การควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*)

Biological Control of Black Rot in Orchids Using Bioactive Compounds from Luminescent Mushroom (*Neonothopanus nambi*)

สุรีย์พร บัวอาจ[1/] อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์[1/] ทัศนาพร ทัศคร[1/] บุษราคัม อุดมศักดิ์[1/]
รุ่งนภา คงสุวรรณ์[1/] รัศมี เหล็กพรหม[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช
[2/]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

จากการเลี้ยงเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ไอโซเลต PW2 ในอาหารเหลว MEB ตั้งเก็บไว้ในห้องมืดให้แสง 2 ชั่วโมงต่อวัน ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน แล้วนำไปสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยเอทิลอะซีเตต (ethyl acetate, EtOAc) ผลได้สาร aurisin A จำนวน 2.5 กรัม ส่วนการเก็บรวบรวมเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าดำของกล้วยไม้ จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections พบว่า เชื้อราที่แยกได้จากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลแวนดา ไม่สามารถเลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และเชื้อราที่ไม่บริสุทธิ์ จึงเก็บตัวอย่างเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าดำของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลแวนดาใหม่ โดยเก็บจากแหล่งปลูกกล้วยไม้ จ. นครปฐม จำนวน 1 ไอโซเลท เนื่องจากช่วงที่ไปสำรวจตัวอย่างสภาพแวดล้อมไม่เหมาะต่อการเกิดโรค

รหัสการทดลอง 01-29-54-02-03-01-03-55

คำนำ

กล้วยไม้ (orchid) จัดเป็นไม้ดอกที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เพราะนอกจากจำหน่ายภายในประเทศแล้ว ยังมีการส่งออกต่างประเทศเป็นจำนวนมาก พันธุ์กล้วยไม้ที่เกษตรกรนิยมปลูกมีหลายสกุล เช่น กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย, ม็อคคารา, ออนซิเดียม, คัทลียา, แอสโคเซนดา, อะแรนดา และแวนดา (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544)

ปัจจุบันการปลูกกล้วยไม้มักประสบปัญหาด้านโรคพืชและแมลง ซึ่งทำให้ผลผลิตของกล้วยไม้ลดลง และไม่ได้มาตรฐาน (กรมวิชาการเกษตร, 2547) ปัญหาด้านโรคที่สำคัญของกล้วยไม้ คือ โรคเน่าดำ หรือโรคยอดเน่า หรือโรคเน่าเข้าไส้ (black rot) ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Phytophthora palmivora* (Butl.) (Uchida, 1994) ซึ่งทำความเสียหายให้กับกล้วยไม้ได้หลายสกุล เช่น แวนดา, ทีเอ็ม เอ, แวนดารอทไชเดียนา, อะแรนคริสติน, แคทลียา, มอลคารา และกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย เป็นต้น สามารถเกิดได้กับทุกส่วนของกล้วยไม้ตั้งแต่ ราก ใบ ยอด และดอก อาการของโรคที่พบ คือ จะเกิดจุดกลมฉ่ำน้ำสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม จากนั้นแผลจะลุกลามขยายทำให้ใบเน่า ถ้าอาการรุนแรงจะเข้าทำลายส่วนยอดและลำต้นทำให้เกิดอาการยอดเน่าดำ (นิยมรัฐ, 2544)

การป้องกันกำจัดโรคเน่าดำของกล้วยไม้โดยทั่วไปนั้นมักจะใช้สารเคมี เช่น fosetyl-Al และ metalaxyl ซึ่งเมื่อมีการใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานมีผลทำให้เชื้อสาเหตุโรคเกิดการดื้อต่อสารเคมี และก่อให้เกิดสารพิษตกค้างเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และทำลายสภาพแวดล้อมได้ ดังนั้นการนำวิธีการอื่นที่ปลอดภัยมาใช้ จึงเป็นแนวทางที่ควรให้ความสำคัญ ในต่างประเทศ Boehlendorf และคณะ (2004) รายงานว่าสาร aurisin A ที่แยกได้จากเห็ดในสกุล *Panus* sp. มีฤทธิ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *Pythium ultimum*, *Venturia inaequalis*, *Plasmopara viticola*, *Puccinia graminis* และ *Phytopthora infestans* ในประเทศไทย สุรีย์พร (2552) พบสาร Aurisin A ซึ่งสกัดได้จากเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* โดยสาร Aurisin A มีผลออกฤทธิ์ต่อการตายของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืช จากการศึกษาโดยทดสอบสาร Aurisin A กับสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย พบว่า ไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. กับ *Rhizobium* sp. นอกจากนี้ยังออกฤทธิ์ต่อเชื้อราชั้นต่ำสาเหตุโรคพืชในสกุล *Pythium* และ *Phytopthora* อีกด้วย ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจที่จะนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสง (*N. nambi*) มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้ ซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อนเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้กับเกษตรกร และหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ไอโซเลท PW2
2. เชื้อรา *Phytophthora palmivora*
3. กล้วยไม้ลูกผสมแวนดา
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ RNV, potato dextrose agar (PDA), carrot Agar (CA), malt extract broth (MEB)
5. อุปกรณ์ในการแยกสกัดสาร ได้แก่ เครื่องปั่น (blender), เครื่องระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดัน (rotary evaporator) เป็นต้น
6. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ เป็นต้น
7. สารเคมี อาทิเช่น สารเอทิลอะซีเตต (ethyl acetate, EtOAc), dimethylsulfoxid (DMSO)

วิธีการ

1. แหล่งที่มาของเชื้อ

1.1 เชื้อเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* ไอโซเลต PW2 ได้รับเชื้อเห็ดเรืองแสงจาก รศ.ดร. วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (รูปที่ 1) ซึ่งแยกได้จากเห็ดเรืองแสงที่พบในเขตโคกภูตากา อำเภอเวียงเก่า จังหวัดขอนแก่น โดยเลี้ยงเชื้อเห็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) จากนั้นเก็บรักษาเชื้อเห็ดที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

1.2 เชื้อรา *Phytophthora palmivora* ได้รับอนุเคราะห์เชื้อรา *P. palmivora* จากคุณอมรรัตน์ ภูไพบูลย์ และคุณทัศนาพร ทัศคร กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และได้จากการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนดา ที่แสดงอาการของโรคเน่าดำ จากแหล่งปลูกกล้วยไม้ จ. นครปฐม

1.3 การแยกเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าดำ จากแหล่งปลูกกล้วยไม้ จ. นครปฐม โดยเก็บตัวอย่างจากส่วนใบและยอดของกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมสกุลแวนดา ที่แสดงอาการโรคเน่าดำ มาแยกหาเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี tissue transplanting ลงบนอาหารจำเพาะ RNV medium (Fujisawa และMasako, 1975) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 3-5 วัน เมื่อเห็นเส้นใยเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืช จึงตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายขอบของเชื้อรามาแยกเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. เตรียมสารสกัดออกฤทธิ์จากเชื้อเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi*

เลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสง ไอโซเลท PW2 บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MEB ตั้งเก็บไว้ในห้องมืด ให้แสง 2 ชั่วโมงต่อวัน ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน กรองเส้นใยและเก็บเส้นใยที่ได้นำไปอบที่ตู้อบ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สำหรับใช้สกัดสารต่อไป

การสกัดสาร โดยนำเส้นใยแห้งมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น (blender) จากนั้นสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยเอทิลอะซีเตต (ethyl acetate, EtOAc) จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 2 วัน และกวนอย่างสม่ำเสมอ เก็บสารละลายที่ได้มากรองและระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดัน ด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตต (crude EtOAc) เก็บ crude ที่ได้ไว้ไปทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ต่อเชื้อรา *P. palmivora* ต่อไป

เตรียมสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 mg/L โดยใช้ Dimethylsulfoxid (DMSO) เป็นตัวละลายร่วมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็นสารทดสอบต่อไป

3. การพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค

นำเชื้อรา *P. palmivora* ที่รวบรวมได้เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และนำเชื้อที่ได้ไปขยายเพิ่มปริมาณเชื้อบนอาหาร CA จากนั้นเมื่อเชื้อรา *P. palmivora* อายุ 5 วัน ปลูกเชื้อสาเหตุโรคลงบนใบกล้วยไม้ลูกผสมแวนดา โดยวิธี mycerial disc โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะตรงบริเวณปลายของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญวางลงบนใบกล้วยไม้ที่ทำแผลไว้ จากนั้นนำต้นกล้วยไม้ที่ทำการปลูกเชื้อแล้ว ใส่ในถุงพลาสติกพ่นน้ำให้ความชื้น โดยระวังไม่ให้น้ำหรือถุงพลาสติกโดนแผลที่ทำการปลูกเชื้อและบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วเปิดถุงพลาสติก และนำชิ้นวุ้นออกจากแผล บันทึกลักษณะอาการอาการของโรคเน่าดำ ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรค (reisolation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ RNV โดยวิธี tissue transplanting เมื่อเห็นเส้นใยเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืช จึงตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายขอบของเชื้อรามาแยกเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และนำมาปลูกเชื้อลงบนกล้วยไม้ต้นใหม่ (reinoculation) อีกครั้งตามกฎการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) จากนั้นนำเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร PDA ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา 9 เดือน **เริ่ม** ตุลาคม 2554 **สิ้นสุด** มิถุนายน 2555

สถานที่ ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. แหล่งที่มาของเชื้อ

1.1 จากรายงานพบว่า เห็ดเรืองแสง *N. nambi* ไอโซเลต PW2 เมื่อนำมาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยใช้เส้นใยแห้ง สามารถได้สารสกัดปริมาณมากกว่าไอโซเลทอื่น คือ PW2 และ KKU ตามลำดับ (สุรีย์พร, 2554)

1.2 การเก็บรวบรวมเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าดำของกล้วยไม้ จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections พบว่า เชื้อราที่แยกได้จากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลแวนดา ไม่สามารถเลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เนื่องจากเมื่อเดือนพฤศจิกายน ปี 2554 ได้เกิดอุทกภัยน้ำท่วม เชื้อรา *P. palmivora* ในศูนย์เก็บเชื้อ culture collections ได้รับความเสียหายไปด้วย ดังนั้นจึงต้องเริ่มงานใหม่โดยการเก็บตัวอย่างเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าดำของกล้วยไม้

1.3 แยกเก็บเชื้อรา *P. palmivora* จำนวน 1 ไอโซเลท จากแหล่งปลูกกล้วยไม้ จ. นครปฐม ลักษณะเส้นใยสีขาวฟูละเอียดบนผิวหน้าอาหาร และเมื่อได้รับความชื้นมากๆ เชื้อราจะสร้าง sporangium ที่มีลักษณะกลม รี คล้ายผลมะนาว จนถึงรูปร่างเรียวยาว ฐานกลมมน มี papilla และ pedicel (รูปที่ 2)

2. เตรียมสารสกัดออกฤทธิ์จากเชื้อเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi*

จากการเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสง ในอาหารเหลว MEB และนำเส้นใยแห้งของเห็ดเรืองแสง ไอโซเลต PW2 มาสกัดด้วย EtOAc จนได้สาร aurisin A จำนวน 2.5 กรัม จากนั้นเตรียมสาร aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 mg/L โดยใช้ Dimethylsulfoxid (DMSO) เป็นตัวทำละลายร่วมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

3. การพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค

ผลการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *P. palmivora* ที่แยกได้สามารถ ลักษณะอาการของโรคเน่าดำในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลแวนดา สามารถก่อให้เกิดอาการ ดังนี้ คือ เริ่มแรกใบเป็นจุดใส ฉ่ำน้ำ แล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อน และสีน้ำตาลเข้ม อาการที่ยอดเริ่มจากปลาย หรือโคน เกิดอาการเน่าดำ ฉ่ำน้ำ (water soaked) เนื้อเยื่อบริเวณที่ถูกทำลายจะอ่อนนุ่ม เมื่อทิ้งไว้นานแผลจะแห้งดำและตาย (ดังรูป 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

คัดเลือกเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ไอโซเลต PW2 ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากได้สารสกัดปริมาณมากกว่าไอโซเลทอื่น คือ PW2 และ KKU จากการสกัดด้วย EtOAc จนได้สาร aurisin A จำนวน 2.5 กรัม ส่วนการเก็บรวบรวมเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าดำของกล้วยไม้ จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections พบว่า เชื้อราที่แยกได้จากกล้วยไม้ลูกผสมสกุลแวนดา ไม่สามารถเลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และอีกสาเหตุหนึ่งคือเชื้อราไม่บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงต้องเริ่มงานใหม่โดยการเก็บตัวอย่างเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าดำของกล้วยไม้ลูกผสมสกุลแวนดาใหม่ โดยเก็บจากแหล่งปลูกกล้วยไม้ จ. นครปฐม จำนวน 1 ไอโซเลท เนื่องจากช่วงที่ไปสำรวจตัวอย่างสภาพแวดล้อมไม่เหมาะต่อการเกิดโรค และงานวิจัยนี้มีระยะกรศึกษาเพียง 9 เดือน เนื่องจากต้องไปศึกษา ณ ต่างประเทศ จึงได้แค่ข้อมูลเบื้องต้นเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการกล้วยไม้. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 152 หน้า.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2544. ทะเบียนเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้เพื่อการส่งออกปี 2544. กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ, กรมส่งเสริมการเกษตร, กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 655 หน้า.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ, กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 90 หน้า.

สุรีย์พร บัวอาจ. 2552. การจำแนกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* และผลของสารออกฤทธิ์ต่อไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูพืช (Steinernema carpocapsae). การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12, วันที่ 12-13 กุมภาพันธ์ 2552 บัณฑิตวิทยาลัย อาคารศูนย์วิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น . ขอนแก่น.

สุรีย์พร บัวอาจ. 2554. ผลของสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi* Speg.) ต่อไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) และสิ่งที่มีชีวิตนอกเป้าหมาย วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Boehlendorf, B., S. Neff., T.C. Schuez., L.P. Molleyres, T. Winkler, M. Dobler, and Y. Huang. 2004. Isolation and characterization of compounds obtained from a fungal microorganism and preparation of some derivatives thereof. Brit. UK Patent Application.

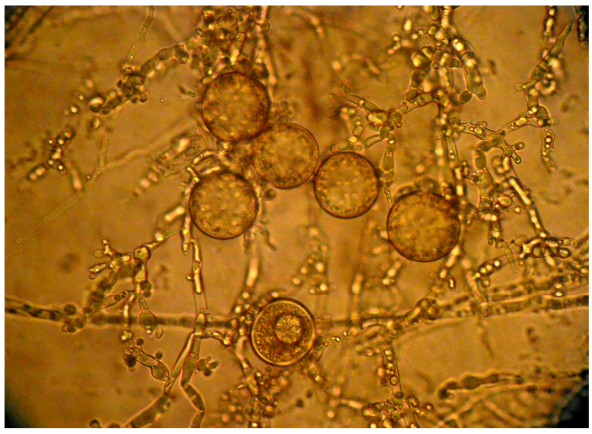
Fujisawa, T. and H. Masago. 1975. Studies on selective medium for Photophthora, Ann. Phytopath. Soc.Japan, 41: 267.

Saksirirat, W., N. Sanoamuang, K. Thomma, J. Kamkajorn, S. Komain, and S. Saepaisan. 2003. A new record of luminesecent mushroom (*Omphalotus* sp.) in Thailand and studies on its cultivation and application. Pp.251-257 in: Proceeding of Medicinal Mushroom & Biodiversity and Bioactive compound. BIOTEC, PEACH pattaya, Chon Buri, Thailand.

Uchida, J. Y. 1994. Diseases of Orchids in Hawaii. Plant Disease. 78: 220-224.

ภาคผนวก

รูปที่ 1 ลักษณะเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi*; A: สภาพกลางวัน และ B: สภาพกลางคืน ที่มา: Saksirirat และคณะ (2003)



รูปที่ 2 ลักษณะ sporangium ของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

รูปที่ 3 ลักษณะอาการของโรคเน่าดำในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลแวนดา