

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากใบพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคเหี่ยวของพริก Screening of Antagonistic Fungi From Plant Leaves Inhibiting Growth of Fusarium Wilt Disease Pathogen in Chilli

สมาพร เรืองสังข์¹ และจุฬารักษ์ ศรีศักดิ์¹

Samaporn Ruangsanka¹ and Jularuck Srisakda¹

¹คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์

¹Faculty of Agricultural Technology, Walailak Rajabhat University

Received: August 23, 2019

Revised: February 12, 2020

Accepted: February 19, 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อราจากใบพืชผักสมุนไพรชนิดต่าง ๆ และเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราจากใบพืชที่แยกได้ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคในพริก โดยทำการแยกเชื้อรา 16 ไอโซเลตได้จากพืช 6 ชนิด ได้แก่ กระเพรา สะระแหน่ มะละกอ ตะไคร้ มินท์ และแมงลัก เมื่อนำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Fusarium* sp. ที่ก่อโรคเหี่ยวในพริก พบว่าเชื้อรารหัส SB5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้มากที่สุด คือ 83.00% รองลงมาคือ เชื้อรารหัส B1 ยับยั้งเชื้อโรคได้ 75.60% ซึ่งเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลตนี้มีประสิทธิภาพสูงกว่าเชื้อราอื่นที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ระดับชีวโมเลกุลพบว่า เชื้อรารหัส SB5 คือ เชื้อ *Aspergillus flavus* และเชื้อรารหัส B1 คือ เชื้อ *Penicillium oxalicum*

คำสำคัญ: ใบพืช, พริก, ราปฏิปักษ์, โรคเหี่ยวพริก

Abstract

This research aims to isolate fungi from various types of vegetables, herbs and leaves. It aims to test the effectiveness of the fungus from the isolated plant leaves to be antagonistic to pathogenic fungi in chilli by isolating 16 isolates of fungi from 6 types of plants: basil, mint, papaya, lemongrass, mint and sweet basil. When tested for antagonism against *Fusarium* sp., it was found that the fungus code SB5 was able to inhibit the growth of pathogens at a maximum of 83.00%, followed by fungus code B1 to inhibit germs at 75.60%. Both of these isolates were statistically more significantly effective than other residual fungi. The molecular analysis reveals that the SB5 fungus is *Aspergillus flavus* and the B1 fungus is *Penicillium oxalicum*.

Keywords: plant leaves, chilli, antagonistic fungi, *Fusarium* wilt



บทนำ

ปัจจุบันเกษตรกรที่ปลูกพืชเพื่อการค้าหรือพืชเศรษฐกิจมักพบปัญหาในการผลิตเป็นอย่างมากนั้นคือ ปัญหาของโรคและแมลงศัตรูพืช ทำให้เกิดการใช้สารเคมีในการจัดการเกษตร เนื่องจากเห็นผลเร็ว แต่ผลที่ตามมาคือผลผลิตมีสารเคมีตกค้างส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค รวมถึงปัญหาการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม จึงได้มีศึกษาการใช้วิธีชีวภาพในการแก้ปัญหาเพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร เช่นเดียวกับการผลิตพริก (*Capsicum annuum*) เป็นพืชผักกินผลเม็ดเล็กที่มีความเกี่ยวข้องกับคนไทยมานาน เพราะสามารถปลูกไว้บริโภคได้ทั่วครัวเรือน โดยส่วนใหญ่จะนำพริกมาเป็นส่วนประกอบอาหารหลายชนิด เพื่อช่วยเพิ่มรสชาติอาหารมากขึ้น จึงทำให้ปัจจุบันนี้พริกเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ประเทศไทยมีการผลิตพริกเป็นอันดับต้นของโลก โดยเป็นพริกเขตร้อน เช่น พริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า พริกหนุ่ม เป็นต้น ผลิตในรูปแบบพริกสดและพริกแห้ง (FAO, 2016) ในปีพ.ศ. 2560 ประเทศไทยมีพื้นที่เก็บเกี่ยวพริกทั้งหมด 42,590 ไร่ มีการนำเข้าพริกแห้งและพริกสดแช่แข็ง ที่ปริมาณ 85,735.61 ตัน และ 20,666.05 ตัน ตามลำดับ ประเทศที่เป็นคู่ค้าในการนำเข้าคือ อินเดีย จีน เมียนมาร์ การส่งออกพริกที่สำคัญคือพริกสดแช่แข็ง และซอสพริก โดยการส่งออกของพริกสดแช่แข็งอยู่

ที่ปริมาณ 14,931.87 ตัน ซอสพริกอยู่ที่ปริมาณ 12,397.71 ตัน ประเทศที่เป็นคู่ค้าส่งออก คือ เนเธอร์แลนด์ ญี่ปุ่น เยอรมนี (Bovichian, 2018) นอกจากการนำพริกไปประกอบอาหารแล้วพริกยังนำไปใช้ประโยชน์อีกหลายอย่าง เนื่องจากพริกมีความเผ็ดซึ่งได้จากสารแคปไซซิน (Capsaicin) ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมอาหารและยามีสรรพคุณในการช่วยบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อและข้อลดปัจจัยเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด เพิ่มอัตราการเผาผลาญของร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในอุตสาหกรรมสัตว์เศรษฐกิจ เช่น สุกรและสัตว์ปีก โดยนำสารสกัดแคปไซซินจากพริกทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะช่วยกระตุ้นให้สัตว์กินอาหารได้มากขึ้น แรงการเจริญเติบโตและเป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Senadee, Pomlit & Chaiyaporn, 2018)

การผลิตพริกมีปัญหาสำคัญที่ทำให้ไม่สามารถผลิตได้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด คือ โรคและแมลง เนื่องจากพริกเป็นพืชที่มีเชื้อโรคและแมลงเข้าทำลายได้ง่าย จึงทำให้ต้องใช้สารเคมีในการกำจัดตลอดระยะเวลาการผลิตพริก โดยโรคสำคัญที่พบในพริก คือ โรคเหี่ยวพืชาวเรียม ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายโดยเชื้อรา *Fusarium* sp. โรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp. โรครากรากปมจากไส้เดือนฝอย โรคใบหงิกใบด่างที่เกิดจากเชื้อไวรัส สำหรับแมลงที่เข้าทำลายพริกได้แก่ เพลี้ยไฟ ไรขาว

แมลงวันผลไม้ เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมีในการกำจัดโรคและแมลงต่าง ๆ ซึ่งทำให้เกิดสารตกค้างและปนเปื้อนในผลผลิตหลายชนิด เช่น คลอร์ไพริฟอส ไดไทโอคาร์บาเมต โพรไทโอฟอส โพรพิโนฟอส พบการตกค้างมากถึง 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและอีโทออน พบการตกค้างในพริก สูงสุดถึง 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ยังตรวจพบ คาร์เบนดาซิม/เบนโนมิล และไซเพอร์เมทริน 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รวมถึงคาร์บาริล คาร์โบซัลแฟน โฟซาโลน พบสูงสุด 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารพิษตกค้างเหล่านี้เกินค่ามาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข ที่กำหนดไม่ให้เป็นค่าดีฟอลต์ลิมิต (Default limits) เช่น คาร์เบนดาซิม/เบนโนมิล ต้องไม่เกิน 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และไซเพอร์เมทริน ไม่เกิน 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Announcement of the Ministry of Public Health on Foods that have toxic residues, 2017) เพื่อลดปัญหาสารพิษตกค้างในผลิตผลทางการเกษตร จึงมีการค้นคว้าวิจัยเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวพืชาวเรียมในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดด้วยวิธีทางชีวภาพ ดังงานวิจัยของ Nareewuttikun and Akarapisan (2010) ที่พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ที่ก่อโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากดินบริเวณรอบรากมะเขือเทศและพริกได้ แต่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญต่ำกว่า 40.00% ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีเป้าหมายที่จะคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากแหล่งอื่นเพื่อเพิ่มโอกาสในการค้นหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคเหี่ยวพืชาวเรียม โดยมุ่งศึกษาในกลุ่มของเชื้อราจากพืชที่มีในท้องถิ่น คือ กระเพรา แมงลัก สะระแหน่ มะละกอ ตะไคร้ และ มันท์ เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคเหี่ยวพืชาวเรียมในพริก สำหรับใช้แทนสารเคมีในการทำเกษตรปลอดภัย (GAP--Good Agricultural Practices) และเกษตรอินทรีย์ (organic farming) ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อราจากใบพืชผักและสมุนไพรชนิดต่าง ๆ
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราจากใบพืชในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคเหี่ยวพืชาวเรียมในพริก

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

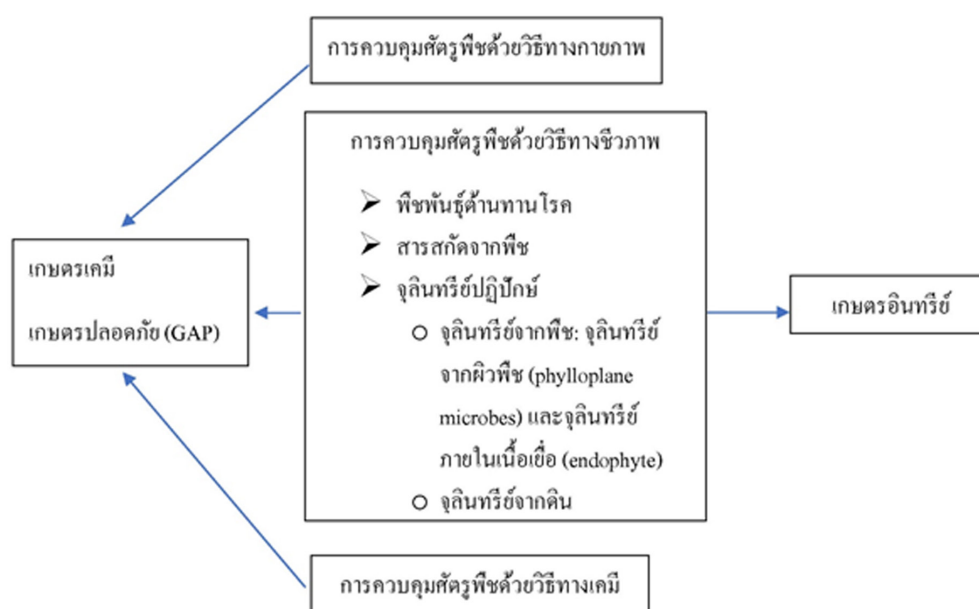
โรคเหี่ยวพืชาวเรียมในพริก มีสาเหตุมาจากเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน (soil borne fungi) เข้าสู่ต้นพริกทางรากผ่านท่อลำเลียงอาหารไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช ส่งผลตั้งแต่วางถึงใบ ทำให้กลายเป็นสีเหลือง เหี่ยว ใบร่วง ต้นแห้งตายในที่สุด มักพบอาการของโรคในระยะย้ายกล้าและระยะออกดอกของต้นพริก ข้อเสนอแนะเพื่อลดปัญหา คือ การจุ่มรากของต้นกล้าพริกในสารเคมีแมนโคเซป หรือฉีดพ่นให้ทั่วพื้นที่ เชื้อราสาเหตุของโรคเหี่ยวพืชาวเรียม ได้แก่ *Fusarium oxysporum* (Murtaza et. al., 2017; Neela, Sonia & Shamsi, 2014; Prasannath, Karunakaran, 2018; Pandita et. al., 2019) นอกจากนี้อาการเหี่ยวใบเหลืองของต้นพริกอาจเป็นผลมาจากการติดเชื้อโรครากเน่า (Root rot) และโรคเน่าคอดิน (Damping off) ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium solani* (Nagendran et. al., 2016; Wani et. al., 2014)

การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี สามารถลดการเกิดโรคได้ แต่มีสารพิษตกค้างในผลผลิตพริกและในพื้นที่เกษตร การหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีอันตรายทำได้หลายวิธี หรืออาจใช้เป็นวิธีผสมผสานเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการควบคุมโรคยิ่งขึ้น ได้แก่ การใช้สายพันธุ์พริกต้านทานโรค การใช้สารสกัดจากพืช และการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค การศึกษาในประเทศปากีสถานพบว่า พริกสายพันธุ์ท้องถิ่น 15 สายพันธุ์ไม่สามารถต้านทานโรคเหี่ยวพืชาวเรียมจากเชื้อ *F. oxysporum* ได้ โดยเฉพาะสายพันธุ์ Arunalu, NARC-4, Sabazperi and Skyline มีความอ่อนแอต่อโรคมาก (Murtaza et. al., 2017) สำหรับประเทศอินโดนีเซีย มีพริกสายพันธุ์ที่ต้านทาน *F. oxysporum* ได้ดีที่สุด คือ Branang ในขณะที่สายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคมามากที่สุด คือ Lembang (Ferniah, Pujiyanto & Kusumaningrum, 2018) นอกจากนี้มีการศึกษาสายพันธุ์พริกพื้นเมือง 32 สายพันธุ์จากพื้นที่ต่าง ๆ ใน Kashmir valley ประเทศอินเดีย พบว่ามี 6 สายพันธุ์ที่ต้านทานโรคเหี่ยวพืชาวเรียมจากเชื้อ *F. oxysporum* ได้ประสิทธิภาพสูง ได้แก่สายพันธุ์รหัส SKUA-SHC-1, SKUA-SHC-2, SKUA-SHC-14, SKUA-SHC15, Arka Lohit and SKUA-SHC-29 (Pandita et. al., 2019)

การควบคุมโรคเหี่ยวพืชาวินิจฉัยด้วยวิธีทางชีวภาพ กรณีการใช้พืชสมุนไพรพบว่า สารสกัดเหียนกิ่งขาวหรือ เสน่น้ำ (*Lowsonia inermis*) และฝรั่ง (*Psidium guajava*) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ 100% (Neela, Sonia & Shamsi, 2014) สารสกัดจาก กระเทียมมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อโรคได้ 53.00% สารสกัด สะเดา (47.70%) และกระเพรา (36.30%) (Prasannath, Karunakaran & Mahendran, 2011) สำหรับการควบคุม โรคเหี่ยวพืชาวินิจฉัยด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีการศึกษา ของ Bashir et. al. (2016) ที่ทำการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์

ระหว่างเชื้อ *Trichoderma viride*, *T. harzianum* และ *T. koningii* กับเชื้อก่อโรค *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* พบว่า *T. viride* สามารถยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum* ได้ดีที่สุด และ Nagendran et. al. (2016) พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *F. solani* ได้มากกว่า 52% เมื่อนำมาทดสอบในแปลงปลูก พบว่าทุกไอโซเลตสามารถ ลดการเกิดโรคเหี่ยวในพริกได้ และเพิ่มผลผลิตพริกเม็ดเขียว สอดคล้องกับ Wani et. al. (2014) พบว่า *T. harzianum* สามารถยับยั้ง *F. solani* ที่แยกจากต้นพริกที่เป็นโรคได้สูงสุด 89.00%

กรอบแนวคิดการวิจัย



วิธีดำเนินการวิจัย

นำตัวอย่างใบของกระเพรา แมงลัก สะระแหน่มะละกอ ตะไคร้ และมินท์ มาทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบพืช โดยนำใบมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ แล้วตัดเป็นชิ้นเล็ก นำมาใส่ในถุงที่มีน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 0.50 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดและนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีเกลี่ยเชื้อ (spread plate) โดยปิเปตส่วนของสารละลายสกัดจากใบพืชลงบนจานอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar-PDA ปริมาณ 0.50 มล. 3 ซ้ำ แล้วใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (spreader) ปกป้องเชื้อเกลี่ยให้สารสกัดใบพืชกระจายทั่วอาหาร

บ่มเชื้อทิ้งไว้ 1-5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) จะได้เชื้อผสม (mix culture) จากนั้นจึงแยกเชื้อราต่อ (sub culture) จนได้เชื้อราบริสุทธิ์ (pure culture) ด้วยเทคนิค spot inoculation

ประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. สาเหตุโรคเหี่ยวในพริก

นำเชื้อราที่แยกได้จากใบพืชและเชื้อราก่อโรคในพริก *Fusarium* sp. ที่ได้จากคลินิกสุขภาพพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี dual culture โดย

การใช้ cork borer ตัดเชื้อบริเวณขอบโคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.50 เซนติเมตร วางบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA โดยวางระยะห่างระหว่างเชื้อ 3 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 วัน สำหรับชุดควบคุม (control) ทำการทดลองเช่นเดียวกันโดยเลี้ยงเฉพาะเชื้อรา *Fusarium sp.*

การระบุชนิดเชื้อรา

วิเคราะห์ชนิดของเชื้อราที่คัดเลือกได้โดย BIOTEC สวทช. ด้วยวิธี DNA extraction (Doyle & Doyle, 1987), PCR: ITS, Gel Electrophoresis and Sequencing โดยทำการ Amplification ด้วยเครื่อง Engine Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) และ Sequence analyses ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer (Macrogen Inc., Korea) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

การเก็บข้อมูลบันทึกผล

บันทึกผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของ

เชื้อก่อโรคในชุดทดลอง และชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (% growth reduction) ของเชื้อก่อโรคจากสูตร คือ $[(Dc-Ds)/Dc] \times 100\%$ โดย Dc คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อก่อโรคในชุดควบคุม และ Ds คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อก่อโรคในชุดทดลอง (Ruangsanka, 2014)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลผลทดลองทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งก่อโรคโดยเชื้อจากใบพืชแต่ละชนิด 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Analysis of variance--ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test--DMRT

ผลการวิจัย

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากใบพืชจากตัวอย่างใบพืช 6 ชนิด สามารถแยกได้เชื้อราจำนวน 16 ไอโซเลต แสดงในตาราง 1

ตาราง 1

เชื้อราจากใบพืชที่แยกได้จากตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืช	จำนวนไอโซเลตที่แยกและคัดเลือกได้	รหัสเชื้อราจากใบพืช	% <i>Fusarium</i> Growth Reduction
กระเพรา <i>Ocimum sanctum</i>	4	B1	75.60+11.59 ab
		B2	40.89+12.38 ef
		B4	58.00+2.00 cd
		B9	50.92+4.86 de
สะระแหน่ <i>Metha cordifolia</i> Opiz.	4	KM3	64.37+6.36 bcd
		KM6	35.26+12.35 fg
		KM11	43.17+7.32 ef
		KM19	68.99+7.46 bc
ตะไคร้ <i>Cymbopogon citratus</i>	1	LG8	62.85+4.34 bcd

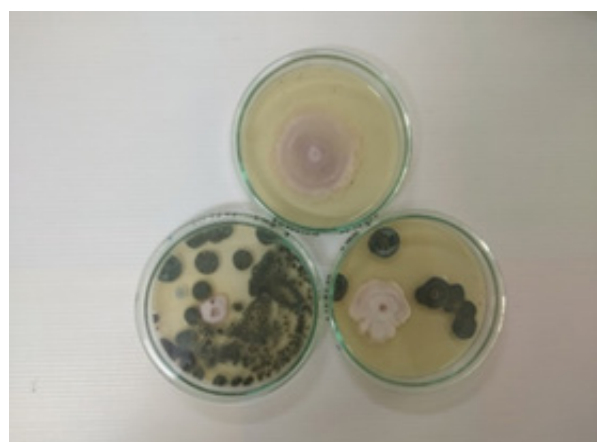
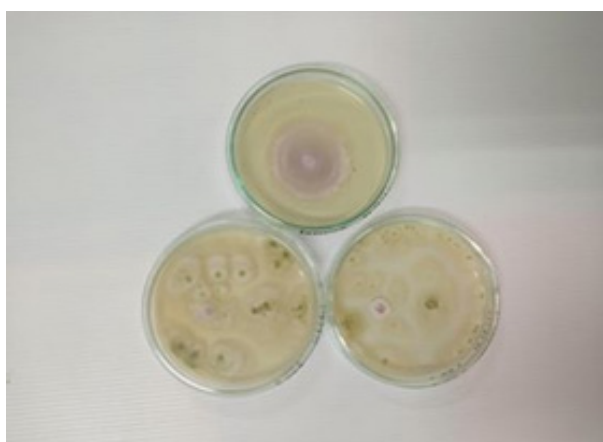
ตาราง 1 (ต่อ)

ตัวอย่างพืช	จำนวนไอโซเลตที่แยกและคัดเลือกได้	รหัสเชื้อราจากใบพืช	% <i>Fusarium</i> Growth Reduction
มินท์	3	M12	40.06+8.00 ef
<i>Mentha arvensis</i> Linn.		M13	58.42+4.69 cd
		M14	65.84+12.96 bcd
มะละกอ	1	P18	58.89+3.10 cd
<i>Carica papaya</i> L.			
แมงลัก	3	SB5	83.00+5.24 a
<i>Ocimum africanum</i> Lour.		SB7	26.07+7.10 g
		SB10	58.00+2.00 cd
รวม	16		

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .05$) ตามวิธี Duncan's Multiple Range Test

2. ประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. สาเหตุโรคเหี่ยวในพริก เมื่อนำเชื้อราจากใบพืชที่แยกได้จำนวน 16 ไอโซเลตมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. บนอาหาร PDA ด้วยวิธี Dual culture พบว่าเชื้อราจากใบพืชที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้สูงสุด คือ SB5 และ B1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 83.00% และ 75.60% ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับเชื้อราที่เหลือมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ

Fusarium sp. ต่ำกว่า 70.00% และที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. น้อยที่สุด คือ SB7 (26.07%) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < .05$) แสดงดังตาราง 1 และภาพ 1 จากการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA พบว่า SB5 คือ *Aspergillus flavus* (98.26% similarity, ATCC 16883) และ B1 คือ *Penicillium oxalicum* (99.60% similarity, NRRL787) มี sequence alignment ของเชื้อทั้งสองชนิดแสดงในภาพ 2



ภาพ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราจากใบพืชที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Fusarium* sp. ด้วยวิธี Dual technique

ลำดับนิวคลีโอไทด์			
Nucleotide sequence(s)			
ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3')
No.	Sample No.	Nucleotide region of	Nucleotide sequence (5' -> 3')
1	SB5	ITS rDNA (ITS1 ITS4)	GAAGTTGGAATGTCCTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTTCCTAGCG AGCCCAACCTCCACCCGATGTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCGCCATTATGGCCGCC GGGGCTCTCAGCCCCGGCCGCCGCCGCCGAGACACCAAGCACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTC TGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACCTTCAACAATGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAG AACCGACGAAATCGATAACTAGTGTGAATGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAC ATTGCCCCCTTGGTATCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACCGGCT TGTGTGTGGGTCGTGTCCTTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAGGACGCGCGGCACCGCTC CGATCCTCGAGCGTATGGGCTTTGTACCCCGCTCTGTAGGCCCCGGCCGCTTGGCGAAACGCA AATCAATCTTTATCCAGGTGACCTCGGATCAAGGAGGGGTACCCGCTTAAATTTAACCTAATCATAA
2	B1	ITS rDNA (ITS1 ITS4)	CAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCCTGGTCCAACCTCC CCACCCGTTGTTATCGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCGCCCTCACGGCCGCCGGGGGATCCGCC CCCCGGCCCGCCGCCGAGACACAAACGAATCTTGTCTGAAGATTGAGTCTGAGTACTTGA CTAAATCAGTTAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGGCATCGATGAAGAACCAGCGAAATG CGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTGAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCCGCCCTGG TATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCAGGCTTGTGTGTGGGCTCTC GCCCCCGCTTCGGGGGGGGGGCCGAAGGCAGCGCGCGACCGCTCGGCTCTCGAGCGTATG GGGCTTGTGACCCGCTCTGTAGGCCCCGGCCGCCGCCGCCGCAACCATCAATCTTAACGAGG TTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAT

ภาพ 2 sequence alignment ของเชื้อราหีส SB5 และ B1

การอภิปรายผล

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* (SB5) ที่แยกได้จากใบแมงลักสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคเหี่ยว *Fusarium* sp. ในพริกได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ 83.00% ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าการศึกษาของ Jankura and Lakatosava (2014); Hamdi, Salem and Hamdi, (2018) ที่พบว่า *A. flavus* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *F. oxysporum* สาเหตุโรครากเน่าและโรคเหี่ยวของต้นองุ่นได้ 30.00% และยับยั้งการเจริญเติบโตของ *F. oxysporum* f. sp. *niveum* และ *F. solani* f. sp. *cucurbitae* ที่ก่อโรคเหี่ยวในต้นกล้าแตงโมและเมลอนได้มากกว่า 50.00% ด้วยเทคนิคเดียวกับการศึกษาครั้งนี้คือ Dual culture technique โดยเลี้ยงเชื้อราก่อโรคและเชื้อราปฏิปักษ์ที่ต้องการทดสอบไว้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ห่างกัน 5 เซนติเมตร ปุ่มเชื้อที่ 28+ 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน

สำหรับเชื้อรา *Penicillium oxalicum* (B1) ที่แยกได้จากกระเพรา สามารถยับยั้งเชื้อ *Fusarium* sp.

ก่อโรคเหี่ยวในพริกได้ประสิทธิภาพดีเช่นกัน คือ ยับยั้งได้ 75.60% สอดคล้องกับงาน Cal et. al.(2009) ที่พบว่า *P. oxalicum* สามารถควบคุมโรคเหี่ยวจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *niveum* ในแตงโมได้ โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้ 54.00% เมื่อทดสอบระดับโรงเรือน จะเห็นว่าประสิทธิภาพของ *A. flavus* และ *P. oxalicum* ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเหี่ยวพืชาวเรียมในพริกครั้งนี้ใกล้เคียงกับการยับยั้ง *F. oxysporum* ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่ยับยั้งได้ 86.75 % (Bunlangswan, 2010) และ 75.50% (Khan et.al., 2017)

อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาเพื่อค้นหาวีธีการยับยั้งเชื้อ *Fusarium* sp. ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ดังที่ Yacharone (2009) พบว่า *Actinomyces* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *F. oxysporum* ได้ 67.13% และ 20.69% ตามลำดับ ในขณะที่ Bunlangswan (2010) พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ด้วยเอนโดไฟต์ดิก และแอกติโนมัยสัทที่แยกได้จากราก ใบ และลำต้นของพริกและมะเขือเทศอยู่

ที่ระหว่าง 0-81.50% และงานวิจัยของ Tang-Um (2012) พบว่า *Streptomyces* เป็นปฏิปักษ์ต้านทานต่อเชื้อรา *F. oxysporum* และ *Fusarium* sp. *lycopercisi* ที่ก่อโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหาร PDA เท่ากับ 12.50% ทำให้ได้ข้อมูลและชนิดเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร สำหรับใช้แทนสารเคมีกำจัดโรคพืชต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้ใช้เชื้อราก่อโรคในพริก *Fusarium* sp. ที่ได้จากคลินิกสุขภาพพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ซึ่งทางคลินิกสุขภาพพืชทำการแยกเชื้อดังกล่าวจากพริกที่เป็นโรคในการทดลองครั้งต่อไปควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้

ข้อมูลและเชื้อปฏิปักษ์ที่จะนำผลการวิจัยไปประยุกต์ใช้กับเกษตรกรอย่างมีประสิทธิภาพ

1. เพื่อให้ผลการทดลองชัดเจนขึ้น ควรทำการระบุสปีชีส์ของเชื้อรา *Fusarium* สาเหตุของโรค
2. ศึกษาเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากแหล่งธรรมชาติอื่น ๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคเหี่ยวพืชมะเขือเทศได้ทั้งในรูปแบบการใช้เชื้อปฏิปักษ์แต่ละชนิด และหลายชนิดร่วมกัน
3. ควรทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งด้วยวิธีการอื่นเพิ่มเติม เพื่ออธิบายกลไกในการยับยั้งของเชื้อที่แยกได้
4. ตรวจสอบว่าเชื้อที่แยกได้นั้นไม่ทำให้เกิดอาการผิดปกติกับพืช



References

- Announcement of the Ministry of Public Health on foods that have toxic residues, 2017” (2017, 18 September). *Government Gazette*, 134(Special issue 228), 8-33. (in Thai)
- Bashir, R. M., Atiq, M., Sahi, T. S., Mohy-ud-Din, A., Mohsan, Abbas, W., Iqbal, M., Raheel, M., & Khan, Q. A. T. (2016). In-vitro antagonistic potential of different fungi against *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, 29(2), 248-257.
- Bovichian, R. (2018). *Agricultural economic data*. Retrieved from <http://www.oae.go.th/>. (in Thai)
- Bunlangswan, N. (2010). *Prevention of Alternaria Leaf Spot and Fusarium wilt diseases in chili and tomato using Endophytic actinomycetes and Trichoderma harzianum* (Master's thesis). Chiang Mai University, Chiang Mai. (in Thai)
- Cal, A. D., Szejnberg, A., Sabuquillo, P., & Melgarejo, P. (2009). Management Fusarium wilt on melon and watermelon by *Penicillium oxalicum*. *Biological Control*, 55(3), 480-486.
- Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA Isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11-15.

- FAO. (2016). *Crop production data*. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Ferniah, R. S., Pujiyanto, S., & Kusumaningrum, H. P. (2018). Indonesian red chilli (*Capsicum annuum* L.) capsaicin and its correlation with their responses to Pathogenic *Fusarium oxysporum*. *NICHE Journal of Tropical Biology*, 1(2), 7-12.
- Hamdi, N. B-M., Salem, I. B., & Hamdi, M. M. (2018). Evaluation of the efficiency of *Trichoderma Penicillium*, and *Aspergillus species* as Biological control agents against four soil-borne Fungi of melon and watermelon. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(25), 1-12.
- Jankura, E., & Lakatosava, J. (2014). Effect of *Aspergillus* spp. On *Fusarium oxysporum* pathogenic for grapevines. *37th World Congress of Vine and Wine, Mendoza, Argentina* (pp. 1-2). Mendoza, Argentina: Ministry of Agriculture, Livestock and Fisheries of Argentina.
- Khan, B., Akash, Z., Asad, S., Javed, N., Rajput, N. A., Jabbar, A., Din, W. U., & Atif, R. M. (2017). Antagonistic potential of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* associated with Panama wilt of banana. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 29(1), 111-116.
- Murtaza, A., Bokhari, S. A. A., Kanwal, I., Ali, Y., Ahmad, T., Habib, A., Mazhar, K., Hussain, M., & Randhawa, S. (2017). Anti-fungal potential of Chilli Germplasm Agent *Fusarium* wilt. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 29(01), 57-61.
- Nagendran, K., Loganathan, M., Saha, S., Mishra, A., Pandey, K. K., Rai, R. M., Gupta, S., Rai, A. B., & Singh, B. (2016). Biological management of wilt disease on chilli caused by *Fusarium solani*. *Vegetable Science*, 43(2), 253-256.
- Nareewuttikun, N. and Akarapisan, A. (2010). Evaluation of Bacterial Antagonistic efficiency for control of *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing tomato soil borne diseases. *Journal of Agriculture* 26(special), 147-154. (in Thai)
- Neela, F. A., Sonia, I. A., & Shamsi, S. (2014). Antifungal activity of selected medicinal plant extract on *Fusarium oxysporum* schlechtthe causal agent of *Fusarium* wilt disease in tomato. *American Journal of Plant Sciences*, 5(11), 2665-2671.
- Pandita, D., Bhat, M. A, Mir, S., Jabeen, N., Anwar, A., Hussain, K., Dar, N. A., Dar, S. Q., & Wani, M. Y. (2019). Screening of traditional chilli cultivars of Kashmir for *Fusarium* wilt resistance. *International Journal of Chemical Studies*, 7(1), 1501-1503.
- Prasannath, K., Karunakaran, S., & Mahendran, S. (2011). Control of *Fusarium* wilt of chilli (*Capsicum annuum*) by crude plant extracts. *Proceedings of the 10th Annual Research Session-2011*(pp. 291-294). Sri Lanka: Eastern University.

- Ruangsanka, S. (2014). Identification of Phosphate-Solubilizing Fungi from the asparagus rhizosphere as antagonists of the root and crown rot pathogen *Fusarium oxysporum*. *Science Asia*, 40(1), 16-20.
- Senadee, W., Pomlit, P., & Chaiyaporn, C. (2018). Turn the chili into a safe chili with the Chili Model. *Agricultural Housing*, 42(2), 63-87. (in Thai)
- Tang-um, J. (2012). *Anti-phytopathogenic fungal activity in tomatoes of Endophytic Streptomyces strain P4*. (Master's thesis). Graduate School, Chiang Mai University, Chiang Mai. (in Thai)
- Wani, S. A., Mohiddin, F. A., Hamid, B., Rizvi, G., Bhat, K. A., Hamid, A., Alam, A., Baba, Z. A., Padder, S. A., & Bhat, M. A. (2014). Incidence of Fusarium wilt of chilli (*Capsicum annum* L.) in Kashmir valley and its management by *Trichoderma* spp. *Mycopathologia*, 12(1), 1-8.
- Yacharone, S. (2009). *Screening of suitable Antagonist Microbes for Biological control of soil borne pathogens* (Master's thesis). Chiang Mai University, Chiang Mai. (in Thai)

