การคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

Selection of the Potential Endophytic Fungi to inhibit *Sclerotium rolfsii*

ชนินทร ดวงสอาด[1/] สุทธินี ลิขิตตระกูลรุ่ง[2/]

พรพิมล อธิปัญญาคม[1/] สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[1/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิชาการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากพืชสมุนไพรได้แก่ ขิงป่า น้ำนมราชสีห์ และสาบเสือ โดยนำส่วนของใบ ลำต้นและราก มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization ได้เชื้อราจำนวน 75 ไอโซเลท และสามารถจัดกลุ่มเป็น 5 taxa คือ *Neosartorya* spp., *Fusarium* spp., *Nigrospora* sp., *Eupenicillium* spp. และ Mycelia Sterilia ทำการวัดอัตราการเจริญของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ และเก็บรักษาเชื้อราเอ็นโดไฟท์

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-02-02-54

คำนำ

Sclerotium rolfsii เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน (soilborne) เป็นสาเหตุโรคเน่าระดับดิน (damping off) ของกล้าพืช และโรครากเน่าและโคนเน่าของพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ โรคลำต้นเน่าของถั่วลิสง โคนเน่าของมะเขือเทศ โคนเน่าของพริก เน่าคอดินของฝ้าย เน่าระดับดินของถั่วฝักยาว เน่าแห้งของกล้วยไม้ รากเน่าของเยอบีร่า ลำต้นเน่าของทานตะวัน หัวและรากเน่าของหอม กระเทียม และต้นแห้งของข้าวบาร์เลย์ (สุณีรัตน์, 2551)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาอย่างมากในการนำเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์ มาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งสามารถเพิ่มความแข็งแรง ความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืชได้ดี โดยจุลินทรีย์ควบคุมโรคสามารถใช้แทนการใช้สารเคมีในกรณีที่ไม่สามารถใช้สารเคมีหรือมีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อีกทั้งจุลินทรีย์สามารถเพิ่มปริมาณและคงทนอยู่ในดินในระยะเวลาที่ยาวนานกว่าสารเคมี

Chanway (1998) กล่าวถึงเชื้อราเอ็นโดไฟท์ว่า คือเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในพืชโดยไม่ทำให้พืชเกิดโรคและมีความสัมพันธ์แบบ mutualistic sysmbiosis เชื้อราเอ็นโดไฟท์บางชนิดสร้างสารประกอบบางอย่างหรือปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ระหว่างเชื้อรากับพืชอาศัย บางสายพันธุ์กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ในทางกลับกันเชื้อราเอ็นโดไฟท์ได้รับประโยชน์จากพืชโดยอาศัยสารต่างๆจากพืช และดำรงชีวิตอยู่ภายในต้นพืช นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อราเอ็นโดไฟท์ บางสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ และสามารถใช้เป็น biological control agents โดยเป็นปฏิปักษ์ต่อ microbial pathogens หรือกระตุ้นให้เกิดความต้านทานแบบ systemic ได้

Gasoni *et al.* (1993) ศึกษาและแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ (nonpathogenic sterile fungus) จาก alfalfa และ alfalfa soil เพื่อใช้ในการควบคุมโรค damping off ของต้น flax ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* พบว่าสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุของโรคได้ดี เมื่อทำการปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ก่อนการปลูก เพื่อให้พืชพัฒนา defense mechanism

จิตรา และคณะ (2550) ศึกษาและทำการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากพืชสมุนไพร 13 วงศ์ 15 ชนิด ได้จำนวน 210 ไอโซเลท ราที่พบมากที่สุดได้แก่ *Colletotrichum, Pestalotiopsis, Phyllosticta, Phoma* และ *Phomopsis* ตามลำดับ และนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จำนวน 7 ชนิดมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 10 ชนิด พบว่า เชื้อราเอ็นโดไฟท์ ที่เจริญช้าและไม่สร้างสปอร์จำนวน 5 ไอโซเลท และรา *Pestalotiopsis* sp. 1ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *Alternaria alternata, Bipolaris maydis, Lasiodiplodia theobromae, Phytophthora palmivora* และ *Sclerotium rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ

Rafaeli *et al.* (2009) แยกและคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากสมุนไพร comfrey (*Symphytum officinale* L.) เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* สาเหตุโรคพืช ซึ่งนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จำนวน 12 ไอโซเลทมาทำการทดสอบโดยวิธี dual cultute พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จำนวน 4 ไอโซเลท ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. sclerotiorum* ได้ 46.7 – 50.0 เปอร์เซ็นต์

Paul and Richard (2008) ให้ความเห็นว่า ในอนาคต การควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีด้วยเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์ และการใช้สารเคมีจะมีวิธีการใช้ที่ผสมผสานกัน เช่น การจำหน่ายเมล็ดพันธุ์เชิงการค้า จะมีการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์ ร่วมกับการใช้สารเคมี เพื่อกระตุ้นประสิทธิภาพระหว่างสารและให้ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคแบบหลากหลาย biological agent จะกลายเป็นส่วนหนึ่งในระบบการผลิตพืช ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตพืชและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกและทดสอบเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการควบคุม เชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างได้แก่ พลั่วมือ ถุงพลาสติก
2. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บิกเกอร์ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด มีด
5. ผ้าขาวบาง กระดาษซับนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (อาจใช้กระดาษทิชชูหรือกระดาษกรอง)
6. แผ่นพลาสติกสำหรับรองตัดส่วนต่างๆของพืช
7. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ sterio
8. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA) Potato Dextrose Agar (PDA) Rose Bengal Agar (RBA)
9. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และเอธิลแอลกอฮอล์ 75%
10. ต้นพืชสมุนไพร

วิธีการ

1.การแยกและจำแนกกลุ่มเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1. การเก็บตัวอย่างพืช (sample selection)

เก็บตัวอย่างต้นพืชสมุนไพรโดยเก็บปกติที่ไม่มีการเข้าทำลายของแมลงและไม่มีอาการของโรค จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ

2. การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวส่วนต่างๆ ของต้นสมุนไพรด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อไม่ให้เชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อที่เจริญหรือติดบริเวณผิวของส่วนต่างๆเช่น ผิวใบ ซึ่งต้องทดสอบในพืชสมุนไพรทุกชนิดที่ทำการเก็บตัวอย่าง ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแช่ชิ้นส่วนใบ กิ่ง ลำต้น และรากของต้นสมุนไพรในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆกัน มีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างต้นสมุนไพรที่ไม่เป็นโรคมาล้างน้ำให้สะอาด
2. ตัดต้นสมุนไพรแต่ละส่วนที่จะทำการแยกให้ได้ความยาวประมาณ 1 ซม.
3. นำผ้าขาวบางมาห่อชิ้นส่วนของพืชที่ตัดได้ จากนั้นนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที
4. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมด แช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆคือ 0, 1, 3 และ 5% ในเวลานานต่างๆกันคือ 1, 3 และ 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว
5. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว
6. นำชิ้นส่วนของพืชวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ RBA (Rose Bengal Agar) โดยแต่ละจานอาหารวาง 5 ตำแหน่ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง
7. ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากแต่ละชิ้นส่วนของพืช วิเคราะห์ผลของการเจริญของเชื้อราที่เวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่างๆกัน

a. การแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ (isolation)

นำตัวอย่างพืชผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวตามข้อ 1.2 ตามความเข้มข้นที่ผ่านการทดสอบ ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อของแต่ละชิ้นพืช แยกเชื้อราที่ได้ไปทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA และเก็บใน PDA slant เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป นับจำนวนชิ้นตัวอย่างที่มีเชื้อราเจริญออกมาเพื่อคำนวณหาค่า isolate prevalence หรือ colonization rate (Taylor *et al.*) ดังสูตร

Colonization rate = Total number of samples yielding ≥ 1 isolate x 100

Total number of samples in that trial

b. การตรวจสอบและจำแนกกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง วัดอัตราการเจริญเติบโต ตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะต่างๆของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ เพื่อจำแนกกลุ่มของเชื้อรา

2. สรุปผลการทดลอง

รวบรวมข้อมูลและสรุปผลการทดลอง

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มต้น – สิ้นสุด

ตุลาคม 2553 – กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ

-ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช

-โรงเรือนทดลองกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

-ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

ผลและวิจารณ์การทดลอง

เก็บตัวอย่างต้นพืชสมุนไพร ได้แก่ ขิงป่า น้ำนมราชสีห์ และสาบเสือ โดยนำส่วนของใบ ลำต้นและราก มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization ได้เชื้อราจำนวน 75 ไอโซเลท และสามารถจัดกลุ่มเป็น 5 taxa คือ *Neosartorya* spp., *Fusarium* spp., *Nigrospora* sp., *Eupenicillium* spp. และ Mycelia Sterilia ทำการวัดอัตราการเจริญของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้และเก็บรักษาเชื้อราเอ็นโดไฟท์ โดยระหว่างการศึกษาจะยังคงดำเนินการเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรเมื่อนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

แยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากพืชสมุนไพรได้แก่ ขิงป่า น้ำนมราชสีห์ และสาบเสือ โดยนำส่วนของใบ ลำต้นและราก มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization ได้เชื้อราจำนวน 75 ไอโซเลท และสามารถจัดกลุ่มเป็น 5 taxa คือ *Neosartorya* spp., *Fusarium* spp., *Nigrospora* sp., *Eupenicillium* spp. และ Mycelia Sterilia ทำการวัดอัตราการเจริญของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้และนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ต่อไป โดยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่จะนำมาทดสอบควรมี

คุณสมบัติเช่น มีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็ว หรือสามารถสร้างสารทุติยภูมิ ซึ่งอาจมีฤทธิ์ในการระงับหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เพื่อนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ มาทำการทดสอบและคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของพริกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

จิตรา เกาะแก้ว เลขา มาโนช จีรพันธ์ วรพงษ์ นิพนธ์ วิสารทานนท์ ณรงค์ สิงห์บุระอุดม อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ และ วรวรรณ ปุณณะตระกูล. 2550. ราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรและการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (1): 571-578.

สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ พรพิมล อธิปัญญาคม และอภิรัชต์ สมฤทธิ์. 2551. สำรวจ รวบรวม จำแนก และศึกษาพืชอาศัยของรา *Sclerotium spp.*สาเหตุโรคพืช. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

Chanway, C.P. 1998. Bacterial endophytes: ecology and practical implication. Sydowia 50: 149-170.

Gasoni, L., Stegman, D.G.B. and Fortugo, C. 1993. Suppression of damping-off causedby *Rhizoctonia solani* through a nonpathogenic sterile septate fungus. Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 100: 467-473.

Paul, A., Backman and Richard, A., Sikora. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control (Online). Available : URL : http://www.worldcocoafoundation.org/scientific-research/research-library/documents/Backman2008D.pdf [2009 August 26]

Rafaeli Rocha, Daniela Eleuterio da Luz, Cibele Engels, Sonia Alvim Veiga Pileggi, David de Souza Jaccoud Filho, Rodrigo Rodrigues Matiello and Marcos Pileggi. 2009. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.). Brazilian Journal of Microbiology 40: 73-78.

Taylor, J.E., Hyde, K.D. and Jones, E.B.G. 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei,* within and outside its natural geographic range. New Phytopathologist 142: 335-346.