

ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคยอดฟักดาบ
(*Fusarium moniliforme* J. Sheld) ของข้าว

Efficiency of Actinomycetes in Controlling Bakanae Disease
(*Fusarium moniliforme* J. Sheld) of Rice

จันทร์ฉาย จันธิมา^{1/}

Chanchai Chantima^{1/}

ฉวีวรรณ มุกทา^{1/}

Chaweewan Mukta^{1/}

สรัญญา ณ ลำปาง^{1/}

Sarunya Nalumpang^{1/}

ABSTRACT

The efficiency of actinomycetes 6 isolates strain NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 and NSP6, in controlling *Fusarium moniliforme* causing Bakanae disease of rice were evaluated by dual culture methods. NSP1 showed the highest inhibitory effects to mycelial growth of *F. moniliforme* isolated from seed and stem of rice at average percentage of 87.19%. Then, these 6 actinomycetes were cultured on enzyme production medium (EPM) by shaking at 30°C for 5 days, and divided into two parts namely cell suspensions and culture filtrate. For testing on the inhibition of spore germinated by slide culture technique. The 5-day-old cell suspensions of each actinomycete isolate showed the inhibitory effect on the spore germination of the pathogen at percentage of 98.89, 98.61, 89.48, 74.38, 76.53 and 77.57%, respectively. After that, NSP1 were tested for controlling *F. moniliforme* on rice seeds by inoculated the pathogen for 24 hours and then soaked into cell suspensions and culture filtrate. The results showed that non pathogen were found on NSP1-soaked rice seeds, different from control. Moreover, 15 days after inoculated pathogen and NSP1 under greenhouse conditions, the height of rice seedling in treatment of inoculated NSP1 before pathogen were 1.39-fold stage from control, 1.16- and 1.32-fold stage in treatment of inoculated pathogen before NSP1 and dual inoculated pathogen and NSP1, respectively.

Key-words: actinomycetes, Bakanae disease, rice

^{1/} ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai province 50200

บทคัดย่อ

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคอดฟักดาบของข้าว โดยวิธี Dual culture พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท NSP1 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเสียใยการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. moniliforme* ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวและต้นข้าวสูงที่สุดซึ่งเฉลี่ย 87.19% จากนั้นเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์จำนวน 6 ไอโซเลท ในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) โดยเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C. เป็นเวลา 5 วัน แล้วแบ่งอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ cell suspensions และ culture filtrate ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรควิธี Slide culture พบว่าที่เวลา 6 ชม. หลังจากการทดสอบ cell suspensions ของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท ที่เลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *F. moniliforme* ได้ 98.89 98.61 89.48 74.38 76.53 และ 77.57% ตามลำดับ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ NSP1 ในการควบคุมเชื้อรา *F. moniliforme* บนเมล็ดข้าว โดยการปลูกเชื้อราสาเหตุบนเมล็ดข้าวเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นแช่เมล็ดข้าวใน cell suspensions และ culture filtrate ปรากฏว่าไม่พบเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวที่ต่างจากชุดควบคุม นอกจากนี้เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ใน

สภาพโรงเรือน เมื่อเปรียบเทียบความสูงต้นข้าวที่ทดสอบเป็นเวลา 15 วัน โดยความสูงของต้นข้าวหลังจากทดสอบเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ NSP1 ก่อนปลูกเชื้อเท่ากับ 1.39 1.16 และ 1.32 เท่า การทดสอบปลูกเชื้อก่อนเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ NSP1 และทดสอบเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ NSP1 และปลูกเชื้อพร้อมกัน ตามลำดับ

คำหลัก: เชื้อแอกติโนมัยซีสต์ โรคอดฟักดาบข้าว

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย โดยเฉพาะข้าวขาวดอกมะลิเป็นข้าวที่ได้รับความนิยมทั่วโลกเพราะมีคุณภาพดี ทำให้เป็นสินค้าเกษตรหลักชนิดหนึ่งที่ทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท (นิรนาม, 2554) โรคข้าวที่พบในประเทศไทยที่มีความสำคัญ ได้แก่ โรคอดฟักดาบ (Bakanae disease) เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. (*Fusarium moniliforme*) (Nelson, 1994) แพร่ระบาดในนาข้าว พบมากเขตภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่งผลให้ต้นข้าวเป็นโรคสูงกว่าปกติ ใบมีสีเหลืองซีด เกิดรากแขนงที่ข้อลำต้นตรงระดับน้ำ บางครั้งพบกลุ่มเส้นใยสีชมพูตรงบริเวณข้อที่ยางปล้องขึ้นมา ซึ่งต้นข้าวที่เป็นโรคจะตาย และผลผลิตของข้าวลดลง (ดารา, 2545) ในการป้องกันกำจัดโรค

ปัจจุบันคือการใช้เมล็ดพันธุ์จากแหล่งที่ไม่มีแหล่งระบาดของโรค และคลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยสารเคมี (ดาราและคณะ, 2550) ซึ่งการใช้สารเคมีส่งผลทำให้เชื้อราเกิดการต้านทานต่อสารที่ใช้ (ธรรมศักดิ์, 2543) โดยในปัจจุบันการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี กำลังได้รับความสนใจและมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เพื่อลดอันตรายจากการใช้สารเคมี โดยเฉพาะการนำเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ (actinomycete) สำหรับใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุ เนื่องจากเชื้อแอกติโนมัยซีสต์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชได้ (Goodfellow and Williams, 1983) นอกจากนี้ยังเป็นผลดีต่อสภาพแวดล้อม เกิดความสมดุลของระบบนิเวศ และลดการปนเปื้อนจากสารพิษตกค้าง ที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ โดยแอกติโนมัยซีสต์ที่ใช้ในการศึกษารังนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคหลายชนิด เช่น โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora* sp. สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดหอม (ณัฐพงษ์, 2553) เชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง (วิลาสินี, 2555) และเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุโรคใบไหม้ของสตอเบอรี่ (วรุตม์, 2554) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาระสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคนั้น จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดการใช้สารเคมี และลดปัญหาการเกิดความต้านทานต่อสารเคมีของเชื้อสาเหตุ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อราสาเหตุและการเก็บรวบรวมเชื้อราบริสุทธิ์

ตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวที่มีลักษณะอาการต่างบนเมล็ด และต้นข้าวที่แสดงอาการโรคยอดฝักดาบ ซึ่งลำต้นแสดงอาการยืดยาวผิดปกติ โดยนำเมล็ดข้าวที่เป็นโรคและชิ้นส่วนลำต้นที่เป็นโรค วางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เมื่อมีเส้นใยเจริญออกมาจากเมล็ดข้าวและลำต้นที่เป็นโรค ย้ายเชื้อราไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จานใหม่ด้วยใช้เทคนิค Hyphal tip isolation เมื่อได้เชื้อราบริสุทธิ์ เก็บเชื้อราสาเหตุบนอาหารเอียง (slant culture) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคยอดฝักดาบของข้าว

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ที่แยกจากดินบริเวณเขตป่า ที่อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วยวิธี Dual culture โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ที่เจริญบนอาหาร

เลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract - malt agar (GYM) เป็นเวลา 7 วัน ขีดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อยาว 3 ซม. ให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ซม. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นวางเชื้อราสาเหตุห่างจากเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ 3 ซม. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ โดยวัดรัศมีโคโลนีของเชื้อราทั้งชุดควบคุมและชุดทดสอบ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกหาเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพ cell suspensions และ culture filtrate ในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราสาเหตุ

เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ casein starch agar (CSA) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ ย้ายลงเลี้ยงในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปหมუნเหวียง แยกตะกอนออกด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 20 นาที แบ่งอาหารเหลวออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกคืออาหารเหลวในรูปของ cell suspensions

และส่วนที่ 2 นำอาหารเหลวส่วนใสที่ได้มากรองด้วยชุดกรองแบคทีเรีย (Minisart®) ขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ในรูป culture filtrate ส่วนเชื้อราสาเหตุโรคเตรียมในรูปแบบ spore suspension ปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^4 สปอร์/มล. จากนั้นทดสอบการยับยั้งการงอก สปอร์ของเชื้อราสาเหตุ โดยวิธี Slide culture technique โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์แต่ละส่วนที่เตรียมไว้ผสมลงใน spore suspension ของเชื้อราสาเหตุอย่างละ 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำมาเกลี่ย (spread plate) บนอาหาร PDA จากนั้นตัดชิ้นวุ้นขนาด 1x1 ซม. ย้ายไปวางบนสไลด์ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประเมินผลโดยตรวจดูการงอก germ tube เมื่อเวลาผ่านไป 6 และ 12 ชม. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุ โดยสปอร์ที่ถือว่างอกนั้น จะงอก germ tube ออกมามากกว่าความกว้างของสปอร์

3. การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อราบนเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด โดยแช่ในสารละลาย 10% Clorox เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 - 4 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง แล้วปลูกเชื้อราสาเหตุโรคโดยแช่เมล็ดข้าวใน spore suspension ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มล. เป็นเวลา 24 ชม. ผึ่งให้

แห้ง จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ไอโซเลท NSP1 ซึ่งมีประสิทธิภาพดีที่สุด ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแช่เมล็ดข้าวในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ 2 ส่วน (cell suspensions และ culture filtrate) ที่บ่มเขย่าเป็นเวลา 5 วัน เป็นเวลา 24 ชม. ซึ่งในแต่ละกรรมวิธีแช่เมล็ดข้าวจำนวน 100 เมล็ด ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ปริมาตร 5 มล. และนำเมล็ดข้าวในกรรมวิธีต่างๆ ฝังให้แห้ง ก่อนนำไปเพาะบนกระดาษขึ้น ด้วยวิธี Blotter method ตรวจสอบผลการทดลองโดยสังเกตการงอก ลักษณะสีของรากต้นกล้าข้าว รวมถึงวิเคราะห์การติดเชื้อที่ติดเมล็ด และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดข้าว หลังจากการเพาะเมล็ดข้าวเป็นเวลา 7 วัน

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ในการควบคุมโรคยอดฝักดาบของข้าวในโรงเรือน

เตรียมเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ไอโซเลท NSP1 โดยเลี้ยงในเมล็ดข้าวเจ้าสุกหนึ่งฆ่าเชื้อ และเชื้อรา *F. moniliforme* สาเหตุโรคยอดฝักดาบของข้าว โดยเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างหนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ในเรือนทดลอง โดยนำเชื้อรา *F. moniliforme* และเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ที่เลี้ยงเตรียมไว้ ผสมคลุกลงในดินที่อบฆ่าเชื้อแล้ว วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 3

ซ้ำๆ ละ 10 เมล็ด ตามกรรมวิธี (treatment) ดังนี้:

1. ดินฆ่าเชื้อ
2. ดินฆ่าเชื้อ + เมล็ดข้าวฟ่างฆ่าเชื้อ
3. ดินฆ่าเชื้อ + เมล็ดข้าวเจ้าสุกฆ่าเชื้อ
4. ดินฆ่าเชื้อ + เมล็ดข้าวฟ่างฆ่าเชื้อ + เมล็ดข้าวเจ้าสุกฆ่าเชื้อ
5. ดินฆ่าเชื้อ + เชื้อรา *F. moniliforme*
6. ดินฆ่าเชื้อ + เชื้อแอกติโนมัยซิสต์
7. ดินฆ่าเชื้อ + เชื้อแอกติโนมัยซิสต์ ก่อน 4 วัน + เชื้อรา *F. moniliforme* เป็นเวลา 7 วัน
8. ดินฆ่าเชื้อ + เชื้อแอกติโนมัยซิสต์ + เชื้อรา *F. moniliforme* พร้อมกัน
9. ดินฆ่าเชื้อ + เชื้อรา *F. moniliforme* ก่อน 7 วัน + แอกติโนมัยซิสต์ เป็นเวลา 4 วัน

โดยที่ในแต่ละกรรมวิธีใช้เวลาในการคลุกเชื้อราสาเหตุ และเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ลงดิน และบ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำจึงปลูกเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 หลังจากการปลูกข้าวเป็นเวลา 15 วัน ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ในการยับยั้งการเกิดโรคยอดฝักดาบของข้าว โดยตรวจสอบผิดปกติของต้นข้าว คือ ความสูงและสีของใบข้าว เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อราสาเหตุและการเก็บรวบรวมเชื้อราบริสุทธิ์

แยกเชื้อราสาเหตุจากเมล็ดข้าวที่แสดง

อาการต่างสามารถแยกเชื้อราได้ จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ FmRSe1, FmRSe2, FmRSe3 และ FmRSe4 และจากลำต้นของข้าวที่แสดงอาการ โรคยอดฝักดาบโดยมีลักษณะยืดยาวผิดปกติได้ ทั้งหมด 4 ไอโซเลท ได้แก่ FmRSt1, FmRSt2, FmRSt3 และ FmRSt4 เมื่อศึกษาลักษณะทาง ลัญฐานวิทยา พบว่าลักษณะเชื้อราที่แยกสร้างโค โลงนีสีชมพูและสีม่วงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าสร้างสปอร์ 2 ชนิด ได้แก่ macroconidia มีขนาดใหญ่รูปร่างยาวเรียว 2 - 3 เซลล์ ขนาด 1.7-3.6 x 44.9-60.6 ไมโครเมตร และ microconidia ซึ่งมีเพียง 1 - 2 เซลล์ ขนาดเล็ก ใสไม่มีสี ขนาด 1.3-2.5 x 5.0-9.0 ไมโครเมตร ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะของ เชื้อรา *Fusarium moniliforme* (ทวิชและนุชนารถ, 2545; Nelson et al., 1994)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัย ซีสต์ ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคยอดฝักดาบของข้าว

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการ ยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *F. moniliforme* 8 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ FmRSe1, FmRSe2, FmRSe3 และ FmRSe4 และแยกจากลำต้นของข้าวจำนวน

4 ไอโซเลท ได้แก่ FmRSt1, FmRSt2, FmRSt3 และ FmRSt4 โดยวิธี Dual culture พบว่าที่ เวลา 7 วัน หลังจากการทดสอบ เชื้อแอกติโนมัย ซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ เส้นใยเชื้อรา *F. moniliforme* สาเหตุโรคยอดฝักดาบทั้ง 8 ไอโซเลท อยู่ระหว่าง 73.57 - 87.19% โดยเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท NSP1 NSP2 NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 มีเปอร์เซ็นต์ การยับยั้งเชื้อรา 87.19 79.95 79.02 73.57 79.48 และ 82.67% ตามลำดับ และเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท NSP1 มีประสิทธิภาพสูง ที่สุดเฉลี่ย 87.19% (Table 1) สอดคล้อง กับวรุตม์ (2554) ที่พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ ไอโซเลท NSP1 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการ ยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุโรคใบไหม้ของสตอเบอรี่ โดยมีประสิทธิภาพในการ ยับยั้ง 89.98%

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพ cell suspensions และ culture filtrate ในการ ยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราสาเหตุ

Cell suspensions ของเชื้อแอกติโนมัย ซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท ที่ป่มเป็นเวลา 5 วัน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *F. moniliforme* สาเหตุโรคยอดฝักดาบที่เวลา 6 ชม. หลังจากการทดสอบอยู่ระหว่าง 74.38 - 98.89% ซึ่งเรียงประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ใน การยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อราจากมากไปน้อยได้ ดังนี้ NSP1, NSP2, NSP3, NSP6, NSP5 และ NSP4 โดยยับยั้งการงอกสปอร์ได้ 98.89 98.61 89.48 77.59 76.53 และ 74.38% ตามลำดับ

และที่เวลา 12 ชม. หลังจากการทดสอบ สามารถยับยั้งสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคได้ ระหว่าง 9.33 - 90.47% ซึ่งเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรามากกว่า 70% ได้แก่ NSP2, NSP1 และ NSP3 สามารถยับยั้งการงอกสปอร์ได้ 90.47 83.5 และ 80.50% ตามลำดับ สำหรับ culture filtrate ของเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ที่บ่มระยะเวลา 5 วัน สามารถยับยั้งสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคได้ในระหว่าง 48.15 - 96.16% ซึ่งเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรามากกว่า 70% ได้แก่ NSP2, NSP1, NSP3 และ NSP4 สามารถยับยั้งการงอกสปอร์ได้ 96.16 91.67 84.75 และ 74.17% ตามลำดับ และหลังจากการทดสอบเป็นเวลา 12 ชม. สามารถยับยั้งสปอร์ของเชื้อรา

สาเหตุโรคได้ในระหว่าง 9.25 - 75.25% ซึ่งเชื้อเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรามากกว่า 70% ได้แก่ NSP3 และ NSP2 สามารถยับยั้งการงอกสปอร์ได้ 75.25 และ 70.96% (Table 2) นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบลักษณะของความผิดปกติของสปอร์เชื้อราสาเหตุที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ พบว่าสปอร์มีรูปร่างผิดปกติต่างจากชุดควบคุม โดยมีผนังสปอร์แตกยุ่ย เส้นใยแตกเป็นกระจุก ไม่สามารถเจริญยืดยาว (Figure 1) และจากผลการทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspensions ทั้งหมดพบว่ามีประสิทธิภาพมากกว่า culture filtrate เนื่องจาก cell suspensions ยังคงมีเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสามารถสร้างสารทุติยภูมิได้อย่างต่อเนื่อง ทำให้มีประสิทธิภาพมากกว่า culture filtrate ที่

Table 1. Efficacy of actinomycetes on mycelia growth inhibition of *Fusarium moniliforme* causing Bakanae disease by Dual cultures methods on glucose yeast extract-malt agar (GYM), incubated for 10 days

Actino- mycetes isolate	Percent inhibition of colony growth								Average
	FmRSe1	FmRSe2	FmRSe3	FmRSe4	FmRSt1	FmRSt2	FmRSt3	FmRSt4	
NSP1	84.43	90.06	78.22	86.53	84.55	88.77	89.19	95.77	87.19 a
NSP2	73.77	87.14	82.18	75.18	73.76	86.95	80.27	80.34	79.95 bc
NSP3	77.05	84.80	77.23	81.56	79.59	78.33	68.38	85.20	79.02 bc
NSP4	67.21	84.80	74.26	70.22	65.01	82.51	65.68	78.86	73.57 c
NSP5	68.03	86.55	65.35	73.76	72.89	94.78	86.49	87.95	79.48 bc
NSP6	77.87	84.80	78.22	82.27	81.63	82.51	81.89	92.18	82.67 ab
CV (%)									8.51
LSD_{.05}									3.42

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by LSD.

Table 2. Efficacy of actinomycetes culture mediums, incubated for 5 days on inhibiting spore germination of *Fusarium moniliforme* causing Bakanae disease.

Actinomycetes isolate	Percent inhibition of spore germination			
	Cell suspensions		Culture filtrate	
	6 hours	12 hours	6 hours	12 hours
NPS1	98.89 a ²	83.52 a	91.67 a	56.31 a
NSP2	98.61 a	90.47 a	96.16 a	70.96 a
NSP3	89.48 a	80.50 a	84.75 ab	75.25 a
NSP4	74.38 b	9.33 c	74.17 ab	14.76 b
NSP5	76.53 b	11.72 bc	48.15 c	9.25 b
NSP6	77.59 b	21.02 b	65.39 bc	21.47 b
CV (%)	4.57	9.37	13.63	29.20
LSD_{.05}	9.59	11.33	25.58	29.53

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by LSD.

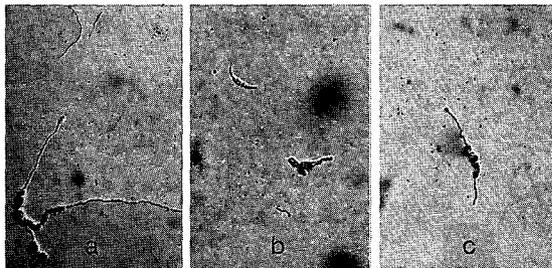


Figure 1. Efficacy of cell suspensions and culture filtrate incubated for 5 days on inhibiting spore germination of *Fusarium moniliforme* causing Bakanae disease at 12 hours after test (40X): a = control, b = cell suspensions and c = culture filtrated

มีเฉพาะสารทุติยภูมิเท่านั้น ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์มีผลต่อการชะลอการงอกของสปอร์ เพราะเชื้อรายังคงงอกเส้นใยได้เมื่อเวลาผ่านหลายชั่วโมง และส่งผลลักษณะสปอร์เชื้อรามีลักษณะผิดปกติ รูปร่างวม พนังเซลล์ยู่

เส้นใยแตกแขนงเป็นกระจุก เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของวิลาสินี (2555) ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sacc สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด cell suspensions และ culture filtrate ไอโซเลท NSP4 และ NSP1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสปอร์ได้สูงที่สุด 89.98 (NF) 40.38 (F) และ 88.01 (NF) 41.42% (F) ตามลำดับ ตามผลการศึกษาค้นคว้าต้องการควบคุมโรคยอดฝักดาบของข้าว เกษตรกรควรเลือกใช้ cell suspensions เนื่องจากผลการทดลองสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุได้ดี นอกจากนี้การใช้เชื้อแอกติโนมัยซีสต์นั้นได้ใช้กับเมล็ดพันธุ์ข้าว ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคได้

3. การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อราบนเมล็ดข้าว

คัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท NSP1 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสูงสุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM โดยวิธี Dual culture เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *F. moniliforme* ที่ติดมาเมล็ดข้าวสุพรรณบุรี 60 พบว่าเมล็ดข้าวที่ฆ่าเชื้อที่ผิว และเมล็ดข้าวที่แช่ cell suspensions และ culture filtrate ไม่มีเชื้อราเจริญที่ผิวเมล็ดข้าวเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุ

ซึ่งพบเชื้อราสาเหตุติดภายนอกเมล็ด 5% เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวที่ปลูกเชื้อราสาเหตุแล้วแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ทั้ง 2 ส่วน คือ cell suspensions และ culture filtrate ไม่พบเชื้อราติดมากับภายนอกเมล็ด จากผลการทดสอบแสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์สามารถควบคุมเชื้อราบนเปลือกเมล็ดภายนอกได้ นอกจากนี้เมื่อทดสอบความงอกพบว่าเมล็ดข้าวที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ cell suspensions และ culture filtrate ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวที่ไม่ฆ่าเชื้อที่ผิวแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

Table 3. Efficacy of actinomycetes culture mediums for controlling *Fusarium moniliforme* causing Bakanae disease on rice seed by Blotter method for 10 days

Treatment	Percentage	
	Contamination	Germination
Control		
- seed rice non surface sterile + sterilized distilled water	1 b	85 c
- seed rice surface sterile by 10% Clorox + sterilized distilled water	0 b	91 c
-seed rice + <i>Fusarium moniliforme</i>	5 a	88 c
-seed rice + culture filtrate	0 b	93 a
-seed rice + cell suspensions	0 b	96 a
Treatment		
- seed rice + <i>F. moniliforme</i> + culture filtrate	0 b	94 a
- seed rice + <i>F. moniliforme</i> + cell suspensions	0 b	96 a
CV (%)	3.10	2.73
LSD_{.01}	3.44	5.91

Mean in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by LSD.

ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การงอก 94 96 และ 85% ตามลำดับ (Table 3) ส่วนสีของรากของต้นกล้าในชุดทดสอบที่แช่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด มีลักษณะรากสมบูรณ์ มีสีขาว ต่างจากชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุที่มีลักษณะรากสีน้ำตาล โคนเน่า รากฝอยมีจำนวนน้อย ดังนั้นแสดงว่าการนำเมล็ดข้าวมาแช่อาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิสต์ชนิดสามารถควบคุมเชื้อราที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดข้าวเพื่อลดการเกิดโรคถดถอยได้ และยังส่งเสริมการงอกของเมล็ดข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับรายงานของ วรธรรมน (2554) ที่ใช้เชื้อแอคติโนมัยซิสต์ชนิด cell suspensions และ culture filtrate ในการแช่เมล็ดพริก เมื่อตรวจสอบความงอกเมล็ดพริกสามารถงอกได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกอยู่ในระหว่าง 91.0 - 99.0%

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซิสต์ในการควบคุมโรคถดถอยของข้าวในโรงเรือน

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซิสต์ไอโซเลท NPS1 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสูงสุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM โดยวิธี Dual culture ในการยับยั้งการเกิดโรคถดถอยของข้าวในเรือนทดลอง พบว่าหลังจากนำเมล็ดข้าวไปปลูกเป็นเวลา 15 วัน ต้นข้าวที่ปลูกเชื้อแสดงอาการผิดปกติมีความสูงเท่ากับ 12.55 ซม. ในขณะที่ทดสอบใช้เชื้อแอคติโนมัยซิสต์ก่อนการปลูกเชื้อมีความสูงเท่ากับ 9.03 ซม. และทดสอบใส่เชื้อแอคติโนมัยซิสต์หลังการปลูกเชื้อพบว่าต้นข้าวมีความสูง 10.79 ซม. นอกจากนี้การใช้เชื้อแอคติโนมัยซิสต์พร้อมกันกับการปลูกเชื้อ พบว่า

Table 4. Efficacy of actinomycetes for controlling *Fusarium moniliforme* causing Bakanae disease in green house condition for 15 days

Treatment	Height of rice seedling (cm)
Sterile soil	11.11 ab
Sterile soil + <i>F. moniliforme</i>	12.55 a
Sterile soil + actinomycetes	11.04 b
Sterile soil + actinomycetes before 4 days + <i>F. moniliforme</i> 7 days	9.03 d
Sterile soil + actinomycetes + <i>F. moniliforme</i> together	9.48 cd
Sterile soil + <i>F. moniliforme</i> before 7 days - actinomycetes 4 days	10.79 bc
CV (%)	7.75
LSD_{.05}	1.44

Mean in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by LSD.

ต้นข้าวมีความสูง 9.48 ซม. เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Table 4) ซึ่งการใช้เชื้อแอกติโนมัยซีสต์สามารถทำให้ลดการโรคอดปักตาบจากเชื้อราสาเหตุได้ เนื่องจากเชื้อแอกติโนมัยซีสต์สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุอาจจะอาศัยกลไกที่สำคัญ โดยการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา สอดคล้องกับรายงานของพรนภา (2554) ที่ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โคติเนสในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ผลิตเอนไซม์โคติเนสเป็นส่วนใหญ่ และสามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกได้

สรุปผลการทดลอง

เชื้อแอกติโนมัยซีสต์ที่แยกได้จากดินบริเวณเขตป่า ที่อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย ไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *F. moniliforme* สาเหตุโรคอดปักตาบของข้าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract-malt agar (GYM) ระหว่าง 73.57 - 87.19% ซึ่งเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท NSP1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด โดยเฉลี่ย 87.19% เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ในการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *F. moniliforme* โดยใช้รูปแบบ cell suspensions

และ culture filtrate ที่บ่มเป็นเวลา 5 วัน พบว่าที่เวลา 6 ชม. เชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท NSP1, NSP2 และ NSP3 ในรูปแบบ cell suspensions มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา โดยมีการยับยั้ง 98.89 98.61 และ 89.48% ตามลำดับ นอกจากนี้สปอร์ของเชื้อรามีลักษณะรูปร่าง และขนาดผิดปกติ เช่น ลีบ หักหลุดและเจริญไม่ยืดยาว ลักษณะเส้นใย และแตกเป็นกระจุก จากการทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspensions และ culture filtrate ไอโซเลท NSP1 โดยการแช่เมล็ดข้าวพบว่าเมล็ดข้าวที่ปลูกเชื้อราสาเหตุแล้วแช่ใน cell suspensions และ culture filtrate ไม่พบเชื้อราบนเปลือกภายนอกเมล็ด และมีการงอก 94 และ 96% ต้นกล้าสามารถงอกได้ปกติ นอกจากนี้ลักษณะรากของต้นกล้าที่แช่ cell suspensions และ culture filtrate ลักษณะรากสมบูรณ์มีสีเขียว และจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท NSP1 ในการควบคุมเชื้อรา *F. moniliforme* ในสภาพเรือนทดลอง พบว่าหลังจากนำเมล็ดข้าวไปปลูกเป็นเวลา 15 วัน ต้นข้าวที่ปลูกเชื้อแสดงอาการผิดปกติมีความสูง 12.55 ซม. ในขณะที่ทดสอบใช้เชื้อแอกติโนมัยซีสต์ก่อนการปลูกเชื้อมีความสูง 9.03 ซม. และทดสอบใส่เชื้อแอกติโนมัยซีสต์หลังการปลูกเชื้อพบว่าต้นข้าวมีความสูง 10.79 ซม. นอกจากนี้การใช้เชื้อแอกติโนมัยซีสต์พร้อมกันกับการปลูกเชื้อพบว่าต้นข้าวมีความสูง 9.48 ซม. เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการเงินทุนสนับสนุนการวิจัยบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และขอขอบคุณ หัวหน้าห้องปฏิบัติการสาขาวิชาโรคพืชภาคกีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย และดร.สรัญญา ณ ลำปาง สำหรับการอนุเคราะห์เชื้อแอกติโนมัยซิสต์

เอกสารอ้างอิง

ดารา เจตนะจิตร นงรัตน์ นิลพานิชย์ พากเพียร อรัญนารก วิชิต ศิริสันธนะ วิชชุดา รัตนากาญจน์ รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ เขียวภา ตันติวานิช วันชัย โรจนหัสติน และจรรยา อารยาพันธ์. 2545. *คู่มือโรคข้าว*. กลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืช เมืองหนาว กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 40 หน้า.

ดารา เจตนะจิตร นงรัตน์ นิลพานิชย์ พากเพียร อรัญนารก วิชิต ศิริสันธนะ วิชชุดา รัตนากาญจน์ รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ วันชัย โรจนหัสติน และธัญลักษณ์ อารยาพันธ์. 2550. *โรคข้าวและการป้องกันกำจัด*. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 68 หน้า.

ณัฐพงษ์ นวลดี. 2553. *การวิเคราะห์พันธุกรรมและความควบคุมเชื้อรา Cercospora spp. ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมโดยใช้เชื้อแอกติโนมัยซิสต์*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 164 หน้า.

ทวิช พุ่มวงษ์ และนุชนารถ จงเลขา. 2545. *ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเหง้าขมิ้นแห้งในการควบคุม เชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยวิธีการคลุก และวิธีการแช่เมล็ด*. สถาบันวิทยาการหลังการเกี่ยวเกี่ยว และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 6 หน้า.

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2543. *สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช*. พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์ลินคอร์น กรุงเทพฯ. 371 หน้า.

นิรนาม. 2554. *สถิติการส่งออก (Export) ข้าวหอมมะลิ: ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน*. http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php: 28 กุมภาพันธ์ 2553.

ประพาส วีระแพทย์. 2526. *ความรู้เรื่องข้าว*. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 108 หน้า.

พรนภา โทตรี. 2554. *ผลของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซิสต์ที่ผลิตเอนไซม์โคติเนสต่อเชื้อรา Colletotrichum spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 123 หน้า.

วรรษมน บุญยั้ง. 2553. *การวิเคราะห์ และการควบคุมเชื้อรา Colletotrichum spp. ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในพริก*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์

- มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
180 หน้า.
- วรุตม์ ใจปิ่น. 2554. การควบคุมเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุโรคใบไหม้ของสตอเบอรี่โดยใช้เชื้อปฏิปักษ์แอกติโนไมซีสต์. ปัญหาพิเศษระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 81 หน้า.
- วิลาลินี แสงนาค. 2555. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์จากดินในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 201 หน้า.
- Goodfellow, M. and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37: 189-216.
- Nelson, P.E., C.M. Dignani and E.J. Anaissie, 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 7(4): 479-504.