

1. ชื่อชุดโครงการวิจัย 96. วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

2. โครงการวิจัย 210. วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี

กิจกรรม 3. การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช

กิจกรรมย่อย 3.5 การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช

3. ชื่อการทดลอง 3.5.5 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจาก *Oudemansiella* spp. ต่อการเจริญของรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืช
Efficiency Test of *Oudemansiella* spp. Extract on the Growth of *Alternaria* spp.

รหัสการทดลอง : 03-04-54-01-03-02-07-57

4. คณะผู้ดำเนินการทดลอง

หัวหน้าคณะ นางสาวพจนา ตระกูลสุจริตน์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน นางสาวบุษราคัม อุดมศักดิ์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเต็อ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาวสุรีย์พร บัวอาจ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเห็ด *Oudemansiella* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท ต่อการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืช ผลการทดลองพบว่าไม่สามารถทดสอบเนื่องจากมีการปนเปื้อนแบคทีเรียทุกครั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เลี้ยงเพื่อขยายเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. เมื่อนำเส้นใยเห็ดไปสกัดด้วยตัวทำละลายทำให้สารที่ได้ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืช จึงจำเป็นต้องมีการแยกเชื้อใหม่และทิ้งระยะเวลาไว้เพื่อกระตุ้นให้เส้นใยเห็ดมีชีวิตก่อนเริ่มทำการทดลองอีกครั้ง

6. คำนำ

เชื้อราในกลุ่ม *Alternaria* spp. เช่น *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *A. porri* และ *A. solani* เป็นเชื้อสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคใบจุดกับพืชผัก เช่น คะน้า ผักกาดกะหล่ำ มะเขือเทศ (อรพรรณ, 2552) โรคใบจุดสีม่วงในพืชตระกูลหอมและกระเทียม (นิตยา, 2545) และไม้ดอก เช่น โรคใบจุดดำของกล้วยไม้ (นิยมรัฐ, 2544) เป็นต้น โดยพบอาการโรคเป็นแผลจุดวงกลมสีน้ำตาลซ้อนกันหลายชั้น เนื้อเยื่อรอบๆ แผลเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ขนาดของแผลมีทั้งเล็กและใหญ่ บนแผลมักจะมีเชื้อราชั้นบางๆ มองเห็นเป็นผงสีดำ สปอร์ของเชื้อสาเหตุ

สามารถปลิวไปได้ไกลๆ โดยไปตามน้ำ ลม แมลง สัตว์ เครื่องมือการเกษตร มนุษย์ และสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ได้หรืออาศัยอยู่กับวัชพืชในแปลง

สารประกอบที่ได้จากการสกัดราในกลุ่ม *Oudemansiella* เช่น สาร oudemansin X และ mucidin สกัดจากเห็ด *O. radicata* (Anke and Werle, 1991) สารประกอบที่ได้จาก *O. canarii* มีฤทธิ์ในการควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคในคนทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย (Rosa et al., 2005) สาร oudemansin จาก *O. radicata* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Penicillium notatum* และ *Alternaria porri* (Anke et al., 1990) และสารประกอบที่ได้จากการสกัดเชื้อราในกลุ่ม *Oudemansiella* บางชนิดสามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียเชื้อรา *Shpaerotheca fuliginea* สาเหตุโรคราแป้งในแตงกวาได้ถึง 71% (Stadnik et al., 2003) และการสกัดเชื้อราในกลุ่ม *Oudemansiella* ด้วยตัวทำละลายต่างๆ เช่น เอธิลแอลกอฮอล์หรือเอธิลอะซิเตตรดและนำสารสกัดไปใช้กับเชื้อรา *Aspergillus niger* สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียได้ (Vahidi and Namjoyan, 2004) ซึ่งสาร oudemansin นี้สามารถพบได้ใน fruiting body ของเห็ดสกุล *Oudemansiella* ทั้ง 2 ชนิดคือ *O. radicata* และ *O. mucida* (Anke et al., 1983)

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

(1) เห็ด *Oudemansiella* spp. 4 ไอโซเลท

(2) ตัวอย่างพืชเป็นโรคที่เกิดจากรา *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *A. porri* และ *A. solani* จากแปลงเกษตรกร

(3) อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ PDB

(4) อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ และกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงแบบ compound และ stereo

(5) อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการระเหิดแห้ง ฯลฯ และตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ อะซีโตน เมทานอล เอธิลแอลกอฮอล์ และ เอธิลอะซิเตท

(6) อุปกรณ์เครื่องแก้ว และกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

(7) อุปกรณ์บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ กล้องถ่ายภาพ และสมุดบันทึก

- วิธีกร

(1) เลี้ยงและขยายปริมาณเห็ด *Oudemansiella* spp.

เลี้ยงเห็ดในสกุล *Oudemansiella* spp. ซึ่งเก็บรักษาอยู่ขวดในน้ำกลั่นหนึ่งหลอดเชื้อ ของหน่วยเก็บรักษาศูนย์เชื้อพันธุ์เห็ด กรมวิชาการเกษตร จำนวน 4 ไอโซเลท คือ

- ไอโซเลท L3P พบที่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.พิกุลทอง จ.นราธิวาส เมื่อ พ.ศ. 2539

- ไอโซเลท ชช 17 พบที่ จ.ตาก โดยศุภนิธย์ หิรัญประดิษฐ์ และยงยุทธ สายฟ้า เมื่อ พ.ศ. 2544

- ไอโซเลท หนาว พบที่ อ.ภูเรือ จ.เลย เมื่อ พ.ศ. 2545

- ไอโซเลท สุราษฎร์ พบที่ อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี เมื่อ พ.ศ. 2552

บนอาหาร PDA เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จนเห็นเส้นใยเจริญ ใช้ cork borer เจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ใส่ลงในขวดบรรจุอาหารเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร วางขวดอาหารเหลว PDB บนเครื่องเขย่าขวดอาหารและตั้งให้เครื่องเขย่ามีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 30 และ 60 วัน จนเห็นการเจริญของกลุ่มเส้นใยเห็ดเป็นก้อนกลมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.0-5.0 มิลลิเมตร นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ อะซีโตน เมทานอล เอธิลแอลกอฮอล์ และ เอธิลอะซิเตท จนได้เป็นสารสกัดหยาบ นำมาเติมด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อละลายก่อนนำไปทดลอง

(2) เลี้ยงและขยายปริมาณเชื้อราสาเหตุโรค

เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชเป็นโรคซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria* spp. จากแปลงเกษตร จำนวน 1 ไอโซเลท แยกและเลี้ยงบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วันจนเห็นเส้นใยเจริญเพื่อรอทดสอบ

(3) ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร เจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืชเจริญอยู่บริเวณขอบโคโลนีวางบนอาหาร PDA ในจานอาหาร อีกด้านหนึ่งวางกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 อบฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร หยดด้วยสาร *Oudemansiella* spp. ไอโซเลทต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ชุดควบคุม (control) วางชั้นวุ้นที่มีเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDA และหยดน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อบนกระดาษกรอง วางจานอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในจานอาหารชุดควบคุมเจริญเต็มจาน จดบันทึกลักษณะการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืชที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเห็ด *Oudemansiella* spp. ไอโซเลทต่างๆ

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2557

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์ สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

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 (ภาพที่ 1) ลักษณะเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. ภายหลังจากอบแห้ง เส้นใยจับตัวกันเป็นแผ่นแข็งและเปลี่ยนจากสีขาว-ขาวครีม เป็นสีน้ำตาลเข้ม อุณหภูมิที่ใช้อบเปรียบเทียบ 3 ระดับอุณหภูมิ พบว่า อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับการอบเส้นใยเห็ดคือ 35 องศาเซลเซียสใช้เวลาอบประมาณ 3 วัน ในขณะที่ อุณหภูมิ 45 และ 50 องศา ใช้เวลาเร็วกว่าคือ 1-2 วัน แต่เส้นใยเห็ดที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนแข็งจนไม่สามารถนำบดเป็นผงเพื่อนำไปใช้สกัดสารประกอบต่อได้ ในขณะที่ทดลองพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารเหลว PDB ทุกครั้ง อาหารเหลว PDB จะมีลักษณะขุ่นเป็นตะกอน เส้นใยเห็ดไม่เจริญ (ภาพที่

2) และสารที่ได้จากเห็ดไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืช

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารที่ได้จากเห็ด *Oudemansiella* spp. เนื่องจากมีการปนเปื้อนแบคทีเรียทุกครั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว สารที่สกัดได้ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืช จึงจำเป็นต้องมีการแยกเชื้อใหม่และทิ้งระยะเวลาไว้เพื่อกระตุ้นให้เส้นใยมีชีวิตก่อนเริ่มทำการทดลองอีกครั้ง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง

นิตยา กั้นหลง. 2545. สมุดภาพโรคสำคัญของพืชตระกูลหอมและกระเทียมในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 32 หน้า.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 90 หน้า.

อรพรรณ วิเศษสังข์. 2552. คู่มือการเลือกใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 128 หน้า.

Anke, T., Besel, H., Mocek, U., and Steglich, W. 1983. Antibiotics from basidiomycetes XVIII. Strobilurin C and oudemansin B, two new antifungal metabolites from *Xelura* species (Agaricales). *J. Antibiotics* 36:661-666.

Anke, T. and Werle, A. 1991. Antibiotic from basidiomycetes (XXXIII). Oudemansin X, a new antifungal E- β -methoxy acrylate form *Oudemansiella radicata*. *J. Antibiotics* 43:1010-1011.

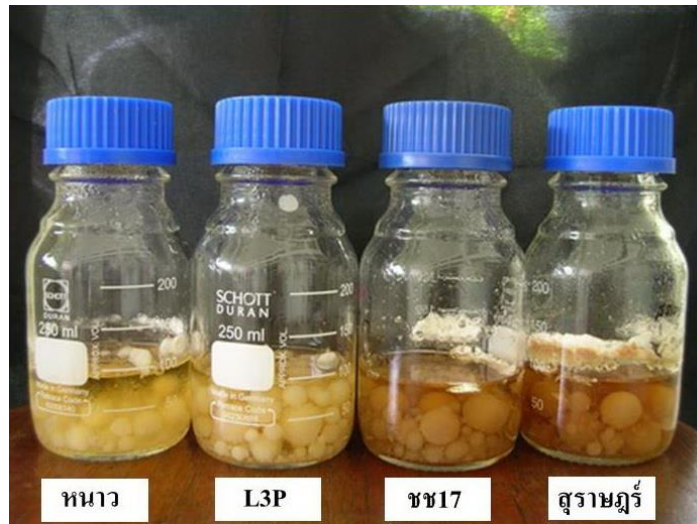
Anke T., Werle A., Bros M., and Steglich W. 1990. Antibiotics from basidiomycetes XXXIII. Oudemansin X, A new antifungal F- β -methoxyacrylate from *Oudemansiella radicata* (Relhan ex Fr.) sing. *J Antibiotics* XLIII(8):1010–1011.

Rosa, L.H., Cota, B.B., Machado, K.M.G., Rosa, C.A., and Zani, C.L. 2005. Antifungal and other biological activities form *Oudemansiella canarii* (Basidiomycota). *World J. of Microbiology & Biotechnology* 21(6-7):983-987. (Abstract) (Online). Available.

http://www.d.wanfangdata.com.cn/NSTLQK_NSTL_QK11365412.aspx (August, 27 2009).

Vahidi, H. and Namjoyan, F. 2004. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Oudemansiella* sp. (Basidiomycetes). *Iranian J. of Phamaceutical Research* 2:115-117. (Online). Available. http://www.sid.ir/en/NEWSSID/J_pdf/927200400205.pdf (August, 27 2009).

13. ภาคผนวก



ภาพที่ 1 ลักษณะเห็ด *Oudemansiella* spp. ที่เจริญอยู่ในอาหารเหลว PDB



ภาพที่ 2 การปนเปื้อนของแบคทีเรียในขวดอาหารเหลว