ประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อรา Prochloraz, Propiconazole + Difenoconazole และเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว

Efficiency Test of Prochloraz, Propiconazole + Difenoconazole Fungidides and Actinomycetes in Controlling Fungal Causing Dirty Panicles of Rice

วิลาสินี แสงนาค[1/,2/,3/] ออวิษณุ โหมดเทศ[1/] สรัญยา ณ ลำปาง[1/,2/,3/]

Vilasinee Saengnak[1/,2/,3/] Witsanu Modted[1/] Sarunya Nalumpang[1/,2/,3/]

ABSTRACT

The effiicacy of two systemic fungicides namely prochloraz and propiconazole + difenoconazole with half- and recommended concentrations, were completely inhibited (100%) the mycelia growth of *Curvularia* sp. and *Helminthosporium* sp. causing dirty panicles of rice on potato dextrose agar (PDA), but the highest percentage of inhibiting the conidial germination was found at 49.32%. While six effective actinomycetes namely NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 and NSP6, were inhibited the mycelia growth of *Curvularia* sp. ranging from 48.00 - 82.22%, and 48.00 - 74.22% against *Helminthosporium* sp. on PDA. Nevertheless, the highest percentage of inhibiting the conidial germination of the culture medium (NF) and culture filtrate medium (F) of isolate NSP2 and NSP6 were found at 92.39%. For the effect of two systemics and the NF- and F-type culture mediums were found in same results, which germ tube length of control developed longer than treated treatments. Abnormally-appearance of germinated conidias was found in treated treatments. Moreover, if the conidia were found abnormal, the conidial germination and mycelium development could not take place. While the germination were found in normally conidia but delay comparable to control.

Key-words: systemic fungicide, actinomycetes, dirty panicle of rice

1/ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

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

2/ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

2/ Centre for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Kamphaeng Saen district, Nakhon Pathom 73140

3/ ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

3/ Centre for Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE, Science and Technology Postgraduate of Higher Education Comission, Education Research Development Office, Chatuchak, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

สารป้องกันกำจัดเชื้อรา prochloraz และ propiconazole + difenoconazole ที่ความเข้มข้นครึ่งและตามอัตราแนะนำของผู้ผลิต มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia* sp. และ *Helminthosporium* sp. สาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าวบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ได้ 100% แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์สูงสุด 49.32% ในขณะที่เชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia* sp. บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อยู่ระหว่าง 74.67 - 82.22% และเชื้อรา *Helminthosporium* sp. ระหว่าง 48.00 - 74.22% แต่เชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP2 และ NSP6 ในรูปแบบของอาหารเลี้ยงเชื้อในส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (culture medium, NF) และส่วนที่กรองเอาเชื้อออก (culture filtrate medium, F) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคสูงสุด 92.39% สำหรับการตรวจสอบความยาว germ tube พบว่าเชื้อราที่ทดสอบทั้งสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 2 ชนิด และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 2 ส่วน ให้ผลเช่นเดียวกันคือ germ tube ของเชื้อราในชุดควบคุมมียาวกว่าชุดทดสอบ และยังพบความผิดปกติที่ของสปอร์เชื้อราในชุดทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าหากสปอร์เชื้อรางอกมีลักษณะผิดปกติ ไม่สามารถงอกและพัฒนาไปเป็นเส้นใยต่อไปได้ ส่วนสปอร์ที่มีลักษณะปกติยังสามารถงอกได้แต่งอกช้ากว่าชุดควบคุม และมี germ tube สั้นกว่าสปอร์เชื้อราในชุดควบคุม

คำหลัก: สารป้องกันกำจัดเชื้อรา prochroraz, propiconazole + difenoconazole, แอกติโนไมซีสต์ โรคเมล็ดด่างของข้าว

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญที่สุดของประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศกสิกรรม และคนไทยบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก นอกจากนี้ยังมีประชากรมากกว่าหนึ่งในสามของโลกที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลักโดยเฉพาะทวีปเอเชีย ซึ่งทำการผลิตและบริโภคประมาณ 90% ของการผลิตและการบริโภคทั่วโลก (Herdt, 1991) สำหรับประเทศไทยมีที่ดินในการปลูกข้าวมากที่สุดเป็นอันดับห้าของโลก และเป็นผู้ส่งออกข้าวเป็นอันดับหนึ่งของโลก ทำรายได้หลักให้กับประเทศไทยปีละหลายล้านบาท และมีการวางแผนเพื่อเพิ่มที่ดินเพาะปลูกข้าวให้มากยิ่งขึ้น (เอกสงวน, 2544) แต่ปัญหาหนึ่งที่สำคัญส่งผลกระทบต่อของการผลิตข้าวคือ โรคเมล็ดด่าง (dirty panicle) มีสาเหตุมาจากเชื้อราหลายชนิด เช่น เชื้อรา *Curvularia* lunata (Wakker) Boedjin, *Cercospora oryzae* T. Miyake, *Alternaria padwikii* (Ganguly) M.B. Ellis, *Helminthosporium* oryzae Berk+Ravenel, Brede de Haan, *Fusarium semitectum*,

Trichoconis padwicki Ganguly และ *Sarocladium oryzae* Sawada W. Gams + D. Hawksw. เป็นต้น ตามรายงานของดาราและคณะ (2550) ที่ได้รวบรวมรายงานโรคข้าวที่สำคัญในประเทศไทย พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างที่พบมากคือ เชื้อรา *C. lunata*, *H. oryzae* และ *Trichoconis padwickii* นอกจากนี้อัญชลีและคณะ (2546) ยังพบว่าความรุนแรงของโรคเมล็ดด่างมากขึ้นมีผลทำให้ระยะเวลาการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ข้าวลดลง โดยเฉพาะที่ระดับความรุนแรงของโรคที่ 25% มีผลทำให้ระยะเวลาการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งเมื่อความรุนแรงของโรคเมล็ดด่างรุนแรงขึ้น 1% มีผลทำให้ผลผลิตข้าวลดลง 0.48% (พากเพียรและคณะ, 2533) และถ้าหากเก็บรักษาข้าวที่เป็นโรคเมล็ดด่างในระยะเวลามากกว่า 3 เดือน ส่งผลกระทบต่อความงอกของเมล็ดพันธุ์ (ทิพสุดาและคณะ, 2539) ลักษณะอาการของข้าวที่เป็นโรคเมล็ดด่างจะไหม้ทั้งรวงเมล็ดลีบเป็นบางส่วน บนเมล็ด ส่วนใหญ่มีแผลเป็นจุดสีน้ำตาลดำ บางส่วนก็มีสีน้ำตาลและบางส่วนก็มีสีเทาปนชมพู แตกต่างกันตามเชื้อราสาเหตุ โรคเมล็ดด่างมักเกิดระหว่างที่ดอกข้าวผสมแล้วอยู่ในระยะเป็นน้ำนม และกำลังสุกเมื่อใกล้เก็บเกี่ยว อาการเมล็ดด่างจะปรากฏเด่นชัด โรคนี้สามารถแพร่กระจายไปกับลม ติดไปกับเมล็ด และอาจทำให้เชื้อราแพร่กระจายในยุ้งฉางได้ (นิรนาม, 2536)

ในการควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มีหลายวิธี ซึ่งวิธีที่มักนิยมใช้มากที่สุดคือ วิธีคลุกเมล็ดด้วยสารเคมี เพื่อกำจัดเชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ และป้องกันเมล็ดพันธุ์จากการเข้าทำลายของโรคและแมลงที่อยู่ในดิน ก่อนนำเมล็ดพันธุ์ไปปลูก (จวงจันทร์, 2529) ซึ่งสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) เป็นสารเคมีชนิดดูดซึมที่ได้รับความนิยม หรือมีการใช้อย่างแพร่หลายเป็นระยะเวลากว่า 30 ปี สามารถควบคุมป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด (broad-spectrum) ได้ผลดีและรวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีกลุ่มนี้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชเกิดการปรับตัวเอง หรือกลายพันธุ์ (mutant) ให้ต้านทานต่อสารเคมีเพื่อความอยู่รอด (Koenraadt *et al.*, 1992) โดยมีรายงานการต้านทานต่อสารเบนซิมิดาโซลของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการใช้สารเคมีลดลง และทำให้อายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์สั้นลงด้วย (วันชัย, 2542) นอกจากนี้การใช้สารเคมีในการกำจัดโรคพืชนั้น ส่งผลให้เป็นพิษต่อคน สัตว์ พืช และสภาพแวดล้อม รวมทั้งความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เนื่องจากสารเคมีเกือบทุกชนิดเป็นสินค้านำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ต้องเสียดุลการค้าไปเป็นจำนวนเงินมหาศาลในแต่ละปี (สืบศักดิ์, 2540)

ปัจจุบันยังมีงานวิจัยอีกจำนวนมากที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี โดยเป็นการใช้เชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งเชื้อแอกติโนไมซีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติหลายประการ ได้แก่ การย่อยสลายอินทรียวัตถุ

สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟทในรูปที่พืชนำไปใช้ได้ และยังนำไปใช้ในการควบคุมศัตรูพืช (มาลินี, 2540) สำหรับงานวิจัยนี้ให้ความสนใจในการนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์ 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเมล็ดด่างของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากเขตป่า ที่อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย (Suthep-Pui National Park) อ.เมือง จ.เชียงใหม่ และผ่านการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูง ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก และเชื้อรา *Cercospora lactucae-sativae* สาเหตุโรคใบจุดในผักกาด (ณัฐพงศ์, 2553; วรรษมน, 2553) โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย 100% นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme*, J.Sheldon *Curvilaria lunata* และ *Helminthosporium oryzae* สาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ *F. oxysporum* f. sp. *capsici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของพริก, *Pestalotiopsis* sp. สาเหตุโรคใบไหม้ของสตรอเบอร์รี และ *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Sace สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง (จันทร์ฉาย, 2553; จิราภรณ์, 2553; ชิงชัย, 2553; ฉวีวรรณ, 2553; วราพรรณ์, 2553; วิลาสินี, 2555) ได้มากกว่า 70% และเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้งหมดยังมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส อะไมเลสและไคติเนส (ณัฐพงศ์, 2553; วรรษมน, 2553; วิลาสินี, 2555; Suwan, 2012) นอกจากนี้จากการจัดจำแนกด้วยวิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ และการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บางส่วนของตำแหน่ง 16S rDNA gene พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Streptpmyces* (วิลาสินี, 2555; Suwan *et al.*, 2012) ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของทั้งสารป้องกันกำจัดโรคพืช และประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ควบคุมโรคแบบผสมผสานต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์

เตรียมเชื้อราสาเหตุโรคโดยแยกจากเมล็ดข้าวที่แสดงอาการของโรคเมล็ดด่าง ฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดโดยการแช่ใน 1% sodium hypoclorite (10% Clorox) เป็นเวลา 10 นาที ล้างทำความสะอาดในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจำนวนสองครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อ จากนั้นนำเมล็ดข้าวไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) จำนวน 15 เมล็ด/จาน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 ± 2 °ซ. เป็นเวลา 3 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

5 มม. เจาะปลายเส้นใยเชื้อราที่เจริญออกมาจากเมล็ดไปทำให้บริสุทธิ์โดยการเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง แล้วจึงเก็บเชื้อราไว้ในหลอดอาหารเอียง (PDA slant) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เก็บไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เตรียมเชื้อแอกติโนไมซีสต์ 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 จากภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract-malt extract agar (GYM) เป็นเวลา 10 วัน ก่อนการทดสอบ

2. ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าว

ทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึม 2 ชนิด ได้แก่ prochloraz (Oxthap, Bayer Crop Protection Co., Ltd.) อัตราแนะนำ 500 ppm และ propiconazole + difenoconazole (Amure 300EC, Syngenta Group Company Co., Ltd.) อัตราแนะนำ 225 ppm โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด โดยให้ปริมาตรสุดท้ายมีความเข้มข้น 2 ระดับคือ ความเข้มข้นครึ่งอัตราแนะนำและความเข้มข้นตามอัตราแนะนำของผู้ผลิต

การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ

ทดสอบด้วยวิธี Dual culture method โดยนำชิ้นเชื้อราสาเหตุโรค (culture disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน วางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่เตรียมไว้ ส่วนชุดควบคุมวางเชื้อราสาเหตุโรคที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ไม่ได้ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา การทดลองวางแผนแบบ CRD ประกอบด้วย 3 ซ้ำ เมื่อเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราทั้งในชุดควบคุมและชุดทดสอบ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (percent Inhibition of colony growth, PICG)

$$\text{โดยใช้สูตร PIRG} = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

เมื่อ R_1 คือความยาวรัศมีของเชื้อราชุดควบคุมและ และ R_2 คือชุดทดสอบ (เกษม, 2532)

การยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุ

ทดสอบด้วยวิธี Slide culture method โดยเตรียมเชื้อราสาเหตุในรูปสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) นับจำนวนสปอร์ด้วย heamacytometer ให้ได้ความเข้มข้น 10^5 สปอร์/มล. จากนั้นนำมาเกลี่ย (spread) บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่เตรียมไว้ แล้วตัดชิ้นวุ้นให้มีขนาด 1 × 1 ซม. นำไปวางในชุด slide culture ส่วนชุดควบคุมเกลี่ย spore suspension ของเชื้อราสาเหตุโรคที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ไม่ได้ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา การทดลองวางแผนแบบ CRD ประกอบด้วย 3 ซ้ำ ตรวจสอบผลโดยนับการงอกของสปอร์เชื้อราที่เวลา 3 6 9 และ 12 ชม.

หลังจากการทดสอบ โดยสปอร์ที่ถือว่างอกนั้นต้องงอก germ tube ออกมามากกว่าความกว้างของสปอร์ และการตรวจดูลักษณะ รวมถึงการตรวจนับการงอกของสปอร์ โดยสุ่มทั้งหมด 5 ตำแหน่ง ได้แก่ บริเวณรอบชิ้นวุ้น 4 ตำแหน่ง และตรงกลางชิ้นวุ้นอีก 1 ตำแหน่ง จากนั้นนำข้อมูลการงอกของสปอร์ที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุ

$$\text{โดยใช้สูตร } \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

เมื่อ A คือจำนวนสปอร์เชื้อราในชุดควบคุม และ B คือชุดทดสอบที่งอก (เกษม, 2532)

จากนั้นวัดความยาว germ tube ของเชื้อรา แล้วคำนวณอัตราส่วนความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อราชุดควบคุมต่อชุดทดสอบ โดยที่ค่ามากกว่า 1 หมายถึง germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมยาวกว่าชุดทดสอบ น้อยกว่า 1 หมายถึง germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดทดสอบยาวกว่าชุดควบคุม และเท่ากับ 1 หมายถึง germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมและชุดทดสอบยาวเท่ากัน

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าว

การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ

ทดสอบด้วยวิธี Dual culture method โดยขีด (streak) เชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM เป็นเวลา 10 วัน บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM ที่ใช้ในการทดสอบให้มีความยาว 3 ซม. ห่างจากขอบจานอาหาร 2 ซม. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน เพื่อให้เชื้อแอกติโนไมซีสต์สร้างสารทุติยภูมิ จากนั้นนำชิ้นเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. มาวางด้านตรงข้ามกับเชื้อแอกติโนไมซีสต์ และห่างจากขอบจานอาหาร 2 ซม. ส่วนชุดควบคุมวางชิ้นเชื้อราในตำแหน่งเดียวกับชุดทดสอบ แต่ไม่ขีดเชื้อแอกติโนไมซีสต์ การทดลองวางแผนแบบ CRD ประกอบด้วย 3 ซ้ำ เมื่อเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราทั้งในชุดควบคุมและชุดทดสอบ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (PICG)

$$\text{โดยใช้สูตร PIRG} = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

เมื่อ R_1 คือความยาวรัศมีของเชื้อราชุดควบคุมและ R_2 คือชุดทดสอบ (เกษม, 2532)

การยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุ

นำชิ้นเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYM เป็นเวลา 10 วัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. จำนวน 10 ชิ้น เลี้ยงในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) ปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำอาหารเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที แยกตะกอนทิ้ง แล้วนำอาหารส่วนใสแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกสามารถนำไปใช้ทดสอบได้ทันที เรียกว่าอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่ไม่กรอง

เอาเชื้อออก (culture medium, NF) ส่วนที่สองนำไปกรองผ่านชุดกรองแบคทีเรีย ซึ่งมีขนาดของรู 0.22 ไมโครเมตร (Minisart®) เรียกอาหารส่วนนี้ว่าอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ที่กรองเอาเชื้อออก (culture filtrate medium, F) จากนั้นนำอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 2 ส่วน ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อราด้วยวิธี Slide culture method โดยนำไปผสมกับ spore suspension ของเชื้อราสาเหตุความเข้มข้น 10^5 สปอร์/มล. อย่างละ 50 ไมโครลิตร นำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วตัดชิ้นวุ้นให้มีขนาด 1 × 1 ซม. นำไปวางในชุด slide culture ส่วนชุดควบคุมเกลี่ย spore suspension ของเชื้อราสาเหตุโรคที่ผสมอาหารเหลว EPM ที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 3 ซ้ำ ตรวจสอบผลโดยนับการงอกของสปอร์เชื้อราที่เวลา 3 6 9 และ 12 ชม. หลังจากการทดสอบ โดยสปอร์ที่ถือว่างอกนั้นต้องงอก germ tube ออกมามากกว่าความกว้างของสปอร์ และการตรวจดูลักษณะรวมถึงการตรวจนับการงอกของสปอร์ สุ่มทั้งหมด 5 ตำแหน่ง ได้แก่ บริเวณรอบชิ้นวุ้น 4 ตำแหน่ง และตรงกลางชิ้นวุ้นอีก 1 ตำแหน่ง จากนั้นนำข้อมูลการงอกของสปอร์ที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุ

$$\text{โดยใช้สูตร } \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

เมื่อ A คือจำนวนสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมและ B คือชุดทดสอบที่งอก (เกษม, 2532)

จากนั้นวัดความยาว germ tube ของเชื้อรา แล้วคำนวณอัตราส่วนความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อราชุดควบคุมต่อชุดทดสอบ โดยที่ค่ามากกว่า 1 หมายถึง germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมยาวกว่า ชุดทดสอบน้อยกว่า 1 หมายถึง germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดทดสอบยาวกว่าชุดควบคุม และเท่ากับ 1 หมายถึง germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมและชุดทดสอบยาวเท่ากัน

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เชื้อราสาเหตุโรคบริสุทธิ์

แยกเชื้อราสาเหตุโรคจากเมล็ดข้าวที่แสดงอาการของโรคเมล็ดด่างได้ 2 ชนิด เมื่อตรวจสอบลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และจัดจำแนกโดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้จุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าเชื้อราที่แยกได้คือ เชื้อรา *Curvularia* sp. และ *Helminthosporium* sp.

2. ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าว

สารป้องกันกำจัดเชื้อรา prochloraz และ propiconazole + difenoconazole ทั้งความเข้มข้นครึ่งและตามอัตราแนะนำของผู้ผลิตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าวทั้ง 2 ชนิด (*Curvularia* sp. และ *Helminthosporium* sp.)

ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ถึง 100% แต่เมื่อตรวจสอบการงอกของสปอร์เชื้อราเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เวลา 3, 6, 9 และ 12 ชม. หลังการทดสอบ พบว่าสปอร์ของเชื้อรายังสามารถงอกได้ ซึ่งสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำมีประสิทธิภาพสูงกว่าครึ่งอัตราแนะนำของผู้ผลิต ในทุกช่วงเวลาที่ตรวจสอบหลังจากการทดสอบ เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. พบว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อรา prochloraz ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำ มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา 49.32 39.71 30.70 และ 24.82% ตามลำดับ ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา propiconazole + difenoconazole ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำมีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา 44.0 34.62 21.19 และ 12.20% ตามลำดับ สำหรับการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Helminthosporium* sp. พบว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อรา prochloraz ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำ มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา 45.34 42.41 35.68 และ 28.57% ตามลำดับ และสารป้องกันกำจัดเชื้อรา propiconazole + difenoconazole ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำ มีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา 48.32 38.05 32.31 และ 21.27% ตามลำดับ โดยประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำของผู้ผลิต มีประสิทธิภาพสูงกว่าความเข้มข้นครึ่งอัตราแนะนำของผู้ผลิต (Table 1)

นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบการสร้าง germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. ที่ทดสอบด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา prochloraz

Table 1. Inhibition percentages of two fungicides on conidial germination of fungal causing dirty panicles of rice on potato dextrose agar according to incubation period

Fungicides	Rate (ppm)	Percent inhibition of conidial germination							
		Curvularia sp.				*Helminthosporium* sp.			
		3 h[1/]	6 h	9 h	12 h	3 h	6 h	9 h	12 h
Prochloraz	250 (a)[2/]	45.57 b	34.67 b	22.30 b	18.87 b	36.41 b	33.04 c	29.11 c	22.17 b
	500 (b)	49.32 a	39.71 a	30.70 a	24.82 a	45.34 a	42.41 a	35.68 a	28.57 a
Propiconazole +	112.5 (a)	40.42 c	29.60 c	18.04 c	7.86 d	35.91 b	32.64 c	22.50 d	12.00 c
Difenoconazole	225 (b)	44.08 b	34.62 b	21.19 b	12.20 c	43.82 a	38.05 b	32.31 b	21.27 b
CV(%)		**2.58**	**3.11**	**4.41**	**3.61**	**2.58**	**3.11**	**4.41**	**3.61**
$LSD_{.01}$		**3.17**	**2.95**	**2.83**	**1.58**	**3.17**	**2.95**	**2.83**	**1.58**

[1/] h = hour

[2/] (a) = half of recommended rate, (b) = recommended rate

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by LSD.

ความเข้มข้นครึ่งอัตราแนะนำของผู้ผลิต พบว่า อัตราส่วนความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมต่อชุดทดสอบในระยะเวลา 3 6 9 และ 12 ชม.หลังการทดสอบมีค่า 2.76 3.68 5.69 และ 7.06 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำของผู้ผลิตมีค่า 2.94 4.09 7.01 และ 7.73 ตามลำดับ ส่วนสปอร์ของเชื้อราที่ทดสอบด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา propiconazole + difenoconazole ความเข้มข้นครึ่งอัตราแนะนำของผู้ผลิต มีอัตราส่วนความยาว 3.00 4.12 7.23 และ 8.26 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำของผู้ผลิตมีค่า 3.49 4.48 7.83 และ 8.69 ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบการสร้าง germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Helminthosporium* sp. พบว่า ที่เวลา 12 ชม. หลังจากการทดสอบ germ tube ของเชื้อราในชุดควบคุมมีความยาวมากเกินที่จะสามารถวัดได้ เนื่องจากได้พัฒนาไปเป็นเส้นใยเชื้อราแล้ว แต่ในระยะเวลา 3 6 และ 9 ชม. หลังจากการทดสอบพบว่า germ tube ของเชื้อราที่ทดสอบด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา prochloraz ความเข้มข้นครึ่งอัตราแนะนำของผู้ผลิต มีอัตราส่วนความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมต่อชุดทดสอบ 1.46 2.19 และ 3.03 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำของผู้ผลิตมีค่า 1.60 2.26 และ 3.33 ตามลำดับ ส่วนสปอร์ของเชื้อราที่ทดสอบด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา propiconazole + difenoconazole ความเข้มข้นครึ่งอัตราแนะนำของผู้ผลิต มีอัตราส่วนความยาว 1.47, 2.22 และ 3.15 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำของผู้ผลิตมีค่า 1.62, 2.29 และ 3.45 ตามลำดับ (Table 2) แสดงว่าอัตราส่วนความยาวของ germ tube ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ในทุกระยะเวลาของการตรวจสอบมีค่ามากกว่า 1 แสดงว่า germ tube ของเชื้อราในชุดควบคุมมียาวกว่าชุดทดสอบ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่ตรวจสอบผลหลังจากการทดสอบ แต่อย่างไรก็ตาม germ tube ในชุดทดสอบก็ยังมีความยาวไม่เท่ากับชุดควบคุม (ค่าเท่ากับ 1) และเมื่อตรวจสอบลักษณะของสปอร์เชื้อราในชุดทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบความผิดปกติที่ต่างจากสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมคือ germ tube มีลักษณะเป็น ข้อปล้อง บวมพอง บิดเบี้ยว และมีการแตกเส้นใยออกทางด้านข้างมากว่ายืดยาวออกไป (Figure 1) นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าหากสปอร์เชื้อรางอกมีลักษณะผิดปกติไม่สามารถงอกและพัฒนาไปเป็นเส้นใยต่อไปได้ ส่วนสปอร์ที่มีลักษณะปกติยังสามารถงอกได้แต่งอกช้ากว่าชุดควบคุม และมี germ tube สั้นกว่าสปอร์เชื้อราในชุดควบคุม

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างข้าว

เชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6

Table 2. Inhibitory effects of two fungicides to germ tube length formation of fungal causing dirty panicles of rice on potato dextrose agar according to incubation period

Fungicides		Germ tube length ratio (control : treatments)							
		Curvularia sp.				*Helminthosporium* sp.			
Common name	Rate (ppm)	3 h[1/]	6 h	9 h	12 h	3 h	6 h	9 h	12 h
Prochloraz	250 (a)[2/]	2.76	3.68	5.69	7.06	1.46	2.19	3.03	-
	500 (b)	2.94	4.09	7.01	7.73	1.60	2.26	3.33	-
Propiconazole + difenoconazole	112.5 (a)	3.00	4.12	7.23	8.26	1.47	2.22	3.15	-
	225 (b)	3.49	4.48	7.83	8.69	1.62	2.29	3.45	-

[1/] h = hour

[2/] a = half of recommended rate, b = recommended rate

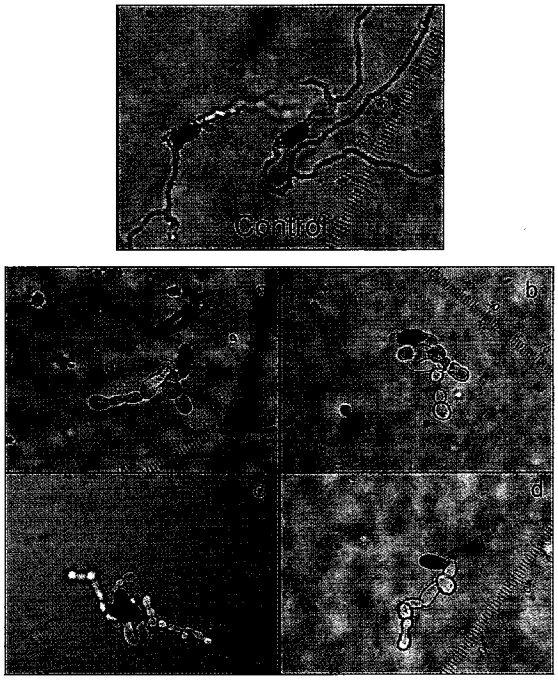

Figure 1. Abnormally-appearance germ tubes of *Curvularia* spp. causing dirty panicle of rice after treated on potato dextrose agar for 6 hours: a = prochloraz (500 ppm), b = propiconazole + difennoconazole (225 ppm), c = culture medium (NF) isolate NSP2 and d = culture filtrate medium (F) isolate NSP2.

สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Curvularia* sp. สาเหตุของข้าวได้ 82.22 81.78 78.22 76.00 74.67 และ 80.44% ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน แต่มีประสิทธิภาพในการสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Helminthosporium* sp. ต่างกัน โดยไอโซเลท NSP3, NSP5 และ NSP6 มีประสิทธิภาพสูงที่สุด สามารถยับยั้งได้ 72.45 72.44 และ 74.22% ตามลำดับ รองลงมาคือ ไอโซเลท NSP2 และ NSP4 สามารถยับยั้งได้ 63.11 และ 59.11% ตามด้วยไอโซเลท NSP1 สามารถยับยั้งได้ 48.00% (Table 3)

ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้คัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ 2 ไอโซเลท มาใช้ในการทดสอบ ได้แก่ NSP6 และ NSP2 ซึ่งคัดเลือกการจัดกลุ่มตามประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยด้วยวิธี Least significant difference (LSD) ที่สูงสุดในกลุ่ม a และ ab

(Table 3) แต่เมื่อตรวจสอบการงอกของสปอร์เชื้อราเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เวลา 3 6 9 และ 12 ชม.หลังการทดสอบ พบว่าสปอร์ของเชื้อรายังสามารถงอกได้ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลท ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF) มีประสิทธิภาพสูงกว่าส่วนที่กรองเอาเชื้อออก (F) ในทุกช่วงเวลาที่ตรวจสอบหลังจากการทดสอบ เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP2 ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออกมีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา 90.64 83.43 51.84 และ 32.83% ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท NSP6 ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออกมีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา 81.52 73.33 43.94 และ 24.80% ตามลำดับ สำหรับการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Helminthosporium* sp. พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท NSP2 ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออกมีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา 92.39 80.07 47.26 และ 24.74% ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP6 ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออกมีประสิทธิภาพยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา 80.19 58.28 33.48 และ 13.89% ตามลำดับ (Table 4)

นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบการสร้าง germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. ที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP2 ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออก พบว่าอัตราส่วนความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมต่อชุดทดสอบในระยะเวลา 3 6 9 และ 12 ชม. หลังการทดสอบมีค่า 4.73 3.23 7.25 และ 10.15 ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนที่กรองเอาเชื้อออก 4.58 3.18 7.06 และ 9.89 ตามลำดับ ส่วนสปอร์ของเชื้อราที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP6 ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออก มีอัตราส่วนความยาว 3.12 1.63 2.19 และ 3.23 ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนที่กรองเอาเชื้อออกมีค่า 3.13 1.59 2.20 และ 3.33 ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบการสร้าง germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Helminthosporium* sp. พบว่าที่เวลา 12 ชม. หลังจากการทดสอบ germ tube ของเชื้อราในชุดควบคุมมีความยาวมากเกินที่จะสามารถวัดได้ เนื่องจากได้พัฒนาไปเป็นเส้นใยเชื้อราแล้ว แต่ในระยะเวลา 3 6 และ 9 ชม. หลังจากการทดสอบพบว่า germ tube ของเชื้อราที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP2 ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออกมีอัตราส่วนความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมต่อชุดทดสอบ 3.72 6.90 และ 9.68 ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนที่กรองเอาเชื้อออกมีค่า 3.58 6.66 และ 9.32 ตามลำดับ ส่วนสปอร์ของเชื้อราที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP6 ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออก มีอัตราส่วนความยาว 1.91, 3.00 และ 3.18 ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนที่กรองเอาเชื้อออกมีค่า 2.11 2.74 และ 3.35 ตามลำดับ (Table 5) ซึ่งผลการตรวจสอบความยาว germ tube ของ

Table 3. Inhibition percentages of six actinomycetes on mycelia growth of fungal causing dirty panicles of rice on potato dextrose agar (incubated for 7 days).

Actinomycetes isolate	Percent inhibition of radial growth	
	Curvularia sp.	*Helminthosporium* sp.
NSP1	82.22 a	48.00 b
NSP2	81.78 a	63.11 ab
NSP3	78.22 a	72.45 a
NSP4	76.00 a	59.11 ab
NSP5	74.67 a	72.44 a
NSP6	80.44 a	74.22 a
CV (%)	**7.05**	**10.12**
$LSD_{.01}$	**4.54**	**5.36**

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by LSD.

Table 4. Inhibition percentages of two actinomycetes on conidial germination of fungal causing dirty panicles of rice on potato dextrose agar according to incubation period

Actinomycetes		Percent inhibition of conidial germination							
		Curvularia sp.				*Helminthosporium* sp.			
Isolate	Type	3 h[1/]	6 h	9 h	12 h	3 h	6 h	9 h	12 h
NSP2	NF[2/]	90.64 a	83.43 a	51.84 a	32.83 a	92.39 a	80.07 a	47.26 a	24.74 a
	F	85.88 b	77.01 b	47.64 b	27.85 b	88.50 b	74.60 b	43.03 b	20.83 b
NSP6	NF	81.52 c	73.33 c	43.94 c	24.80 c	84.47 c	65.23 c	38.14 c	17.23 c
	F	79.86 c	68.68 d	40.40 d	19.85 d	80.19 d	58.28 d	33.48 d	13.89 d
CV (%)		**0.82**	**1.25**	**1.30**	**2.50**	**0.92**	**1.03**	**2.47**	**4.80**
$LSD_{.01}$		**1.91**	**2.58**	**1.63**	**1.8**	**2.18**	**1.95**	**2.74**	**2.52**

[1/] h = hour

[2/] NF: culture medium, F: culture filtrate medium

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 1% level by LSD.

เชื้อราที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ให้ผลเช่นเดียวกับการทดสอบด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คือ อัตราส่วนความยาวของ germ tube ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ในทุกช่วงเวลาของการตรวจสอบมีค่ามากกว่า 1 แสดงว่า germ tube ของเชื้อราในชุดควบคุมมียาวกว่าชุดทดสอบ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่ตรวจสอบผลหลังจากการทดสอบ แต่อย่างไร

Table 5. Inhibitory effects of two actinomycetes to germ tube length formation of fungal causing dirty panicles of rice on potato dextrose agar according to incubation period

Actinomycetes		Germ tube length ratio (control : treatments)							
		Curvularia sp.				*Helminthosporium* sp.			
isolate	type	3 h[1/]	6 h	9 h	12 h	3 h	6 h	9 h	12 h
NSP2	NF[2/]	4.73	3.23	7.25	10.15	3.72	6.90	9.68	-
	F	4.58	3.18	7.06	9.89	3.58	6.66	9.32	-
NSP6	NF	3.21	1.63	2.19	3.32	1.91	3.00	3.18	-
	F	3.13	1.59	2.20	3.33	2.11	2.74	3.35	-

[1/] h = hour

[2/] NF = culture medium, F = culture filtrate medium

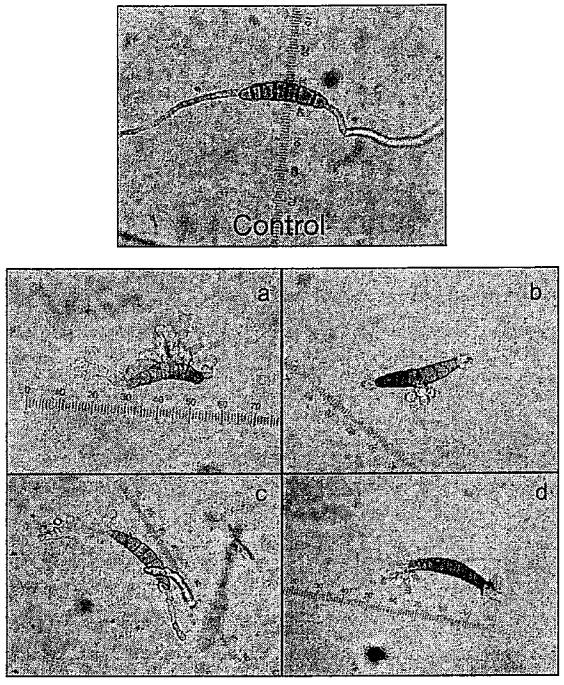

Figure 2. Abnormally-appearance germ tubes of *Helminthosporium* spp. causing dirty panicle of rice after treated on potato dextrose agar for 6 hours: a = prochloraz (500 ppm), b = propiconazole + difennoconazole (225 ppm), c = culture medium (NF) isolate NSP2 and d = culture filtrate medium (F) isolate NSP2.

ก็ตาม germ tube ในชุดทดสอบยังมีความยาวไม่เท่ากับชุดควบคุม (ค่าเท่ากับ 1) และเมื่อตรวจสอบลักษณะของสปอร์ เชื้อราในชุดทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า พบความผิดปกติที่ต่างจากสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมคือ germ tube มีลักษณะเป็นข้อปล้อง บวมพอง บิดเบี้ยว และมีการแตกเส้นใยออกทางด้านข้างมากว่ายืดยาวออกไป (Figure 2) นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าหากสปอร์เชื้อรางอกมีลักษณะผิดปกติไม่สามารถงอกและพัฒนาไปเป็นเส้นใยต่อไปได้ ส่วนสปอร์ที่มีลักษณะปกติยังสามารถงอกได้แต่งอกช้ากว่าชุดควบคุม และมี germ tube สั้นกว่าสปอร์เชื้อราในชุดควบคุม

ตามรายงานของพรนภา (2554) ได้วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ที่กรองเอาสปอร์ออก (F) จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 โดยวัดได้จาก *N*-acetylglucosamine ที่ถูกปล่อยออกมาจาก

ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเทรต โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1992) และใช้ *N*-acetylglucosamine ในการทำกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีสต์ไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ที่บ่มโดยการเขย่าเป็นเวลา 3 วัน มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 0.080 0.111 0.051 0.151 0.094 และ 0.110 mUnit/ml ตามลำดับ ซึ่งจากรายงานนี้สามารถสันนิษฐานได้ว่า สารที่มีผลต่อเชื้อราสาเหตุโรคคือ เอนไซม์ไคติเนส ไม่ใช้สารปฏิชีวนะหรือสารทุติยภูมิ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบต่อไปเพื่อยืนยันผลการทดสอบ และจากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา และเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว พบว่าให้ผลดีในด้านของการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ส่วนการยับยั้งการงอกของสปอร์ถึงแม้จะมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งอยู่ในระดับปานกลาง แต่ผลการทดสอบแสดงให้ทั้งสารป้องกันกำจัดเชื้อรา และเชื้อแอกติโนไมซีต์มีผลในการชะลอการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค และยังมีผลทำให้การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผิดปกติ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านของการประยุกต์ใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราร่วมกับเชื้อแอกติโนไมซีสต์ รวมถึงมีการศึกษาเพิ่มถึงในระดับโรงเรือน โดยอาจใช้สารเคมีสลับกับการใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์ หรือใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์ในดินและใช้สารเคมีทางลำต้น เป็นต้น เพื่อประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคสูงสุด

สรุปผลการทดลอง

สารป้องกันกำจัดเชื้อรา prochloraz และ propiconazole + difenoconazole มีประสิทธิภาพในควบคุมเชื้อรา *Curvularia* sp. และ *Helminthosporium* sp. สาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าวที่แยกได้จากเมล็ดข้าวซึ่งแสดงอาการของโรคเมล็ดด่างบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ได้ 100% แต่สำหรับประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ สารป้องกันกำจัดเชื้อราความเข้มข้นตามอัตราแนะนำให้ประสิทธิภาพสูงกว่าครึ่งอัตราแนะนำของผู้ผลิต โดยที่เวลา 3 ชม. หลังจากการทดสอบ สารป้องกันกำจัดเชื้อรา prochloraz ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. 49.32% และยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *Helminthosporium* sp. 45.34% ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา propiconazole + difenoconazole มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. 44.08% และยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *Helminthosporium* sp. 43.82% สำหรับประสิทธิภาพเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากเขตป่า ที่อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย (Suthep-Pui National Park) อ.เมือง จ.เชียงใหม่ จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia* sp. บน

จานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อยู่ในระหว่าง 74.67 - 82.22% ส่วนการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Helminthosporium* sp. มีประสิทธิภาพอยู่ในระหว่าง 48.00 - 74.22% เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์โดยคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP2 และ NSP6 มาทดสอบในรูปแบบของอาหารเลี้ยงเชื้อในส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออก และส่วนที่กรองเอาเชื้อออก พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออกมีประสิทธิภาพสูงกว่าส่วนที่กรองเอาเชื้อออก โดยที่เวลา 3 ชม. หลังจากการทดสอบ อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท NSP2 ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. 90.64% และยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *Helminthosporium* sp. 92.39% ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนมซีสต์ไอโซเลท NSP ส่วนที่ไม่กรองเอาเชื้อออก มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. 81.52% และยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *Helminthosporium* sp. 83.47% ส่วนการตรวจสอบความยาว germ tube พบว่าเชื้อราที่ทดสอบทั้งสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 2 ชนิด และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 2 ส่วน ให้ผลเช่นเดียวกันคือ germ tube ของเชื้อราในชุดควบคุมมียาวกว่าชุดทดสอบในทุกช่วงเวลาที่ตรวจสอบผลหลังจากการทดสอบ และยังพบความผิดปกติที่ของสปอร์เชื้อราในชุดทดสอบคือ germ tube มีลักษณะเป็นข้อปล้อง บวมพอง บิดเบี้ยว และมีการแตกเส้นใยออกทางด้านข้างมากว่ายืดยาวออกไป นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าหากสปอร์เชื้อรางอกมีลักษณะผิดปกติ ไม่สามารถงอกและพัฒนาไปเป็นเส้นใยต่อไปได้ ส่วนสปอร์ที่มีลักษณะปกติยังสามารถงอกได้แต่งอกช้ากว่าชุดควบคุม และมี germ tube สั้นกว่าสปอร์เชื้อราในชุดควบคุม ดังนั้นรายงานฉบับนี้จึงเป็นแนวทางสำหรับการควบคุมโรคพืชแบบผสมผสาน ระหว่างชีววิธีร่วมกับการใช้สารเคมี

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2532. *การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี.* คณะเทคโนโลยีการอาหารสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ. 326 หน้า.

เอกสงวน ชูวิสิฐกุล. 2544. *เทคโนโลยีการผลิตข้าวพันธุ์ดี.* สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 137 หน้า.

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. *การตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพันธุ์.* ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัย

เกษตรศาสตร์. 194 หน้า.

จันทร์ฉาย จันทิมา. 2553. *ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อรา Fusarium moniliforme ที่ติดมากับเมล็ดข้าว.* ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 64 หน้า.

จิราภรณ์ วิริยา. 2553. *ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าว.* ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 66 หน้า.

ฉวีวรรณ มุกทา. 2553. *ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อรา Fusarium moniliforme สาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว.* ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 76 หน้า.

ชิงชัย ไชยศิริ. 2553. *ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ในการควบคุมเชื้อรา Fusarium moniliforme f.*sp. *capsici สาเหตุโรคเหี่ยวของพริก.* ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 81 หน้า.

ณัฐพงศ์ นวลดี. 2553. *การวิเคราะห์พันธุกรรมและควบคุมเชื้อรา Cecospora* spp. *ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยซีส.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 164 หน้า.

ดารา เจตนะจิต นงรัตน์ นิลพานิชย์ พากเพียร อรัญนารถ วิชิต ศิริสันธนะ วิชชุดา รัตนากาญจน์ รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ วันชัย โรจนหัสดิน และธัญลักษณ์ อารยาพันธ์. 2550. *โรคข้าวและการป้องกันกำจัด ครั้งที่ 1.* โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ. 68 หน้า.

ทิพสุดา เอพาณิช อ่วม คงชู วารินทร์ ศรีถัด อดุลย์ กฤษวะดี และกัมปนาท มุขดี. 2539. การเสื่อมความงอกของข้าวโคชิฉิการิเนื่องจากการทำลายของเชื้อรา. หน้า 118. *ใน: รายงานการประชุมทางวิชาการปี 2539.* ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัยข้าว และกรมวิชาการเกษตร.

นิรนาม. 2536. *โรคพืชและจุลชีววิทยา.* กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 174 หน้า.

พรนภา โทตรี ชาติชาย โขนงนุช และสรัญยา ณ ลำปาง. 2554. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. *ว. วิทย. กษ.* 42:1 (พิเศษ): 163-166.

พากเพียร อรัญนารถ อรุณี สุรินทร์ วิชิต ศิริสันธนะ นพพร นภีรงค์ และกัญจนา พุทธสมัย. 2522. การศึกษาโรคเมล็ดด่างของข้าว. หน้า 309-310. *ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2522.* กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2540. *ยาต้านจุลชีพ.* พิมพ์ครั้งที่ 4. จรัลสนิทวงศ์ กรุงเทพฯ. 680 หน้า.

วรรษมน บุญยิ่ง. 2553. *การวิเคราะห์ลักษณะ*

และการควบคุมเชื้อรา Colletotrichum spp. *ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในพริก.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 180 หน้า.

วราพรรณ์ ใจเย็น. 2553. *ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์จากดินในการควบคุมเชื้อรา Fusarium moniliforme f.*sp. *lycopersici สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ.* ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 53 หน้า.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2542. *สรีรวิทยาเมล็ดพันธุ์.* ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 213 หน้า.

วิลาสินี แสงนาค. 2555. *ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์จากดินในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 200 หน้า.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2540. *การจัดการโรคพืช.* วี.บี. บุ๊คเซนเตอร์. กรุงเทพฯ. 141 หน้า.

อัญชลี ประเสริฐศักดิ์ เกษม สุทราจารย์ นิพนธ์ มาฆทาน ณัฐหทัย เอพาณิช และอ่วม คงชู. 2546. ผลของระดับความรุนแรงของโรคเมล็ดด่างต่อการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์หลัก. หน้า 25. *ใน: บทคัดย่อการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2546.* 7-9 มีนาคม พ.ศ. 2546 ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน ชลบุรี.

Herdt, R.W. 1991. Research priorities for rice biotechnology. Pages 19-54. *In: Rice Biotechnology* Khush, G.S. and G.H. Toenniessen (eds.). CAB International Rice Research Institute, Wallingford, UK.

Koenraadt, H., S. C. Somerville and A.L. Jones 1992. Characterization of mutation in the beta-pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent of determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.

Suwan, N, W, Boonying and S, Nalumpang 2012. Antifungal activity of soil actinomycetes to control chilli anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides. J. Agri. Tech.* 8(2): 725-737.