การยับยั้งรา *Pyricularia grisea* (Sacc.) สาเหตุโรคไหม้ข้าวด้วยราเอนโดไฟต์

Inhibition of *Pyricularia grisea* (Sacc.), Causing of Rice Blast Disease with Endophytic Fungi

พัชรี สินธุนาวา[1] และ ชุติมา แก้วกระจาย[1*]
Patcharee Sinthunawa[1] and Chutima Kaewkrajay[1*]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกราเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Pyricularia grisea* (Sacc.) สาเหตุโรคไหม้ข้าว จากการแยกราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างข้าวที่เก็บแบบสุ่มในพื้นที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยาและอ่างทอง จำนวน 89 ตัวอย่าง แยกราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 126 ไอโซเลต ในจำนวนนี้มี 3 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งรา *P. grisea* (Sacc.) สาเหตุโรคไหม้ข้าว คือ SK18-1s PM19-3s และ TR31 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 51.43±0.02 44.29±0.04 และ 51.43±0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของราโดยวิธีชีวอณูโมเลกุล บริเวณ internal transcript spacer (ITS) ราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Penicillium oxalicum* โดยมีความเหมือนกับ *P. oxalicum* (NR_121232.1[T]) 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์มีเส้นใยสีเขียวแก่ เส้นใยมีผนังกั้น สร้างสปอร์ลักษณะกลมจำนวนมาก จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีศักยภาพในการยับยั้งรา *P. grisea* (Sacc.) ได้ดี การวิจัยต่อยอดกับต้นข้าวในแปลงทดลองน่าจะเป็นการยืนยันศักยภาพของราเอนโดไฟท์นี้ในการควบคุมโรคไหม้ข้าว ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาการเกษตรของประเทศไทย ลดการใช้สารเคมี การผลิตแบบเกษตรอินทรีย์ อันเป็นมิตรต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ: ราเอนโดไฟต์ การควบคุมศัตรูพืชแบบชีววิธี *Pyricularia grisea* (Sacc.) โรคไหม้ข้าว การยับยั้ง

[1] สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา, 13000
[1] Division of Microbiology, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University, Phranakhon Si Ayutthaya. 13000
* E-mail: kchutima@aru.ac.th

Abstract

This research aimed to screen for endophytic fungi which high efficiency to inhibit *Pyricularia grisea* (Sacc.), causing of rice blast disease. One hundred-twenty six isolates of endophytic fungi were isolated from 89 rice samples which were randomly collected from paddy field in Phranakhon Si Ayutthaya and Ang-thong provinces. Three isolates showed dominantly against *P. grisea* (Sacc.) namely strain SK18-1s, PM19-3s and TR31. The percentage of inhibition showed 51.43±0.02, 44.29±0.04 and 51.43±0.00, respectively. The molecular identification of these fungi were performed at the internal transcript spacer (ITS) region. The results implied that all of them were identified as *Penicillium oxalicum* which similarity to type strain *P. oxalicum* (NR_121232.1^{T}) 100%. The morphology of three strains showed dark green colonies, septate hyphae and numerous globose spores. These results implied that the three endophytic fungi strains showed high efficiency to inhibit *P. grisea* (Sacc.). Endophytic fungi against *P. grisea* (Sacc.) on rice plants should be studied to confirm the ability of these fungi to control rice blast disease. This research is more beneficial to develop Thai agriculture such as reduce the use of synthetic chemical substances, organic agriculture promoting, and show friendly to consumers and environments.

Keywords: endophytic fungi, biological control, *Pyricularia grisea* (Sacc.), rice blast disease, inhibition

บทนำ

โรคไหม้ข้าว (rice blast disease) มีเชื้อสาเหตุมาจากรา *Pyricularia grisea* (Sacc.) เป็นโรคที่มีความสำคัญทำให้ผลผลิตของข้าวเสียหาย สามารถทำลายพืชตระกูลหญ้าได้หลายชนิด ได้แก่ ข้าว (*Oryza sativa* L.) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) (Asuyama, 1965; Kato *et al.*, 1977; พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) โดยทำลายผลผลิตข้าวมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ (Hubert *et al.*, 2015) สามารถเข้าทำลายข้าวในทุกส่วนของข้าวที่อยู่เหนือดินตั้งแต่ระยะต้นกล้าถึงระยะออกรวงโดยทำลายที่ใบและรวง มากที่สุด เมื่อเชื้อเข้าทำลายเริ่มแรกจะเป็นจุดสีเทาหรือขาว บริเวณรอบขอบจุดจะมีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลแดง แผลจะขยายขนาดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมีลักษณะเป็นรูปวงรีแล้วขยายขนาดใหญ่ออกไปเป็นรูปตา เมื่อเชื้อเข้าทำลายมากจะทำให้ใบไหม้คล้ายถูกน้ำร้อนลวก ต่อมาใบจะแห้งตายอย่างรวดเร็ว ภายหลังจากที่เชื้อเข้าทำลายและมีอาการใบจุดช้ำน้ำจะพบข้าวแห้งตายภายใน 3 – 5 วัน ซึ่งเรียกอาการนี้ว่า โรคใบไหม้ และเมื่อเชื้อเข้าทำลายข้าวในระยะออกรวงเชื้อจะเข้าทำลายที่คอรวงทำให้คอรวงแห้งตายเมล็ดข้าวจะลีบ เรียกว่า โรคไหม้คอรวง ส่วนใหญ่ราชนิดนี้จะเข้าไปก่อโรคที่ใบแต่ก็มีบ้างที่ไปเกิดที่เมล็ดข้าว พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อนี้ที่ความชื้นสูงกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 26-28 องศาเซลเซียส สามารถทำให้ผลผลิตข้าวสูญเสียไปถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Rodriguez *et al.*, 2007) อีกทั้งเชื้อราชนิดนี้มีความแปรปรวนของเชื้อมากกว่าเชื้อราชนิดอื่น มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วอายุ (Ou, 1980) จึงเกิดการกลายพันธุ์ดื้อต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนโนมิล (benomyl) ทำให้ต้องใช้สารกำจัดเชื้อราในปริมาณที่เพิ่มขึ้น

ราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) หมายถึง ราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้พืชแสดงอาการของโรค และราบางชนิดยังช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช และความเครียดจากสิ่งแวดล้อม ทำให้พืชอาศัยทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่

เหมาะสมได้ (Atugala and Deshappriya, 2015) บางชนิดอาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบภาวะพึ่งพา (symbiosis) โดยราจะอาศัยน้ำเมือกจากต้นไม้แล้วสร้างตะขอทะลุเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช สร้างไฮฟาเข้าไปในเนื่อเยื่อชั้นผิว และอยู่ภายในนั้นโดยไม่เพิ่มจำนวนจนกว่าใบจะแก่ ตลอดช่วงอายุของเนื้อเยื่อโฮสท์จะมีราเอนโดไฟท์อยู่ภายในรอบ ๆ เนื้อเยื่อ โดยมีโครงสร้างที่ประสานสอดคล้องกัน จากนั้นจะสร้างสปอร์เมื่อใบหลุดออกมา มีรายงานพบว่าราเอนโดไฟท์อยู่ภายในเมล็ดพืชช่วยทำให้เมล็ดพืชปราศจากโรค (มนสวรรค์, 2553)

ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจศึกษาราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชจำนวนมาก เช่น ประเทศอินโดนีเซีย ศึกษาความสามารถของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากข้าวมายับยั้งเชื้อ *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ข้าวโดยพบเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *Phialemonium curvatum* และ *Phaeosphaeriopsis musae* ซึ่งมีความสามารถยับยั้งเชื้อราได้ 66 และ 63.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Suada *et al.*, 2012) ในประเทศไทยมีการค้นพบราเอนโดไฟท์จากโสน *Talaromyces trachyspermus Phomopsis* sp. และ *Chaetomium globosum* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช 10 ชนิด ได้แก่ *Bipolaris maydis Alternaria alternate Collectotrichum* spp. *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora palmivora Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* (ชุติมา และคณะ, 2557) และในปีเดียวกันนี้ได้มีการรายงานการแยกราเอนโดไฟท์จากใบของข้าวหอมกระดังงา และศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของราเอนโดไฟต์ต่อเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว โดยแยกราเอนโดไฟท์จากใบข้าวได้ทั้งหมด 93 ไอโซเลต พบว่ามี 2 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของรา *P. grisea* ได้แก่ NHS021 และ NHS022 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 95.4 และ 91.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเชื้อทั้งสอง ไอโซเลตจัดจำแนกภายหลังเป็น *Trichoderma* sp. (สายทอง, 2557) มีการใช้ราเอนโดไฟท์จากโสมจีน (*Panax ginseng* Meyer) ในการยับยั้งโรคที่เกิดกับโสมจีน (Park *et al.*, 2015) นอกจากนี้ยังศึกษาประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์ต่อความรุนแรงของโรคไหม้ของข้าว (*Magnaporthe oryzae*) พบเชื้อ *Daldinia eschscholtzii Trichoderma harzianum* และ *Trichoderma ghanense* ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว (กานต์ และ อนันต์, 2559) เห็นได้ว่าราเอนโดไฟท์มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืช และสามารถนำมาใช้ควบคุมราสาเหตุโรคพืชได้เป็นอย่างดี

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำแยกราเอนโดไฟท์จากข้าวแล้วนำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อรา *P. grisea* (Sacc.) สาเหตุโรคไหม้ในข้าวที่ได้ทำการแยกจากข้าวในพื้นที่ภาคกลาง โดยภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาก่อนหน้านี้ และศึกษาชนิดของราเอนโดไฟท์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. grisea* (Sacc.) ด้วยวิธีชีวอณูโมเลกุล บริเวณ internal transcript spacer (ITS)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบและต้นของข้าวนาปรัง ที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยาและอ่างทอง โดยเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม ในระยะก่อนข้าวออกรวง เดือนกันยายน จำนวน 267 ต้น จากนาข้าว 16 อำเภอในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา คือ อำเภอพระนครศรีอยุธยา อุทัย บางปะอิน บางบาล บางซ้าย ผักไห่ วังน้อย เสนา บางไทร บ้านแพรก ลาดบัวหลวง มหาราช ท่าเรือ นครหลวง ภาชี และบางปะหัน และนาข้าวจากจังหวัดอ่างทอง จำนวน 7 อำเภอ คือ อำเภอไชโย ป่าโมก เมืองอ่างทอง วิเศษชัยชาญ แสวงหา สามโก้ และโพธิ์ทอง โดยเก็บใบและลำต้นใส่ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ บันทึกข้อมูล สถานที่ที่เก็บ วันที่เก็บ จากนั้นนำมาแยกราเอนโดไฟต์ภายใน 24 ชั่วโมง ในขั้นตอนต่อไป

การแยกราเอนโดไฟต์

นำตัวอย่างใบที่รวมถึงเส้นกลางใบและต้นข้าวมาตัดให้มีขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ด้วยกรรไกรที่ปราศจากเชื้อ ตัดตัวอย่างละ 6 จุด แล้วนำไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง แล้วจึงนำไปวางบนกระดาษกรอง (Whatman no. 1) เพื่อซับน้ำให้แห้ง แล้วนำตัวอย่างไปวางบนอาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) ที่เติมสารปฏิชีวนะเพนิซิลลินที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางตัวอย่าง 6 ชิ้น ต่อหนึ่งจาน

เพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน เมื่อเส้นใยเจริญโดยรอบชิ้นตัวอย่างให้ใช้เข็มเขี่ยเชื้อตัดปลายเส้นใยแล้วนำไปวางบนอาหาร PDA ที่ปราศจากสารปฏิชีวนะ บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยเจริญแล้วตัดปลายเส้นใยวางบนอาหาร PDA ใหม่ต่อไปจนกว่าจะได้เชื้อราบริสุทธิ์ (ดัดแปลงมาจาก Strobel, 2006) เชื้อราบริสุทธิ์ที่ได้ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็งเอียง PDA และบนอาหารแข็งเอียง PDA ที่เททับด้วยพาราฟิน

การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia grisea*

นำราเอนโดไฟต์ที่แยกได้และราสาเหตุโรคไหม้ข้าว (*P. grisea* Sacc.) ไปทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ด้วยวิธี Dual Culture Technique โดยนำราเอนโดไฟท์ที่แยกได้และเชื้อรา *P. grisea* (Sacc.) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณใกล้ขอบโคโลนีที่มีการเจริญของเชื้อราสม่ำเสมอ ชุดทดสอบทำโดยย้ายราเอนโดไฟต์และเชื้อรา *P. grisea* (Sacc.) ไปวางบนอาหารแข็ง PDA ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อโดยให้เชื้อราแต่ละชนิดอยู่ห่างจากขอบจาน 1 เซนติเมตร และวางให้อยู่ตรงข้ามกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ส่วนชุดควบคุมให้ใช้วางเฉพาะราสาเหตุโรคพืช วัดการเจริญของเส้นใย *P. grisea* (Sacc.) ด้วยเวอร์เนีย และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชจากสูตร (ชุติมา และคณะ, 2557)

% การยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช

$$= \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

เมื่อ A คือ เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของราสาเหตุโรคพืช (control)

B คือ เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของราสาเหตุโรคพืชที่เจริญบน PDA ร่วมกับราเอนโดไฟท์

การระบุชนิดของราเอนโดไฟต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia grisea* (Sacc.) ด้วยวิธีชีวอณูโมเลกุล บริเวณ internal transcript spacer (ITS)

ศึกษาชนิดของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้โดยการเพาะเลี้ยงราบนอาหารแข็ง PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30-33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน นำส่วนของเส้นใยไปบดให้ละเอียด แล้วย้ายเส้นใยที่บดใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สกัดดีเอ็นเอโดยเติม homogenization buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ที่เติม β-mercaptoethanol 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม lysis buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม precipitation buffer ปริมาตร 192 ไมโครลิตร และ chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตรเท่ากับส่วนใส ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ดัดแปลงจาก สรินนา และคณะ, 2561) จากนั้นเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcript spacer (ITS1-5.8S-ITS2) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) และ ITS4 (5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) (White *et al.*,1990) ตรวจสอบ PCR product ที่ได้บน 1% agarose gel จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย TIANquick Midi Purification Kit และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดย First Base (Malaysia) นำผลลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ sequencing ทั้งสองสายไป pairwise ด้วยโปรแกรม muscle ใน MEGA software version 7.0 จากนั้นจึงนำไป blast เพื่อเทียบกับราที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank (NCBI)

ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ด้วยต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้ Neighbor Joining (NJ) method ใน MEGA software version 7.0 ระดับความเชื่อมั่นจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 replicates

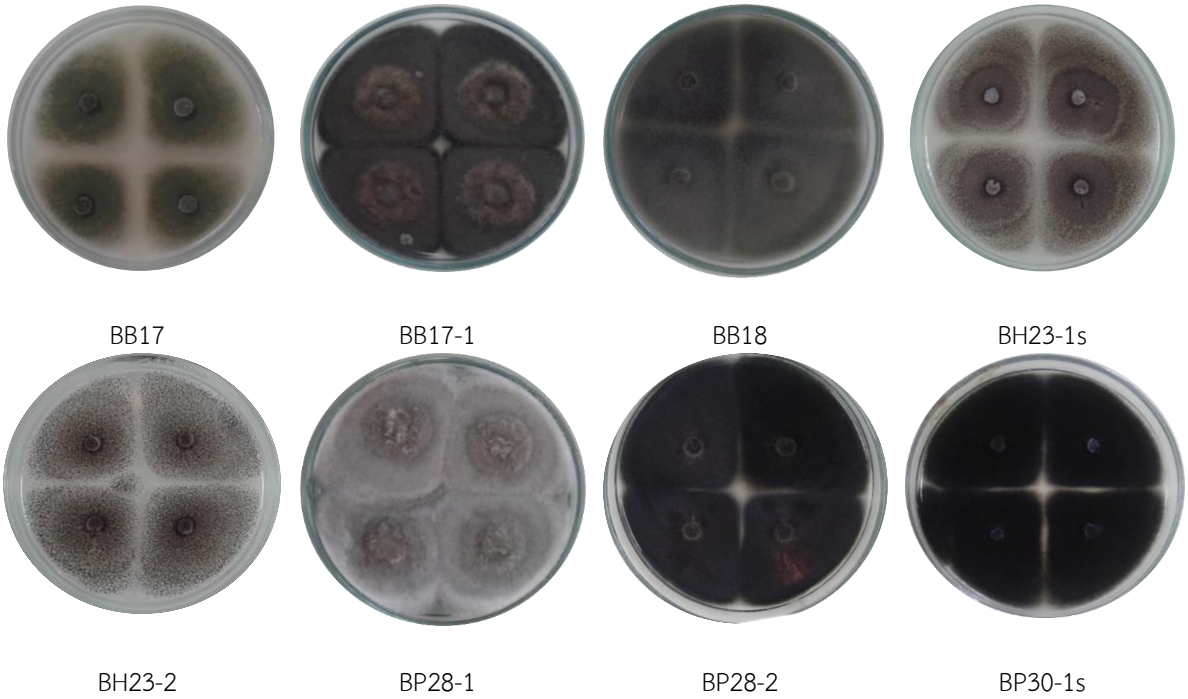
ผลการวิจัย

การแยกราเอนโดไฟต์จากข้าว

จากการแยกราเอนโดไฟต์จากตัวอย่างข้าวจำนวน 89 ตัวอย่าง (เก็บจุดละ 3 ต้นต่อ 1 ตัวอย่าง) ที่เก็บแบบสุ่มในพื้นที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยาและอ่างทอง พบว่าแยกราเอนโดไฟต์ทั้งหมด 126 ไอโซเลต จากการใช้อาหารแข็ง Potato dextrose agar (PDA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 1) โดยโคโลนีของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้มีสีแตกต่างกันไป (ภาพที่ 1) ตัวอย่างข้าว 1 ตัวอย่างสามารถแยกราเอนโดไฟต์ได้ 0-4 ชนิด

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าว

พระนครศรีอยุธยา	อ่างทอง
AY1-1, AY2-1, AY3-1, AT10-1, AT10-2, PS13-1, PS14-1s, PS15-1, BB16-1, BB16-1s, BB16-2s, BB17, BB17-1, BB18, BB18-1, BB18-1s, BB18-2, BH22-2s, BH23-1s, BH23-2, BH24-1, MR25, MR25-1s, MR27-1s, BP28-1, BP28-2, BP29-1s, BP30-1s, BP30-2, TR31, TR31-1s, TR32, TR33, LB34-1, LB34-2, LB35-1s, LB35-2, LB36-1, LB36-2, BS37, BS39-1, BS39-1s, SN40-1, SN40-2, SN42, SN42-1, PH43-1, PH43-2, PH44-1, PH44-2, PH45-2, WN46-1, WN46-2, WN47-1, WN47-1s, WN48-2, WN48-3, S-1, S-2, S-3, S-4, S-5, S-6, S-7, S-8, S-9, S-10, S-11, S-12, S-13, S-14, S-15, A0, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A11, A12, A14, A16, A19	M1, M1-1s, M2, M2-1s, CY5-2, CY5-3s, CY6, CY6-1s, CY6-2s, CY6-3s, CY6-4s, CY6-5s, PT7, PT7-1s, PT8, PT9, PT9-1s, SH10, SH10-1, SH10-1s, SH10-2s, WS13-2s, WS14-2s, WS15, SK17, SK17-1s, SK18, SK18-1s, SK18-2s, PM19, PM19-1, PM19-2, PM19-2s, PM19-4s, PM20, PM20-1s, PM20-2s, PM21, WS22-2s



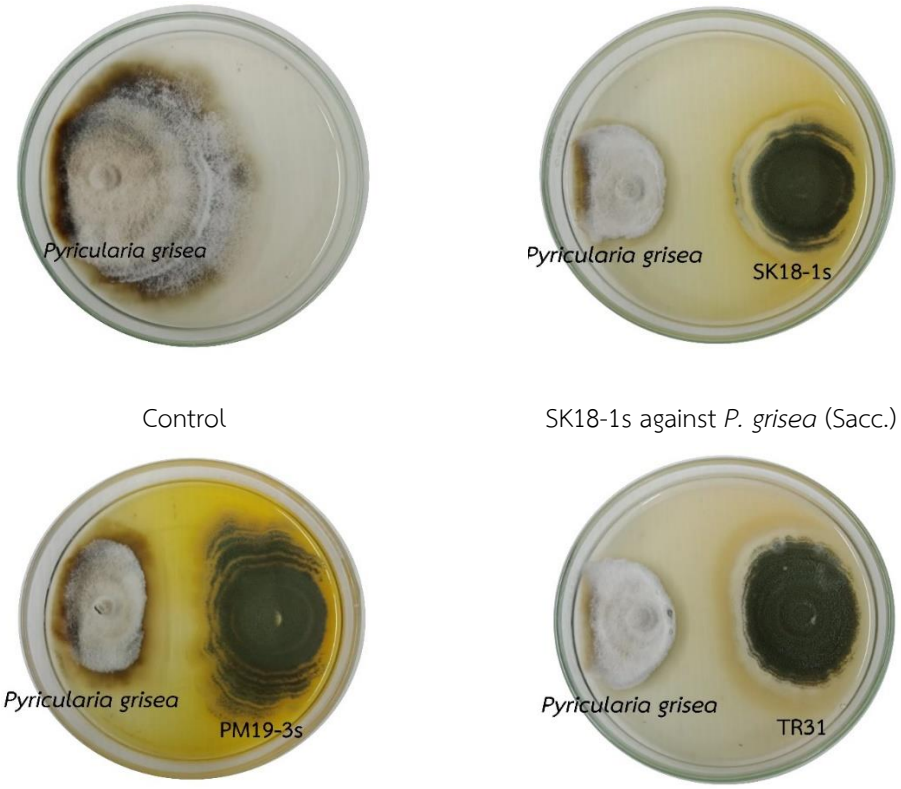
ภาพที่ 1 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าว

BS39-1 SN40-1 PH43-1 PH45-2

ภาพที่ 1 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าว(ต่อ)

การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pyricularia grisea*

เมื่อนำราเอนโดไฟต์ทั้ง 126 สายพันธุ์ มาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวที่มี *P. grisea* (Sacc.) เป็นเชื้อสาเหตุ พบราเอนโดไฟต์ 3 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคไหม้ข้าว ได้แก่ สายพันธุ์ SK18-1s PM19-3s และ TR31 (ภาพที่ 2) มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 51.43±0.02 44.29±0.04 และ 51.43±0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสายพันธุ์ SK18-1s และ TR31 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ใกล้เคียงกัน ส่วนสายพันธุ์ PM19-3s แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่น้อยกว่า 2 สายพันธุ์ข้างต้น



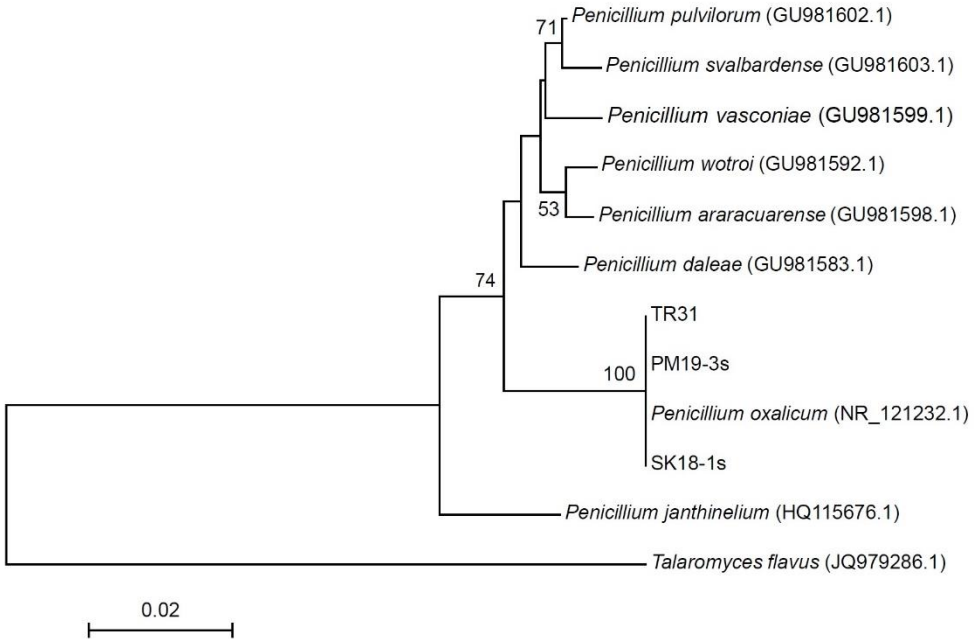
Control SK18-1s against *P. grisea* (Sacc.)

PM19-3s against *P. grisea* (Sacc.) TR31 against *P. grisea* (Sacc.)

ภาพที่ 2 การเป็นปฏิปักษ์ต่อรา *P. grisea* (Sacc.) ของราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ SK18-1s, PM19-3s และ TR31 เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

การจัดจำแนกชนิดของราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้

จากการพิจารณาลักษณะของโคโลนีของราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บนอาหารแข็ง PDA พบว่าสายพันธุ์ SK18-1s โคโลนีมีสีเขียวเข้ม ไม่ฟู เจริญช้า สร้างสปอร์จำนวนมาก สายพันธุ์ PM19-3s โคโลนีมีสีเขียวขี้ม้า เส้นใยไม่ฟู เจริญช้า สร้างสปอร์จำนวนมาก และสายพันธุ์ TR31 โคโลนีสีเขียมอมเทา เส้นใยไม่ฟู เจริญช้า สร้างสปอร์จำนวนมาก เมื่อนำราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ไปศึกษาลำดับของนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcript spacer (ITS) พบว่าราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 สายพันธุ์จัดจำแนกเป็น *Penicillium oxalicum* เหมือนกับ *P. oxalicum* (NR_121232.1) ซึ่งเป็น type strain 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ SK18-1s, PM19-3s และ TR31 สร้างด้วย Neighbor-Joining (NJ) method ในโปรแกรม MEGA software version 7.0 โดยใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1000 replicates และใช้ *Talaromyces flavus* เป็น outgroup

สรุปและวิจารณ์ผล

จากผลการทดลองแยกราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 126 ไอโซเลต จากตัวอย่างข้าวจำนวน 89 ตัวอย่าง พบว่าในจำนวนนี้มี 3 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *P. grisea* (Sacc.) สาเหตุโรคไหม้ในข้าว ได้แก่ สายพันธุ์ SK18-1s PM19-3s และ TR31 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราสาเหตุโรคไหม้ข้าวเท่ากับ 51.43 44.29 และ 51.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทำการจัดจำแนกโดยวิธีชีวอณูโมเลกุลบริเวณ ITS พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *P. oxalicum* โดยมีความเหมือนกับ type strain 100 เปอร์เซ็นต์ โดยรา *P. oxalicum* นอกจากมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืชแล้วยังมีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์กับราก่อโรคกลุ่ม soilborn diseases อย่างโรค downy mildew ที่เกิดกับมะเขือเทศอีกด้วย (Murali and Amruthesh, 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้โคนิเดียของ *P. oxalicum* ในการควบคุมโรคเหี่ยวในมะเขือเทศที่มีรา *Fusarium* เป็นเชื้อสาเหตุ (Larena *et al.*, 2003) ทำให้ราชนิดนี้น่าสนใจต่อการนำไปประยุกต์ใช้ด้านการควบคุมโรคพืชแบบชีววิธี

รา *P. grisea* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคไหม้ในข้าวอันเป็นโรคที่สำคัญในการทำลายข้าวทั่วโลก ทำให้นักวิจัยต่างให้ความสำคัญและศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชชนิดนี้ ในปี 2015 Hubert *et al.* ได้ศึกษาสารสกัดจากพืชเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของรา *P. griseae* ทั้งแบบ *in-vitro* และ *in-vivo* ผลการทดลองพบว่าสาร

สกัดจากกาแฟ (*Coffee arabica*) ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีผลการยับยั้ง *P. grisea* สูงสุดเท่ากับ 81.12 และ 89.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากการใช้สารสกัดในการควบคุมราโรคพืชแล้วการใช้ราควบคุมราสาเหตุโรคพืชก็ให้ผลดีเช่นกัน ในปี พ.ศ. 2559 ได้มีการรายงานประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคไหม้ข้าวที่มีรา *Magnaporthe oryzae* เป็นเชื้อสาเหตุ ผลการทดลองพบว่ามี 5 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *M. oryzae* สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ FL02, FL11, FL19, FR46 และ FR55 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 71 100 58 56 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงสุดจัดจำแนกเป็น *Daldinia eschscholtzii* (FL11) (กานต์ และ อนันต์, 2559) นอกจากนี้มีรายงานการแยกราเอนโดไฟต์จากโสน และพบว่ามีราเอนโดไฟต์หลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช โดยราเอนโดไฟต์ *Talaromyces trachyspermus* (1-41-1) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา *Bipolaris maydis* สาเหตุโรคใบไหม้ข้าวโพดและ *Alternaria alternate* สาเหตุโรคผลเน่าของสาลีถึง 64.8 และ 76.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ชุติมา และคณะ, 2557) สำหรับงานวิจัยนี้ก็เช่นเดียวกัน การค้นพบราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *P. grisea* จะนำไปสู่การศึกษาวิจัยเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง เป็นการพัฒนาการเกษตรของไทย เกษตรกรสามารถนำผลงานวิจัยไปใช้ได้ อีกทั้งการควบคุมโรคพืชแบบชีววิธีนี้ยังเป็นมิตรสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยตลอดทั้งโครงการ และขอขอบคุณ ผศ.ดร. ธิดา เดชฮวบ อาจารย์ประจำภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อรา *Pyricularia grisea* (Sacc.) เพื่อการทดลองในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กานต์ จิตสุวรรณรักษ์ และอนันต์ วงเจริญ. 2559. ผลของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการควบคุมโรคไหม้ของข้าว (*Oryza sativa* L.) แก่นเกษตร. 44(ฉบับพิเศษ), 232-237.

ชุติมา แก้วกระจาย ธิดา เดชฮวบ และเลิศชาย สถิตย์-พนาวงศ์. 2557. ประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์จากโสน (*Sesbania javanica*) ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช. แก่นเกษตร. 42(3), 271-282.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, พยอม โคเบลลี่ อัจฉรา-พร ณ ลำปาง เนินพลับ ถนอมจิตร์ ฤทธิ์-มนตรี กุลชนา, เกศสุวรรณ ชนสิริน กลิ่น-มณี และสงวน เที่ยงดีฤทธิ์. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย. วิชาการข้าว. 1(1), 52-64.

มนสวรรค์ ภูยาดาว. 2553. การสกัดและหาโครงสร้างของสารจากเชื้อราเอนโดไฟต์ Li. สารนิพนธ์มหาบัณฑิต คณะบัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สรินนา อ่ำรุ่ง ธิดา เดชฮวบ เนตรนภิส เขียวขำ อรอุมา เพียซ้าย วันวิสา ศิริวรรณ์ และ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง. 2561. การจำแนกเชื้อรา *Pyricularia* species ที่แยกจากข้าวและหญ้าด้วยลักษณะ สัณฐานวิทยา และ Pot2 rep–PCR. วิทยาศาสตร์เกษตร. 49(1), 27-43.

สายทอง แก้วฉาย. 2557. การศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบข้าวหอมกระดังงาและคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์. มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์. 6(3), 112-120.

Asuyama, H. 1965. Morphology, taxonomy, host range,and life cycle of Pyricularia oryzae. pp. 9-22. In : The Rice Blast Disease - Proceedings of a Symposium at IRRI. Baltimore, Maryland, USA: John Hopkins Press.

Atugala, D.M., and N. Deshappriya. 2015. Effect of endophytic fungi on plant growth and blast disease incidence of two

traditional rice varieties. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka. 43(2), 173–187.

Hubert, J., R.B. Mabagala, and D.P. Mamiro. 2015. Efficacy of Selected Plant Extracts against *Pyricularia grisea*, Causal Agent of Rice Blast Disease. American Journal of Plant Sciences. 6(5), 602–611.

Kato, H., T. Yamaguchi and N. Nishihara. 1977. Seed transmission, pathogenicity and control of ragi blast fungus and susceptibility of ragi to *Pyricularia* spp.from grasses, cereals and miloga Japanese Journal of Phytopathology. 43(4), 392–401

Larena, I., P. Melgarejo, and A. De Cal. 2003. Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against Fusarium wilt of tomato. Journal of Phytopathology. 151(11–12), 600–606.

Murali, M., and K.N. Amruthesh. 2015. Plant Growth-promoting Fungus *Penicillium oxalicum* enhances plant growth and induces resistance in pearl millet against downy mildew disease. Journal of Phytopathology. 163(9), 743–754.

Ou, S.H. 1980. Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. Annual review of phytopathology. 18(1), 167–187.

Park, Y.H., J.Y. Chung, D.J. Ahn, T.R. Kwon, S.K. Lee, I. Bae, H.K. Yun, and H. Bae. 2015. Screening and characterization of endophytic fungi of *Panax ginseng* Meyer for biocontrol activity against ginseng pathogens. Biological Control. 91, 71–81.

Rodríguez, A.T., M.A. Ramírez, R.M. Cárdenas, A.N. Hernández, M.G. Velázquez, and S. Bautista. 2007. Induction of defense response of *Oryza sativa* L. against *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. by treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan. Pesticide Biochemistry and Physiology. 89(3), 206–215.

Strobel, G. 2006. *Muscodor albus* and its biological promise. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 33(7), 514-522.

Suada, I.K., D.M.W.Y. Suhartini, N.P.L. Sunariasih, I.G.P. Wirawan, K. Chun, J. Cha, and S. Ohga. 2012. Ability of endophytic fungi isolated from rice to inhibit *Pyricularia oryzae*-induced rice blast in Indonesia. Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University. 57(1), 51–53.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**.** *In*: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. (Eds.) PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press.