ทดสอบสายพันธุ์เห็ด *Oudemansiella* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์เชื้อสาเหตุโรคพืช

Efficiency Test of *Oudemansiella* spp. Varieties to Control Plant Disease Pathogen

พจนา ตระกูลสุขรัตน์[1/] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[2/] และอัจฉรา พยัพพานนท์[2/]

[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/] สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การทดลองหาไอโซเลทเห็ด *Oudemansiella* spp. ที่สร้างสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เชื้อสาเหตุโรค 4 ชนิดคือ *Colletotrichum capsici* และ *C. gloeosposiodes* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก *C. gloeosposiodes* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง และ *Macrophomina phaseolina* ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าไอโซเลท L3P สามารถสร้างสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 4 ชนิดเมื่อเลี้ยงบนอาหารผสมที่ความเข้มข้น 10% ในขณะที่บนอาหารผสมจากไอโซเลท ชช17 และสุราษฎร์โคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกับชุดควบคุม

รหัสการทดลอง 01-16-49-03-04-01-07-53

คำนำ

เห็ดในสกุล *Oudemansiella* spp. พบได้ทั้งในเขตร้อนชื้นและเขตอบอุ่น เป็นเห็ดในกลุ่มผู้ย่อยสลาย (saprophyte) ที่เจริญเติบโตและพบได้ทั่วไปบนรากต้นไม้ที่เน่าผุ ในประเทศไทยมีรายงานการพบเห็ดในสกุลนี้บางชนิดในเขตจังหวัดนราธิวาส ตากและเลย (อัจฉรา, 2545) เห็ดในสกุลนี้บางชนิดสามารถนำมาใช้รับประทานเป็นอาหารได้ บางชนิดมีคุณสมบัติในการควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทั้งในพืชและในมนุษย์ มีรายงานว่าเห็ดบางชนิดในสกุล *Oudemansiella* spp. เช่น *O. radicata*, *O. canarii* และ *O. mucida* มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคในมนุษย์ (Denisova, 2001; Reshetnikos *et al*., 2001; Vahidi and Namjoyan, 2004) และสารประกอบที่ได้ส่วน fruiting body ของเห็ดในสกุลนี้สามารถลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Sphaerotheca fuliginea* สาเหตุโรคราแป้งแตงกวาได้ถึง 20% นอกจากนี้ยังลดอัตราการงอกของโคนีเดียได้ถึง 71% ภายใน 48 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ (Stadnik *et al*., 2003) ดังนั้นการศึกษาหาชนิดเห็ดในสกุล *Oudemansiella* spp. ที่สามารถสร้างสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงมีความจำเป็นเพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดในสกุล *Oudemansiella* spp. ที่มีศักยภาพสำหรับการนำมาใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมโรคพืช เพื่อลดความเสียหายของพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค และเป็นการลดการใช้สารเคมีควบคุมโรคอีกทางหนึ่ง

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ข้อมูลผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เชื้อสาเหตุโรคของเห็ด *Oudemansiella* spp. ในสภาพห้องปฏิบัติการ สำหรับเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาการป้องกันกำจัดจุลินทรีย์เชื้อสาเหตุโรคพืชอย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เห็ดในสกุล *Oudermansiella* spp. ที่เก็บอยู่ในหน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด กรมวิชาการเกษตร
2. เชื้อราสาเหตุโรคพืช
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และ potato dextrose broth (PDB)
4. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการและเครื่องแก้ว
5. อุปกรณ์บันทึกผลการทดลองได้แก่ กล้องถ่ายภาพ และสมุดบันทึก

วิธีการ

1. เลี้ยงและขยายปริมาณเห็ด *Oudemansiella* spp.

เลี้ยงเห็ดในสกุล *Oudermansiella* spp. จากหน่วยเก็บรักษาศูนย์เชื้อพันธุ์เห็ด กรมวิชาการเกษตร จำนวน 3 ไอโซเลท คือ

1. ไอโซเลท ชช 17 พบที่ จ.ตาก โดยศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์ และยงยุทธ สายฟ้า
2. ไอโซเลท สุราษฎร์ พบที่ อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี
3. ไอโซเลท L3P พบที่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.พิกุลทอง

จ.นราธิวาส

บนอาหาร PDA เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จนเห็นเส้นใยเจริญ ใช้ cork borer เจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ใส่ลงในขวดบรรจุอาหารเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร วางขวดอาหารเหลว PDB บนเครื่องเขย่าขวดอาหารและตั้งให้เครื่องเขย่ามีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 40 วัน จนเห็นการเจริญของกลุ่มเส้นใยเห็ดเป็นก้อนกลมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.0-5.0 มิลลิเมตร สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารเหลวที่มีสารจากเห็ด *Oudemansiella* spp. จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างแบบมีฝาปิด (eppendorf tube) ทุก 7 วัน เก็บแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรค

2. เลี้ยงและขยายปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคพืช

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 ชนิด คือ

1. *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดคะน้า พบที่ จ.กาญจนบุรี
2. *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก พบที่ จ.อุบลราชธานี
3. *C. gloeosposiodes* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก พบที่ จ.พิจิตร
4. *C. gloeosposiodes* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง พบที่ จ.สุพรรณบุรี
5. *Macrophomina phaseolina* สาเหตุโรค charcoal rot ของข้าวฟ่างหวาน พบที่ จ.ชัยนาท จำนวน 1 ไอโซเลท

บนอาหาร PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วันจนเห็นเส้นใยเจริญ

3. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค

ทำการทดสอบ 2 วิธีการคือผสมรวมไปกับอาหารเลี้ยงเชื้อและจุ่มสารด้วยกระดาษกรอง

<u>วิธีที่ 1</u> วิธีผสมรวมไปกับอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมอาหาร PDA ปริมาตร 90 มิลลิลิตรที่หลอมจนเหลวและทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนสามารถจับขวดอาหารได้ ใช้ปิเปตดูดเอาเฉพาะอาหารเหลว PDB ที่ใช้เลี้ยงเห็ด *Oudemansiella* spp. ไอโซเลทต่างๆ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดอาหาร PDA ได้เป็นอาหารผสมที่ความเข้มข้น 10% เขย่าขวดให้อาหารทั้งสองเข้ากันก่อนเทลงในจานอาหาร จำนวน 10 จานต่อ 1 ขวดอาหาร ตั้งทิ้งไว้ในตู้เขี่ยเชื้อจนอาหารผสมแข็งและเย็นตัวที่อุณหภูมิห้อง

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตรเจาะอาหาร PDA ที่มีเชื้อราสาเหตุโรคเจริญอยู่บริเวณของโคโลนี วางลงกลางอาหารผสมความเข้มข้น 10% ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ชุดควบคุม (control) วางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDA ผสมอาหาร PDB เปล่า วางจานอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในจานอาหารชุดควบคุมเจริญเต็มจาน วัดและจดบันทึกการเจริญของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรค

วิธีที่ 2 วิธีหยดสารบนกระดาษกรอง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตรเจาะอาหาร PDA ที่มีเชื้อราสาเหตุโรคเจริญอยู่บริเวณของโคโลนี วางลงกลางจานอาหาร วางกระดาษกรอง Wathman No. 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตรบนจานอาหารให้มีระยะห่างจากเชื้อรา 3.0 เซ็นติเมตรทั้ง 2 ด้าน ใช้ปิเปตดูดอาหารเหลว PDB ที่ใช้เลี้ยงเห็ด *Oudemansiella* spp. ไอโซเลทต่างๆ ที่เก็บในหลอดเก็บตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตรหยดบนกระดาษกรอง ชุดควบคุม (control) หยดด้วยอาหาร PDB เปล่า วางจานอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในจานอาหารชุดควบคุมเจริญเต็มจาน วัดและจดบันทึกการเจริญของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรค

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2552 สิ้นสุด กันยายน 2553

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์ สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เลี้ยงและขยายปริมาณเห็ด *Oudemansiella* spp.

ลักษณะเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. จำนวน 4 ไอโซเลทคือ ชช17, สุราษฎร์, หนาว และ L3P เส้นใยมีสีขาวขุ่น มีการเจริญของกลุ่มเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. ในอาหาร PDB เหลวที่สะอาดไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เริ่มแรกมีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาวขุ่นขนาดเล็ก ต่อมาก้อนขยายขนาดจนมีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 3.0-5.0 มิลลิเมตร อาหารเหลว PDB ใสไม่ขุ่น ถ้าเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเส้นใยเห็ดก็ยังสามารถเจริญได้แต่อาหารเหลว PDB จะมีลักษณะขุ่นเป็นตะกอน

2. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค

วิธีที่ 1 วิธีผสมรวมไปกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 6 ไอโซเลท คือ *Colletotrichum capsici* (C69) *C. gloeosposiodes* (C64 C65 และ R43 จากพริก และ CM4 จากมะม่วง) และ *Macrophomina phaseolina* ที่ถูกเลี้ยงบนอาหารเหลว PDB ที่ใช้เลี้ยงเห็ด *Oudemansiella* spp. (อาหารผสม) จำนวน 3 ไอโซเลทคือ ชช17, สุราษฎร์ และ L3P ที่ความเข้มข้น 10% โดยวัดในวันที่โคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหาร PDA ที่ผสมอาหาร PBD เปล่า (ชุดควบคุม) เจริญเต็มจานอาหาร (ตารางที่ 1) พบว่าโคโลนีเชื้อราทุกชนิดที่เลี้ยงบนอาหารผสมจาก *Oudemansiella* ไอโซเลท ชช 17 และสุราษฎร์ มีการเจริญใกล้เคียงกับชุดควบคุม ในขณะที่โคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารผสมจากไอโซเลท L3P มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า (ตารางที่ 2) แสดงว่าเห็ด *Oudemansiella* ไอโซเลท L3P ระหว่างที่เจริญในอาหารเหลว PDB มีการปลดปล่อยสารประกอบบางอย่างออกมา ซึ่งสารประกอบนี้ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค มีผลทำให้เชื้อราเจริญได้ช้ากว่าที่เลี้ยงในอาหารผสมจากไอโซเลท ชช 17 และสุราษฎร์ ตรงกับรายงานของ Stadnik *et al*. (2003) ที่ว่าสารประกอบที่ได้ส่วน fruiting body ของเห็ดในสกุล *Oudemansiella* สามารถลดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Sphaerotheca fuliginea* สาเหตุโรคราแป้งแตงกวาได้ถึง 20%

ตารางที่ 1 จำนวนวันที่โคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคชุดควบคุม (control) เจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

เชื้อรา	จำนวน (วัน)
Macrophomina phaseolina	6
Colletotrichum capsici -C69 (พริก)	13
C. gloeosposiodes -C64 (พริก)	17[1/]
C. gloeosposiodes -C65 (พริก)	17
C. gloeosposiodes -R43 (พริก)	20
C. gloeosposiodes CM4 (มะม่วง)	8

[1/] โคโลนีเชื้อราหยุดเจริญในวันที่ 17

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคต่างชนิดที่เจริญบนอาหารผสม 10% ของเห็ด

Oudemansiella spp. (วัดเมื่อโคโลนีเชื้อราชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหาร)

โอโซเลทเห็ด *Oudemansiella* spp.	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา (ซม.) [1/]					
	Macrophomina phaseolina	*Colletotrichum capsici* - C69 (พริก)	*C. gloeosposiodes*			
			C64 (พริก)	C65 (พริก)	R43 (พริก)	CM4 (มะม่วง)
ชช 17	9.0 b	8.41 b	5.72 b	7.42 b	8.12 a	7.84 b
สุราษฎร์	9.0 b	8.63 b	5.48 b	7.33 b	7.89 a	9.0 c
L3P	6.41 a	5.07 a	4.56 a	5.34 a	7.74 a	5.82 a
control	9.0 b	9.0 b	6.58 [2/] c	9.0 c	9.0 b	9.00 c
F-test	**	**	**	**	**	**
CV (%)	1.71	6.1	4.83	5.44	4.25	3.65

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

[2/] โคโลนีเชื้อราหยุดเจริญในวันที่ 17

<u>วิธีที่ 2</u> วิธีหยดสารบนกระดาษกรอง ทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 7 ไอโซเลท คือ *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum capsici* (C69), *C. gloeosposiodes* (C64 C65 และ R43 จากพริก และ CM4 จากมะม่วง) และ *Macrophomina phaseolina* ผลการทดลองไม่พบการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคจากอาหารผสมของเห็ด *Oudemansiella* spp. ทุกไอโซเลทที่อายุการสุ่มเก็บต่างๆ ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาตรสารที่หยดบนประดาษกรองมีน้อยเกินไป (100 ไมโครลิตร) ทำให้ได้สารประกอบที่เห็ด *Oudemansiella* spp. ปลดปล่อยออกมาในปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการทดลองหาไอโซเลทเห็ด *Oudemansiella* spp. ที่สร้างสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เชื้อสาเหตุโรคของในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าไอโซเลท L3P สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคเมื่อเลี้ยงบนอาหารผสมที่ความเข้มข้น 10% ในขณะที่การเจริญโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารผสมจากไอโซเลท ชช17 และสุราษฎร์ยับยั้งการเจริญได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เอกสารอ้างอิง

อัจฉรา พยัพพานนท์. 2545. เห็ดสกุล *Oudemansiella* จะเป็นเห็ดพาณิชย์. วารสารเห็ดไทย 2545 :45-55.

Denisova, N.P. 2001. Traditional of using medicinal mushroom in different nations. Int. J. Med. Mushr. 3:409-415.

Reshetnikos, S.V., Wasser, S.P. and K.K. Ton. 2001. Higher basidiomycotota as a source jof antitumor and immunostimulation polysaccharides (Review). Int. J. Med. Mushr. 3:361-394

Stadnik, M.J., Bettiol, W., and M.L. Saito. 2003. Bioprospecting for plant and fungus extracts with systemic effect to control the cucumber powdery mildew. J. of Plant Disease and Protection 110 (4): 383-393.

Vahidi, H. and F. Namjoyan. 2004. Evaluation of antimicrobial activity of *Oudermansiella* sp. (Basidiomycetes). Iranian J. of Pharmaceutical Research 2:115-117.