเข้าสู่กระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ โดยที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าในเซลล์ที่ได้รับสารนี้มีค่าดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์แบบไมโทซิส 3.01% ในขณะที่เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารมีค่าดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์แบบไมโทซิส 7.66% แม้ว่าข้อมูลที่ได้ยังไม่ชัดเจนว่ามีการควบคุมหรือรบกวนเซลล์ที่ระยะใดของวัฏจักรเซลล์ และยังไม่พบลักษณะการตายแบบอะโพอโทซิส แต่พบว่านิวเคลียสของเซลล์ที่ได้รับสาร pestalotin มีลักษณะเป็นวงรีและโค้งงอคล้ายเมล็ดถั่วซึ่งแตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม (Figure 8)

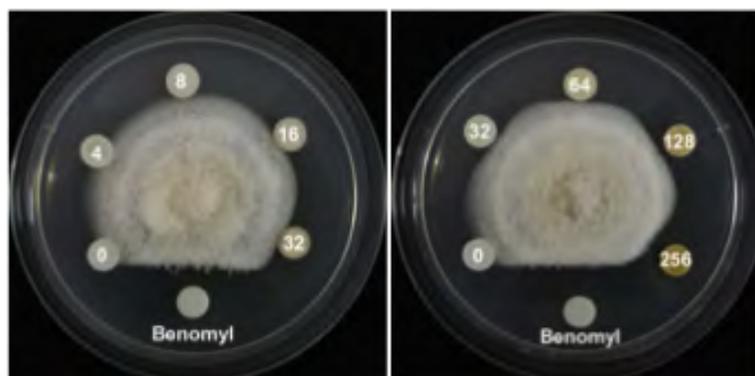


Figure 6. Minimal inhibitory concentration of crude extracts of *Pestalotiopsis maculiformans* PDB151 and benomyl on hyphal growth of *Pyricularia oryzae* BS285.

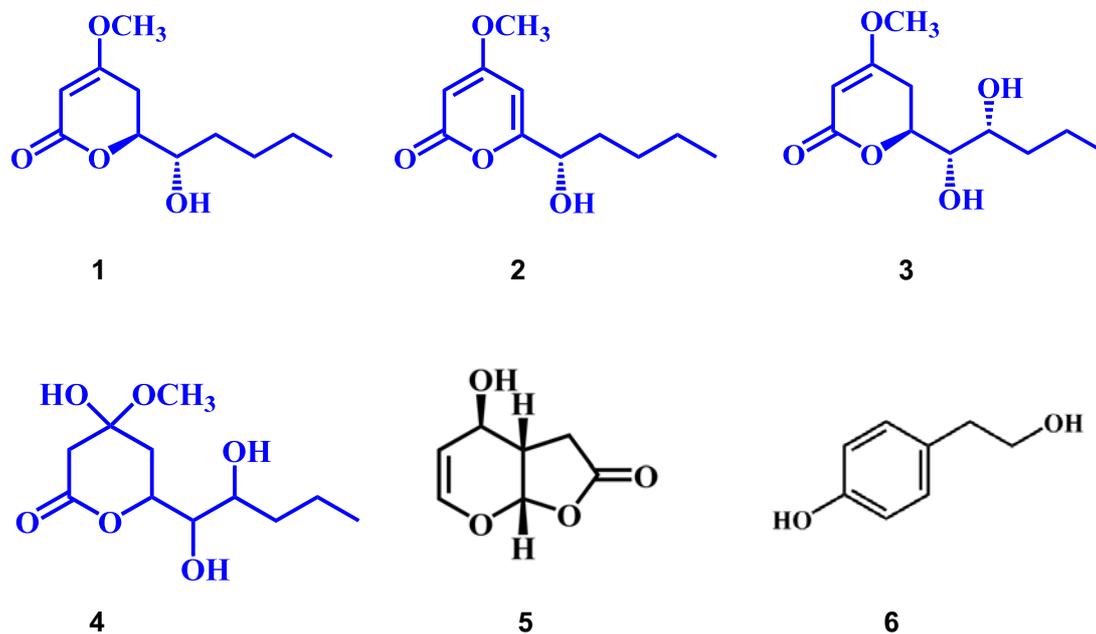


Figure 7. Structure of compounds isolated from culture broth of *Pestalotiopsis maculiformans* PDB151. **1** Pestalotin, **2** Dehydropestalotin, **3** Hydroxypestalotin, **4** Unknown structure, **5** Oxysporone, **6** Tyrosol.

Table 6. Compounds produced by *Pestalotiopsis* sp. PDB151 cultured in F2 and F4.

Compound	F2 (563.3 mg)		F4 (282.9 mg)	
	Weight (mg)	% yield	Weight (mg)	% yield
1	220.4	39.13	63.2	22.34
2	12.9	2.29	11.3	3.99
3	59.8	10.62	19.9	7.03
4	1.9	0.34	0	0
5	0	0	1.5	0.53
6	0	0	5.7	2.02
Total	295.0	52.37	101.6	35.91

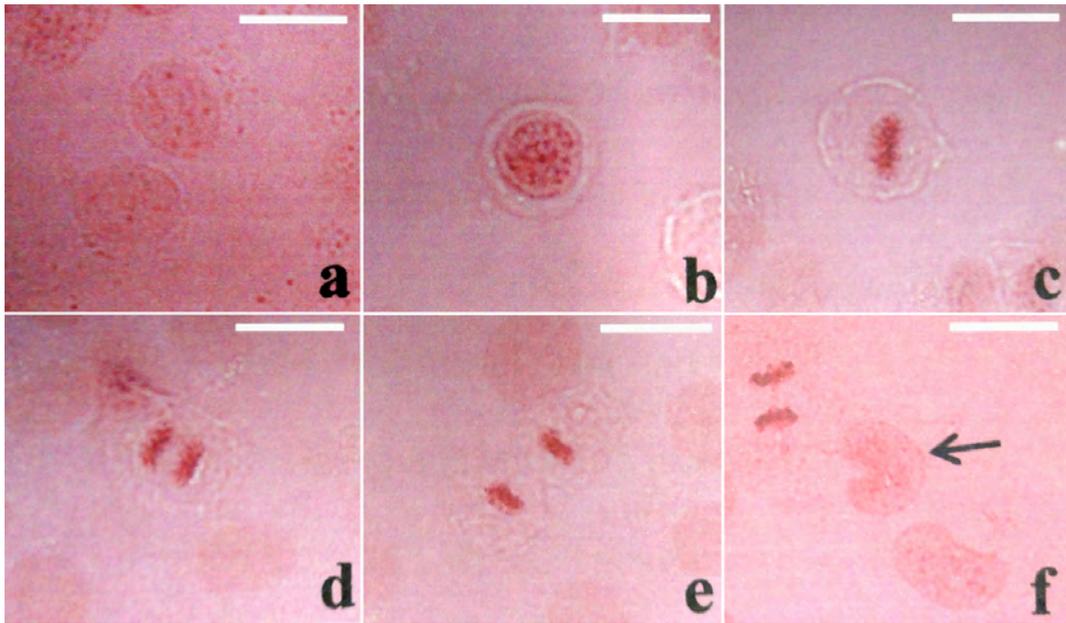


Figure 8. Cell cycle of NCI-H1299 after treated with (-)-pestalotin for 72 h, a. Interphase, b-e. Mitotic phase, b. Prophase, c. Metaphase, d. Anaphase, e. Telophase, and f. Bean-shaped nuclei (arrowed). Bars, a-f = 10 μ m.

4. การจัดทำฐานข้อมูลและรวบรวมสายพันธุ์บริสุทธิ์ของราที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

บันทึกข้อมูลของราสกุล *Pyricularia* ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 33 ไอโซเลท และราแอนโดไฟท์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคไหม้ 42 ไอโซเลท (ภาคผนวก) และเก็บสายพันธุ์บริสุทธิ์ของราดังกล่าวแบบระยะยาวในรูปที่มีชีวิต (mineral oil และ 15% glycerol) ไว้ ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยด้านการพัฒนาแบบยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพ (SDBR Laboratory) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สรุปและวิจารณ์

ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่

เชื้อราสาเหตุโรคในข้าวและพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่นๆ ที่แสดงอาการใหม่ที่ทำการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีความหลากหลายและจัดอยู่ในสกุล *Pyricularia* เมื่อพิจารณาจากลักษณะสัณฐานของโคนิเดียที่แตกต่างกัน จำแนกได้เป็น 7 ชนิด คือ *P. caricis* พบในกกวัชพืช *P. costina*, *P. zingiberis* และ *Pyricularia* sp. พบในพืชวงศ์ขิง *P. sphaerulata* พบในผักปลาบ *Pyricularia* sp. พบในพืชวงศ์คล้า และ *P. oryzae* พบในข้าว หญ้าเลี้ยงสัตว์ และหญ้าวัชพืช เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ rDNA-ITS, actin, β -tubulin และ calmodulin พบว่า *P. oryzae* และ *P. grisea* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดโดยมีบรรพบุรุษร่วมกัน (bootstrap support = 100%) และการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลจากทั้งสี่ยีนส์นี้สามารถระบุชนิดราที่แยกได้จากข้าว หญ้าวัชพืชในนาข้าว (*Eleusine* sp. และ *Brachiaria* sp.) และหญ้าแวงโกล่า (*Digitaria eriantha*) ที่ปลูกใกล้บริเวณนาข้าวว่ามีจีโนมที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *P. oryzae* ที่แยกได้จากข้าว ข้าวป่าสามง่าม (*E. coracana*) ข้าวโอต (*Avena sativa*) และหญ้าอเลกซานเดอร์ (*B. plantaginea*) (Hirata et al., 2007) สำหรับราที่แยกได้จากหญ้าวัชพืช (*Digitaria* sp. และ *Stenotaphrum* sp.) ในการศึกษาครั้งนี้ที่เจริญในบริเวณอื่น เช่น ในสวนอนุบาลพันธุ์ไม้และบริเวณข้างทางมีจีโนมที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *P. grisea* ที่แยกได้จากหญ้าตีนนก (*D. sanguinalis*) และ *Pyricularia* sp. (CE) ที่แยกได้จากหญ้าหางหมาแอฟริกัน (*Cenchrus ciliaris*) ตามลำดับ (Hirata et al., 2007) จะเห็นว่าการใช้ข้อมูลทางอณูชีววิทยาช่วยในการระบุชนิดของราทั้งสองที่มีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกันได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับในการศึกษาของ Couch and Kohn (2002) ที่ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส์ actin, β -tubulin และ calmodulin แล้วสรุปว่าเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในหญ้าตีนนก (*D. sanguinalis*) คือ *P. grisea* ส่วนเชื้อที่ทำให้เกิดโรคใหม่ในข้าวและธัญพืช คือ *P. oryzae* และจัด teleomorph *Magnaporthe oryzae* ให้เป็นราชนิดใหม่โดยใช้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนส์ทั้งสามตำแหน่งนี้ ในทำนองเดียวกัน Zellerhoff et al. (2006) ได้ทดสอบความสามารถของ *Pyricularia* 19 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ ในการทำให้เกิดโรคกับข้าวบาร์เลย์ 8 สายพันธุ์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ actin, β -tubulin และ calmodulin genes พบว่าราชนิดใหม่ที่แยกได้จาก *Pennisetum* spp. มีความใกล้ชิด กับ *P. grisea* ที่แยกได้จาก *Digitaria* spp. ซึ่งเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์นี้ไม่ก่อให้เกิดโรคในข้าวบาร์เลย์และเป็นคนละชนิดกับราที่แยกได้จากข้าว สำหรับ Hirata et al. (2007) ที่ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสี่ยีนส์เช่นเดียวกับในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการใช้ข้อมูลจากยีนส์หลายตำแหน่งช่วยในการระบุชนิดและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *P. oryzae* และ *P. grisea* ได้เป็นอย่างดี รวมถึงเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลทางชีววิทยาและสัณฐานวิทยาของ *Pyricularia* สปีชีส์อื่นๆ แม้ว่าจะยังไม่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ชัดเจนของ *Pyricularia* กลุ่มที่มีลักษณะสัณฐานต่างกันอย่างเด่นชัดเหล่านั้นได้ แต่สนับสนุนการระบุสปีชีส์ของ *Pyricularia* ได้อย่างถูกต้องโดยพิจารณาจากค่า bootstrap support ของแต่ละ clade ที่สูงถึง 100% ทั้งในวิธี parsimony และ neighbor-joining

Pyricularia oryzae นอกจากเข้าทำลายพืชได้ทุกส่วน และทำความเสียหายกับข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโตแล้วยังมีพืชอาศัยกว้าง และอาจจะสามารถอาศัยในพืชทางเลือกชนิดอื่นได้ เช่น หญ้าวัชพืช โดยเชื้อสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้ทั่วบริเวณเพาะปลูก และเมื่อสภาพเหมาะสมก็มีการระบาดของโรคใหม่อย่างรุนแรงได้ (Asuyama, 1965; Ou, 1987) สำหรับในประเทศไทย Sirithunya *et al.* (2008) ได้ประเมินความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่โดยใช้ลายพิมพ์ DNA จาก RAPD DNA และรายงานว่าเป็น *P. grisea* (ซึ่งคือ *P. oryzae* ตามรายงานของ Couch and Kohn (2002) Hirata *et al.* (2007) และในงานวิจัยครั้งนี้) สาเหตุโรคใหม่ในข้าว ข้าวป่า ข้าวบาร์เลย์ และวัชพืช มีสายพันธุ์แตกต่างกันไปในแต่ละภาค และยังพบว่าเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ในข้าวและวัชพืชมีความสัมพันธ์กัน วัชพืชอาจจะเป็นพืชอาศัยทางเลือกได้ จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งใหม่ที่พบว่าราสาเหตุโรคใหม่ในข้าว หญ้าวัชพืชในนาข้าว (*Eleusine sp.* และ *Brachiaria sp.*) และหญ้าแพงโกลา (*D. eriantha*) ที่ปลูกใกล้บริเวณนาข้าวเป็นชนิดเดียวกัน คือ *P. oryzae* โดยเฉพาะข้าวญี่ปุ่นที่ปลูกในจังหวัดเชียงรายซึ่งมีสภาพอากาศเหมาะสม ประกอบกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนของเกษตรกรเพื่อเร่งการเจริญของข้าว จะแสดงอาการไหม้ทั่วทั้งแปลงรวมถึงหญ้าวัชพืชที่อยู่ในแปลงข้าวด้วย หลังจากเก็บเกี่ยวข้าวแล้ววัชพืชเหล่านี้และหญ้าเลี้ยงสัตว์อาจเป็นแหล่งสะสม inoculum โดยเป็นพืชทางเลือกให้กับเชื้อสาเหตุได้ จึงควรมีการวางแผนป้องกันพืชและเลือกวิธีการป้องกันกำจัดราสาเหตุโรคใหม่ให้เหมาะสม นอกจากนี้ ในหลายประเทศ เช่น จีน ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินเดีย มีรายงานว่าเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคใหม่ในข้าวและธัญพืชอื่นเป็นคนละชนิดกันกับเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในหญ้าตีนนก (*D. sanguinalis* และ *Digitaria sp.*) โดยใช้ลักษณะการเข้าคู่ของเชื้อ (laboratory matings) ความรุนแรงในการทำให้เกิดโรค ความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย ความสามารถในการทำให้เกิดโรคในพืชทดสอบชนิดต่างๆ (Borromeo *et al.* 1993, Kato *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2006; Yamagashira *et al.*, 2008) ดังนั้นงานด้านความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ในประเทศไทยควรที่จะศึกษาให้ครอบคลุมในลักษณะดังกล่าวด้วย เพื่อนำไปสู่แผนการจัดการความเสี่ยงที่อาจเกิดจากโรคใหม่นี้ ให้สอดคล้องกับความผันแปรทางพันธุกรรมของราสาเหตุโรคใหม่และสายพันธุ์ข้าวที่หลากหลายในแต่ละภาคของประเทศไทย

ศักยภาพของราเอนโดไฟท์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ *Pyricularia*

ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีศักยภาพในการผลิตสารต้านเชื้อรา โดยพบราเอนโดไฟท์ประมาณ 82% และ 35% ของจำนวนที่คัดกรองสร้างสารต้านเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ *Pyricularia* ได้อย่างน้อยหนึ่งสายพันธุ์ โดยแสดงฤทธิ์ยับยั้งมากกว่า 15% และ 30% ตามลำดับ และการคัดกรองด้วยการเลี้ยงราเอนโดไฟท์แต่ละไอโซเลทในอาหารทั้ง 5 ชนิดนั้นทำให้เพิ่มโอกาสของเชื้อในการสร้างสารต้านเชื้อราได้ เช่น *Pestalotiopsis maculiformans* PDB151 (แยกจากลำต้นเหนือดินของ *Amomum siamense*) ที่เลี้ยงในอาหาร F1 สร้างสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใหม่ (13–26%) ได้ 4 สายพันธุ์ (*P. oryzae* BS265, *P. oryzae* BS285, *Pyricularia sp.* BS191 และ *Pyricularia sp.* BS279) แต่ที่เลี้ยงในอาหาร F2 ยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ดีขึ้น (17–65%) และในสารสกัดหยาบยังพบสัญญาณโปรตรอนของกลุ่มสารที่

น่าสนใจ โดยเฉพาะที่เลี้ยงในอาหาร F2 (113 mg/ml) และ F4 (161 mg/ml) ซึ่งให้สารสกัดยับยั้งมากกว่าการเลี้ยงในอาหารชนิดอื่นด้วย จึงได้คัดเลือกราเอนโดไฟท์ *P. maculiformans* PDB151 มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารทั้งสองชนิด สกัดแยกและระบุชนิดของสารได้ 6 ชนิด ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ phenol คือ tyrosol (Sentheshanmuganathan and Elsdon, 1958) และสารอนุพันธ์ของ lactones คือ (-)-pestalotin (Ayer *et al.*, 2000), dehydropestalotin (Dickinson, 1993), hydroxypestalotin (Venkatasubbaiah *et al.*, 1991), oxysporone (Adesogan and Alo, 1979) และสารอนุพันธ์ของ lactones ที่ยังไม่ทราบโครงสร้างมาก่อน โดยสารหลักที่พบคือ (-)-pestalotin (22–39% yield) ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดของสาร (MIC 35 µg/ml) ต่อการยับยั้งการเจริญของ *P. oryzae* ต่ำกว่าค่าความเป็นพิษเฉียบพลันที่ทำให้ไรแดงซึ่งเป็นแมลงศัตรูต้นสัตรีตายไปครึ่งหนึ่ง (LD₅₀ 208.12 µg/ml) ประมาณ 6 เท่า นอกจากนี้ pestalotin มีแนวโน้มในการยับยั้งการเข้าสู่กระบวนการแบ่งตัวของเซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดมนุษย์ NCI-H1299 โดยที่ 72 ชั่วโมงหลังการทดสอบเซลล์ที่ได้รับสารนี้มีค่าดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์แบบไมโทซิส (3.01%) ต่ำกว่าในเซลล์กลุ่มควบคุม (7.66%) และนิวเคลียสของเซลล์ที่ได้รับสารนี้มีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม

ราในสกุล *Pestalotiopsis* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นทั้งราซาโพรบ รากอโรคในพืชหลายชนิด และราเอนโดไฟท์ที่พบการกระจายตัวในพืชปกติกเกือบทุกชนิดโดยเฉพาะพืชในเขตร้อน (Wang *et al.*, 2005; Lui *et al.*, 2007) หลังจากที่มีการค้นพบ taxol ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งได้จากราเอนโดไฟท์ *P. microspora* (Strobel *et al.*, 1996) ก็มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ต่างๆ ที่ได้จากราสกุลนี้เป็นจำนวนมาก โดยสารทุติยภูมิที่ศึกษาโครงสร้างแล้วมีมากกว่า 196 สาร จัดอยู่ใน 8 กลุ่ม ได้แก่ terpenoids (sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes), nitrogen-containing compounds (amines and amides, indole derivatives), quinone and semiquinone derivatives, coumarins, lactones, chromone derivatives, phenolic compounds และสารทุติยภูมิอื่นๆ (Yang *et al.*, 2012) ซึ่งสารอนุพันธ์ของ lactones หลายชนิดมักมีรายงานว่าสร้างโดยราสกุลนี้ เช่น pestalotin, hydroxypestalotin และ oxysporone ที่แยกได้จาก *P. oenotherae* สาเหตุโรคพืชในต้น evening primrose ซึ่งสารสองชนิดแรกเป็นพิษอย่างอ่อนต่อพืชอาศัยและส่งเสริมฤทธิ์ของ gibberellin ส่วนสารชนิดหลังเป็นพืชต่อพืชอาศัย (Adesogan and Alo, 1979; Venkatasubbaiah *et al.*, 1991) สำหรับ pestalotin ที่แยกได้จาก *P. cryptomeriaecola* เมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว แต่สารนี้จะไปกระตุ้นการสังเคราะห์ α -amylase ในเอนโดสเปิร์มของข้าว และเมื่อใช้ร่วมกับ gibberellic acid พบว่าช่วยส่งเสริมการทำงานของ gibberellic acid ได้ดีขึ้น โดยชักนำให้กล้าข้าวมีการเจริญทางยอดได้ดีกว่า (Kimura *et al.*, 1971; Kimura and Tamura, 1972) สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ สารที่แยกได้จากราเอนโดไฟท์ *P. maculiformans* PDB151 เกือบทั้งหมดเป็นสารอนุพันธ์ของ lactones โดยเฉพาะสารหลักที่พบคือ pestalotin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคไหม้ *P. oryzae* ได้ (MIC 35 µg/ml) แม้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. oryzae* จะน้อยกว่าสาร cryptocin ที่ผลิตโดยราเอนโดไฟท์ *Cryptosporiopsis quercina* (MIC 0.39 µg/ml, Li *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบความเป็นพิษของ pestalotin ต่อไรแดงให้ค่า LD₅₀ สูงกว่า (208.12 µg/ml) ค่า MIC ของสารนี้ในการยับยั้ง *P. oryzae* ถึง 6 เท่า นอกจากนี้ ในโครงสร้างหลักของ pestalotin มักพบในสารธรรมชาติอื่นๆ ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย โดยเฉพาะ oxygen function บน pyrone ring และตรง side chain คาร์บอน

ตำแหน่งที่ 6 ซึ่งมักมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของพืช ต้านเชื้อรา และ antitumor อาจใช้เป็นต้นแบบในการปรับปรุงโครงสร้างเพื่อพัฒนาสารออกฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ ต่อไป

มีการศึกษาจำนวนมากเพื่อการนำจุลินทรีย์เอนโดไฟต์มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งราเอนโดไฟท์ช่วยเพิ่มความแข็งแรง ความต้านทานต่อโรค และแมลงศัตรูพืชได้ (Belanger, 1996) โดยมีกลไกการแข่งขันเจริญกับเชื้อราโรคพืช สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช หรือกระตุ้นให้พืชอาศัยสร้างกลไกป้องกันตัวเอง (Brown *et al.*, 2003; Photita, 2003; Rubini *et al.*, 2005) เพื่อแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะนำราเอนโดไฟท์หรือสารที่ผลิตจากราเหล่านี้มาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ควรมีการทดสอบกับต้นพืชในระดับโรงเรือนหรือระดับแปลงปลูก เช่น การทดสอบพบความสามารถของราเอนโดไฟท์ *Phialocephala fortinii* ที่แยกได้จากรากของมะเขือและกะหล่ำปลีในการยับยั้งอาการเหลือง (*Verticillium yellows*) ที่เกิดจาก *V. dahliae* and *V. longisporum* ในต้นกะหล่ำปลีได้ (Narisawa *et al.*, 2003) ราเอนโดไฟท์ *Gliocladium catenulatum* ที่แยกได้จากกิ่งของต้นโกโก้ (*Theobroma cacao*) สามารถลดความรุนแรงของโรคพุ่มไม้กวาด (witches' broom disease) ในต้นกล้าโกโก้ได้เป็นอย่างดี (Rubini *et al.*, 2005) นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังมีราเอนโดไฟท์อีกหลายไอโซเลทที่แสดงประสิทธิภาพในการสร้างสารต้านการเจริญของราสาเหตุโรคใหม่ได้ และแสดงสัญญาณโปรตรอนของกลุ่มสารที่น่าสนใจหลังจากการบันทึก ^1H NMR สเปกตรัมแล้ว เช่น unidentified fungus PDB7, unidentified fungus PDB21, *Fusarium* sp. PDB141 และ *Pestalotiopsis* sp. PDB197 ราเหล่านี้ควรมีการศึกษาต่อไปเพราะเชื้อราจะมีความได้เปรียบในเรื่องการเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้อย่างไม่จำกัดและใช้เวลาในการเจริญเติบโตน้อยกว่าพืชหรือสัตว์ จึงน่าจะเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่อาจเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม

เอกสารอ้างอิง

- กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. องค์ความรู้เรื่องข้าว. [ออนไลน์]. เข้าได้ถึงจาก: http://www.ricethailand.go.th/rkb/data_005/rice_xx2-05_index.html. สืบค้น 19 มิถุนายน 2554.
- ทัศนีย์ สงวนสำจ. 2540. บทบาทของพันธุกรรมด้านทานโรคและแมลงกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทย. เอกสารวิชาการ. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแหงฤทธรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. สหมิตรพรินติ้ง. นนทบุรี.
- ศรารุณี ฒ เชียงใหม่. 2555. ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร pestalotin จากเชื้อราต่อเซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดมนุษย์ NCI-H1299. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สำนักมาตรฐานสินค้านำเข้าส่งออก กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. 2554. ปริมาณการส่งออกข้าวของไทย ปี 2551–2554. [ออนไลน์]. เข้าได้ถึงจาก: <http://www.dft.go.th/บริการข้อมูล/สถิติการนำเข้าส่งออกของไทย/tabid/164/ctl/DetailUserContent/mid/689/contentID/1007/Default.aspx>. สืบค้น 15 กุมภาพันธ์ 2555.
- Adelin, E., Servy, C., Cortial, S., Lévaïque, H., Martin, M.-T., Retailleau, P., Goff, G.L., Bussaban, B., Lumyong, S. and Ouazzani, J. 2011a. Isolation, structure elucidation and biological activity of metabolites from Sch-642305-producing endophytic fungus *Phomopsis* sp. CMU-LMA. *Phytochemistry* 72: 2406–2412.
- Adelin, E., Servy, C., Cortial, S., Lévaïque, H., Gallard, J.-F., Martin, M.-T., Retailleau, P., Bussaban, B., Lumyong, S. and Ouazzani, J. 2011b. Biotransformation of natural compounds. Oxido-reduction of Sch-642305 by *Aspergillus ochraceus* ATCC1009. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21: 2456–2459.
- Adesogan, E.K. and Alo, B.I. 1979. Oxysporone, a new metabolite from *Fusarium oxysporum*. *Phytochemistry* 18: 1886–1887.
- von Arx, J.A. 1981. *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. A.R. Gantner, Germany.
- Asuyama, H. 1965. Morphology, taxonomy, host range, and life cycle of *Piricularia oryzae*. In R.F.Jr. Chandler (ed.), *The Rice Blast Disease*, pp. 9–22. The Johns Hopkins Press, USA.

- Ayer, W.A., Trifonov, L.S., Hutchison, L.J. and Chakravarty, P. 2000. Metabolites from a wood-inhabiting cup fungus, *Urnula craterium*. *Natural Product Letters* 14: 405–410.
- Belanger, F.C. 1996. A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability. *Crop Science* 36: 460–462.
- Bhilabutra, W. 2009. *Biodiversity of Fungi on Some Grasses and Their Production of Bioactive Compounds*. Ph.D. Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Borromeo, E.S., Nelson, R.J., Bonman, J.M. and Leung, H. 1993. Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia* infecting rice weed hosts. *Phytopathology* 83: 393–399.
- Brown, K.B., Johnson, G.I. and Guest, D.I. 2003. Interactions between the endophytic fungi of durian (*Durio zibethinus*) and *Phytophthora palmivora*. *Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology*, p. 41. Christchurch, New Zealand.
- Bussaban, B., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Lumyong, S. 2002. Index of fungi described from the Zingiberaceae. *Mycotaxon* 83: 165–182.
- Bussaban, B., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Lumyong, S. 2003a. *Xenosporium amomi* sp. nov. from Zingiberaceae in Thailand. *Fungal Diversity* 14: 61–66.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., Hyde, K.D. and McKenzie, E.H.C. 2003b. Three new species of *Pyricularia* isolated as Zingiberaceae endophytes from Thailand. *Mycologia* 95: 519–524.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., Seelanan, T., Park, D.C., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. 2005. Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. *Mycologia* 97: 1002–1011.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. 2001a. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 943–948.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., Hyde, K.D. and McKenzie, E.H.C. 2001b. Two new species of endophytes (ascomycetes) from Zingiberaceae sporulating in culture. *Nova Hedwigia* 73: 487–493.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. 2001c. A synopsis of the genus *Berkleasmius* with two new species and new records of *Canalisporium caribense* from Zingiberaceae in Thailand. *Fungal Diversity* 8: 73–85.
- Carbone, I. and Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.

- Chen, Q.H., Wang, Y.C. and Zheng, X.B. 2006. Genetic diversity of *Magnaporthe grisea* in China as revealed by DNA fingerprint haplotypes and pathotypes. *Journal of Phytopathology* 154: 361–369.
- Choi, Y.W., Hyde, K.D. and Ho, W.H. 1999. Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* 3: 29–38.
- Couch, B.C. and Kohn, L.M. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94: 683–693.
- Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.-R., Pan, H., Read, N.D., Lee, Y.-H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofri, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeyer, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.-H., Bohnert, H., Coughlam, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.-J., Nicol, R., Purcell, S., Nussbaum, C., Galagan, J.E. and Birren, B.W. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434: 980–986.
- Dickinson, J.M. 1993. Microbial pyran-2-ones and dihydropyran-2-ones. *Natural Product Reports* 10: 71–98.
- Dingle, J. and McGee, P.A. 2003. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. *Mycological Research* 107: 301–316.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Ellis, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Glass, N.L. and Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–1330.
- Guba, E.F. 1932. Monograph of the genus *Pestalotia*. *Mycologia* 24: 355–397.
- Hashioka, Y. 1973. Notes on *Pyricularia* II. Four species and one variety parasitic to Cyperaceae, Gramineae and Commelinaceae. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 14: 256–265.
- Hirata, K., Kusaba, M., Chuma, I., Osue, J., Nakayashiki, H., Mayama, S. and Tosa, Y. 2007. Speciation in *Pyricularia* inferred from multilocus phylogenetic analysis. *Mycological Research* 111: 799–808.

- Huang, Z., Cai, X., Shao, C., She, Z., Xia, X., Chen, Y., Yang, J., Zhou, S. and Lin, Y., 2008. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochemistry* 69: 1604–1608.
- Kato, H., Tamamoto, M., Yamaguchi-Ozaki, T., Kadouchi, H., Iwamoto, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S. and Mori, N. 2000. Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from Gramineae, Bambusideae and Zingiberaceae plants. *Journal of General Plant Pathology* 66: 30–47.
- Kimura, Y. and Tamura, S. 1972. Isolation and structure of pestalotin, a gibberellin synergist from *Pestalotia cryptomeriaeicola*. *Agricultural and Biological Chemistry* 36: 1925–1930.
- Kimura, Y., Katagiri, K., Inoue, T. and Tamura, S. 1971. Isolation and biological activity of pestalotin, a gibberellin synergist from *Pestalotia cryptomeriaeicola*. *Agricultural and Biological Chemistry* 35: 1313–1314.
- Li, J.Y., Strobel, G.A., Harper, J.K., Lobkovsky, E. and Clardy, J. 2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Organic Letters* 2: 767–770.
- Liu, A.R., Chen, S.C., Lin, X.M., Wu, S.Y., Xu, T., Cai, F.M. and Jeewon, R. 2010. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Palmae, Rhizophoraceae, Planchonellae and Podocarpaceae in Hainan, China. *African Journal of Microbiological Research* 4: 2661–2669.
- McKenzie, E.H.C., Park, D., Bellgard, S.E. and Johnston, P.R. 2010. A new species of *Pyricularia* (hyphomycetes) on *Cortaderia* (Poaceae) in New Zealand. *Mycosphere* 1: 223–228.
- Mishra, D., Singh, U.D., Dash, A.B., Reddy, J.N. and Sridhar, R. 2006. Analysis of *Pyricularia grisea* populations from three different blast epidemics. *Pest Science & Management* 31: 22–24.
- Narisawa, K., Currah, R.S. and Hashiba, T. 2003. The root endophytic fungus *Phialocephala fortinii* suppresses *Verticillium* yellow in Chinese cabbage. *Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology*, p. 39. Christchurch, New Zealand.
- Noenplab, A., Vanavichait, A., Toojinda, T., Sirithunya, P., Tragoonrung, S., Sriprakhon, S. and Vongsaprom, C. 2006. QTL mapping for leaf and neck blast resistance in khao dawk mali105 and jao hom nin recombinant inbred lines. *ScienceAsia* 32: 133–142.

- Ou, S.H. 1987. *Rice Diseases, 2nd Edition*. CAB International, Kew, UK.
- Park, M.-J. and Shin, H.-D. 2009. A new species of *Pyricularia* on *Commelina communis*. *Mycotaxon* 108: 449–456.
- Paterson, R.R.M. 2006. Fungi and fungal toxins as weapons. *Mycological Research* 110: 1003–1010.
- Photita, W. 2003. *Survey and Isolation of Endophytic and Saprobic Fungi of Wild Banana in Doi Suthep-Pui National Park*. Ph.D. Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Pimentel, M.R., Molina, G., Dionísio, A.P., Junior, M.R.M. and Pastore, G.M. 2011. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology Research International [Electronic Resource]* 2011: 1–11.
- Prabhu, A.S., Araújo, L.G., Silva, G.B. and Trindade, M.G. 2007. Virulence and rep-PCR analysis of *Pyricularia grisea* isolates from two Brazilian upland rice cultivars. *Fitopatologia Brasileira* 32: 13–20.
- Purchio, A.F. and Muchovej, J.J. 1993. *Commelina agraria*: a new host of *Pyricularia grisea*. *Plant Pathology* 42: 818–819.
- Rathaiah, Y. 1980. Leaf spot of turmeric. *Plant Disease* 64: 104–105.
- Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T., Pomella, A.W.V., Maki, C.S., Araújo, W.L., dos Santos, D.R. and Azevedo, J.L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease. *International Journal of Biological Science* 1: 24–33.
- Sarbajna, K.K. 1990. New species of *Mycovellosiella* and *Pyricularia* from West Bengal. *Journal of Mycopathological Research* 28: 159–164.
- Sentheshanmuganathan, S. and Elsdén, S.R. 1958. The mechanism of the formation of tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biochemistry* 69: 210–218.
- Shull, V. and Hamer J.E. 1994. Genomic structure and variability in *Pyricularia grisea*. In R. Zeigler, S. Leong, P. Teng (eds.), *Rice Blast Disease*, pp. 65–86. CAB International, Wallingford, UK.
- Sirithunya, P., Sreewongchai, T., Sriprakhon, S., Toojinda, T., Pimpisithavorn, S., Kosawang, C. and Smitamana, P. 2008. Assessment of genetic diversity in Thai isolates of *Pyricularia grisea* by random amplification of polymorphic DNA. *Journal of Phytopathology* 156: 196–204.

- Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S. and Hess, W.M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora* of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142: 435–440.
- Swofford, D.L. 2002. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)*, Beta Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tharreau, D., Lebrun, M.H., Talbot, N.J. and Notteghem, J.L. 2000. *Advances in Rice Blast Research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- Thongkantha, S., Jeewon, R., Vijaykrishna, D., Lumyong, S., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. 2008. Molecular phylogeny of Magnaporthaceae (Sordariomycetes) with a new species *Ophioceras Chiangdaoense* from *Dracaena loureiroi* in Thailand. *Fungal Diversity* 34: 155–171.
- Venkatasubbaiah, P., van Dyke, C.G. and Chilton, W.S. 1991. Phytotoxins produced by *Pestalotiopsis oenotherae*, a pathogen of evening primrose. *Phytochemistry* 30: 1471–1474.
- Villarroel, M.J., Sancho, E., Ferrando, M.D. and Andreu, E. 2003. Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53: 857–864.
- Vilgalys, R., Hester, M., 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172, 4238–4246.
- Wang, Z.-Y., Jenkinson, J.M., Holcombe, L.J., Soanes, D.M., Veneault-Fourrey, C., Bhambra, G.K. and Talbot, N.J. 2005. The molecular biology of appressorium turgor generation by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Biochemical Society Transactions* 33: 384–388.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, pp. 315–322. Academic Press, San Diego, USA.

- Yamagashira, A., Iwai, C., Misaka, M., Hirata, K., Fujita, Y., Tosa, Y. and Kusaba, M. 2008. Taxonomic characterization of *Pyricularia* isolates from green foxtail and giant foxtail, wild foxtails in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 74: 230–241.
- Yang, Z.-L., Zhang, J.-Z. and Luo, D.-Q. 2012. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. *Natural Product Reports* 29: 622–641.
- Zellerhoff, N., Jarosch, B., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. and Schaffrath, U. 2006. Nonhost resistance of barley is successfully manifested against *Magnaporthe grisea* and a closely related *Pennisetum*-infecting lineage but is overcome by *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1014–1022.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

1. Bussaban, B., Ouazzani, J., Klaiklay, S., Rukachaisirikul, V. and Lumyong, S. Activity of endophytic fungi from Zingiberaceae against rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. The Annual Meeting of Thai Phytopathological Society (TTPS) and Conference on Plant Pathology in Thailand. 15 May 2010, Kasetsart University, Bangkok. (poster)
2. Bussaban, B., Klaiklay, S., Sukpondma, Y., Rukachaisirikul, V. and Lumyong, S. Bioactive compounds produced by endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. PDB151. การประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 10. 14–16 ตุลาคม 2553, โรงแรมฮอติเต็ยอินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ, เพชรบุรี. (oral)
3. Bussaban, B., Klaiklay, S., Sukpondma, Y., Rukachaisirikul, V. and Lumyong, S. Activity of metabolites produced by endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. PDB151 against phytopathogens. การประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 11. 19–21 ตุลาคม 2554. โรงแรมฮอติเต็ยอินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ, เพชรบุรี. (poster)

ภาคผนวก

Table A. Composition of fermentation media, F1–F5.

F1	
Glucose	3%
Soybean meal	0.5%
CaCl ₂	0.01%
KH ₂ PO ₄	0.1%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
F2	
Malt extract	2%
Corn starch	2%
Corn steep liquor	1.5%
Pharmamedia	0.5%
Red grain	0.5%
CaCO ₃	0.2%
F3	
Glucose	1%
Soybean oil	0.2%
Peptone	0.2%
Sugar cane baggras	0.1%
Yeast extract	0.3%
KH ₂ PO ₄	0.1%
NaCl	0.2%
CaCO ₃	0.3%
F4	
Potato	20%
Dextrose	2%
Galanga powder	0.5%
F5	
Potato	20%
Dextrose	2%

Table B. The sources of *Pyricularia* isolates and potential anti-*Pyricularia* endophytic fungi.

Fungal taxa	Strain No.	Host	Habitat	Geographic origin
<i>Pyricularia</i> isolates				
<i>Pyricularia caricis</i>	BS198	<i>Cyperus</i> sp.	Dead culms	Chiang Mai
<i>P. caricis</i>	BS199	<i>Cyperus</i> sp.	Dead culms	Chiang Mai
<i>P. caricis</i>	BS313	<i>Fimbristulis</i> sp.	Leaf blast	Chiang Rai
<i>P. costina</i>	BS134	<i>Amomum siamense</i>	Leaf blast	Chiang Mai
<i>P. costina</i>	BS155	<i>Am. siamense</i>	Dead leaf	Chiang Mai
<i>P. costina</i>	BS194	<i>Am. siamense</i>	Dead leaf	Chiang Mai
<i>P. costina</i>	BS193	Zingiberaceae	Leaf blast	Chiang Mai
<i>P. grisea</i>	BS315	Poaceae	Leaf blast	Nakhonnayok
<i>P. grisea</i>	BS316	<i>Digitaria</i> sp.	Leaf blast	Nakhonnayok
<i>P. oryzae</i>	BS267	<i>Brachiaria muticus</i>	Leaf blast	Lampang
<i>P. oryzae</i>	BS290	<i>Digitaria eriantha</i>	Leaf blast	Lampang
<i>P. oryzae</i>	BS319	<i>D. eriantha</i>	Leaf blast	Payao
<i>P. oryzae</i>	BS265	<i>Oryza sativa</i> KDM105	Leaf blast	Chiang Rai
<i>P. oryzae</i>	BS285	<i>O. sativa</i> RD6	Leaf blast	Lumphun
<i>P. oryzae</i>	BS314	<i>O. sativa</i>	Leaf blast	Nakhonnayok
<i>P. oryzae</i>	BS302	<i>O. sativa</i> var. <i>japonica</i>	Leaf blast	Chiang Rai
<i>P. oryzae</i>	BS303	<i>O. sativa</i> var. <i>japonica</i>	Leaf blast	Chiang Rai
<i>P. oryzae</i>	BS305	<i>O. sativa</i> var. <i>japonica</i>	Leaf blast	Chiang Rai
<i>P. oryzae</i>	BS308	<i>O. sativa</i> var. <i>japonica</i>	Leaf blast	Chiang Rai
<i>P. oryzae</i>	BS310	<i>Eleusine</i> sp.	Leaf blast	Chiang Rai
<i>P. oryzae</i>	BS311	<i>Brachiaria</i> sp.	Leaf blast	Chiang Rai
<i>Pyricularia</i> sp.	BS191	<i>Boesenbergia pandurata</i>	Leaf blast	Chiang Mai
<i>Pyricularia</i> sp.	BS286	<i>Boesenbergia</i> sp.	Leaf blast	Chiang Mai
<i>Pyricularia</i> sp.	BS287	<i>Boesenbergia</i> sp.	Leaf blast	Chiang Mai
<i>Pyricularia</i> sp.	BS146	Maranthaceae	Leaf blast	Chiang Mai
<i>Pyricularia</i> sp. (CE)	BS126	<i>Stenotaphrum</i> sp.	Leaf blast	Nakhon Sawan
<i>Pyricularia</i> sp. (CE)	BS279	<i>Stenotaphrum</i> sp.	Leaf blast	Chiang Mai
<i>Pyricularia</i> sp. (CE)	BS281	<i>Stenotaphrum</i> sp.	Leaf blast	Chiang Mai
<i>Pyricularia</i> sp. (CE)	BS318	<i>Stenotaphrum</i> sp.	Leaf blast	Payao
<i>Pyricularia</i> sp. (CE)	BS99	<i>Stenotaphrum</i> sp.	Leaf blast	Nakhon Sawan
<i>Pyricularia sphaerulata</i>	BS150	<i>Commenlina</i> sp.	Leaf blast	Chiang Mai
<i>Pyricularia sphaerulata</i>	BS151	<i>Commenlina</i> sp.	Leaf blast	Chiang Mai

Fungal taxa	Strain No.	Host	Habitat	Geographic origin
<i>Pyricularia zingiberis</i>	BS130	Zingiberaceae	Dead leaf	Chiang Mai
Anti-Pyricularia endophytes				
<i>Acremonium</i> sp.	PDB16	<i>Curcuma mangga</i>	Leaf	Chiang Mai
<i>Chaetomium globosum</i>	PDB2	<i>Alpinia malaccensis</i>	Leaf	Chiang Mai
<i>Favolaschia</i> sp.	PDB187	<i>Am. siamense</i>	Leaf	Chiang Mai
<i>Fusarium</i> sp.	PDB51	<i>Al. malaccensis</i>	Leaf	Chiang Mai
<i>Fusarium</i> sp.	PDB113	<i>Al. malaccensis</i>	Pseudostem	Chiang Mai
<i>Fusarium</i> sp.	PDB114	<i>Al. malaccensis</i>	Pseudostem	Chiang Mai
<i>Fusarium</i> sp.	PDB141	<i>Alpinia</i> sp.	Leaf	Chiang Mai
<i>Periconia</i> sp.	PDB13	<i>Boesenbergia</i> sp.	Leaf	Chiang Mai
<i>Periconia</i> sp.	PDB14	<i>B. pandurata</i>	Leaf	Chiang Mai
<i>Periconia</i> sp.	PDB15	<i>B. pandurata</i>	Leaf	Chiang Mai
<i>Pestalotiopsis maculiformans</i>	PDB151	<i>Am. siamense</i>	Pseudostem	Chiang Mai
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	PDB197	<i>Alpinia</i> sp.	Pseudostem	Chiang Mai
<i>Phoma</i> sp.	PDB11	<i>Al. malaccensis</i>	Pseudostem	Chiang Mai
<i>Phomopsis</i> sp.	PDB12	<i>Al. galanga</i>	Leaf	Chiang Mai
<i>Phomopsis</i> sp.	PDB168	<i>Am. siamense</i>	Leaf	Chiang Mai
<i>Phomopsis</i> sp.	PDB169	<i>Am. siamense</i>	Leaf	Chiang Mai
<i>Tetraploa</i> sp.	PDB9	<i>Zingiber zerumbet</i>	Leaf	Nakhon Sawan
<i>Tetraploa</i> sp.	PDB10	<i>Hedychium coronarium</i>	Leaf	Chiang Mai
Unidentified fungus	PDB1	<i>Bambusa</i> sp.	Leaf	Lumphun
Unidentified fungus	PDB3	Zingiberaceae	Leaf	Chiang Mai
Unidentified fungus	PDB4	Zingiberaceae	Leaf	Chiang Mai
Unidentified fungus	PDB5	Zingiberaceae	Leaf	Chiang Mai
Unidentified fungus	PDB6	Zingiberaceae	Leaf	Chiang Mai
Unidentified fungus	PDB7	Zingiberaceae	Leaf	Chiang Mai
Unidentified fungus	PDB19	<i>Costus curvibracteatus</i>	Leaf	Chiang Mai
Unidentified fungus	PDB20	<i>Al. galanga</i>	Leaf	Chiang Mai
Unidentified fungus	PDB21	<i>Z. zerumbet</i>	Leaf	Nakhon Sawan
Unidentified fungus	PDB22	<i>Z. zerumbet</i>	Leaf	Nakhon Sawan
Unidentified fungus	PDB23	<i>Z. zerumbet</i>	Leaf	Nakhon Sawan
Unidentified fungus	PDB24	<i>Z. cassumunar</i>	Leaf	Nakhon Sawan
Unidentified fungus	PDB45	<i>Cu. parviflora</i>	Leaf	Chiang Mai
Unidentified fungus	PDB62	<i>Etlingera litteralis</i>	Leaf	Chiang Mai
Unidentified fungus	PDB65	<i>E. litteralis</i>	Pseudostem	Chiang Mai

Fungal taxa	Strain No.	Host	Habitat	Geographic origin
Unidentified fungus	PDB133	<i>Cu. ecomata</i>	Flower	Chiang Mai
Unidentified fungus	PDB137	<i>Cu. ecomata</i>	Flower	Chiang Mai
<i>Xylaria</i> sp.	PDB161	<i>Alpinia</i> sp.	Leaf	Chiang Mai
<i>Xylaria</i> sp.	PDB162	<i>Am. siamense</i>	Leaf	Chiang Mai
<i>Xylaria</i> sp.	PDB163	<i>Alpinia</i> sp.	Leaf	Chiang Mai
<i>Xylaria</i> sp.	PDB164	<i>Alpinia</i> sp.	Leaf	Chiang Mai
<i>Xylaria</i> sp.	PDB165	<i>Alpinia</i> sp.	Leaf	Chiang Mai
<i>Xylaria</i> sp.	PDB166	<i>Am. siamense</i>	Pseudostem	Chiang Mai
<i>Xylaria</i> sp.	PDB167	<i>Alpinia</i> sp.	Leaf	Chiang Mai