

การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งราสาเหตุโรคข้าว

Screening of endophytic fungi from rice (*Oryza sativa* L.) against rice pathogenic fungi

อนันต์ วงเจริญ^{1,2*}

Anan Wongcharoen^{1,2*}

บทคัดย่อ: การศึกษานี้ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าวในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้ 232 ไอโซเลต จัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัยลักษณะทางวิทยาได้ 57 ชนิด การศึกษาผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าว 6 ชนิด ได้แก่ *Magnaporthe grisea*, *Fusarium* sp. FSK1, *Fusarium* sp. FSK2, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata* และ *Rhizoctonia solani* ด้วยเทคนิค dual culture assay พบว่ามี 12 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด จากการศึกษานี้พบว่า ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต GR03 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วน ITS1-ITS2 ของ rDNA คล้ายคลึงกับ *Trichoderma harzianum* สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคข้าวทดสอบได้ทุกชนิดโดยมีประสิทธิภาพมากกว่า 75% ขึ้นไป นอกจากนี้ยังพบว่า ไอโซเลต GR03 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย (chitinase, protease และ cellulase) และผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (Indole-3-Acetic Acid และการละลายฟอสเฟต) ได้ จากการทดสอบการควบคุมโรคกล้าเนาด้วยวิธี blotter test พบว่า เมล็ดที่แช่สปอร์แขวนลอยไอโซเลต GR03 ลดการเกิดโรคกล้าเนาที่เกิดจากเชื้อ *B. oryzae*, *C. lunata* และ *Fusarium* sp. FSK2 ได้ 87%, 93.3% และ 47.5% ตามลำดับ จากการศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าวในสภาพเรือนทดลองพบว่า เมล็ดที่แช่สปอร์แขวนลอย GR03 สามารถเพิ่มความยาวราก ความสูงลำต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้น และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าข้าวได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต GR03 มีศักยภาพในการนำมาควบคุมโรคข้าวโดยชีววิธีต่อไป

คำสำคัญ: ข้าว, เอนโดไฟต์, ชีววิธี, ความหลากหลาย, ปฏิบัณช์

ABSTRACT: This study aimed to isolate endophytic fungi from rice plants in northeastern Thailand. A total of 230 isolates from 130 rice plants were obtained and grouped into 57 morphotypes based on morphological features. The antagonistic activities were investigated in the dual culture assay against 6 rice pathogenic fungi, namely *Magnaporthe grisea*, *Fusarium* sp. FSK1, *Fusarium* sp. FSK2, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata* and *Rhizoctonia solani*. The result showed that twelve endophytic fungi were able to inhibit the growth of at least one tested pathogen. This study found that endophytic fungi isolate GR03, which the sequence analysis of ITS1-ITS2 region of rDNA was similarity to *Trichoderma harzianum*, was effective to inhibit the growth of all the tested pathogens, by more than 75%. Furthermore, the isolate GR03 was able to produce degrading enzymes (chitinase, protease and cellulase) and plant growth promoters (IAA and phosphate solubilization). The efficacy of controlling seedling rot of rice was evaluated using blotter test. The result indicated that seed treatment with a spore suspension of GR03 reduce the incidence of seedling rot caused by *B. oryzae*, *C. lunata* and *Fusarium* sp. FSK2 with 87%, 93.3% and 47.5%, respectively. The effectiveness of endophytic fungi to enhance rice seedlings (Khao Dowk Mali 105 variety) growth under greenhouse condition were assessed. The result showed that seed treatment with GR03 increased root length, shoot height, fresh weight and dry weight of shoot, when compared with control. This study suggested that the isolate GR03 has the potential to be used as biological control agent for rice diseases.

Keyword: rice, endophyte, biological control, diversity, antagonist

¹ สาขาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น 40002

Plant Pathology Section, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

² ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002
Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University 40002

* Corresponding author: wanan@kku.ac.th

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยมีการส่งออกมากกว่าหนึ่งล้านตัน ข้าวสาร คิดเป็นมูลค่ามากกว่าหนึ่งแสนล้านบาทต่อปี อีกทั้งข้าวยังเป็นพืชอาหารหลักในหลายประเทศ นอกจากนี้ ความต้องการข้าวในตลาดโลกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากปริมาณประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวมากที่สุด แต่มีผลผลิตต่อไร่ต่ำที่สุด (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) ปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของข้าว ได้แก่ โรคข้าวสาเหตุจากเชื้อรา เช่น โรคไหม้ (*Magnaporthe grisea*) โรคกาบใบแห้ง (*Rhizoctonia solani*) โรคใบจุดสีน้ำตาล (*Bipolaris oryzae*) และโรคเมล็ดด่าง (เช่น *B. oryzae*, *Curvularia lunata* และ *Fusarium* spp.) เป็นต้น (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2550; Mew and Gonzales, 2002) นอกจากนี้ โรคเมล็ดด่างยังเป็นแหล่งเชื้อเริ่มต้นที่สำคัญสำหรับการแพร่ระบาดของโรคกล้าเน่าในแปลงเพาะกล้าอีกด้วย (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2550) ถึงแม้ว่าการใช้สารเคมีควบคุมโรคพืชเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ยังคงเป็นอันตรายต่อมนุษย์ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง (แสงโสม, 2556) รวมถึงยังมีผลกระทบต่อระบบนิเวศของนาข้าว (Kim et al., 2002) อีกทั้งการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานมีความเสี่ยงต่อการเกิดความต้านทานของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (Suzuki et al., 2010) ทำให้ต้องใช้สารเคมีในปริมาณที่เพิ่มขึ้นหรือมีความเป็นพิษสูงขึ้น ซึ่งเป็นเหตุให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น

ปัจจุบันการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการโรคพืชแบบผสมผสาน หรือการผลิตพืชอินทรีย์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งนำไปสู่การควบคุมโรคพืชอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต (Fravel, 2005) การใช้เชื้อราเอนโดไฟต์ควบคุมโรคพืชได้ให้ความสำคัญและศึกษามากขึ้น (Backman and Sikora, 2008) เนื่องจากเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชแบบพึ่งพากันโดยไม่ก่อโรคแก่พืชและ

มีประโยชน์ต่อพืชหลายด้าน ได้แก่ การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม การแข่งขันกับวัชพืช และการต้านทานแมลงศัตรูพืชและโรคพืช (Mejía et al., 2008; Rodriguez et al., 2009; Aschehoug et al., 2012)

มีการศึกษาพบว่า ข้าวเป็นแหล่งของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *M. grisea*, *R. solani*, *Fusarium moniliforme*, *Xanthomonas oryzae* (Tian et al., 2004), *Nigrospora oryzae*, *Macrophomina phaseolina*, *Phoma sorghina* และ *Alternaria alternata* (Naik et al., 2009) เป็นต้น นอกจากนี้ ชนินทร์ (2545) พบว่ามีเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าวหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. moniliforme* สาเหตุโรคยอดฝักดาบของข้าวได้ อย่างไรก็ตามการศึกษารูปร่างของเชื้อราเอนโดไฟต์ในข้าวในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือยังคงมีจำกัดอยู่ อีกทั้งความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ขึ้นอยู่กับถิ่นอาศัยและสภาพแวดล้อม (Arnold, 2007) ทำให้จำเป็นต้องทำการค้นหาเชื้อที่มีศักยภาพและเหมาะสมต่อแหล่งปลูก ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ แยกและคัดเลือกราเอนโดไฟต์จากข้าวที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวชนิดต่างๆ

วิธีการศึกษา

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าวที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

1.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าว

ทำการเก็บตัวอย่างต้นข้าวจากแปลงเกษตรกรที่ไม่ใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน 5 จังหวัด ได้แก่ กาฬสินธุ์ มหาสารคาม อุดรธานี หนองบัวลำภู หนองคาย และขอนแก่น (Table 1) โดยสุ่มเก็บต้นข้าวที่สมบูรณ์และไม่เป็นโรค ในระยะออกรวงจนถึงเก็บเกี่ยว เดือนเมษายน พ.ศ. 2555 จำนวน 10 ต้น และทำการแยกเชื้อภายใน 24 ชม.

การแยกราเอนโดไฟต์โดยนำไปข้าว (บริเวณ 3 ใบที่อยู่ด้านบนของต้นข้าว) มาตัดให้มีขนาดยาว 1 ซม./ชิ้น และให้มีแผ่นใบและเส้นกลางใบรวมอยู่ด้วย จากนั้นทำการแยกเชื้อด้วยเทคนิค tissue transplanting โดยวิธีกำจัดเชื้อที่ผิวใบตัดแปลงจาก Naik et al. (2009) ด้วยการแช่ชิ้นส่วนใบใน 70% EtOH นาน 1 นาที, 2.5% (a.i.) NaOCl นาน 3 นาที และ 70% EtOH นาน 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แล้วจึงนำชิ้นส่วนใบมาวางบนผิวหน้าอาหาร PDA ที่มีผสม tetracycline (20 µg/ml) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ โดยให้แสงสลับกับไม่ให้แสง (12/12 ชม.) นาน 7-21 วัน ย้ายเส้นใยให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ทำการแยกเชื้อ 10 ชิ้นไป/ต้น

ตรวจสอบวิธีกำจัดเชื้อที่ผิวโดย 1) นำน้ำล้างครั้งสุดท้าย 100 ไมโครลิตร มา spread บน PDA ที่ใช้แยกเชื้อ และ 2) วางชิ้นส่วนใบที่ผ่านการกำจัดเชื้อที่ผิวบน PDA ที่ใช้แยกเชื้อ เป็นเวลา 30 วินาที ตรวจสอบการเจริญของเชื้อหลังบ่มตามสภาพข้างต้น นาน 7 วัน

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

เชื้อราสาเหตุโรคข้าวที่ใช้ในการศึกษานี้แยกจากส่วนของต้นข้าวที่เป็นโรค และทดสอบการเกิดโรคแล้ว ได้แก่ *M. grisea* (MAG), *Fusarium* sp. FSK1 (FUS1), *Fusarium* sp. FSK2 (FUS2), *B. oryzae* (BIP), *C. lunata* (CUR) และ *R. solani* (RHI)

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคข้าวด้วยเทคนิค dual culture assay (Naik et al., 2009) โดยวางชิ้น PDA ที่มีปลายเส้นใยของราเอนโดไฟต์และราสาเหตุโรค ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ลงบน PDA โดยมีระยะห่างระหว่างกัน 5 ซม. กรรมวิธีควบคุมคือ ใช้ชิ้น PDA ที่ปลอดเชื้อ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 28°C นาน 7 วัน วัดรัศมีของราสาเหตุโรค (มม.) ในแต่ละกรรมวิธี และวิเคราะห์การยับยั้ง (%) จากสูตร $(Ct-T)/Ct \times 100$ เมื่อ Ct = กรรมวิธีควบคุม และ T = กรรมวิธีทดสอบ

ตรวจสอบกลไกการยับยั้งโดยดัดแปลงจาก Mejía et al. (2008) และ Campanile et al. (2007) ดังนี้ 1) การครอบครองพื้นที่ (C) โดยปลายเส้นใยของเชื้อเจริญชนกัน 2) การเป็นปรสิต (M) โดย M1 และ M2 คือ การเจริญที่ปราศสาเหตุโรคเพียงบางส่วน และอย่างสมบูรณ์ ตามลำดับ 3) การเกิดแนวยับยั้ง (I) โดยเกิดแนวใสระหว่างเส้นใยของราสองชนิด และ 4) การยับยั้งต่ำกว่า 50% (L)

1.3 การระบุเชื้อราเอนโดไฟต์

ทำการระบุชนิดของราเอนโดไฟต์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 1.2 โดยอาศัย 1) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับ Barnett and Hunter (1972) และ 2) การตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA ส่วน ITS1 และ ITS2 (Druzhinina and Kubicek, 2005) โดยเทคนิค PCR ด้วย primer ITS1 (TCCG-TAGGTGAACCTGCGG) และ ITS2 (GCTGCGT-TCTTCATCGATGC) (White et al., 1990) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ MU-OU: CRC มหาวิทยาลัยมหิดล และเปรียบเทียบความเหมือนในฐานข้อมูล GenBank (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

2. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือก

2.1 ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยเซลล์เชื้อราสาเหตุโรคและการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืช

ศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยเซลล์เชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ chitinase, protease และ cellulase ตามวิธีการของ สุวิตา (2549) โดยเลี้ยงราเอนโดไฟต์ในอาหาร PDB บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองเส้นใยออกด้วยกระดาษชกรอง Whatman® เบอร์ 1 แล้วจึงนำ culture filtrate มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใส (supernatant) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ โดยการหยอดลงในอาหารทดสอบที่ถูกเจาะขึ้นรู้อาหารด้วย cork borer ขนาด 8 มล. อาหารทดสอบได้แก่

PDA ที่ผสม 2.4% colloidal chitin, pH 6.0 (สำหรับ chitinase), 1% gelatin (สำหรับ protease) และ 4% carboxymethylcellulose sodium salt (สำหรับ cellulase) กรรมวิธีควบคุมได้แก่ ส่วนน้ำใสจากอาหารปลอดเชื้อ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 5 วัน ทำการตรวจสอบโดยวิธีที่เหมาะสมต่อเอนไซม์แต่ละชนิด และประเมินกิจกรรมโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสทั้ง 2 ด้าน (มม.) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การทดสอบการผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ Indole-3-Acetic Acid (IAA) และการละลายฟอสเฟต สำหรับการผลิต IAA ดัดแปลงวิธีการจาก Zhang et al. (2013) โดยเลี้ยงเชื้อใน PDB ที่ผสม tryptophan (0.1 g/l) เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ IAA สำหรับการศึกษการละลายฟอสเฟต ดัดแปลงวิธีการจาก Saravanakumar et al. (2013) ด้วยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NBRIP ที่ผสม 1% ของ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ หรือ FePO_4 เป็นแหล่งของฟอสเฟต หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °ซ นาน 5 วัน ตรวจสอบกิจกรรมตามวิธีที่เหมาะสม สำหรับ IAA หากสารผสมเปลี่ยนเป็นสีชมพู/สีแดง แสดงว่าผลิต IAA ได้ สำหรับการละลายฟอสเฟต ตรวจสอบกิจกรรมโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 880 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ KH_2PO_4 ($\mu\text{g/ml}$) และวิเคราะห์การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของการละลายฟอสเฟต (%) กรรมวิธีควบคุม คือ อาหารทดสอบปลอดเชื้อ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

2.2 ศึกษาความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการควบคุมโรคกล้าเน่าในสภาพห้องปฏิบัติการ
เชื้อราสาเหตุโรคที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ BIP, CUR และ FUS2 ซึ่งเป็นเชื้อสำคัญที่ติดไปกับเมล็ดข้าวและก่อโรคกล้าเน่าในระยะต้นกล้า สำหรับการเตรียมสปอร์แขวนลอยของราเอนโดไฟต์และราสาเหตุโรค โดยเลี้ยงเชื้อบน PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ นาน 7-10 วัน จากนั้นนำมาทำสปอร์แขวนลอยด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และปรับความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 และ 10^5 สปอร์/มล. สำหรับราเอนโดไฟต์และราสาเหตุโรคตามลำดับ ด้วย hemocytometer

การเตรียมเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยนำเมล็ดที่สมบูรณ์มากำจัดเชื้อที่ผิวด้วยการแช่ใน 2.5% (a.i.) NaOCl นาน 24 ชม. จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง และผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ

การทดสอบการควบคุมโรค โดยนำเมล็ดข้าวมาแช่สปอร์แขวนลอยของราสาเหตุโรคแต่ละชนิดนาน 30 นาที แล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำเมล็ดมาแช่ในสปอร์แขวนลอยของราเอนโดไฟต์ เปรียบเทียบกับการคลุกเมล็ดด้วยสารเคมี mancozeb (80% WP) อัตรา 3 ก./เมล็ด 1 กก. กรรมวิธีควบคุม คือ เมล็ดแช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และเมล็ดแช่ราสาเหตุโรค (DC) หลังจากผึ่งเมล็ดให้แห้งแล้วจึงนำมาทดสอบโดยวิธี blotter test ตามวิธีของ Mew and Gonzales (2002) ทำการทดสอบ 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด หลังจากบ่มตามสภาพข้อ 1.2 เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบจำนวนต้นที่แห้งตายและประเมินการควบคุมโรค (%) จากสูตร $(DC-T)/DC \times 100$ เมื่อ $DC =$ กรรมวิธีควบคุมการเกิดโรค และ $T =$ กรรมวิธีทดสอบ

2.3 ศึกษาความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการเจริญของกล้าข้าวในสภาพเรือนทดลอง

นำเมล็ดข้าวที่แช่สปอร์แขวนลอยเชื้อราเอนโดไฟต์ (เตรียมตามวิธีข้อ 2.2) นาน 30 นาที มาเพาะในกระบะที่บรรจุทรายฆ่าเชื้อ และใช้เมล็ดข้าวที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นกรรมวิธีควบคุม ทำการทดสอบ 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด ทำการวิเคราะห์การงอก (%) ที่ 7 และ 14 วัน วิเคราะห์ดัชนีความแข็งแรง (Raju et al., 1999) จากสูตร $(RL + SL) \times GP$ เมื่อ $RL =$ ความยาวราก (ซม.), $SL =$ ความสูงลำต้น (ซม.) และ $GP =$ การงอก (%) ที่ 14 วัน และวิเคราะห์น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากและลำต้น โดยสุ่มตัวอย่างซ้ำละ 25 ต้น

3. การวิเคราะห์สถิติ

การทดลองในข้อ 1.2, 2.2 และ 2.3 วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design วิเคราะห์ความแปรปรวน วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS v.19

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าวที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

1.1 การแยกเชื้อราเอนโดไฟต์

จากการตรวจสอบวิธีกำจัดเชื้อที่ผิว ไม่พบเชื้อเจริญบนอาหารแยกเชื้อ ดังนั้นราที่แยกได้มีแนวโน้มเป็นเอนโดไฟต์ในข้าว จากการแยกเชื้อพบว่า ต้นข้าว 130 ต้น (1,300 ขึ้นใบ) แยกเชื้อได้ 232 ไอโซเลต และจัดกลุ่มตามสัณฐานวิทยาได้ 57 ชนิด (morphotype)

โดยความหลากหลายของราเอนโดไฟต์มีความแตกต่างกันในแต่ละแหล่งปลูก ซึ่งแหล่งปลูกที่มีความหลากหลายมากที่สุด (14 ชนิด) และน้อยที่สุด (2 ชนิด) ได้แก่ อ.เมือง จ.มหาสารคาม และ อ.เมือง จ.ขอนแก่น ตามลำดับ (Table 1) ความหลากหลายของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แตกต่างกันอาจขึ้นอยู่กับสภาพอากาศเฉพาะจุดย่อย (microclimate) หรือถิ่นอาศัยเฉพาะ (microhabitat) ซึ่งมีผลต่อสังคมราเอนโดไฟต์ (ชนินทร์, 2550; Arnold, 2007) โดยปัจจัยที่มีผลต่อ microclimate ของแปลงนาเช่น ภูมิอากาศของแหล่งปลูก ความหนาแน่นของต้นข้าว และความชื้นดิน เป็นต้น

Table 1 Number of the foliar endophytic fungi from rice plants in northeastern Thailand

Location (District, Province)	Rice varieties	No. fungal endophyte
Mueang, Kalasin (MKS)	Chai Nat 1	4
Yang Talat, Kalasin (YTKS)	Chai Nat 1	6
Mueang, Maha Sarakham (MMK)	Chai Nat 1	14
Kosum Phisai, Maha Sarakham (KPMK)	Chai Nat 1	11
Kumphawapi, Udon Thani (KPUT)	Chai Nat 1	7
Non Sang, Nong Bua Lam Phu (NSN)	Pathum Thani 1	5
Mueang, Nong Khai (MNK)	Chai Nat 1	7
Mueang, Khon Kaen (MKK)	Chai Nat 1	2
Nam Phong, Khon Kaen (NPKK)	Phitsanulok 2	3
Khon Kaen University 1 (KKU1)	Chai Nat 1	11
Khon Kaen University 2 (KKU2)	Taichung Native 1 (TN1)	6
Khon Kaen University 3 (KKU3)	Khao Dowk Mali 105	8
Khon Kaen University 4 (KKU4)	Kor Kho 6	6

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าว

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟต์ 57 ไอโซเลต ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทดสอบ 6 ชนิด พบว่า มี 12 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด (Table 2) ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ MAG อยู่ในช่วง 57-100 % โดยไอโซเลตที่ยับยั้งอย่างสมบูรณ์ (100%) ได้แก่ GR01, GR03,

GR06 และ WH08 การยับยั้งเชื้อ FUS1 อยู่ในช่วง 65-89% ซึ่งไอโซเลตที่ยับยั้งสูงที่สุด ได้แก่ GR03 (89%), GR02 (86%), GR06 (86%) และ WH07 (83%) ในขณะที่การยับยั้งเชื้อ FUS2 อยู่ระหว่าง 31-97% โดยไอโซเลตที่ยับยั้งสูงที่สุดคือ WH08 (97%) ส่วนการยับยั้งเชื้อ BIP อยู่ระหว่าง 46-81% โดยไอโซเลตที่ยับยั้งสูงที่สุด ได้แก่ GR01 (81%), WH07 (80%), GR02 (77%) และ GR03 (78%) นอกจากนี้การยับยั้งเชื้อ CUR อยู่ในช่วง 50-90% โดยไอโซเลต GR01 (90%) ยับยั้งสูงที่สุด และการยับยั้งเชื้อ RHI

อยู่ระหว่าง 34-100% โดยไอโซเลตที่ยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ ได้แก่ GR01, GR03, GR06 และ Y04

จากการศึกษานี้พบว่า กลไกของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคข้าว (Table 2 และ Figure 1) ได้แก่ 1) การครอบครองพื้นที่ ซึ่งกลไกนี้ทำให้ราสาเหตุโรคมีพื้นที่ในการเข้าทำลายพืชน้อยลง 2) การเกิดแนวไสยบยับยั้ง เกิดจากการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต่อราสาเหตุโรค และ 3) การเจริญทับเส้นใยแบบบางส่วนและแบบสมบูรณ์ เกิดจากการเป็นปรสิตต่อราสาเหตุโรค โดยเชื้อปฏิปักษ์สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค (Benítez et al., 2004) สำหรับกลไกการยับยั้งที่แตกต่างกันนี้อาจเกิด

จากการต่อต้านของราสาเหตุโรค เช่น เชื้อสาเหตุโรคสามารถสร้างสารยับยั้ง (inhibitors) การทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์ได้ (Ham et al., 1997) และกลไก (mode of action) ของสารทุติยภูมิต่อการทำลายราแต่ละชนิดมีผลแตกต่างกัน (Gottlieb and Shaw, 1970) เป็นต้น จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าข้าวเป็นแหล่งของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่มีความหลากหลายมากในด้านการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าว อย่างไรก็ตามหากเชื้อราเอนโดไฟต์สามารถแสดงคุณสมบัติเหล่านี้ในเนื้อเยื่อพืชได้ อาจทำให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้

Table 2 Inhibition of rice pathogenic fungi by endophytic fungi

Fungal isolate	Growth inhibition (%) ^{1/}					
	MAG	FUS1	FUS2	BIP	CUR	RHI
GR01	100.0 a (M2)	66.0 c (I)	63.4 de (C)	80.6 a (I)	90.3 a (M1)	100.0 a (M2)
GR02	89.2 b (C)	85.8 a (C)	53.1 f (C)	77.0 a (C)	56.5 d (I)	87.8 b (C)
GR03	100.0 a (M2)	89.2 a (C)	78.4 b (C)	77.6 a (M1)	78.9 b (C)	100.0 a (M2)
GR06	100.0 a (M2)	85.6 a (C)	65.4 de (C)	65.9 b (C)	78.2 b (C)	100.0 a (M2)
GR07	56.8 f (I)	76.5 b (C)	31.1 h (L)	54.5 cde (C)	45.4 e (L)	44.8 f (L)
WH07	86.8 b (C)	83.4 a (C)	70.1 cd (C)	79.6 a (C)	75.6 b (C)	70.9 d (C)
WH08	100.0 a (M2)	74.1 b (C)	97.4 a (M1)	46.1 f (L)	63.7 c (M1)	34.5 h (L)
WH12	78.7 c (M1)	76.7 b (C)	58.2 ef (I)	57.6 cd (C)	65.4 c (I)	51.0 e (C)
WH14	79.5 c (C)	74.1 b (C)	58.5 ef (I)	53.4 de (C)	62.8 c (I)	52.9 e (C)
WH19	73.3 d (M1)	71.7 b (C)	76.3 bc (M1)	55.4 cde (C)	79.6 b (M1)	75.7 c (M1)
OR04	63.0 e (I)	64.7 c (I)	44.6 g (L)	51.9 e (I)	49.8 e (I)	41.5 g (L)
Y04	76.9 cd (I)	77.2 b (I)	64.1 de (I)	58.9 c (I)	73.9 b (C)	100.0 a (M2)
CV (%)	17.5	10.4	26.5	19.4	19.4	35.0

^{1/}Each value represents the mean of three replicates and mean within a column followed by same letter(s) are not significantly different at P<0.05 using DMRT. MAG: *Magnaporthe grisea*, FUS1: *Fusarium* sp. isolate FSK1, FUS2: *Fusarium* sp. isolate FSK2, BIP: *Bipolaris oryzae*, CUR: *Curvularia lunata*, and RHI: *Rhizoctonia solani*. Antagonistic activity, M1: Partial mycoparasite, M2: Complete mycoparasite, C: competition, I: inhibition zone and L: Loss.

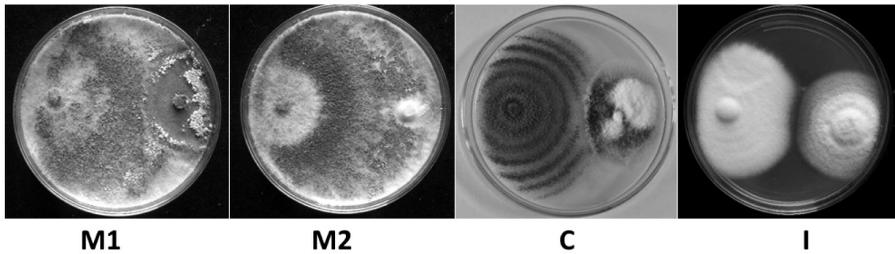


Figure 1 Antagonistic activities of rice endophytic fungi (left) against rice pathogenic fungi (right). M1: Partial mycoparasite, M2: Complete mycoparasite, C: competition and I: clear zone.

1.3 การระบุเชื้อราเอนโดไฟต์

จากการระบุเชื้อราเอนโดไฟต์ทั้ง 12 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทดสอบ โดยอาศัย สันฐานนิเวศและอนุชีววิทยาพบว่า สามารถจำแนกเชื้อในระดับสกุล (genus) ได้แก่ เชื้อรา *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Diaporthe*, *Cytospora*, *Pestalotiopsis* และ *Trichoderma* (Table 3) อย่างไรก็ตาม การระบุชนิด (species) ที่ถูกต้องควรศึกษาแบบ polyphasic taxonomy โดยอาศัย สันฐานนิเวศ สรีรวิทยา และลำดับเบสของ rDNA ส่วนต่างๆ ร่วมกัน (Druzhinina and Kubicek, 2005)

จากผลการศึกษาพบว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Tian et al. (2004) ที่แยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าวและพบว่า เชื้อสกุล *Fusarium*, *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *M. grisea*, *R. solani* และ *F. moniliforme* ได้ อีกทั้ง Naik et al. (2009) พบว่า ราเอนโดไฟต์ *Penicillium chrysogenum* จากข้าวสามารถยับยั้งเชื้อ RHI ได้ ในขณะที่ ชนินทร (2545) รายงานว่าราเอนโดไฟต์จากข้าว *Aspergillus* sp. 0035 สามารถยับยั้งเชื้อ *F. moniliforme* ได้ นอกจากนี้ Yuan et al. (2010) ได้รายงานการพบเชื้อราเอนโดไฟต์สกุล *Phomopsis* (teleomorph: *Diaporthe*), *Cytospora* และ *Pestalotiopsis* ในข้าว ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อ *Pestalotiopsis* มีความสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เช่น Tejesvi et al. (2007) แยกเชื้อราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis* spp. จากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ และพบว่า บาง species สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิดเช่น *Fusarium oxysporum* และ *F. verticilloides* เป็นต้น จากการ

ศึกษานี้ยังพบเชื้อราเอนโดไฟต์ในสกุล *Trichoderma* ทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Naik et al. (2009) ที่พบราเอนโดไฟต์ *T. viridae* ในข้าว

จากการศึกษานี้ยังพบว่า มีเชื้อราเอนโดไฟต์ที่จัดเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชสำคัญ ได้แก่ *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum*, *Cytospora* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. จากการศึกษาของ Fisher et al. (1992) รายงานว่า เชื้อ *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum* และ *Phoma sorghina* สามารถอยู่ในระยะแฝง (latent) ในเนื้อเยื่อของใบข้าวได้โดยไม่แสดงอาการโรค แต่อาจทำให้พืชอาศัยเกิดโรคได้เมื่อมีปัจจัยที่เหมาะสม นอกจากนี้ Rodriguez et al. (2008) รายงานว่า การดำรงชีพของเชื้อราเอนโดไฟต์ขึ้นอยู่กับพืชอาศัยเช่น เชื้อ *Colletotrichum magna* ไอโซเลต CmL2.5 สาเหตุโรค anthracnose ในพืชวงศ์แตงสามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของมะเขือเทศได้โดยไม่ทำให้เกิดโรค และยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตได้อีกด้วย

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคข้าวที่ใช้ในการทดสอบที่ระดับการยับยั้งตั้งแต่ 60% ขึ้นไปพบว่า ไอโซเลต GR01, GR03, GR06 และ WH07 สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทดสอบได้ทุกชนิด แต่อย่างไรก็ตาม จากการระบุเชื้อพบว่าไอโซเลต GR01 และ WH07 จัดอยู่ในสกุลที่ก่อโรคพืชได้ ดังนั้นการนำมาใช้จึงจำเป็นต้องระบุชนิดที่ถูกต้องหรือศึกษาการก่อโรคในพืชชนิดต่างๆ ก่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงคัดเลือกเชื้อไอโซเลต GR03 และ GR06 ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Trichoderma* มาทำการศึกษาคุณสมบัติในการควบคุมโรคและการส่งเสริมการเจริญ

เติบโตของข้าว เนื่องจากเชื้อ *Trichoderma* เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคในพืช และยังเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืช

ที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดอีกด้วย (อรรณกร และคณะ, 2551; Howell, 2003; Benítez et al., 2004)

Table 3 Morphological and molecular identification of rice endophytic fungi

Fungal isolate	Identification		GenBank accession no.	Similarity (%)
	Morphology	Molecular ^{1/}		
GR01	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium indicum</i>	AY742699.1	100
GR02	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus nomius</i>	KF221090.1	100
GR03	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma harzianum</i>	KC569359.1	99
GR06	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma ghanense</i>	KF294858.1	100
GR07	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp. SHW05	JQ988819.1	99
WH07	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	KJ562373.1	100
WH08	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. G39	JQ623494.1	100
WH12	Sterile mycelium	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	JX157855.1	99
WH14	Sterile mycelium	<i>Cytospora</i> sp. CR200	DQ996039.1	98
WH19	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp. L512C	KF228020.1	100
OR04	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp. 4 JJK-2011	HM469422.1	99
Y04	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus terreus</i>	KF278468.1	100

^{1/} Identification by comparison of ITS1, 5.8S and ITS2 sequence regions in GenBank using BLAST.

2. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือก

2.1 ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยเซลล์เชื้อราสาเหตุโรคและการผลิตสารส่งเสริมการเจริญของพืช

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยเซลล์เชื้อราสาเหตุโรคพืช (Table 4) พบว่า ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกทั้งไอโซเลต GR03 และ GR06 สามารถผลิตเอนไซม์ chitinase proteinase และ cellulase ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสอยู่ระหว่าง 21.0-35.0 มล., 29.7-33.7 มล. และ 19.7-33.7 มล. ตามลำดับ ซึ่งไอโซเลต GR06 ผลิตเอนไซม์เหล่านี้ได้สูงที่สุด มีรายงานว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่เป็นปรสิตรต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เหล่านี้เพื่อย่อยสลายเซลล์เชื้อราสาเหตุโรค และนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต (สุวิตา, 2549; Howell, 2003; Benítez et al., 2004)

จากการทดสอบการผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชพบว่า สำหรับการผลิต IAA พบเฉพาะในไอโซเลต GR03 สอดคล้องกับ Zhang et al. (2013) ที่รายงานว่า *T. harzianum* มีความสามารถในการผลิต IAA ได้ ซึ่งมีผลต่อการเจริญของรากและลำต้นของพืช สำหรับการละลายฟอสเฟตพบว่า ไอโซเลต GR03 สามารถละลายฟอสเฟตที่อยู่ในรูปของเหล็กและแคลเซียมได้ ในขณะที่ไอโซเลต GR06 ไม่สามารถละลายฟอสเฟตที่อยู่ในรูปของแคลเซียมได้ โดยการละลายฟอสเฟตที่อยู่ในรูปของ $FePO_4$ และ $Ca_3(PO_4)_2$ เพิ่มขึ้นสูงที่สุดเท่ากับ 5.5% และ 4.6% ในไอโซเลต GR06 และ GR03 ตามลำดับ (Table 4) สอดคล้องกับการศึกษาของ Saravanakumar et al. (2013) พบว่าเชื้อ *Trichoderma* แต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตแตกต่างกัน ซึ่งไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงมีศักยภาพในการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ และส่งผลให้พืชเจริญเติบโตดี จากผลการทดสอบใน GR03

(*T. harzianum*) สอดคล้องกับ Altomare et al. (1999) ที่รายงานไว้ว่า เชื้อ *T. harzianum* Rifai 1295-22 สามารถละลายฟอสเฟตที่อยู่ในรูปของแคลเซียมได้

ตรงข้ามกับการศึกษาของ Zhang et al. (2013) พบว่า เชื้อ *T. harzianum* ที่ใช้ในการทดสอบไม่สามารถละลายฟอสเฟตทั้งที่อยู่ในรูปของเหล็กและแคลเซียมได้

Table 4 The detection of degrading enzymes, phosphate solubilization and indole-3-acetic acid (IAA) production.

Isolate	Clear zone diameter (mm) ^{1/}			Increasing phosphate solubilization (%) ^{1/}		IAA ^{2/} production
	Chitinase	Proteinase	Cellulase	FePO ₄	Ca ₃ (PO ₄) ₂	
GR03	21.0 + 1.0	29.7 + 1.2	19.7 + 0.6	1.3 ± 1.1	4.6 ± 1.0	+
GR06	35.0 + 1.0	33.7 + 0.6	33.7 + 0.6	5.5 ± 2.1	-0.1 ± 0.4	-

^{1/} Each value represents the mean ± standard deviation.

^{2/} Indole-3-Acetic Acid; Positive reaction (+) and negative reaction (-).

2.2 ศึกษาความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการควบคุมโรคกล้าในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบการควบคุมโรคกล้าที่เกิดจากเชื้อ BIP, CUR และ FUS2 โดยวิธี blotter test ไม่พบการเกิดโรคในเมล็ดที่แช่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) สำหรับประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ BIP อยู่ระหว่าง 68.5-87.0% โดยไอโซเลต GR03 (87.0%) ลดการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้สารเคมี mancozeb อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (68.5%) (Figure 2) การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ CUR อยู่ระหว่าง 88.1-93.3% ซึ่งไอโซเลต GR03 (93.3%) ลดการเกิดโรคได้สูงกว่าสารเคมี mancozeb (88.1%) อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ในขณะที่การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ FUS2 อยู่ในช่วง 8.5-57.5% โดยการใช้สารเคมี mancozeb (57.5%) และ GR03 (47.5%) ลดการเกิดโรคได้สูงที่สุดโดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ

จากการศึกษาพบว่า ไอโซเลต GR03 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกล้าที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรคทดสอบชนิดต่างๆ ได้ดีกว่าหรือเท่าเทียมกับการใช้สารเคมี mancozeb ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ควบคุมเมล็ดพันธุ์เพื่อป้องกันการเกิดโรค สำหรับประสิทธิภาพของไอโซเลต GR03 ในการควบคุมโรค อาจเกิดจากกลไกการแข่งขันครอบครองพื้นที่ (Table 2) และความสามารถในการเจริญที่ผิวทั้งที่ส่วนราก ลำต้น และใบของข้าว (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ส่งผลให้เชื้อราสาเหตุโรคมีพื้นที่ในการเข้าทำลายต้นกล้าข้าวน้อยลง นอกจากนี้ Abdel-Fattah et al. (2007) รายงานว่า

T. harzianum สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ BIP ได้ และเมื่อนำมาฉีดพ่นลงบนต้นข้าวในสภาพไร่ นา สามารถลดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคได้โดยไม่แตกต่างจากสารเคมี Edifenphos ในขณะที่ สายชล และสมบัติ (2550) พบว่า เมล็ดข้าวที่แช่สปอร์แขวนลอย *Trichoderma* sp. สามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อรา *F. moniliforme* ได้นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การใช้ *Trichoderma* spp. แชนหรือคลุกเมล็ดพันธุ์สามารถลดการเกิดโรคหรือความรุนแรงของโรคได้ (อรรถกร และคณะ, 2551; เกศินี และสมบัติ, 2552; Harman, 1991)

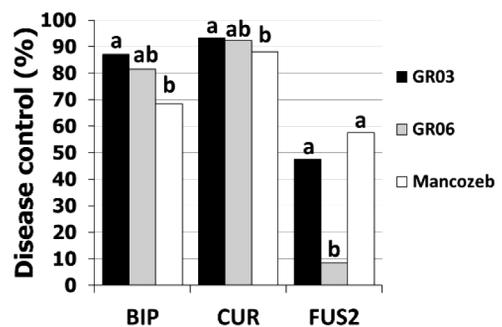


Figure 2 The effect of endophytic fungi and fungicide on disease control of rice seedling rot caused by *Bipolaris oryzae* (BIP), *Curvularia lunata* (CUR) and *Fusarium* sp. FSK2 (FUS2). Data are represents the mean of four replicates. Values with different letters in the same column are significantly different at < 0.01 by DMRT.

2.3 ศึกษาความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการเจริญของกล้าข้าวในสภาพเรือนทดลอง

จากการศึกษาพบว่า เมล็ดข้าวมีอัตราการงอกไม่แตกต่างกันในทุกกรรมวิธี (Table 6) โดยอัตราการงอกที่ 7 และ 14 วันหลังปลูก อยู่ในช่วง 89.5-95.3% และ 96-100% ตามลำดับ ผลการเปรียบเทียบการเจริญของกล้าข้าวอายุ 14 วันหลังปลูก มีดังนี้

สำหรับความยาวรากพบว่า เมล็ดข้าวที่แช่สปอร์แขวนลอยไอโซเลต GR03 มีความยาวรากมากที่สุดเท่ากับ 12.3 ซม. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดแช่ไอโซเลต GR06 และแช่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) ที่มีความยาวรากเท่ากับ 9.1 และ 11.3 ซม. ตามลำดับ ความสูงของลำต้นพบว่า เมล็ดที่แช่ GR03 มีความสูงมากที่สุดเท่ากับ 21.1 ซม. และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (19.5 ซม.) และแช่ GR06 (19.6 ซม.)

สำหรับน้ำหนักสดและแห้งของรากไม่มีความแตกต่างกันในทุกกรรมวิธี ส่วนน้ำหนักสดและแห้งของลำต้นพบว่า เมล็ดแช่ GR03 (1.93 ก และ 0.24 ก. ตามลำดับ) มีน้ำหนักมากกว่ากรรมวิธีควบคุม

(1.65 ก. และ 0.20 ก. ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ดัชนีความแข็งแรงของกล้าข้าวพบว่า เมล็ดแช่ GR03 (3337) มีค่ามากกว่าเมล็ดแช่ GR06 (3057) และกรรมวิธีควบคุม (2745) อย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต GR03 ช่วยส่งเสริมการเจริญของกล้าข้าวได้ ซึ่งอาจเกิดจากการผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (Table 4) ทำให้กล้าข้าวมีความยาวราก ความสูงของลำต้น น้ำหนักสดและแห้งของลำต้นเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับการรายงานของ สายชล และสมบัติ (2550) พบว่า เมล็ดข้าวที่แช่สปอร์แขวนลอย *Trichoderma* sp. ช่วยเพิ่มความสูงลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ของต้นกล้าได้ ทำนองเดียวกับ Doni et al. (2014) พบว่าเมล็ดข้าวที่แช่สปอร์แขวนลอยเชื้อ *Trichoderma* spp. ทำให้ต้นกล้าข้าวเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมล็ดที่ไม่แช่สปอร์แขวนลอย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อรา *T. harzianum* มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด (Raju et al., 1999; Zhang et al., 2013)

Table 6 Effect of fungal endophyte isolate GR03 and GR06 on germination and growth of rice var. Khao Dowk Mali 105

Treatment	Parameters ^{1/2/}								
	GP 7	GP 14	RL	SH	RW (g)		SW (g)		VI
	(%)	(%)	(cm)	(cm)	Fresh	Dry	Fresh	Dry	
Control	89.5	96.0	9.1 c	19.5 b	0.39	0.02	1.65 b	0.20 b	2745 c
GR03	95.3	100.0	12.3 a	21.1 a	0.42	0.03	1.93 a	0.24 a	3337 a
GR06	93.0	99.0	11.3 b	19.6 b	0.38	0.02	1.78 ab	0.21 ab	3057 b
F-test ^{3/}	ns	ns	*	*	ns	ns	*	*	*
CV (%)	8.3	4.7	13.6	4.4	12.8	11.7	8.7	9.8	9.3

^{1/} GP7 and GP14 = seed germination at 7 and 14 days after sowing (DAS), RL = root length, SH = shoot height, RW = root weight, SW = shoot weight and VI = vigor index (RL, SH, RW, SW and VI were investigated 14 DAS).

^{2/} Each value represents the mean of four replicates and mean within a column followed by same letter are not significantly different at $p < 0.05$ using DMRT.

^{3/} ns and * are non-significantly and significantly at $p < 0.05$, respectively.

สรุป

จากการศึกษาพบว่า ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต GR03 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับเชื้อรา *T. harzianum* เป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเซลล์เชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ chitinase, proteinase และ cellulase การผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญของพืชได้แก่ IAA และการละลายฟอสเฟต อีกทั้งยังสามารถลดการเกิดโรคกล้าเน่าที่เกิดจากเชื้อ BIP CUR และ FUS2 ได้ รวมถึงช่วยส่งเสริมให้กล้าข้าวเจริญแข็งแรงในด้านของการเพิ่มความยาวราก ความสูงลำต้น และน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้น ดังนั้นไอโซเลต GR03 จึงมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาใช้ควบคุมโรคข้าวและเพิ่มคุณภาพของผลผลิตข้าวในสภาพไร่นาต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล ที่ให้คำแนะนำในการเขียนบทความวิจัย รศ.ดร.วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ ผศ.ดร. วรณดี บัญญัติวิรัชต์ และ ผศ.ดร.กิริยา สังข์ทองวิเศษ ที่อนุเคราะห์สารเคมี (บางส่วน) ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

เกศินี แก้วมาลา และ สมบัติ ศรีชูวงศ์. 2552. ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ต่อการควบคุมโรคแอนแทรกซ์ของถั่วเหลืองในระยะต้นอ่อน. วารสารเกษตร. 25: 229-236.

ชนินทร ดวงสะอาด. 2545. การควบคุมโรคยอดฝักดาบของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* Sheldon โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ในข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สายชล ไนชัย และ สมบัติ ศรีชูวงศ์. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการควบคุมโรคยอดฝักดาบในต้นกล้าข้าว. วารสารเกษตร. 23: 59-66.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปี 2555. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ,

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2550. โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2556. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2557. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สุวิตา แสไพศาล. 2549. เอนไซม์ย่อยสลาย ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA และการโคลนยีนโคดีเนสของเชื้อรา *Trichoderma* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

แสงโสม ศิริพานิช. 2556. สถานการณ์และผลต่อสุขภาพจากการสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ปี พ.ศ. 2556. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำปี 2556. 44: 689-692.

อรรถกร พรหมวี, สมชาย ชดตระกูล และจิระเดช แจ่มสว่าง. 2551. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินขุยไม้ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของคะน้า. ว.วิจัย.เกษตร. 39(พิเศษ): 180-184.

Abdel-Fattah, G. M., Y. M. Shabana, A. E. Ismail, and Y. M. Rashad. 2007. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. Mycopathologia. 164: 81-89.

Altomare, C., W. Norvell, T. Björkman, and G. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2926-2933.

Arnold, A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. Fungal Biol. Rev. 21: 51-66.

Aschehoug, E. T., K. L. Metten, R. M. Callaway, and G. Newcombe. 2012. Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. Ecology. 93: 3-8.

Backman, P. A., and R. A. Sikora. 2008. Endophytes: an emerging tool for biological control. Biol. Control 46: 1-3.

Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi 3rd ed. Burgess Publishing Company, Minnesota.

Benítez, T., A. M. Rincón, M. C. Limón, and A. C. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int. microbiol. 7: 249-260.

Campanile, G., A. Ruscelli, and N. Luisi. 2007. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. Eur. J. Plant Pathol. 117: 237-246.

- Doni, F., I. Anizan, C. M. Z. Che Radziah, A. Salman, M. H. Rodzihan, and W. M. W. Yusoff. 2014. Enhancement of rice seed germination and vigour by *Trichoderma* spp. Res. J. App. Sci. Eng. Technol. 21: 4547-4552.
- Druzhinina, I., and C. P. Kubicek. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? J. Zhejiang Univ. Sci. 6B(2): 100-112.
- Fisher, P., and O. Petrini. 1992. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). New Phytol. 120: 137-143.
- Fravel, D. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 337-359.
- Gottlieb, D., and P. D. Shaw. 1970. Mechanism of action of antifungal antibiotics. Annu. Rev. Phytopathol. 8: 371-402.
- Ham, K. S., S. C. Wu, A. G. Darvill, and P. Albersheim. 1997. Fungal pathogens secrete an inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis-related endo- β -1, 3-glucanases. Plant J. 11: 169-179.
- Harman, G. E. 1991. Seed treatments for biological control of plant disease. Crop Prot. 10: 166-171.
- Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87: 4-10.
- Kim, I. S., L. A. Beaudette, J. H. Shim, J. T. Trevors, and Y. T. Suh. 2002. Environmental fate of the triazole fungicide propiconazole in a rice-paddy-soil lysimeter. Plant Soil. 239: 321-331.
- Mejia, L. C., E. I. Rojas, Z. Maynard, S. V. Bael, A. E. Arnold, P. Hebbbar, G. J. Samuels, N. Robbins, and E. A. Herre. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. Biol. Control. 46: 4-14.
- Mew, T. W., and P. Gonzales. 2002. A Handbook of Rice Seedborne Fungi. International Rice Research Institute, Los Baños.
- Naik, B. S., J. Shashikala, and Y. Krishnamurthy. 2009. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*. Microbiol. Res. 164: 290-296.
- Raju, N., S. Niranjana, G. Janardhana, H. Prakash, H. S. Shetty, and S. Mathur. 1999. Improvement of seed quality and field emergence of *Fusarium moniliforme* infected sorghum seeds using biological agents. J. Sci. Food Agric. 79: 206-212.
- Rodriguez, R., J. White Jr., A. Arnold, and R. Redman. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytol. 182: 314-330.
- Rodriguez, R. J., J. Henson, E. Van Volkenburgh, M. Hoy, L. Wright, F. Beckwith, Y.-O. Kim, and R. S. Redman. 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. The ISME journal. 2: 404-416
- Saravanakumar, K., V. Shanmuga Arasu, and K. Kathiresan. 2013. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. Aquat. Bot. 104: 101-105.
- Suzuki, F., J. Yamaguchi, A. Koba, T. Nakajima, and M. Arai. 2010. Changes in fungicide resistance frequency and population structure of *Pyricularia oryzae* after discontinuance of MBI-D fungicides. Plant Dis. 94: 329-334.
- Tejesvi, M. V., K. R. Kini, H. S. Prakash, V. Subbiah, and H. S. Shetty. 2007. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. Fungal Divers. 24: 37-54.
- Tian, X. L., L. X. Cao, H. M. Tan, Q. G. Zeng, Y. Y. Jia, W. Q. Han, and S. N. Zhou. 2004. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. World J. Microbiol. Biotechnol. 20: 303-309.
- White T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. P. 315-322. In: Innis M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York.
- Yuan, Z.-I., C.-I. Zhang, F.-c. Lin, and C. P. Kubicek. 2010. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. Applied and environmental microbiology. 76: 1642-1652.
- Zhang, F., J. Yuan, X. Yang, Y. Cui, L. Chen, W. Ran, and Q. Shen. 2013. Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization. Plant Soil. 368: 433-444.