

ชีวภัณฑ์แอกติโนไมซีส์เอนโดไฟต์แบบกระดาษเพื่อควบคุมโรคถดฝักดาบ ของข้าวไรซ์เบอร์รี่ในระยะกล้า

Paper Type Bioproduct of Endophytic Actinomycetes for Controlling Bakanae Disease of Riceberry Rice in Seedling Stage

ชวลิต ตนะทิพย์ และ เกวาลิน คุณาศักดากุล^{*}
Chavalit Tanatip and Kaewalin Kunasakdakul^{*}

ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^{*}Corresponding author: Email: kaewalin.k3@gmail.com

(Received: 12 April 2017; Accepted: 25 September 2017)

Abstract: A total of 45 isolates of endophytic actinomycete (EA) were isolated from herb and rice explants then were evaluated for their antifungal activities against *Fusarium moniliforme* causing bakanae disease of riceberry rice. Three isolates of EA; PRE5, CINv1 and CEN26, isolated from herbal plants significantly exhibited high percentages of inhibitory activities at 84.80, 82.66 and 81.85, respectively. In order to collect aerial mycelia of the selected EA isolates, type of filter paper (Ø 9.0 cm) were place on the surface of IMA-2 cultured media. The results showed that the germination test paper was the best trial obtaining the highest aerial mycelium averaged number at 4.13×10^9 spores/piece for using as bioproduct. Efficacy testing of bio product to control bakanae disease in rice seedling stage was determined at the rating of bioproduct 1 piece/ 1 liter of water, then rice seeds were soaked for 24 hr before planting. Evaluation of the disease trial of isolate CINv1 revealed the diseases reduction and increased survival rate of seedling. Accordingly, colonization trials of CINv1 in rice seedling successfully observed in the root parts with the highest re-isolation percentage at 96.15.

Keywords: Endophytic actinomycetes, bakanae disease, riceberry rice

บทคัดย่อ: จากการคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จำนวน 45 ไอโซเลทที่แยกได้จากพืชสมุนไพรและข้าว ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคอดฝักดาบของข้าวไรซ์เบอร์รี่ พบว่า สามารถคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ได้ 3 ไอโซเลท คือ PRE5, CINv1 และ CEN26 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 84.80, 82.66 และ 81.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในการเก็บสปอร์ที่สร้างบน aerial mycelium ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้โดยเพิ่มปริมาณบนอาหารสังเคราะห์ IMA-2 และทดสอบวากระดาศรอนชนิดต่าง ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรบนผิวหน้าของอาหารเพื่อรองรับ aerial mycelium พบว่า สามารถเก็บสปอร์บนกระดาษชนิด germination test paper ได้ดีที่สุดเฉลี่ยจากทั้ง 3 ไอโซเลท เท่ากับ 4.13×10^9 สปอร์ต่อแผ่น จากนั้นนำแผ่นกระดาษที่รองรับสปอร์ไปทำให้แห้งเพื่อใช้เป็นชีวภัณฑ์และจากการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคอดฝักดาบในระยะกล้า โดยใช้แช่เมล็ดพันธุ์ข้าวในสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ใน อัตราการใช้ 1 แผ่นต่อน้ำ 1 ลิตร ก่อนนำไปเพาะปลูก ผลการทดสอบพบว่า ไอโซเลท CINv1 สามารถยับยั้งการเกิดโรคและทำให้ต้นกล้าข้าวมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดในทุกชุดการทดสอบ สอดคล้องกับผลแยกเชื้อกลับเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในต้นกล้าข้าวหลังงอก 7 วัน ซึ่งพบว่า ไอโซเลท CINv1 มีเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับในส่วนรากของต้นกล้าข้าวมากที่สุด เท่ากับ 96.15 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ โรคอดฝักดาบ ข้าวไรซ์เบอร์รี่

คำนำ

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (riceberry rice) เป็นสายพันธุ์ข้าวที่ได้รับการพัฒนาให้เป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ที่เรียกว่า ธัญโอสธ โดยมีลักษณะประจำพันธุ์เป็นข้าวเจ้า สีม่วงเข้ม เมล็ดเรียวยาว ปลูกได้ตลอดปี ด้านทานต่อโรคไหม้ แต่ไม่ต้านทานต่อโรคอดฝักดาบ อีกทั้งระบบการปลูกที่เหมาะสมและที่เป็นยอมรับของตลาด คือ การปลูกในระบบเกษตรอินทรีย์ที่ไม่มีการใช้สารเคมีชนิดใด ๆ จึงมักประสบกับปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคอดฝักดาบ ที่สามารถถ่ายทอดโรคโดยการติดไปกับเมล็ดได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Ou, 1985) และยังสามารถก่อให้เกิดความเสียหายกับเมล็ดพันธุ์ได้ทุกระยะขณะเก็บรักษาไว้ (Sunder et al., 1997) จึงเป็นเหตุให้เกษตรกรไม่มีเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพใช้ในการเพาะปลูกในฤดูถัดไป (Hossain et al., 2013) การใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจสนับสนุนในกระบวนการผลิตพืชแบบอินทรีย์ แต่เนื่องด้วยวิธีการนำไปใช้แบบเชื้อสดยังมีความยุ่งยากและไม่เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร งานวิจัยในครั้งนี้

จึงมุ่งหวังพัฒนารูปแบบชีวภัณฑ์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในรูปแบบสปอร์แห้งบนกระดาษเพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ในการควบคุมโรคอดฝักดาบได้ง่ายขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรค

สุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ จำนวน 400 เมล็ด จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ตัวอย่าง 1 กิโลกรัม ในแต่ละแหล่งผลิต คือ จังหวัดเชียงราย (CR) สระบุรี (SB) และพิษณุโลก (PL) มาเพาะบนกระดาษชนิดเพาะเมล็ด (germination test paper) ด้วยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น (blotter method) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นแยกเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่เจริญออกมาบนเปลือกเมล็ดพันธุ์ข้าว ด้วยวิธี single spore isolation เพื่อเลี้ยงเป็นเชื้อราบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะของเชื้อราเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อรา *F. moniliforme* และทดสอบความสามารถในการก่อโรคอดฝักดาบในข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยการปลูกเชื้อลงในเมล็ดพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา

3 นาที และแช่ในน้ำร้อน อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเมล็ดแช่ลงใน spore suspension ของเชื้อรา *F. moniliforme* แต่ละไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 10^6 spores/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะลงในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่บรรจุในกระบะเพาะเมล็ดขนาด 23 x 23 x 9 เซนติเมตร จำนวนกระบะละ 100 เมล็ด สังเกตและตรวจดูอาการผิดปกติของต้นกล้าหลังจาก 14 วัน และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (disease incidence) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นกล้าที่แสดงอาการผิดปกติ}}{\text{จำนวนต้นกล้าทั้งหมด}} \times 100$$

คัดเลือกเชื้อรา *F. moniliforme* สาเหตุโรคที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงที่สุดในแต่ละแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

นำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร เช่น ผักแว่น อบเชย กระเทียม และดีปลี เป็นต้น จำนวนรวม 15 ไอโซเลท และที่แยกได้จากต้นข้าว จำนวน 30 ไอโซเลท จากห้องปฏิบัติการโรคพืชภาควิชาที่วิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *F. moniliforme* สาเหตุโรคยอดผักตบของข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่คัดเลือกจากการทดลองข้อ 1 ด้วยวิธี dual culture โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวางเชื้อราสาเหตุโรคบริเวณตรงกันข้าม ระยะห่าง 3 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ 1 จานอาหาร สำหรับชุดควบคุมวางเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว เมื่อบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 10 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent

inhibition of radial growth, PIRG) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{PIRG} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

โดยประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งจากค่า PIRG ดังนี้

>75	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูงมาก
61-75	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูง
50-60	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับปานกลาง
<50	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับต่ำ

คัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งระดับสูงมากตั้งแต่ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (Phuakjaiphaeo and Kunasakdakul, 2015) เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. การทดสอบชนิดกระดาดรองรับ aerial mycelium ในการเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2

นำ spore suspension ความเข้มข้น 10^6 spores/ml ปริมาตร 100 µl ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งระดับสูงมากตั้งแต่ 80 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 โดยใช้เทคนิค spread plate จากนั้นวางทับผิวหน้าอาหารด้วยกระดาษชนิดเพาะเมล็ด และกระดาษกรอง (Whatman filter paper) No.1, 2, 4 และ 5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร บ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ลอกแผ่นกระดาษออกมาด้วยความร้อน 30 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน วางแผนการ

ทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ 1 จานอาหาร บันทึกผลการทดลองโดยนับสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์แต่ละไฮโซเลทที่สร้างบน aerial mycelium ต่อกระดาษ 1 แผ่น ด้วยวิธี dilution plate method

4. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในควบคุมโรคยอดผักดาบของข้าวไรซ์เบอร์รี่ ระยะกล้า

เตรียมเมล็ดพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่สำหรับการทดสอบด้วยวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 3 นาที และแช่ในน้ำร้อน อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ข้าวไรซ์ใน spore suspension ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ที่ความเข้มข้น 10^8 spores/ml ส่วนชุดควบคุมแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ข้าวมาเพาะบนวัสดุเพาะเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วผสมด้วย spore suspension ความเข้มข้น 10^6 spores/ml ของเชื้อรา *F. moniliforme* สาเหตุโรคยอดผักดาบของพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคมากที่สุดของแต่ละแหล่งผลิต ส่วนชุดควบคุมวางเมล็ดพันธุ์ข้าวบนวัสดุที่ไม่มีการผสมของ spore suspension เชื้อราสาเหตุ วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ 100 เมล็ด ตรวจสอบอาการของโรคในต้นกล้าข้าวเมื่ออายุครบ 7 วัน และนับจำนวนต้นกล้าข้าวที่มีชีวิตรอดหลังอายุครบ 30 วัน

5. การตรวจสอบความคงอยู่ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในต้นกล้าข้าวหลังการออก

ตรวจสอบความสามารถในการเข้าอาศัยพืชด้วยวิธีการแยกเชื้อกลับ (re-isolation) โดยนำต้นกล้าข้าวไรซ์เบอร์รี่ อายุ 7 วัน จากการทดลองในข้อ 4 ที่แช่ใน spore suspension ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ มาทำการแยกเชื้อกลับโดยตัดแบ่งต้นกล้าข้าวออกเป็นส่วนเล็ก ๆ โดยแยกเป็นส่วน ใบ ลำต้นติดกับเมล็ด และราก นำชิ้นส่วนพืชทั้งหมดล้างผ่านน้ำไหล 30 นาที จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยน้ำ EO (electrolyzed oxidizing water) 1 เปอร์เซ็นต์ 3 นาที แช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

5 นาที และแช่ในสารกำจัดเชื้อรา azoxystrobin (Heritage) ความเข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที เพื่อกำจัดเชื้อราที่ปนเปื้อนมากับชิ้นพืช ซับชิ้นพืชให้แห้งแล้วตากบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งลมให้แห้งภายในตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำชิ้นพืชวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 บ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืชที่สามารถแยกเชื้อกลับได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการแช่ในเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ คำนวณเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับจากสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับ} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่แยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ได้}}{\text{จำนวนชิ้นพืชทั้งหมด}} \times 100$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรค

หลังนำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่มาเพาะบนกระดาษชนิดเพาะเมล็ด เป็นเวลา 5 วัน พบการเจริญของเส้นใยเชื้อราสีขาวฟูออกมาจากบริเวณส่วนปลายของเมล็ดที่ติดกับข้าว (ภาพที่ 1A, B) เมื่อนำเส้นใย เชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวของทั้ง 3 แหล่งผลิต มาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) และตรวจสอบลักษณะการเจริญของโคโลนี พบว่า เชื้อราแต่ละไฮโซเลทสามารถเจริญเติบโตสร้างเส้นใยฟูสีขาว หลังการเลี้ยง 3 วันและเจริญเต็มผิวหน้าอาหารในเวลา 7 วัน เมื่อเส้นใยของเชื้อราแต่ละไฮโซเลทมีอายุมากขึ้น จะมีการเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีขาวอมม่วง สีขาวอมชมพู สีเหลืองอ่อน สีเหลืองแกมส้ม สีชมพูอ่อน สีชมพูเข้มด้วยสีม่วง จนถึงสีชมพูอมม่วง และสีของโคโลนีได้อาหารวันพบ มีสีขาว สีขาวอมชมพู และสีเหลือง เมื่อนำเส้นใยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อราสร้าง microconidium จำนวนมาก โดยสร้างเป็นกลุ่ม (false head) และสร้างต่อกันเป็นลูกโซ่ยาวบน micronidiophore แบบ monophialide micronidiophore มีรูปร่างไข่ (oval)

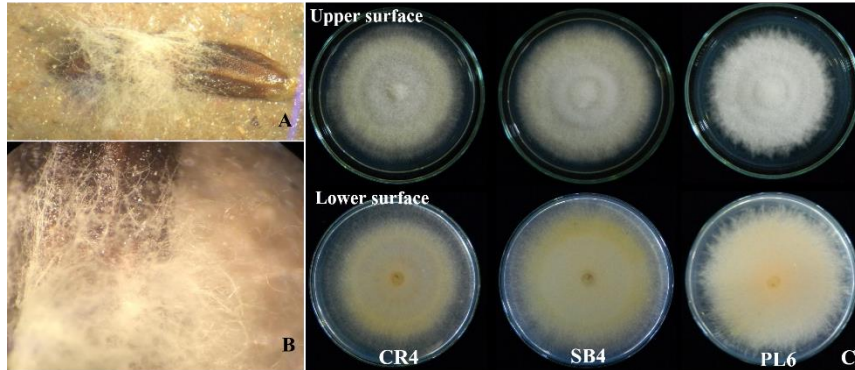


Figure 1. *Fusarium moniliforme* causing bakanae disease of riceberry rice; A and B: mycelial growth on seed. C: colony of 3 isolates, CR4, SB4 and PL6 on PDA incubated at room temperature for 7 days

1 เซลล์ ขนาด $1.75\text{-}2.5 \times 5\text{-}8.5 \mu\text{m}$ macroconidium มีรูปร่าง fusiform โค้งเล็กน้อยจนถึงเกือบตรง ช่วงกลางสปอร์ค่อนข้างแคบยาว ไม่มีสี มี septum 3-6 ขนาด $15\text{-}50 \times 2.5\text{-}4 \mu\text{m}$ สอดคล้องกับลักษณะฐานฐานวิทยาของเชื้อราที่ศึกษาโดย Zainudin *et al.* (2008) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ คือ เชื้อรา *F. moniliforme* ผลการแยกเชื้อราสาเหตุโรคสามารถแยกได้ทั้งหมดจำนวน 20 ไอโซเลท ซึ่งจำแนกได้ตามแหล่งที่มาของเมล็ดพันธุ์ คือ จังหวัดเชียงราย (CR) 5 ไอโซเลท จังหวัดสระบุรี 9 ไอโซเลท และจังหวัดพิษณุโลก 6 ไอโซเลท จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคยอดผักตบต่อต้นกล้าข้าวของเชื้อรา *F. moniliforme* แต่ละไอโซเลท พบว่า เชื้อราทำให้เมล็ดแสดงอาการผิดปกติตั้งแต่เริ่มงอก โดยพบเส้นใยของเชื้อราเจริญปกคลุมบนเมล็ด ต้นกล้าอ่อนที่งอกออกมาจะถูกเส้นใยเชื้อราเจริญคลุมจนทำให้ต้นกล้าตายและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนต้นกล้าที่รอดตายเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน ต้นกล้าแสดงอาการยืดยาว ใบซีดเหลือง บางต้นแสดงอาการแฉะแฉกรีนแตกต่างจากชุดควบคุม โดยเชื้อราไอโซเลท CR4, SB4 และ PL6 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงที่สุดในแต่ละแหล่งผลิต เท่ากับ 84.00, 78.00 และ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ สายชล และสมบัติ (2550) อภิวิทย์ และคณะ (2553) และ Karov *et al.* (2009) รายงานว่ามีเพียงเชื้อรา

F. moniliforme (syn. *Fusarium fujikuroi*) เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถสร้างฮอร์โมนจิบเบอเรลินได้และก่อให้เกิดโรคยอดผักตบในข้าว ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ี้ทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคเพื่อนำไปทดสอบในการทดลองต่อไป ได้ทั้งหมด จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ CR4, SB4 และ PL6 (ภาพที่ 1C)

2. การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคจำนวน 30 ไอโซเลท ด้วยวิธี dual culture พบว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร แต่ละไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* ไอโซเลท CR4, SB4 และ PL6 ได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งในระดับสูงมากจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ PRE5, CINv1 และ CEN26 เท่ากับ 84.80, 82.66 และ 81.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 2) นอกจากนั้นจากรายงานของ อาภาพร และ เกวลิน (2557) ที่นำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท CINv1 มาใช้ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora cactorum* สาเหตุโรครากเน่าของสตรอว์เบอร์รี่ พบว่า สามารถยับยั้งได้ในระดับสูงเช่นกัน

3. การทดสอบชนิดกระดาศรองรับ aerial mycelium ในการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีตส์เอนโดไฟต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีตส์เอนโดไฟต์ไอโซเลท PRE5, CINv1 และ CEN26 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 แล้ววางกระดาศชนิดต่าง ๆ ทับบนผิวหน้าอาหาร การทดลองด้วยกระดาศชนิดเพาะเมล็ดเป็นกระดาศที่พบจำนวนสปอร์ที่สร้างบน aerial mycelium ต่อแผ่นมากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 4.13×10^9 spores/piece (ตารางที่ 1) และเมื่อนำกระดาศที่มีสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีตส์เอนโดไฟต์ทดสอบแก้วในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ พบว่าสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีตส์เอนโดไฟต์สามารถหลุดออก

จากกระดาศได้ง่ายและรวดเร็ว แตกต่างจากการใช้กระดาศกรองที่สปอร์จะยึดติดได้แน่นหลุดออกได้ยาก นอกจากนี้กระดาศชนิดเพาะเมล็ดมีความเหนียว ทนต่อการเปื่อยยุ่ยเมื่อจุ่มแก้วในน้ำ และมีราคาถูก จึงเหมาะแก่การนำมาเป็นวัสดุรองรับการสร้างสปอร์และใช้เป็นชีวภัณฑ์แบบสปอร์แห้งควบคุมโรคยอดผักดาบ วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อย่างง่ายและราคาประหยัดที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการคือ การเก็บบนกระดาศกรอง ซึ่งมีรายงานการวิจัยของวันเจริญ และคณะ (2540) สามารถเก็บรักษาได้นาน 3 ปี ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ การพัฒนาวิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้กระดาศกรองเป็นวัสดุรองรับมีการรายงานโดย Fong *et al.* (2000) และ



Figure 2. *Fusarium moniliforme* isolates PL6, CR4 and SB4 colony inhibited by 3 isolates, PRE5, CEN26 and CINv1 of endophytic actinomycetes using dual culture method on IMA-2 medium for 10 days

Table 1. Number of aerial mycelium (spore) of endophytic actinomycete 3 isolates obtaining on various supported papers placing on surface of IMA-2 media for 7 days then drying at 30 °C for 4 days

treatment	x 10 ⁹ spores/piece ¹			
	PRE5	CINv1	CEN26	Average
Germination test paper	2.29	5.34	4.77	4.13 (413%) ²
Whatman filter paper No.1	1.52	2.29	1.91	1.91 (191%)
Whatman filter paper No.2	1.78	1.83	1.72	1.78 (178%)
Whatman filter paper No.4	1.01	2.80	2.86	2.22 (222%)
Whatman filter paper No.5	1.02	1.65	1.40	1.36 (136%)
Control (without paper)	0.09	0.10	0.11	0.10

¹ Average of 4 replicates

² Percentage increased number of aerial mycelium spore

Kulkarni and Chitte (2015) พบว่า สามารถคงความมีชีวิตของเชื้อราและเชื้อ *Streptomyces* sp. ชนิดทนอุณหภูมิสูงได้เป็นระยะเวลาอันยาวนานมากกว่า 1 ปี

4. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในควบคุมโรคยอดผักตบของข้าวไรซ์เบอร์รี่ ระยะกล้า

จากการตรวจสอบวัดความสูงของต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 7 วันหลังวางเมล็ด พบว่า ในชุดควบคุมต้นข้าวที่มีการแช่ด้วยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ PRE5, CINv1 และ CEN26 มีความสูงมากกว่าต้นข้าวที่ไม่ได้แช่ด้วยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ซึ่งแตกต่างกันในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีความสูง 10.95, 11.42 และ 11.05 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ปลูกด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* ไอโซเลท PL6, CR4 และ SB4 พบว่า ต้นข้าวที่มีการปลูกเชื้อร่วมกับการแช่แอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท PRE5 มีความสูงมากที่สุด คือ 19.88, 15.38 และ 19.16 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละชุดการทดลอง จากลักษณะความสูงของต้นกล้าที่พบแสดงให้เห็นว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์สามารถผลิตฮอร์โมนที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้ในระดับหนึ่งที่ไม่ก่อให้เกิดผลเสียกับพืช ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อรุณา และเบญจวรรณ (2560) และ Marja (2000) รายงานว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์สามารถผลิตสารที่มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของพืชได้ แต่เมื่อสังเกตในชุดการทดลองที่มีการปลูกเชื้อราสาเหตุร่วมกับเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ พบว่า ต้นข้าวมีความสูงมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเกือบ 2 เท่า ต้นกล้าข้าวมีสีเขียวอมเหลือง ลำต้นลีบเล็ก ใบเรียวยาว ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวเกิดจากต้นกล้าข้าวได้รับปริมาณฮอร์โมนจิบเบอเรลินที่เชื้อราสาเหตุโรคสร้างขึ้นเป็นปริมาณมากจนก่อให้เกิดอาการผิดปกติในพืช สอดคล้องกับผลการรวบรวมเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคยอดผักตบในข้าวของ Gupta *et al.* (2015) ระบุว่า สารทุติยภูมิสำคัญที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา *F. moniliforme* (syn. *F. fujikuroi*) คือ gibberellic acid (GA_3) เช่นเดียวกับ Chung *et al.*

(2016) รายงานว่าอาการของโรคยอดผักตบในต้นกล้าข้าว สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะลำต้นที่ยืดยาว ต้นแคระแกร็น มุมกางของใบกับลำต้นที่กว้างมากกว่าปกติ และใบเหลือง ในการตรวจสอบโดยใช้ลักษณะอาการดังกล่าวมีระดับความแม่นยำ เท่ากับ 87.90-91.80 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการนับจำนวนต้นกล้าที่มีชีวิตรอดหลังครบ 30 วัน พบว่า การแช่เมล็ดข้าวด้วยเชื้อแอกติโนไมซีสต์ไอโซเลท CINv1 ต้นกล้ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุดในทุกชุดการทดลอง โดยในชุดควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อรา *F. moniliforme* มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 80.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในชุดการทดลองที่มีการปลูกด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* ไอโซเลท PL6, CR4 และ SB4 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ 20.00, 69.50 และ 55.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อสังเกตลักษณะของต้นกล้าข้าวที่มีชีวิตรอด พบว่า ต้นกล้ามีความสูงในระดับเดียวกับชุดควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค ลำต้นอวบแข็งแรง ใบมีสีเขียว แตกต่างจากต้นกล้าในชุดการทดลองที่มีการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคอย่างชัดเจน สอดคล้องกับรายงานของ Kizuka *et al.* (1998) และ Shimizu *et al.* (2001) ที่ต้นกล้า rhododendron เมื่อได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์สามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้มากกว่าต้นกล้าในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

5. การตรวจสอบความคงอยู่ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในต้นกล้าข้าวหลังการออก

จากการนำต้นกล้าข้าวอายุ 7 วัน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยการแช่ใน spore suspension ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ มาตรวจสอบความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยในพืชโดยวิธีการแยกเชื้อกลับจากชิ้นส่วนใบ ลำต้น ราก และเปลือกเมล็ดของข้าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 เป็นเวลา 7 วัน สามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์กลับได้ทุกไอโซเลท สอดคล้องกับการทดลองของ ฅมปพ และเกวลิน (2560) ที่สามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์กลับจากต้นกล้าข้าวตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อ 1, 3, 5, 7 และ

14 วันได้เช่นกัน โดยแยกได้จากบริเวณรากมากที่สุดและเมื่อเวลาครบ 14 วันไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้นซึ่งเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับแต่ละไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์มีความแตกต่างกัน โดยเชื้อไอโซเลท CINv1 มีเปอร์เซ็นต์แยกเชื้อกลับสูงที่สุดเท่ากับ 96.15 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ PRE5 92.31 เปอร์เซ็นต์และ CEN26 75.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ออกมาจากชิ้นส่วนต่าง ๆ สอดคล้องการทดลองใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท CINv1 โดย อามาร และเกวลิน (2557) ที่พบว่า เชื้อสามารถเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อต้นสตรอว์เบอร์รีในสภาพปลอดเชื้อได้ดีมากเช่นกัน

สรุป

เชื้อรา *F. moniliforme* สาเหตุโรคยอดฝักดาบของข้าวไรซ์เบอร์รี ไอโซเลท CR4, SB4 และ PL6 มีความสามารถในการก่อโรคในต้นกล้าข้าวได้อย่างรุนแรงซึ่งส่งผลให้ต้นกล้าที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงอาการลำต้นลีบเล็ก ยึดยาว มีสีเหลือง หากอาหารรุนแรงจะแห้งตายไปในที่สุด จากนั้นนำเชื้อราสาเหตุโรคมาทดสอบกับการเพาะต้นกล้าข้าวโดยใช้วิธีแช่เมล็ดข้าวใน spore suspension ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท PRE5, CINv1 และ CEN26 ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรก่อนนำไปปลูกเชื้อราสาเหตุโรค พบว่า สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของต้นกล้าข้าว และเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์มีความสามารถในการคงอยู่ในเนื้อเยื่อต้นกล้าข้าวหลังงอกได้ โดยผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ทั้ง 3 ไอโซเลทเหมาะกับการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคยอดฝักดาบของข้าวไรซ์เบอร์รี โดยรูปแบบที่เลือกคือ การเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์บนกระดาษเพาะเมล็ด ซึ่งพบว่าสามารถสร้างสามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดมากกว่ากระดาษชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และกลุ่มการผลิตข้าวกำลังนาและข้าวไรซ์เบอร์รี อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ระดับปริญญาโท

เอกสารอ้างอิง

- ณภพ แก้วกันทา และ เกวลิน คุณาศักดากุล. 2560. ศักยภาพการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวในการควบคุมโรคไหม้ของต้นกล้าข้าว. วารสารเกษตร 33(2): 203-213.
- วันเชิญ โพธาเจริญ ไพพรรณ นุตกะ บัณฑิต ผังสินธุ์ ขวัญจิต วรรดี และ ลาวลย์ ชตานนท์. 2540. การใช้เทคนิคอย่างง่ายในการเก็บรักษาจุลินทรีย์. หน้า 228-235. ใน: รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สายชล โนชัย และ สมบัติ ศรีชูวงศ์. 2550. ประสิทธิภาพของ เชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการควบคุมโรคยอดฝักดาบในต้นกล้าข้าว. วารสารเกษตร 23: 59-66.
- อภิรักษ์ สมฤทธิ์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี ธารทิพย์ ภาสบุตร และ สุณิรัตน์ สิมะเดื่อ. 2553. สำรวจ รวบรวมและจำแนกราก *Fusarium* สาเหตุโรคพืช. รายงานผลงานวิจัยและพัฒนา ปี 2553. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 20 หน้า.
- อรอุมา เรืองวงษ์ และ เบญจวรรณ ใจจันทร์. 2560. การใช้แอกติโนไมซีท์จากดินเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคน้ำลายของมะเขือเทศ. วารสารเกษตร 33(1): 49-59.

- อภาพพร โพธิยอด และ เกวลิน คุณาศักดากุล. 2557. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรครากเน่าไฟทอปธอราในสตรอว์เบอร์รี่ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเชื้อแอกติโนไมซีส์เอนโดไฟต์. วารสารเกษตร 30(3): 213-222.
- Chung, C.L., K.J. Huang, S.Y. Chen, M.H. Lia, Y.C. Chen and Y. F. Kuo. 2016. Detecting bakanae disease in rice seedling by machine vision. Computers and Electronics in Agriculture 121: 404-411.
- Fong, Y.K., S. Anuar, H.P. Lim, F.Y. Tham and F.R. Sanderson. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. Mycologist 14(3): 127-130.
- Gupta, A.K., I.S. Solanki, B.M. Bashyal, Y. Singh and K. Srivastava. 2015. Bakanae of rice - an emerging disease in Asia. The Journal of Animal & Plant Sciences 25(6): 1499-1514.
- Hossain, S.A., M. Ayub Ali, M.A. Taher Mia, M.S. Islam and Z.R. Moni. 2013. Estimation of yield loss by *Fusarium moniliforme* caused bakanae disease of rice. Eco-Friendly Agriculture Journal 6(03): 40-43.
- Karov, I.K., S.K. Mitrev and E.D. Kostadinovska. 2009. *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenweber, the new parasitical fungus on rice in the Republic of Macedonia. Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska Novi Sad 116: 175-182.
- Kizuka, M., R. Enokita, K. Takahashi, Y. Okamoto, T. Otsuka, Y. Shigematu, Y. Inoue and T. Okazaki. 1998. Studies on actinomycetes isolated from plant leaves. Actinomycetologica 12: 89-91.
- Kulkarni, G.A. and R.R. Chitte. 2015. Preservation of thermophilic bacterial spores using filter paper disc techniques. Journal of Bioprocessing & Biotechniques 5: 1-4.
- Marja, L.L. 2000. How Mycostop® acts in the control of fungal plant diseases. (Online). Available: http://www.shkagro.com/otros/efecto_fungicida.pdf (April 1, 2016).
- Ou, S.H. 1985. Rice Diseases. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 380 p.
- Phuakjaiphaeo, C. and K. Kunasakdakul. 2015. Isolation and screening for inhibitory activity on *Alternaria brassicicola* of endophytic actinomycetes from *Centella asiatica* (L.) Urban. Journal of Agricultural Technology 11(4): 903-912.
- Shimizu, M., N. Fujita, Y. Nakagawa, T. Nishimura, T. Furumai, Y. Igarashi, H. Onaka, R. Yoshida and H. Kunoh. 2001. Disease resistance of tissue-cultured seedlings of rhododendron after treatment with *Streptomyces* sp. R-5. Journal of General Plant Pathology 67: 325-332.
- Sunder, S., Satyavir and K.S. Virk. 1997. Studies on correlation between bakanae incidence and yield loss in paddy. Indian Phytopathology 50(1): 99-101.
- Zainudin, N.A.I.M., A.A. Razak and B. Salleh. 2008. Bakanae disease of rice in Malaysia and Indonesia: etiology of the causal agent based on morphological, physiological and pathogenicity characteristics. Journal of Plant Protection Research 48(4): 475-485.