

การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ในเขตป่าอนุรักษ์จังหวัดจันทบุรี ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในทุเรียน

ธิตี ทองคำงาม, สุกฤตา อนุตระกูลชัย*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก จันทบุรี

*Corresponding author email: Sukritta_An@rmutto.ac.th

ได้รับบทความ: 4 มีนาคม 2567

ได้รับบทความแก้ไข: 9 พฤษภาคม 2567

ยอมรับตีพิมพ์: 14 มิถุนายน 2567

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์จากป่าอนุรักษ์จังหวัดจันทบุรี โดยเก็บตัวอย่างจากต้นกะทือ เปราะป่า จิกทะเล เล็บมือนาง เถาวัลย์แดง รางจืด และ เฟิร์นข้าหลวง สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้จำนวน 16 ชนิด คือ เชื้อรา *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Fusarium* sp. 01-02, *Curvularia* sp., *Bipolaris* sp., *Fusarium solani*, *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Nigrospora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp. 01-02 และ *Trichoderma* sp. จากนั้นแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า ใบติด และโรคราสีชมพู ด้วยวิธี Tissue transplanting method พบเชื้อราจำนวน 3 ชนิด คือ *Fusarium solani*, *Lasiodiplodia* sp. และ *Rhizoctonia solani* หลังจากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิดได้ โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท CPB 5 สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด คือ เชื้อรา *F. solani*, *Lasiodiplodia* sp. และ *R. solani* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา เท่ากับ 95.4, 96.6 และ 98.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นนำเชื้อรา CPB 5 ไปจัดจำแนกในระดับโมเลกุลสามารถยืนยันว่าเป็นเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการใช้เชื้อราเอนโดไฟต์ในเขตป่าอนุรักษ์จังหวัดจันทบุรีสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตทุเรียนในจังหวัดจันทบุรีได้

คำสำคัญ: เชื้อราเอนโดไฟต์/ เขตป่าอนุรักษ์/ เชื้อราสาเหตุโรค

Screening of Endophytic Fungi from Protected Forest Areas in the Chanthaburi Against Disease in Durians

Titi Thongkamngam, Sukritta Anutrakunchai*

Department of Plant Production and Landscape,
Faculty of Agro Industrial Technology,
Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Chanthaburi

*Corresponding author email: Sukritta_An@rmutto.ac.th

Received: 4 March 2024

Revised: 9 May 2024

Accepted: 14 June 2024

Abstract

Samples of endophytic fungi were collected from protected forest areas located in Chanthaburi province. The samples were obtained from various plant species including the *Zingiber zerumbet*, *Kaempferia marginata*, *Barringtonia asiatica*, *Combretum indicum*, *Ichnocarpus frutescens*, *Thunbergia laurifolia* and *Asplenium nidus*. Sixteen types of endophytic fungi are as follows: *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Fusarium* sp. 01-02, *Curvularia* sp., *Bipolaris* sp., *Fusarium solani*, *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Nigrospora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp. 01-02, and *Trichoderma* sp. Subsequently, pathogenic fungi causing fruit rot, leaf spot, and pink disease were identified: *Fusarium solani*, *Lasiodiplodia* sp., and *Rhizoctonia solani*. Further testing showed that all strains of the endophytic fungi were able to inhibit the growth of these three pathogenic fungi. The endophytic fungus CPB 5 showed inhibition percentages against *F. solani*, *Lasiodiplodia* sp., and *R. solani* equal to 95.4, 96.6, and 98.3 percent, respectively. Molecular analysis confirmed the classification of *Trichoderma asperellum* up to 100 percent. Conclusion, that the Endophytic fungi in the protected forest areas can be applied to durian production in Chanthaburi.

Keywords: Endophytic fungi/ Forest Conservation/ Plant Pathogenic fungi

บทนำ

ปัจจุบันการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติพิเศษในการควบคุมโรคพืช จำเป็นต้องเสาะแสวงหาจากสถานที่ ไม่เคย หรือเป็นพื้นที่เขตป่าอนุรักษ์ที่ยังคงความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศอยู่ ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กรวมตัวกันอยู่ในพื้นที่ จะอาศัยอยู่บริเวณรอบ รากพืช (Rhizosphere) หรืออยู่อาศัยภายในพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Symbiosis) โดยการอาศัยอยู่ด้วยกันนั้นจะต้องไม่เป็นอันตรายต่อพืช และไม่ทำให้พืชเกิดโรค [1] โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของเชื้อราเอนโดไฟต์ (Endophytic fungi) ที่สามารถอยู่อาศัยภายในพืชและผลิตสารที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตให้กับพืช นอกจากนั้นสารเหล่านั้นยังสามารถเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด โดยสารปฏิชีวนะ (Antibiosis) ที่เชื้อราเอนโดไฟต์สามารถสร้างสารพิษและปล่อยสารพิษ (Toxin) ออกมาสู่ภายนอกและสารดังกล่าวมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส ฯลฯ [2,3] นอกจากจะสร้างสารพิษแล้วยังมีกลไกการแข่งขัน (Competition) โดยการแย่งชิงธาตุอาหารจากเชื้อสาเหตุโรคทำให้สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าเชื้อสาเหตุโรคพืช [4] การเป็นปรสิต (Exploitation) การที่เชื้อราเข้าไปเจริญชีวิตในเชื้อราสาเหตุโรคพืชใน 2 ลักษณะ คือ เข้าไปพันรัดเส้นใย (Parasitism) ส่งผลทำให้การเจริญของเชื้อราสาเหตุเกิดความผิดปกติ และแทงทะลุเข้าไปดูดกินสารอาหารในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช การสร้างภูมิคุ้มกันในพืช (Induce resistance) การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค โดยพืชสามารถพัฒนาความต้านทานหลังการติดเชื้อ

จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นของเชื้อราเอนโดไฟต์จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะค้นหาและคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ใหม่ที่ยังคงคุณสมบัติสำคัญไว้ เพราะเนื่องจากในปัจจุบันเกษตรกรผู้ปลูกทุเรียนในภาคตะวันออกหรือแถบทั่วทุกภาคของประเทศไทยประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคพืชส่งผลทำให้เกษตรกรหันมาใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดอย่างมากในทิศทางตรงกันข้ามการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่องอาจส่งผลเสียโดยตรงต่อสภาพแวดล้อม ทำให้เกิดการสะสมของสารพิษ ข้ำร้ายไปกว่านั้นอาจจะทำให้เชื้อโรคพืชเกิดการดื้อต่อสารเคมี ซึ่งในปัจจุบันก็มีการดื้อยาของโรคพืชในทุเรียน [5] ด้วยเหตุผลนี้จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากในพื้นที่เขตป่าอนุรักษ์มาใช้ทดแทนการใช้

สารเคมีในการควบคุมโรคในทุเรียนเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค รวมถึงสภาพแวดล้อมที่ปลอดภัยไร้มลพิษทางอากาศ

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ในเขตป่าอนุรักษ์จังหวัดจันทบุรีที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในทุเรียนตลอดจนสามารถใช้เป็นแนวทางให้เกษตรกรผู้ปลูกทุเรียนทุกภาคของประเทศไทยได้

วัสดุและวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์

เก็บตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์จากป่าอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ภายในสาขาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรม การเกษตร และอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองไพบูลย์ จังหวัดจันทบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากส่วนของพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ และเปลือกไม้ ล้างทำความสะอาดโดยผ่านน้ำไหล จากนั้นล้างด้วย Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 นาที ล้างผ่านน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ นำตัวอย่างพืชที่ได้จากการล้างและซับให้แห้งมาทำการผ่าเอาส่วนของเนื้อเยื่อด้านใน ขนาด 1-3 มิลลิเมตร มาวางลงบนอาหาร selective media (SM) [6] สังเกตลักษณะเส้นใยของเชื้อที่เจริญ เมื่อพบการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อให้ย้ายลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) และเก็บรักษาเชื้อให้บริสุทธิ์ไว้ในอาหาร PDA slant

การตั้งรหัสเชื้อราเอนโดไฟต์จากป่าอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ แต่ละชนิดจะใช้อักษรย่อ SUT ส่วนเชื้อราเอนโดไฟต์จากอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองไพบูลย์ จะใช้อักษรย่อว่า CPB หลังจากตัวภาษาอังกฤษตัวสุดท้ายจะตามด้วยตัวเลขส่วนที่เก็บของพืชและจำนวนครั้งที่เก็บตัวอย่างพืช

การเก็บตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคทุเรียน

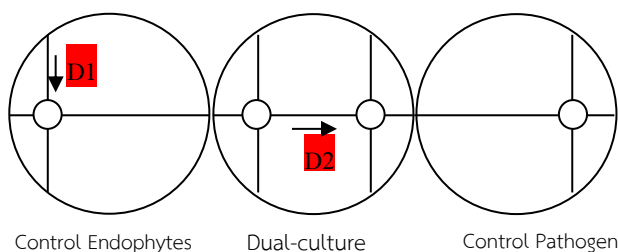
เก็บตัวอย่างโรคจากส่วนต่าง ๆ ของต้นทุเรียน เช่น ใบ เปลือกลำต้น ผล และราก ในแปลงปลูกทุเรียนจากตำบลเขาหัวพลอยแหวน อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี และ ตำบลบ่อพลอย อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด มาแยกเชื้อโดยวิธี Tissue transplanting method เริ่มจากนำชิ้นส่วนตัวอย่างอาการของโรค มาล้างทำความสะอาดบริเวณพื้นผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ และแอลกอฮอล์ จากนั้นล้างผ่านน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ ซับตัวอย่างเปลือกด้วยกระดาษทิชชู

ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำขึ้นตัวอย่างเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Water agar (WA) เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำเส้นใยที่เจริญออกมาจากขึ้นตัวอย่างย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน นำมาจัดจำแนกและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์และเก็บรักษาเพื่อรอใช้ในการทดลองต่อไป

การคัดเลือกคุณสมบัติของเชื้อเอนโดไฟต์จากเขตป่าอนุรักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

นำเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้อ 1 มาทดสอบโดยวิธี dual-culture antagonistic tests [7] โดยเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบของโคโลนีของเชื้อทั้งสอง ย้ายชิ้นส่วนของเชื้อราแต่ละชนิดจำนวน 1 ชิ้น วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในลักษณะตรงข้ามกัน ให้มีระยะห่างพอประมาณ สำหรับการเปรียบเทียบ (control) ให้เลี้ยงเชื้อทั้งสองแยกจากกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลอง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราสาเหตุโรค รวมทั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค (Growth inhibition; GI) และศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค ทั้งกลไก competition, antibiosis และ mycoparasitism (exploitation) ของเชื้อที่มีต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช รวมทั้งสังเกตความผิดปกติของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากสูตรของ [7] ดังต่อไปนี้

$$\%GI = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$



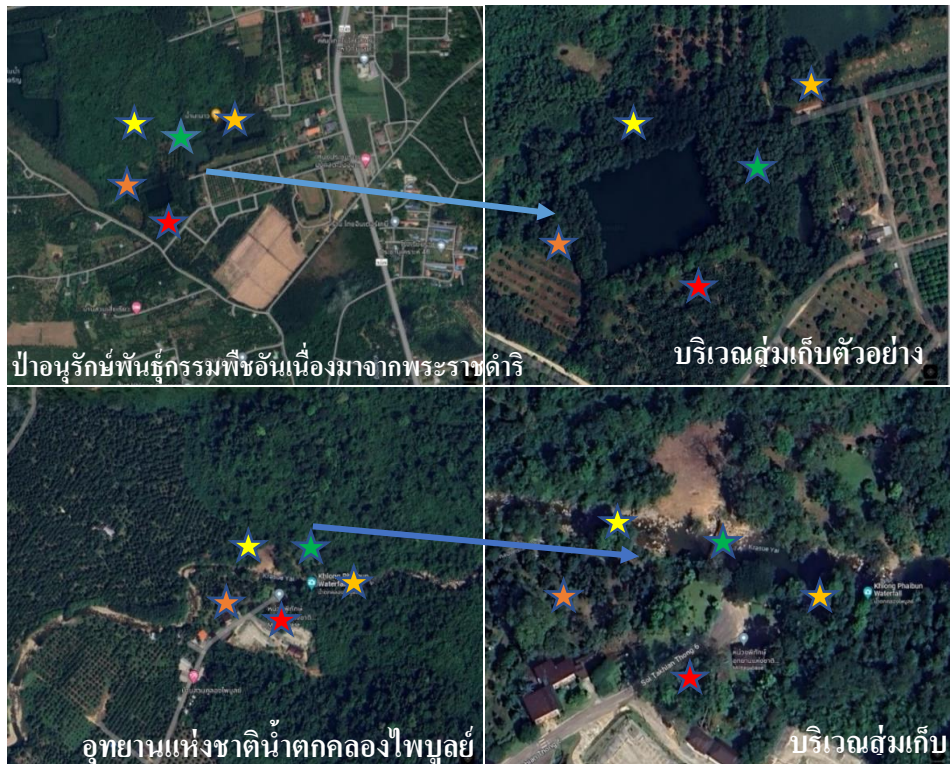
โดย D1 = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค ในงานอาหารเปรียบเทียบ (control)
D2 = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค ในงานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม (dual-culture test)

หลังจากทดสอบคุณสมบัติของเชื้อเอนโดไฟต์เสร็จแล้ว จะคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคในทุเรียนมากที่สุดมาจัดจำแนกในระดับโมเลกุล โดยคัดเลือก primer และหาอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมโดยใช้ primer ในส่วนของ rDNA (ITS5 และ ITS4) คือ primer ITS5 (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3)-ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) [8] โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม MEGA 11.0 กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000 พร้อมรายงานผลเป็น Phylogenetic tree เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อเอนโดไฟต์ชนิดใด

ผลการศึกษา

1. ผลการเก็บตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์จากเขตป่าอนุรักษ์

จากการเก็บตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์จากป่าอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ภายในสาขาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรม การเกษตร และอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองไหลบุรี จังหวัดจันทบุรี (ภาพที่ 1) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากส่วนของพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ และเปลือกไม้ จากตัวอย่างพืชที่เก็บ ได้แก่ กะทือ เปราะป่า จิกทะเล เล็บมือนาง เถาวัลย์แดง รางจืด และ เฟิร์นข้าหลวง เป็นต้น (ตารางที่ 1) หลังจากแยกเชื้อราจากตัวอย่างพืชพบว่า สามารถจัดจำแนกเชื้อราตามหลักฐานวิทยาของเชื้อโดยสังเกตจากลักษณะของเส้นใยที่เจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อและส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสามารถจัดจำแนกตามหลักวิชาการได้ลักษณะเชื้อราที่แยกได้ จำนวนทั้งหมด 16 ชนิด ประกอบด้วยเชื้อรา *Penicillium* sp. *Aspergillus* sp. *Colletotrichum* sp. *Pestalotia* sp. *Fusarium* sp.01-02 *Curvularia* sp. *Bipolaris* sp. *Fusarium solani* *Alternaria* sp. *Aspergillus niger* *Nigrospora* sp. *Rhizoctonia* sp. *Sclerotium* sp. 01-02 และ *Trichoderma* sp. (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์

ตารางที่ 1 ชนิดพืช ขึ้นส่วนตัวอย่างพืชและสถานที่เก็บ

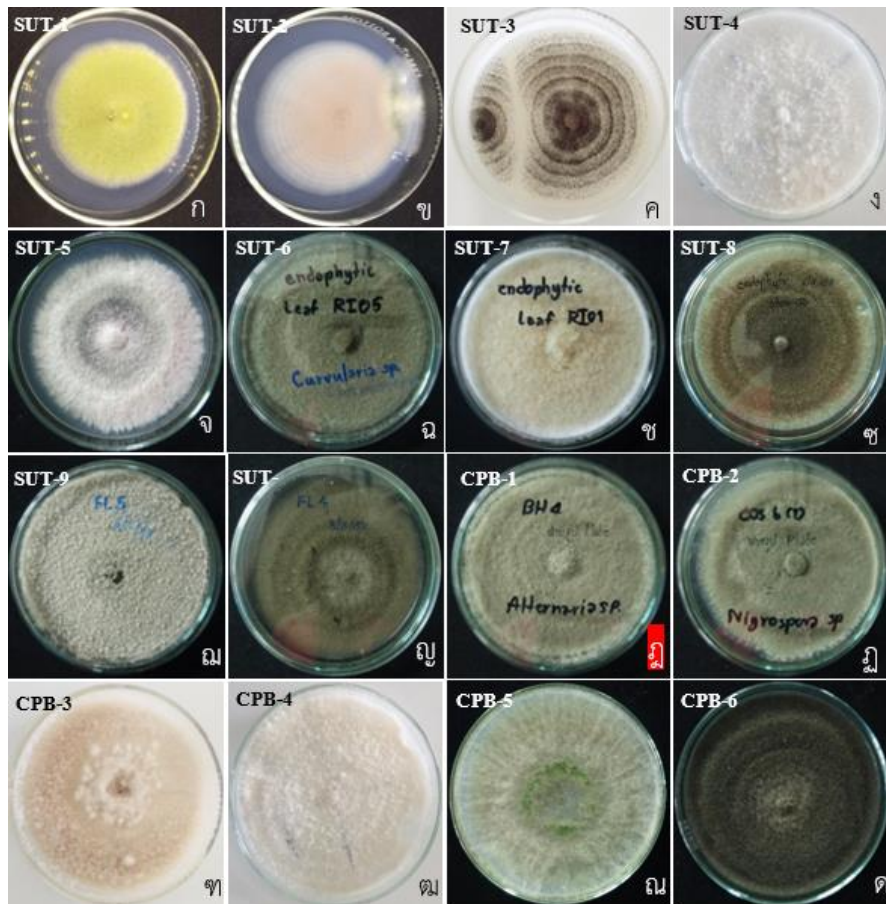
ชนิดพืช	ขึ้นส่วนตัวอย่างพืช	สถานที่เก็บ
กะทือ <i>Zingiber zerumbet</i>	ใบ เหง้า ลำต้น ราก	ป่าอนุรักษ์พันธุ์กรรม
เปราะป่า <i>Kaempferia marginata</i>	ใบ ลำต้น เปลือกไม้	พืชอันเนื่องมาจา
จิกทะเล <i>Barringtonia asiatica</i>	ใบ ลำต้น ราก เปลือกไม้	พระราชดำริ ทั้ง 5
เล็บมือนาง <i>Combretum indicum</i>	ใบ ลำต้น ราก	จุด
เถาว์ลย้แดง <i>Ichnocarpus frutescens</i>	ใบ เหง้า ลำต้น ราก	อุทยานแห่งชาติ
รางจืด <i>Thunbergia laurifolia</i>	ใบ ลำต้น ราก	น้ำตกคลองไพบูลย์
เฟิร์นข้าหลวง <i>Asplenium nidus</i>	ใบ ลำต้น	ทั้ง 5 จุด

2. ผลการเก็บตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคพืชในทุเรียน

จากการเก็บตัวอย่างลำต้นทุเรียนที่แสดงอาการโรค จากตัวอย่าง ใบ เปลือกลำต้น ผล และราก ในแปลงปลูกทุเรียนของสาขาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตรมาแยกเชื้อโดยวิธี Tissue transplanting method พบว่าจากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคของทุเรียนพบอาการของโรคผลเน่า ใบติด และโรคราสีชมพู โดยแยกได้เชื้อรา จำนวน 3 ชนิด คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. *R. solani* และเชื้อรา *F. solani* เป็นต้น โดยเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. มีลักษณะการเข้าทำลายเป็นจุดดำน้ำ และบริเวณหนามของเปลือกทุเรียนมีการลุกลามและติดเชื้ออย่างรวดเร็ว พบเส้นใยสีขาวเจริญขึ้นปกคลุมบริเวณเปลือกของผล จากนั้นเชื้อจะเข้าทำลายสู่ภายในเนื้อของผล ทุเรียน สปอร์เชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. สปอร์มีลักษณะคล้ายไข่ไก่ (Immature conidia) ในระยะนี้มีสีใสไม่มีผนังกันเซลล์ (ภาพที่ 3) ส่วนเชื้อรา *R. solani* มีลักษณะโรคคล้ายกับถูกน้ำร้อนลวกบนส่วนด้านบนของใบจะเกิดเป็นสีดำ ขอบแผลไม่แน่นอนซึ่งอาการจะเกิดที่ส่วนของกลางใบและส่วนปลายใบ หลังจากนั้นแผลจะขยายขนาดไปทั่วทั้งใบ (ภาพที่ 4) และเชื้อรา *F. solani* อาการเริ่มแรกของโรคจะแสดงที่กิ่ง ใบ และต้น สังเกตเห็นเป็นกลุ่มของเส้นใยสีขาว เหลือง และสีชมพูปกคลุมบริเวณส่วนของกิ่งและโคนต้น ส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา คือ Macroconidia และ Chlamydospore (ภาพที่ 5)

3. การคัดเลือกคุณสมบัติของเชื้อเอนโดไฟต์จากเขตป่าอนุรักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในทุเรียน

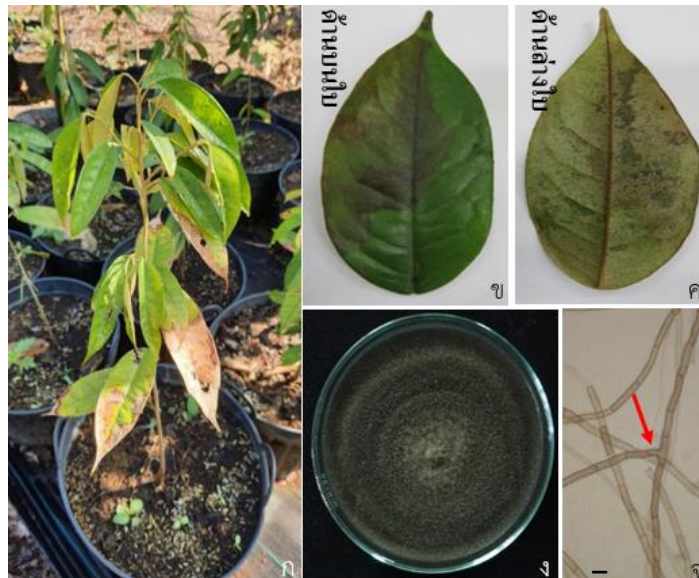
จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยนำเชื้อราเอนโดไฟต์จากเขตป่าอนุรักษ์ที่แยกได้จากข้อ 1 และ 2 โดยมีจำนวน 16 ไอโซเลท ประกอบด้วย SUT 1-10 และ CPB 1-6 มาใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของทุเรียน 3 ชนิด คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. *R. solani* และ *F. solani* พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 เชื้อได้แตกต่างกัน โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ CPB 5 สามารถควบคุมเชื้อราทั้ง 3 เชื้อรา *F. solani*, *Lasiodiplodia* sp. และ *R. solani* ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 95.4, 96.6 และ 98.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2; ภาพที่ 6) และเมื่อจัดจำแนกในระดับโมเลกุลสามารถจัดจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ถึง 100 รองลงมาคือ SUT 8 และ SUT 10 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. และ *R. solani* อยู่ในช่วง 75.3 – 85.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในเชื้อรา *F. solani* พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ SUT 7 และ CPB 4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 49.5 และ 56.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



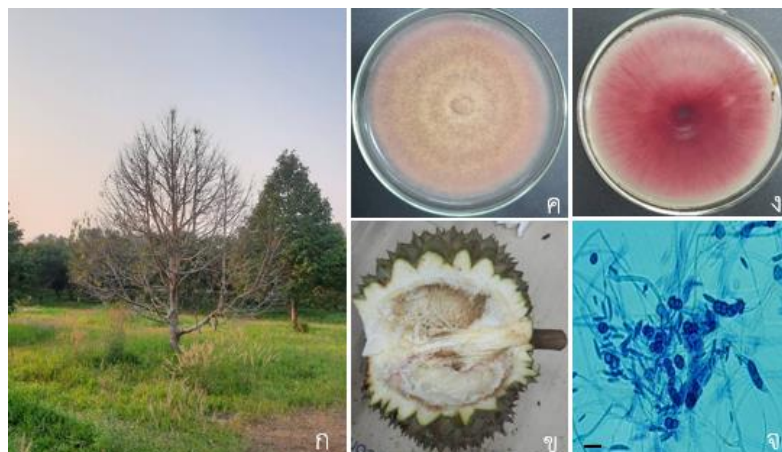
ภาพที่ 2 ลักษณะเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืช (SUT-1-10, CPB 1-6)
 (ก) เชื้อรา *Penicillium* sp. (ข) เชื้อรา *Fusarium solani* (จ) เชื้อรา *Sclerotium* sp. 01
 (ช) เชื้อรา *Fusarium* sp. (ฉ) เชื้อรา *Aspergillus niger* (ฅ) เชื้อรา *Sclerotium* sp. 02
 (ค) เชื้อรา *Aspergillus* sp. (ณ) เชื้อรา *Pestalotia* sp. (ณ) เชื้อรา *Trichoderma* sp.
 (ง) เชื้อรา Unknow 01 (ญ) เชื้อรา *Bipolaris* sp. (ด) เชื้อรา *Rhizoctonia* sp.
 (จ) เชื้อรา *Colletotrichum* sp. (ฎ) เชื้อรา *Alternaria* sp.
 (ฉ) เชื้อรา *Curvularia* sp. (ฏ) เชื้อรา *Nigrospora* sp.



ภาพที่ 3 ตัวอย่างผลทุเรียนที่นำมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของทุเรียน (ก) ลักษณะผลทุเรียนเน่าและการผ่า 2 ซีก (ข) เชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา (ค) และสปอร์เชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ลักษณะคล้ายไข่ไก่ (Immature conidia) ในระยะนี้มีสีใสไม่มีผนังกันเซลล์ (ง)



ภาพที่ 4 ตัวอย่างต้นและใบที่นำมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบติดของทุเรียน (ก) ลักษณะใบด้านบนและด้านล่างใบที่แสดงอาการโรคใบติด (ข-ค) เชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา (ง) และ เส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ตั้งฉาก 90 องศา (จ)



ภาพที่ 5 ตัวอย่างต้นและผลทุเรียนที่นำมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคราสีชมพู (ก-ข) เชื้อรา *Fusarium solani* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา (ด้านบนและด้านล่าง) (ค-ง) ส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา *Fusarium solani* ที่เรียกว่า Macroconidia และ Chlamydospore (จ)

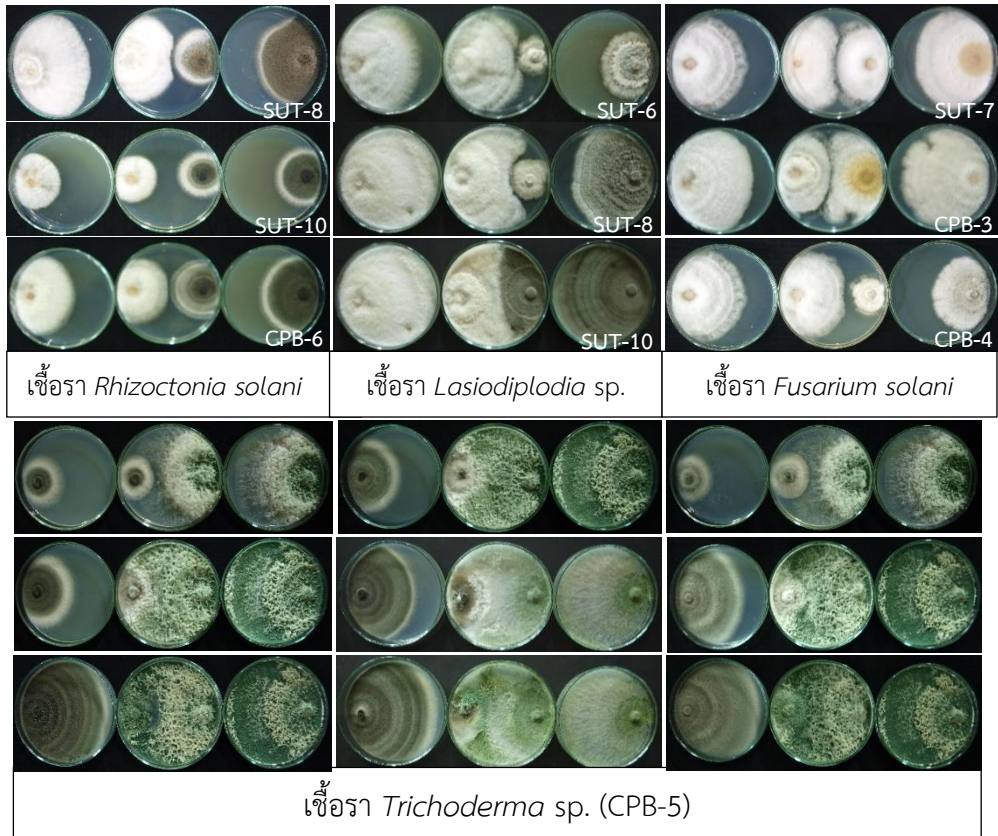
ตารางที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟต์จากเขตป่าอนุรักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทุเรียน 3 ชนิด (*Lasiodiplodia* sp., *Rhizoctonia solani* และ *Fusarium solani* โดยวิธี Dual-culture test

เชื้อราเอนโดไฟต์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรค (Growth rate inhibition) 7 วันหลังการปลูกเชื้อ					
	<i>Lasiodiplodia</i> sp.		<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Fusarium solani</i>	
	GI ^{1/} (%)	M ^{2/}	GI (%)	M	GI (%)	M
SUT-1	43.5b ^{3/}	A	13.4d	C	21.7c	C
SUT-2	39.7bc	A	24.6c	C	24.7c	A
SUT-3	52.6b	A	26.1c	C	27.8c	A
SUT-4	35.7bc	A	31.8bc	C	33.2b	A
SUT-5	37.8bc	A	33.5bc	A	34.6b	A
SUT-6	44.8b	A	46.3b	A	22.3c	A
SUT-7	58.6b	A	26.7c	A	49.5ab	C
SUT-8	75.3ab	A	85.7ab	A	34.7b	A
SUT-9	49.7b	A	35.8b	A	39.1b	A
SUT-10	85.4ab	A	75.3ab	C	30.6c	A
CPB-1	48.6b	A	38.9b	A	32.3b	A
CPB-2	52.4b	C	22.5c	C	35.6b	A
CPB-3	22.7c	A	26.4c	C	52.4ab	C
CPB-4	36.9bc	A	32.7bc	A	56.3ab	A
CPB-5 (Tricho)	96.6a	C	98.3a	C	95.4a	C
CPB-6	67.5ab	A	37.3b	A	34.5b	A
C.V. (%)	7.5	-	7.9	-	8.6	-
F-value	*	-	*	-	*	-

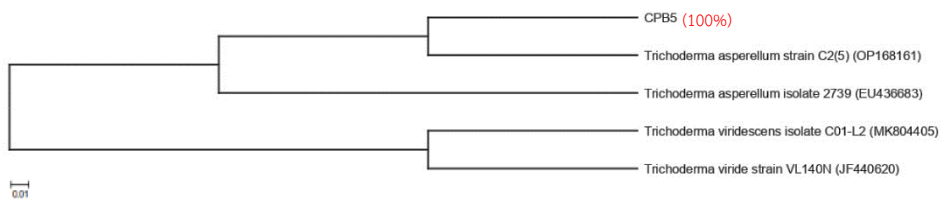
^{1/}เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (%Growth inhibition over control : % GI) = (D1-D2)/D1× 100
Where, D1: diameter of colony growth of pathogen in control, D2: diameter of colony growth of pathogen in treatment.

^{2/}กลไกของเชื้อเอนโดไฟต์ (Mechanism: M) (A: Antibiosis, C: Competition)

^{3/}Average followed by uppercase English letters in column rows have no significant statistical differences P= 0.05 by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).



ภาพที่ 6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดไฟต์จากเขตป่าอนุรักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทุเรียน 3 ชนิด (*Lasiodiplodia* sp., *Rhizoctonia solani* และ *Fusarium solani*) โดยวิธี Dual-culture test



ภาพที่ 7 การจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma asperellum* (CPB 5) โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1000

วิจารณ์

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยนำเชื้อราเอนโดไฟต์จากเขตป่าอนุรักษ์ จำนวน 16 ไอโซเลท ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของทุเรียน 3 ชนิด คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. *Rhizoctonia solani* และ *Fusarium* sp. พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 เชื้อได้ โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ CPB 5 สามารถควบคุมเชื้อราทั้ง 3 เชื้อรา *Fusarium* sp. *Lasiodiplodia* sp. และ *Rhizoctonia solani* ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rubini *et al.* [9] ทดสอบเชื้อราเอนโดไฟต์ *Gliocladium catenulatum* สามารถควบคุมโรคพุ่มไม้กวาดของต้นโกโก้ที่เกิดจากเชื้อรา *Crinipellis perniciosa* ในขณะเดียวกันจากการรายงานของ Stinson *et al.* [10] เชื้อราเอนโดไฟต์ *Gliocladium* sp. สามารถสร้างสารระเหย (Volatile compound) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินและเหี่ยวเฉียว ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium ultimum* และ *Verticillium dahliae* ได้ รวมไปถึงงานวิจัยของ Muller [11] ทดสอบเชื้อราเอนโดไฟต์ *Epichloe typhina* ในการช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นหญ้า (*Lolium perenne*) พบว่าเชื้อรา *E. Typhina* สามารถช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ดและส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกต้นกล้าสูงกว่าในกรรมวิธีที่ไม่ได้ใส่เชื้อราเอนโดไฟต์

สรุป

จากการเก็บตัวอย่างเชื้อราเอนโดไฟต์จากป่าอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ และอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองไพบูลย์ สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์ได้จำนวน 16 ชนิด คือ เชื้อรา *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Fusarium* sp. 01-02 , *Curvularia* sp., *Bipolaris* sp., *Fusarium solani*, *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Nigrospora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp. 01-02 และ *Trichoderma* sp. หลังจากทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในทุเรียน ผลการทดลองพบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ที่ทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 เชื้อได้แตกต่างกัน โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ CPB 5 มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในทุเรียนทั้ง 3 ได้ดีที่สุด คือ เชื้อรา *F. solani*, *Lasiodiplodia* sp. และ *R. solani* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ

95.4, 96.6 และ 98.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลสามารถจัดจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อรา *Trichoderma asperellum* ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยสรุปจากการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ในเขตป่าอนุรักษ์จังหวัดจันทบุรี ควรนำไปพัฒนาและต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์และส่งเสริมให้เกษตรกรได้นำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในทุเรียนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหัวหน้าเขตป่าอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ภายในสาขาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร และอุทยานแห่งชาติน้ำตกคลองไพบูลย์ จังหวัดจันทบุรี ที่ช่วยสนับสนุนสถานที่ และห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ เพื่อดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Unterseher M, Persoh D, Schnittler M. Leaf-inhabiting endophytic fungi of European beech (*Fagus sylvatica*) co-occur in leaf litter but are rare on decaying wood of the same host. *Fungal Divers.* 2013;60(1):1-13.
2. Bayman P, Lebron LL, Tremblay RL, Lodge DJ. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytol.* 1997;135(1):143-9.
3. Carroll G. Bacterial endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology.* 1988;69(1):2-9.
4. Rocha ACS, Garcia D, Uetanabaro APT, Carneiro RTO, Araujo IS, Mattos CRR, et al. Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Divers.* 2011;47(1):75-84.
5. Kongtragoul P, Ishikawa K, Ishii H. Metalaxyl resistance of *Phytophthora palmivora* causing durian diseases in Thailand. *Horticultrae.* 2021;7(10):375-89.

6. Mukhtar I, Mushtaq S, Ali A, Khokhar I. Epiphytic and endophytic phyllosphere microflora of *Cassytha filiformis* L. and its hosts. *Ekoloji*. 2010;17(68):1-8.
7. Dennis C, Webster J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*-III. Hyphal interaction. *Trans Br Mycol Soc*. 1971;57(2):363-9.
8. White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.
9. Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWV, Maki CS, Araujo WL, Santos DR, et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' broom disease. *Int J Biol Sci*. 2005;1(1):24-33.
10. Stinson M, Ezra D, Hess WM, Sears J, Strobel G. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Sci*. 2003;165(4):913-22.
11. Muller J. Artificial infection by endophytes affects growth and mycorrhizal colonization of *Lolium perenne*. *Funct Plant Biol*. 2003;30(4):419-24.