ประสิทธิภาพของเห็ดรังนก (*Cyathus* sp.) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินโดยชีววิธี

Efficiency of bird's nest fungi (*Cyathus* sp.) for biological control of soil-borne plant pathogenic fungi

วราภรณ์ สุทธิสา[1*] และ นิวัฒ เสนาะเมือง[2,3]
Waraporn Sutthisa[1*] and Niwat Sanoamuang[2,3]

บทคัดย่อ: ประสิทธิภาพของเห็ดรังนก (*Cyathus* sp.) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินด้วยวิธีการ dual culture พบว่า เห็ดรังนกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) ได้เพียงชนิดเดียว ส่วนเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotium rolfsii* และ *Rhizoctonia* sp. ไม่สามารถยับยั้งได้ เชื้อเห็ดรังนกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ KKU1 และ KKU2 โดยมีการยับยั้งการเจริญของเส้นใยร้อยละ 63.64 และ 62.22 และมีการคลุมทับเส้นใย ร้อยละ 22.46 และ 21.84 ตามลำดับ การใช้ culture filtrate ของเห็ดรังนกไม่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา FOL ได้ แต่มีผลทำให้เส้นใยมีลักษณะผิดปกติ การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา FOL ในระดับเรือนทดลองพบว่า หลังจากปลูกมะเขือเทศ 28 วัน กรรมวิธีที่มีการใช้เห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 สามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวได้ดีกว่าการใช้เห็ดรังนกไอโซเลต KKU2 และพบว่าเห็ดรังนกมีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ ทำให้น้ำหนักแห้งและความสูงของมะเขือเทศเพิ่มขึ้น

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี, โรคเหี่ยวมะเขือเทศ, เห็ดรังนก

ABSTRACT: The efficiency of bird's nest fungi (*Cyathus* sp.) to inhibit the mycelial growth of soil-borne plant pathogenic fungi was carried out by dual culture technique. The results showed that *Cyathus* sp. inhibited the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), but not inhibit *Pythium aphanidermatum*, *Sclrotium rolfsii* and *Rhizoctonia* sp. The most inhibition obtained from isolate KKU1 and KKU2 which 63.64 and 62.22 %inhibition of mycelial growth with 22.46 and 21.84% overgrowth, respectively. The culture filtrate of *Cyathus* showed no effect to FOL conidial germination, but affected to mycelium growth. The efficacy of *Cyathus* sp. to control tomato wilt disease caused by *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* in greenhouse condition was done. At twenty-eight day after inoculation, KKU1 could reduce disease incident than KKU2. *Cyathus* sp. KKU1 and KKU2 were enhance growth in tomato that affected to increasing tomato dry weight and high.

Keywords: Biological control, tomato wilt disease, Bird's nest fungi

1 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University
2 สาขาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Plant Pathology Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen Province, 40002, Thailand
3 ศูนย์วิจัยอนุกรมวิธานประยุกต์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Applied Taxonomic Research Center, Khon Kaen University
* Corresponding author: wsutthisa@gmail.com, waraporn.s@msu.ac.th

บทนำ

ปัญหาโรคพืชส่วนใหญ่มักมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ในดินที่ทำความเสียหายอย่างมากต่อพืช เชื้อสาเหตุโรคในดินสามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืชที่พบบ่อยครั้งและเป็นปัญหาของการปลูกพืชหลายชนิด เช่น *Fusarium* sp., *Sclerotium rofsii*, *Phytopthora* sp.และ *Pythium* sp. เป็นต้น ซึ่งเกษตรกรนิยมควบคุมด้วยสารเคมี เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและปฏิบัติได้ง่าย แต่การใช้สารเคมีมักก่อให้เกิดปัญหาโดยตรงต่อผู้ใช้และผู้บริโภค อีกทั้งยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และที่สำคัญคือเกิดการระบาดของเชื้อโรคในภายหลัง เนื่องจากสารเคมีที่ใช้ไปทำลายเชื้อจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มีประโยชน์ในการควบคุมเชื้อโรค หรือสิ่งมีชีวิตที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรค (antagonist) ทำให้เชื้อโรคเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีการนำมาใช้ควบคู่ไปกับการเขตกรรม (cultural practice) ซึ่งในปัจจุบันมีการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์มากขึ้น ทั้งนี้เพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมี ซึ่งจะส่งผลให้ระบบนิเวศเกษตรกลับคืนสู่สภาพที่สมดุล เชื้อโรคไม่สามารถเพิ่มปริมาณจนถึงระดับที่สร้างความเสียหายต่อพืชได้ อีกทั้งการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธียังประหยัด ปลอดภัยและได้ผลในระยะยาว

ปัจจุบันหลายประเทศได้ให้ความสนใจในการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินรวมทั้งเห็ดมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในดิน เห็ดหลายชนิดที่น่าสนใจอย่างมากที่จะนำมาศึกษาการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น เห็ดรังนก (*Cyathus stercoreus* (Schw.) de Toni) ที่สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของมันฝรั่ง (El-fallal and Moussa, 2008) *Cyathus* sp. สามารถพบได้บริเวณซากใบไม้และบนไม้ มีการสร้างสารพิษจากเส้นใยซึ่ง ได้แก่ สาร striatins มีสรรพคุณในการเป็นสารต่อต้านแบคทีเรียและต่อต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช สารนี้สกัดได้จากเส้นใยเชื้อ *C. striatus* (Huds.) Willd. นอกจากนี้ยังสร้างสารอีกหลายชนิด ได้แก่ สาร diterpenoid จากเชื้อ *C. helenae* H. J. Brodie และ *C. intermedies* (Mont.) Tul & C. Tul ผลิตสาร secondary metabolites (Anke and Oberwinkler, 1977; Ayer, 2011) ที่ทำให้เกิดความผิดปกติทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ในข้าว โดยมีผลทำให้การงอกของสปอร์ลดลง การแตกกิ่งและลักษณะของเส้นใยเชื้อ *P. oryzae* ผิดปกติ (Liu and Zhang, 2004) การศึกษาวิจัยนี้ จึงได้ทำการคัดเลือกเห็ดรังนกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน เพื่อลดการใช้สารเคมีเพื่อความปลอดภัยของทั้งผู้ใช้ผู้บริโภคและคืนสมดุลให้กับสภาพแวดล้อม

วิธีการศึกษา

เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เห็ดรังนก (*Cyathus* sp.) จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ KKU1, KKU2, KKU3, KKU4 และ NN และเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotium rolfsii* และ *Rhizoctonia* sp. ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การเป็นปฏิปักษ์ของเห็ดรังนกต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน ด้วยวิธีการ dual culture

เลี้ยงเชื้อเห็ดรังนกและเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ซม. เจาะเส้นใยของเชื้อเห็ดรังนก 1 ชิ้น มาวางลงบนจานอาหาร PDA จานใหม่ให้ห่างจากขอบจาน 2 ซม. บ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นย้ายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ตัดด้วย cork borer ขนาดเดียวกันมาวางตรงข้ามกันในแนวเส้นผ่านศูนย์กลางให้ห่างกันประมาณ 5 ซม. ไอโซเลตละ 5 ซ้ำ ในกรรมวิธีควบคุมวางชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเพียงอย่างเดียว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 10 วัน บันทึกผลโดยวัดการเจริญของเส้นใยจากระยะทางของเส้นใยเชื้อราทั้ง 2 ชนิด หลังจากเส้นใยของเชื้อเห็ดรังนกและเชื้อราสาเหตุโรคเจริญมาสัมผัสกันก่อนนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญและคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่วางเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค (ดัดแปลงจากวารินและคณะ, 2550) คำนวณโดยใช้สูตร เปอร์เซ็นต์ยับยั้ง

การเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค = [(R1 - R2)/R1 x 100] เมื่อ R1 คือ ค่าเฉลี่ยรัศมีของเชื้อราสาเหตุโรคในจานควบคุม และ R2 คือ ค่าเฉลี่ยรัศมีของเชื้อราสาเหตุโรคในจานทดสอบ

การเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค = [D x 1]/T เมื่อ D คือ ระยะทางที่เชื้อเห็ดรังนกทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคซึ่งเริ่มวัดจากจุดที่เชื้อเห็ดรังนกเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคจนสุดขอบจานเลี้ยงเชื้อ (ซม.) และ T คือ ระยะเวลาที่เชื้อเห็ดรังนกใช้ในการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคจนสุดขอบจานเลี้ยงเชื้อ (วัน)

การเป็นปฏิปักษ์ของเห็ดรังนกต่อเชื้อรา FOL

เตรียม culture filtrate ของเห็ดรังนก โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร potato dextrose broth (PDB) ในสภาพเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน นำมากรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดช่องเปิด 0.1 μ และเตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อรา FOL ให้ได้ความเข้มข้น 10^5 สปอร์/มล.

หยด culture filtrate ของเห็ดรังนก ปริมาณ 50 μ ลงในสไลด์หลุม (depression slide) หลังจากนั้นหยดสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อรา FOL ปริมาตรเท่ากันลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในกล่องที่ให้ความชื้น จากนั้น 24 ซม. นำมาย้อมด้วย 1% Phloxine นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตการงอกของโคนิเดีย และ germ tube 10 สปอร์ต่อสไลด์หลุม การทดลองละ 3 ซ้ำ โดยในกรรมวิธีควบคุมหยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าชื้อแทน culture filtrate (วราภรณ์, 2545)

ประสิทธิภาพของเห็ดรังนกในการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi* (FOL) ในระดับเรือนทดลอง

การเตรียมต้นกล้ามะเขือเทศ นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดามาแช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อนาน 24 ซม. จากนั้นนำไปเพาะลงในถาดหลุมที่บรรจุวัสดุเพาะประกอบด้วยดินร่วน แกลบดิบ และปุ๋ยคอก อัตราส่วน 1: 1: 1 และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 80 ºซ นาน 6 ซม. นำไปไว้ในเรือนทดลอง รดน้ำทุกเช้า จนกระทั่งมะเขือเทศอายุ 28 วัน จึงนำมาใช้ในการทดลอง

การเตรียมหัวเชื้อเห็ดรังนก คัดเลือกเห็ดรังนกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ FOL ด้วยวิธีการ dual culture ได้แก่ ไอโซเลต KKU1 และ KKU2 มาเพิ่มปริมาณโดยเพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่าง โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างไปแช่น้ำ 2 ซม. บรรจุใส่ขวดทนความร้อน ใส่จุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษใช้ยางรัดปากถุง นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที รอให้วัสดุเพาะเย็น ย้ายเส้นใยของเห็ดรังนกที่เจริญบนอาหาร PDA นาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 °ซ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ซม. เจาะปลายเส้นใยจากอาหาร PDA ลงในขวดเมล็ดข้าวฟ่างที่เตรียมไว้ 2 ชิ้น ต่อขวด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 15 วัน หรือจนกว่าเชื้อจะเจริญเต็มขวด ส่วนกรรมวิธีควบคุมไม่ต้องทำการปลูกเชื้อเห็ดรังนก

การเตรียมเชื้อรา นำเชื้อรา FOL มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 ºซ เป็นเวลา 7 วัน เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดีย ให้มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มล.

การปลูกเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของต้นมะเขือเทศ นำต้นกล้ามะเขือเทศที่มีอายุ 28 วัน มาย้ายปลูกลงในแก้วพลาสติกขนาด 8×5×13 ซม. (กว้าง×ฐาน×สูง) ที่บรรจุดินผสมเชื้อเห็ดรังนกที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่าง ผสมกับดินตามกรรมวิธีทดสอบ และปลูกเชื้อรา FOL โดยการราดสารแขวนลอยเชื้อลงบริเวณโคนต้น ต้นละ 50 มล. รดน้ำตามปกติ วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 6 กรรมวิธีๆ ละ 5 ซ้ำๆ ละ 3 ต้น ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 เห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 ผสมดินในอัตรา 20% และปลูกเชื้อ FOL กรรมวิธีที่ 2 เห็ดรังนกไอโซเลต KKU2 ผสมดินในอัตรา 20% และปลูกเชื้อ FOL กรรมวิธีที่ 3 เมล็ดข้าวฟ่างอบฆ่าเชื้อผสมในดินอัตรา 20% และปลูกเชื้อ FOL กรรมวิธีที่ 4 เห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 ผสมดินในอัตรา 20% กรรมวิธีที่ 5 เห็ดรังนกไอโซเลต KKU2 ผสมดินในอัตรา 20% กรรมวิธีที่ 6 เมล็ดข้าวฟางอบฆ่าเชื้อผสมในดินอัตรา 20% โดยไม่ปลูกเชื้อ

สังเกตและบันทึกผลต้นที่แสดงอาการเหี่ยวทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หรือจนกว่าต้นมะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยวทุกต้นในกรรมวิธีควบคุม (ดัดแปลง

จาก พรไพลิน, 2553) บันทึกผลความสูงของมะเขือเทศทุกสัปดาห์และให้คะแนนการเกิดโรคหลังปลูกเชื้อที่ 21 และ 28 วัน โดยให้ระดับความรุนแรงของโรคเหี่ยวมะเขือเทศ ดังนี้ (Akköprü and Demir, 2005) ระดับ 0 = ไม่เกิดโรค, ระดับ 1 = ใบแสดงอาการ < 25 %, ระดับ 2 = ใบแสดงอาการ 26-50 %, ระดับ 3 = ใบแสดงอาการ 51-75 % และระดับ 4 = ใบแสดงอาการ 76-100 %

การตรวจนับประชากรเชื้อรา FOL โดยการเก็บตัวอย่างดินในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองบริเวณรากต้นมะเขือเทศลึกจากปากแก้ว 7 ซม. กรรมวิธีละ 10 กรัม มาแยกเชื้อ โดยนำดินมาผึ่งลมให้แห้งพอหมาด จากนั้นเตรียมสารละลายโดยใช้ดิน 5 กรัม แขวนลอยในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 45 มล. เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที นำมาแยกเชื้อโดยทำ dilution plating technique บนอาหาร PDA ผสม rose Bengal และผสม streptomycin (Deadman et al., 2006) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ºซ เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจนับโคโลนีของเชื้อรา FOL

ผลการศึกษา

การเป็นปฏิปักษ์ของเห็ดรังนกต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน ด้วยวิธีการ dual culture

เห็ดรังนกทุกไอโซเลตที่ทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *P. aphanidermatum*, *S. rolfsii* และ *Rhizoctonia* sp. ได้ โดยเชื้อรา *P. aphanidermatum*, *S. rolfsii* และ *Rhizoctonia* sp. สามารถเจริญคลุมทับเส้นใยของเห็ดรังนกได้ภายใน 3 วัน แต่สามารถยับยั้งเชื้อรา FOL ได้ พบว่าหลังจากวางเชื้อรา FOL ลงในแนวตรงข้ามเชื้อเห็ดรังนก 5 วัน เส้นใยของเห็ดรังนกเริ่มเจริญคลุมทับเส้นใยของเชื้อรา FOL และเมื่อผ่านไป 7 วัน เห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 และ KKU2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา FOL ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเท่ากับร้อยละ 63.64 และ 62.22 ตามลำดับ และมีร้อยละการคลุมทับเส้นใยเท่ากับร้อยละ 22.46 และ 21.84 ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Antagonism of *Cyathus* sp. isolate on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) testing by dual culture technique

Cyathus sp. isolate	Inhibition ±SD (%)[1/]	over growth ±SD (%)[2/]
Cyathus sp. isolate KKU1	63.64±0.38 a[3/]	22.46±0.45 a[3/]
Cyathus sp. isolate KKU2	62.22±1.11 a	21.84±0.63 a
Cyathus sp. isolate KKU3	58.02±0.19 b	18.62±0.29 b
Cyathus sp. isolate KKU4	59.06±0.93 b	17.70±0.25 c
Cyathus sp. isolate NN	43.30±2.14 c	0.00±0.00 d
CV (%)	2.04	2.41

[1/] % Inhibition = $[(R_{c-}R_t)/R_c] \times 100$

R_c = average of radial of pathogen in control plate

R_t = average of radial of pathogen in treatment plate

[2/] % overgrowth = $[(C_1-C_2)/D) \times 100$

C_1 = average radial of *Cyathus* sp. covered pathogen at study day

C2 = average radial of *Cyathus* sp. covered pathogen before study day

D = period of study (day)

[3/] Means (n=5) in column followed by the same letters are not significantly different (P<0.01, least significant difference) based.

SD = standard deviation

การเป็นปฏิปักษ์ของเห็ดรังนกต่อเชื้อรา FOL

การยับยั้งการงอกของโคนิเดีย พบว่าการใช้ culture filtrate ของเห็ดรังนก ไอโซเลต KKU1 และ KKU2 ไม่มีผลต่อการงอกของโคนิเดียของเชื้อรา FOL แต่มีผลทำให้เส้นใยที่งอกออกมามีการเจริญน้อยกว่าในกรรมวิธีควบคุม คือมีความยาวของเส้นใยอยู่ระหว่าง 147.56-212.86 μ (Table 2) และมีผลทำให้เส้นใยที่เจริญออกมามีลักษณะบิดเป็นเกลียว และเป็นปล้อง

Table 2 Effect of culture filtrate of *Cyathus* sp. on isolate mycelium growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL)

Cyathus sp. isolate	germ tube length ±SD (μm)[1/]
Cyathus sp. isolate KKU1	147.56±15.96 d
Cyathus sp. isolate KKU2	158.98±11.97 d
Cyathus sp. isolate KKU3	208.48±1.68 b
Cyathus sp. isolate KKU4	179.24±2.81 c
Cyathus sp. isolate NN	212.86±7.55 b
Control	240.60±1.80 a

[1/] Means (n=10) in column followed by the same letters are not significantly different (P<0.01, least significant difference) based.

SD = standard deviation

การยับยั้งการเจริญของเส้นใย เมื่อทำการเขี่ยเส้นใยบริเวณที่เชื้อเห็ดรังนกเจริญคลุมทับเชื้อรา FOL มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยของเชื้อรา FOL มีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม คือ เส้นใยจะมีการบิดเป็นเกลียว (Figure 1)

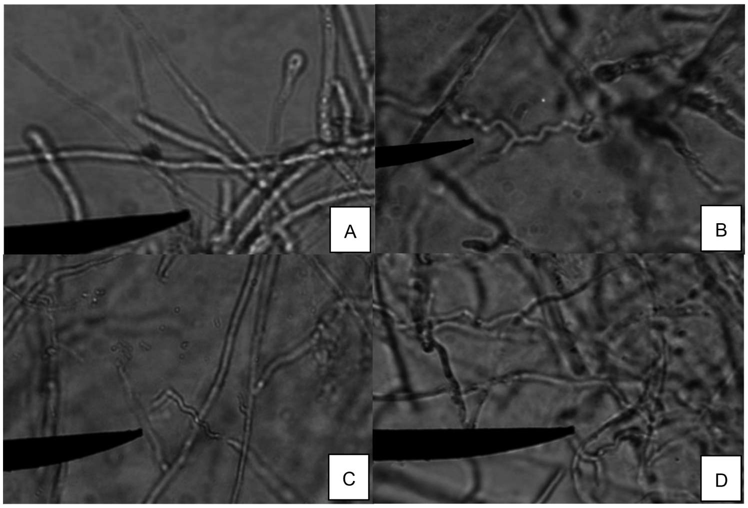

Figure 1 Inhibition of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* mycelium growth by various isolates of *Cyathus* sp.
A: Control (without *Cyathus* sp.) B: twist mycelium FOL by KKU1
C: short and twist mycelium FOL by KKU2 D: twist mycelium FOL by KKU3

ประสิทธิภาพของเห็ดรังนกในการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi* (FOL) ในระดับเรือนทดลอง

การใช้เห็ดรังนกทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศได้ โดยเห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคได้ดีกว่าเห็ดรังนกไอโซเลต KKU2 (Table 3)

Table 3 Efficiency of *Cyathus* sp. KKU1 and KKU2 to control *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), the causal agent of tomato wilt disease

Treatment	Disease index[1/]		Disease severity ±SD (%)[2/]		
	21 days[3/]	28 days[3/]	21 days[3/]	28 days[3/]	
20% KKU1 + FOL	1	1	4.00±3.83	c13.00±4.32	c
20% KKU2 + FOL	1	2	9.67±2.74	b31.67±8.89	b
20% KKU1	0	0	0.00±0.00	c0.00±0.00	d
20% KKU2	0	0	0.00±0.00	c0.00±0.00	d
20% sorghum seed + FOL	2	3	39.33±6.73	a66.00±5.60	a
20% sorghum seed	0	0	0.00±0.00	c0.00±0.00	d
CV (%)			3 7 . 9	32 5 . 1	5

[1/] disease index: 0 = no symptom, 1 = < 25% leaves symptom, 2 = 26-50 % leaves symptom, 3 = 51-75 % leaves symptom, 4 = 76-100 % leaves symptom

[2/] $\% \text{ disease severity} = \frac{\text{Sum of disease index of each level}}{\text{Number of random plants}} \times \frac{100}{\text{Highest level of disease index}}$

[3/] Means (n=5) in column followed by the same letters are not significantly different (P<0.01, least significant difference) based.

SD = standard deviation

เห็ดรังนกทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศได้ ซึ่งพบว่า ในกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อเห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 เพียงอย่างเดียวให้น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินมากที่สุด ส่วนความสูงของต้นมะเขือเทศพบว่าหลังจากปลูกมะเขือเทศ 28 วัน ในกรรมวิธีที่มีการใช้เห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 เพียงอย่างเดียว ทำให้ต้นมะเขือเทศมีความสูงเพิ่มขึ้นคือ 21.22 ซม. ส่วนในกรรมวิธีอื่นๆ นั้น ความสูงของต้นมะเขือเทศไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 4)

Table 4 Effect of *Cyathus* sp.KKU1 and KKU2 to growth of tomato plants.

Treatment	Shoot dry weight (g)	Plant Hight ±SD (cm)[1/]				
		7 days	14 days	21 days	28 days	
20% KKU1 + FOL	1.11±0.04	c6.70±0.29	a11.21±0.26	ab17.96±0.27	b20.41±0.09	bc
20% KKU2 + FOL	1.08±0.05	c5.02±0.31	b11.30±0.98	a17.69±0.19	b20.34±0.15	bc
20% KKU1	1.41±0.08	a7.08±0.28	a11.62±0.58	a20.35±0.45	a21.22±0.26	a
20% KKU2	1.26±0.05	b6.78±0.19	a11.38±0.40	a17.67±0.26	b20.49±0.25	b
20% sorghum seed + FOL	0.67±0.12	d4.78±0.37	b10.38±0.08	b16.53±0.24	d20.10±0.12	c
20% sorghum seed	1.06±0.05	c4.90±0.53	b11.22±0.22	ab17.18±0.26	c20.17±0.29	bc
CV (%)	6.33	5.89	4.61	1.62	1.02	

[1/] Means (n=5) in column followed by the same letters are not significantly different (P<0.01, least significant difference) based.

SD = standard deviation

การตรวจนับประชากรเชื้อรา FOL

เชื้อเห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนประชากรของเชื้อรา FOL ได้ดีกว่าเชื้อเห็ดรังนกไอโซเลต KKU2 **(Table 5)**

Table 5 Population of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) in soil as affected by *Cythus* isolates, 28 days after inoculation

Treatment	Population ±SD (x10^4 spores/g)[1/]
20% KKU1 + FOL	4.00±0.25 c
20% KKU2 + FOL	5.20±0.24 b
20% KKU1	0.00±0.00 d
20% KKU2	0.00±0.00 d
20% sorghum seed + FOL	12.05±0.71 a
20% sorghum seed	0.00±0.00 d
CV (%)	9.14

[1/] Means (n=5) in column followed by the same letters are not significantly different (P<0.01, least significant difference) based.

SD = standard deviation

วิจารณ์

การทดสอบประสิทธิภาพของเห็ดรังนก (*Cyathus* sp.) 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต KKU1, KKU2, มข3, มข4 และ น้ำหนาว ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน 4 ชนิด ด้วยวิธีการ dual culture พบว่า เห็ดรังนกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) ได้เพียงชนิดเดียว ส่วนเชื้อรา *P. aphanidermatum*, *S. rolfsii* และ *Rhizoctonia* sp. ไม่สามารถยับยั้งได้ ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด คือ KKU1 และ KKU2 เมื่อทำการศึกษากลไกการยับยั้งการงอกของโคนิเดียของเชื้อรา FOL โดยใช้ culture filtrate ของเห็ดรังนก พบว่า culture filtrate ของเห็ดรังนกไม่สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียได้ แต่มีผลทำให้เส้นใยที่งอกออกมามีความผิดปกติไปจากเดิม โดยเส้นใยจะบิดงอและมีลักษณะเป็นปล้อง การศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของเส้นใยให้ผลในทำนองเดียวกัน คือ เส้นใยของเชื้อรา FOL บริเวณที่ถูกคลุมทับด้วยเส้นใยของเห็ดรังนกจะมีลักษณะบิดเป็นเกลียว ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ El-Fallal and Moussa (2008) ที่พบว่า *Cyathus* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. และ *Rhizoctonia* sp. ได้โดย *C. stercoreus* และสายพันธุ์ที่พบในเขตร้อนสามารถผลิตสาร striatals และ striatins ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม diterperinoid โดยสาร striatins ที่สกัดจากเส้นใยของเชื้อเห็ดรังนกด้วยเอทานอลมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและสารยับยั้งเชื้อรา (Anke and Steglich, 1988) และจากงานวิจัยของ Liu and Zhang (2004) พบว่า การใช้สารสกัดจากเส้นใยของเชื้อเห็ดรังนก *C. intermedius* มีผลทำให้การงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ในข้าวมีลักษณะผิดปกติ โดยจะไปมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ไคตินของผนังเซลล์ของเชื้อรา (Gunji et al., 1983)

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 และ KKU2 ในการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา FOL ในระดับเรือนทดลองพบว่า หลังจากปลูกมะเขือเทศ 28 วัน กรรมวิธีที่มีการใช้เห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 สามารถลดการเกิดโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีที่มีการใช้เห็ดรังนกไอโซเลต KKU2 ประสิทธิภาพของเห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 และ KKU2 ต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศพบว่า ในกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อเห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศได้ดีกว่าเห็ดรังนกไอโซเลต KKU2

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า เห็ดรังนกมีศักยภาพในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา FOL ได้ และยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศได้ด้วย ซึ่งเห็ดรังนกมีความสามารถในการสลายไม้และเศษซากต่างๆ หากมีการนำเห็ดรังนกมาใช้ร่วมกับปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก นอกจากจะเป็นการเพิ่มปริมาณของเชื้อแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศและพืชอื่นๆ ได้ นอกจากนั้นในการเพิ่มปริมาณเชื้อก็สามารถทำได้ง่ายโดยเลี้ยงเชื้อในเมล็ดข้าวฟ่างเพื่อเป็นหัวเชื้อขยายต่อไปได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยครั้งนี้ยังอยู่ในระดับเรือนทดลอง และกลุ่มตัวอย่างมีจำนวนน้อยหากจะนำไปใช้จริงควรพิจารณาเพิ่มกลุ่มตัวอย่างให้มากขึ้น

สรุป

เห็ดรังนกไอโซเลต KKU1 สามารถยังยั้งการเจริญของเชื้อรา FOL ได้ โดยมีผลทำให้เส้นใยของเชื้อรา FOL มีลักษณะผิดปกติ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ และลดการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ในระดับเรือนทดลอง

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารอ้างอิง

พรไพลิน สุวรรณพิทักษ์. 2553. ปฏิกิริยาของเห็ดสลายไม้โดยเฉพาะเห็ดรังนกเพื่อควบคุมเชื้อราฟิวซาเรียมและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

วราภรณ์ สุทธิสา. 2545. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

วาริน อินทนา, มนตรี อิสรไกรศีล, ศุภลักษณ์ เศรษฐสกุลซ์, ประคอง เย็นจิตต์ และทักษิณ สุวรรณโน. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มา ฮาซิเอนั่ม สายพันธุ์กลายในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการลดปริมาณเชื้อราไฟทอพทอร่า พาล์มมิโวร่าในสวนทุเรียน. วิทยาสารกำแพงแสน. 5(3):1-9.

Akköprü, A., and S. Demir. 2005. Biological control of Fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi* by AMF *Glomus intraradices* and some Rhizobacteria. J. Phytopathology. 153: 544-550.

Anke, T., and F. Oberwinkler. 1977. The striatins-new antibiotic from the basidiomycete *Cyathus striatus* (Huds ex Pers.) willd. The Journal of Antibiotics. 30: 221-225.

Anke, T., and W. Steglich. 1988. Neue wirkstoffe aus casidiomyceten. Forum Mikrobiologie.11: 21-25.

Ayer, A.W. 2011. Metabolites of *Cyathus helenae.* A new class of Diterpenoids. Canadian Journal of Chemistry. 51: 3842-3854.

Deadman, M., H. Al Hasani, and A. Al Sa'di. 2006. Solarization and biofumigation reduce *Pythium aphanidermatum* induced damping-off and enhance vegetative growth of greenhouse cucumber in oman. Plant Pathology. 88: 335-337.

El-Fallal, A. A., and Z. Moussa. 2008. Prospects for biocontrol of brown rot disease of potato in vitro and under greenhouse conditions. Plant Pathology. 7: 54-64.

Gunji, S., K. Arima, and T. Beppu. 1983. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. Agricultural Biological Chemistry. 47: 2061-2069.

Hein, J., and T. Anke. 1988. Antibiotics from basidiomycetes XXIX; Pilatin, a new antibiotically active marasmane derivative from cultures of *Flagelloscypha pilathii* agreer. The Journal of Antibiotics. 41: 1752-1757.

Hwang, E., B. Yun, and Y. Kim. 2000. Pellinsin A, anovel chitin synthases inhibitor produced by *Phillinus* sp. PL3. The Journal of Antibiotics. 53: 903-911.

Lui Y.J., and K.Q. Zhang. 2004. Antimicrobial activities of selected *Cyathus* species. Mycopathologia. 157: 185–89.