การคัดแยกแอคติโนมัยสีทในดินที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Curvularia* sp.

Isolation of actinomycetes from soils for antifungal activity against *Curvularia* sp.

วาสนา เนียมแสวง* เมธาวี แซ่อึ้ง และหัสยา สระหงษ์ทอง

[1]*สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม*
**wasana@npru.ac.th*

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแอคติโนมัยสีทในดินและคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา Curvularia sp. โดยเก็บตัวอย่างดินจำนวน 9 แหล่ง ดังนี้ ดินตำบลท่าเสา อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี 3 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณสวนมะกรูด ดินในไร่มันสำปะหลัง และดินบริเวณไร่มะเขือเปราะ ดินตำบลโพรงมะเดื่อ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 1 แหล่ง คือ ดินบริเวณนาข้าว ดินตำบลทุ่งกระพังโหม อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 2 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณแปลงปลูกพืชผักสวนครัว และดินบริเวณสวนดอกไม้ ดินตำบลวังหว้า อำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี 3 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณใต้ต้นหมาก ดินบริเวณใต้ต้นน้อยหน่า และดินบริเวณใต้ต้นสน พบว่าสามารถคัดแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมดจำนวน 50 ไอโซเลท เมื่อนำแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกไว้ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา Curvularia sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคเมล็ดด่างในข้าว ด้วยวิธี Dual culture technique โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีเพียง 9 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ Curvularia sp. ได้ ซึ่งไอโซเลท CS40 มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 72.00 รองลงมา คือ CS43 และ CS47 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากับ 69.00 และ 63.00 ตามลำดับ ในขณะที่อีก 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง Curvularia sp. ได้ในระดับปานกลาง – ต่ำ ได้แก่ CS49 CS25 CS8 CS14 CS9 และ CS1 มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญเท่ากับ 60.00 36.00 36.00 33.00 และ 30.00 ตามลำดับ

คำสำคัญ: แอคติโนมัยสีท เชื้อรา *Curvularia* sp. โรคเมล็ดด่างในข้าว

Abstract

This study aimed to isolate and screen actinomycetes with antifungal activity for inhibition of Curvularia sp. Soil samples were collected from 9 agricultural areas; 3 areas from Tha Sao Sub-district, Kanchanaburi Province; 1 area from Prongmadua and 2 areas from Thungkraphanghom Sub-district, Nakhon Pathom Province; 3 areas from Wangwa Sub-district, Suphanburi Province. Total 50 isolates of actinimycetes were isolated. Antifungal activity against Curvularia sp. was determined by dual culture technique found that only 9 isolates had the antifungal activities. Isolate CS40 showed the highest antifungal activity with 72% inhibition followed by CS43 and CS47 with 69% and 63% respectively. While the other 6 isolates; CS49, CS25, CS8, CS14, CS9 and CS1 had the antifungal activities against Curvularia sp. in moderate to low levels with the percentage of inhibition of 60, 36, 36, 33 and 30 respectively.

Keywords: actinomycetes, *Curvularia* sp., dirty panicle disease

1. บทนำ

โรคเมล็ดด่างในข้าว (Dirty panicle disease) จัดเป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งในการผลิตข้าวและเกิดการระบาดอย่างรุนแรงทำให้ผลผลิตเสียหายอย่างมาก โรคเมล็ดด่างในนาข้าวเกิดจากเชื้อรา *Curvularia* sp. นั้น พบมากในนาชลประทานเขตภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ หรือทั่ว ๆ ทั้งประเทศก็ว่าได้ โรคนี้จะมีอาการในระยะออกรวง พบแผลเป็นจุดสีน้ำตาลหรือดำที่เมล็ดบนรวงข้าว บางส่วนก็มีลายสีน้ำตาลดำและบางพวกมีสีเทาปนชมพู ทั้งนี้เพราะมีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถเข้าทำลายและทำให้เกิดอาการต่างกันไป การเข้าทำลายของเชื้อรามักจะเกิดในช่วงดอกข้าวเริ่มโผล่จากกาบหุ้มรวงจนถึงระยะเมล็ดข้าวเริ่มเป็นน้ำนม และอาการเมล็ดด่างจะปรากฏเด่นชัดในช่วงเก็บเกี่ยว การกำจัดโรคนี้เกษตรกรไทยส่วนใหญ่ยังคงนิยมใช้สารเคมี เนื่องจากสารเคมีออกฤทธิ์เร็วและมีประสิทธิภาพเห็นผลชัดเจน อย่างไรก็ตามการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีดังกล่าวมักมีผลเสีย เพราะต้องใช้เป็นประจำและต่อเนื่อง ส่งผลให้เชื้อดื้อยาเกิดการปนเปื้อนสารเคมีกับผลผลิตและสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้การควบคุมโรคโดยชีววิธีจึงเข้ามามีบทบาทมากขึ้น เพื่อลดปัญหาการใช้สารเคมีและเป็นการรักษาความสมดุลของธรรมชาติ ปัจจุบันจึงมีการศึกษาความหลากหลายและการนำมาใช้ประโยชน์ของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีท (Actinomycetes) ซึ่งจะมีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก พบมากในดิน เจริญเป็นสายใยและสร้างสปอร์คล้ายเชื้อรา เจริญได้ดีเมื่อมีออกซิเจน ดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายของระบบนิเวศ เพื่อสร้างความสมดุลให้กับระบบนิเวศ และแอคติโนมัยสีทยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase) อะไมเลส (amylase) ไลเปส (lipases) ไคติเนส (chitinase) และสารสี เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำแอคติโนมัยสีทมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ อาทิเช่น ด้านการแพทย์และเภสัชกรรมได้มีการค้นหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ เพื่อใช้ต่อต้านและยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส ส่วนด้านการเกษตรกรรมมีการใช้แอคติโนมัยสีทในการผลิตสารป้องกันกำจัดแมลงและสารป้องกันกำจัดวัชพืช หรือใช้ในการรักษาโรคพืชได้เช่นกัน (กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน, 2555: 12) ดังนั้นในงาวิจัยนี้จึงศึกษาแอคติโนมัยสีทในดินที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Curvularia* sp.

2. วัตถุประสงค์ในการวิจัย

เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia* sp.

3. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แอคติโนมัยสีท เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำพวกหนึ่งที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรา คือมีการเจริญเป็นเส้นใย และมีการสร้างสปอร์ แต่ขนาดเซลล์เล็กเท่ากับแบคทีเรีย มักยึดเกาะแน่นในโคโลนีที่จมอยู่ในอาหารที่เจริญอยู่ ส่วนของเส้นใยที่สัมผัสกับอากาศแห้ง จะมีการเปลี่ยนรูปไปเป็นสปอร์ ซึ่งใช้ในการแพร่พันธุ์เช่นเดียวกันกับเชื้อราดำรงชีวิตอยู่ในดิน ในปุ๋ยหมัก ในน้ำโคลนตม และบริเวณรากพืช ปริมาณของแอคติโนมัยสีทที่พบในดินขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพของดิน เช่น ในดินทั่วไป 1 กรัม ที่มีสภาพความเป็นกรดและมีปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน จะพบแอคติโนมัยสีทประมาณ 10^5- 10^8 เซลล์ แต่ถ้าเป็นดินที่มีสภาพแห้งและมีสภาวะเป็นด่างจะพบแอคติโนมัยสีทในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูง โดยอาจพบได้สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในดินนั้น และแอคติโนมัยสีทที่พบในดินส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตมัยสีท (Streptomyces) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการกระจายตัวและมีความหนาแน่นมากที่สุด

โรคเมล็ดด่าง เป็นโรคที่พบระบาดทำความเสียหายแก่แปลงข้าวของเกษตรกร สามารถพบเห็นได้ทั่วไป โดยเฉพาะนาข้าวในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย ซึ่งเดิมเกษตรกรเชื่อว่าอาการเมล็ดด่างเกิดจากแมลงทำลาย ซึ่งต่อมาพบว่ามีเชื้อราหลายชนิดที่ทำให้เกิดอาการด่างลายของเมล็ดข้าว โดยเชื้อราที่ทำให้เกิดอาการด่างลายของเมล็ดข้าว ได้แก่ *Curvularia lunata*, *Cercospora oryzae*, *Helminthosporium oryzae*, *Fusarium semitectum* และ *Trichoconis padwickii* โรคนี้ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในการปลูกข้าวทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ (จิตรา น้อยพันธ์, 2557: 26)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Curvularia* sp. พบว่าลักษณะเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) เมื่อดูด้วยตาเปล่า จะมีสีขาวฟูและเมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มจนเป็นสีดำ ซึ่งถ้าตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เส้นใยมีผนังกั้นแตกกิ่งก้านมากมาย ซึ่งเส้นใยที่ยังอ่อนอยู่จะไม่มีสี แต่เมื่อแก่เส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว เป็นเส้นใยที่มีผนังกั้นและเมื่อแก่สีของเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน ขนาดเส้นใยเฉลี่ย 4.00 x 17.29 ไมครอน โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) มีเส้นใยที่มีผนังกั้นลักษณะตรงไม่แตกกิ่งก้าน มีสีเขียว แต่เมื่อแก่สีจะเข้ม มีโคนิเดีย (conidia) เกิดติดเป็นช่ออยู่ที่ส่วนปลายโคนิดิโอฟอร์ใหญ่กว่าส่วนโคน โคนิเดียจะเกิดติดเป็นช่ออยู่บนส่วนปลายโคนิดิโอฟอร์ ลักษณะโคนิเดียมีทั้งโค้งและไม่โค้ง มีสีเขียว เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาล เซลล์หัวและท้ายมีสีจางเกือบไม่มีสี สองเซลล์ตรงกลางมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่น ซึ่งมีเซลล์ที่สองนับจากปลายโคนิเดีย มักพบมีขนาดใหญ่ และสีเข้มกว่าเซลล์อื่น บางครั้งพบโคนิเดียมีขนาดเล็ก ไม่มีสี ซึ่งมักพบเกิดติดอยู่บนปลายโคนิดิโอฟอร์เสมอ

การคัดแยกแอคติโนมัยสีทในดินที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Curvularia* sp. มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน (2558: 21-24) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกและระบุหาแอคติโนมัยสีทจากดินอุทยานแห่งชาติภูลังกา จังหวัดนครพนม สุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากของกล้วยไม้ ดินใต้ต้นไม้ ดินบริเวณเห็ดเจริญ และดินจอมปลวก สภาพดินเป็นดินร่วนสีน้ำตาล เตรียมตัวอย่างดินด้วยร้อยละ 10 แคลเซียมคาร์บอเนต ตากแห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน คัดแยกสายพันธุ์แอคติโนมัยสีทด้วยวิธีเจือจางลดหลั่นต่อเนื่อง และเทคนิคเกลี่ยลงจานอาหารเพาะเลี้ยง ประกอบด้วยแป้งและโปรตีนเคซีน ระบุหาได้ 129 กลุ่ม ลักษณะของการยึดติดกลุ่มอัดแน่นบนอาหารเพาะเลี้ยง กลุ่มมีสีต่าง ๆ ได้แก่ ขาว เทา และเหลือง ลักษณะคล้ายหนังฟอกนุ่มเหมือนกำมะหยี่บดเป็นผง เส้นใยใต้อาหารส่วนใหญ่เป็นสีขาว ไม่แตก และมีรงควัตถุสีดำ น้ำตาล และเหลือง การศึกษารูปลักษณะบ่งบอกว่าเป็นสายพันธุ์ของวงศ์ Steptomyces, Microbispora และ Microtetraspora

นราวรรณ ปั้นงาม (2554: 234-241) ได้ทำการศึกษาคัดแยกแอคติโนมัยสีทจำนวน 247 ไอโซเลท จากดินนาข้าวจำนวน 35 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจาก 16 จังหวัดในประเทศไทย เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชนิดของ diaminopimelic ในเซลล์ที่ถูกย่อยพบว่า 198 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม streptomycetes และ 49 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม non-streptomycetes นำไอโซเลทที่คัดแยกได้ทั้งหมด มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคข้าว 3 ชนิด ได้แก่ *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium oryzae* และ *Rhizoctonia solani* บนอาหาร potato dextrose agar ด้วยวิธี dual culture พบว่าไอโซเลท RF 16-12 มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคข้าวทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด จึงนำมาทดสอบผลต่อการงอกของเมล็ดข้าวในสภาวะที่มีและไม่มี *F. moniliforme* โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS ตามวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการใช้สปอร์แขวนลอยไอโซเลท RF 16-12 มีผลควบคุมการเจริญของ *F. moniliforme* ในเมล็ดข้าว และไม่มีผลยับยั้งการงอกของราก และยอดข้าว เมื่อศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลท RF 16-12 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces yogyakartensis* NBRC 100779 sup (T) ที่ 99.86 เปอร์เซ็นต์

ปิยาภรณ์ ทองบ้านไทร และคณะ (2559: 59-62) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. จำนวน 3 ไอโซเลท (Tr-1, Tr-2 และ Tr-3) ในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว ด้วยวิธี dual culture test พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ทัง 3 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. lunata* จำนวน 5 ไอโซเลท (C-11, C-12, C-23, C-24 และ C-25) อยู่ในช่วง 47-61 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. (Tr-3) ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ทางการค้ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยได้ดีที่สุด ส่วนกลไกหลักในการยับยั้งที่พบ คือ competition และ exploitation สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อรา *C. lunata* (C-12) บนต้นกล้าข้าว 2 สายพันธุ์ พบว่าในวันที่ 9 หลังการเพาะเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคบนต้นกล้าข้าวปทุมธานี 1 และสุพรรณบุรี 1 อยู่ในช่วง 40.1-41.7 และ 41.2-43.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

วิไลลักษณ์ โคมพันธุ์ และสมเกียรติ ทับทิม (2559: 942-947) ได้ทำการศึกษาผลของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบรากพริกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช *Colletotrichum capsici*, *Curvularia lunata* และ *Fusarium solani* บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และ McBeth Scale Agar (MBS) ด้วยวิธี dual culture เป็นเวลา 10 วัน พบว่า แอคติโนมัยสีทสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. capsici* ได้ดีบนอาหาร PDA คือ ไอโซเลท CS2 และ CS4 (78.92 เปอร์เซ็นต์ และ 78.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนอาหาร MBS คือ ไอโซเลท CS2 และ CS5 (64.54 เปอร์เซ็นต์ และ 63.63 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *C. lunata* ได้ดีบนอาหาร PDA และ MBS คือ ไอโซเลท CS2 (78.84 เปอร์เซ็นต์ และ 72.81 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ไอโซเลท CS2 CS3 และ CS5 ยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ได้ดีบนอาหาร PDA (70.79 69.09 และ 69.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ในขณะที่บนอาหาร MBS ไอโซเลท CS2 และ CS3 สามารถยับยั้งการเจริญของ *F. solani* ได้ดีที่สุด (64.35และ 62.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารต่างชนิดกัน พบว่าแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหาร PDA ได้ดีที่สุด

Ningthoujam et al. (2009: 737-742) ได้ทำการศึกษาแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ในรัฐมณีปุระเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เป็นปฏิปักษ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว ได้แก่ *Curvularia oryzae* MTCC 2605, *Pyricularia oryzae* MTCC 1477, *Bipolaris oryzae* LSMU1, และ *Fusarium oxysporum* MTCC 287. LSCH-10C, NRP1-14, NRP1-18 และ NRP1-26 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ chitin agar โดยการทดสอบด้วยวิธี dual culture พบแอคติโนมัยสีท 33 ไอโซเลท ที่แยกได้จากทะเลสาบ Loktak แอคติโนมัยสีทที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ chitin agar ส่วนใหญ่มีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นตัวแทนในการควบคุมทางชีวภาพ (BCA) สำหรับนาข้าวในลักษณะของการเป็น fungitoxic หรือ fungistatic รายงานฉบับนี้จึงนำเสนอผลการศึกษาเบื้องต้นของเชื้อแอคติมัยสีทในการควบคุมทางชีวภาพ ของเชื้อบางสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกเพื่อศึกษาต่อไปสู่การประยุกต์ใช้เป็น BCAs ในข้าว

Janaki et al. (2016: 267-271) ได้ทำการศึกษากิจกรรมการต้านเชื้อราของแอคติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลน ด้วยวิธี pre-treatment ที่ความร้อนแห้ง (70 องศาเซลเซียส) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ starch casein agar จากตัวอย่างดินพื้นที่ป่าชายเลน พบว่าสามารถคัดแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี agar plug method คัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *A. marina* ได้เพียง 2 ไอโซเลท ซึ่งไอโซเลท M-20 ได้รับการคัดเลือกในการศึกษาต่อไป

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างดิน และการคัดแยกแอคติโนมัยสีท

เก็บตัวอย่างดินโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างจาก 9 แหล่ง ดังนี้ ดินตำบลท่าเสา อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี 3 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณสวนมะกรูด ดินบริเวณไร่มันสำปะหลัง และดินบริเวณไร่มะเขือเปราะ ดินตำบลโพรงมะเดื่อ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 1 แหล่ง คือ ดินบริเวณนาข้าว ดินตำบลทุ่งกระพังโหม อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 2 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณแปลงปลูกพืชผักสวนครัว และดินบริเวณสวนดอกไม้ ดินตำบลวังหว้า อำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี 3 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณใต้ต้นหมาก ดินบริเวณใต้ต้นน้อยหน่า และดินบริเวณใต้ต้นสน กำหนดจุดเก็บตัวอย่าง 3 จุดต่อ 1 แหล่งพื้นที่ โดยการเก็บตัวอย่างดินบริเวณผิวหน้าดินที่มีความลึกประมาณ 1-2 เซนติเมตร สังเกตลักษะเนื้อดินและวัดค่า pH ตักตัวอย่างดินลงในถุงพลาสติก นำดิน 10 กรัม มาทำ dilutions และทำ Spread plate บนอาหารแข็ง ISP2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เลือกแอคติโนมัยสีทที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการ Streak plate ลงบนอาหารแข็ง ISP2 แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4.2 การคัดแยกเชื้อราก่อโรคข้าว

นำเมล็ดข้าวที่เป็นโรคมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง นำเมล็ดข้าวมาซับด้วยกระดาษปลอดเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน คัดแยกโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Mew, T.W. and Misra, J.K., 1994) เพื่อใช้เป็นเชื้อทดสอบในขั้นต่อไป

4.3 การทดสอบความสามารถของแอติโนมัยสีทในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia* sp

นำแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา*Curvularia* sp ด้วยวิธี Dual culture technique โดยเพาะเชื้อแอคติโนมัยสีทเป็นเวลา 5-7 วัน ตัดชิ้นวุ้นโคโลนีของแอคติโนมัยสีทขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางลงบนอาหารแข็ง PDA โดยวางในแนวเส้นผ่านศูนย์กลางของจานอาหาร และห่างจากขอบจานอาหาร 2.5 เซนติเมตร และตัดชิ้นวุ้นโคโลนีเชื้อราขนาดเท่ากันวางด้านตรงข้ามกัน และห่างจากขอบจานอาหาร 2.5 เซนติเมตร เช่นกันในชุดทดสอบนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ โดยมีเชื้อราเป็นชุดควบคุม ตรวจผลโดยการวัดขนาดรัศมีของเชื้อราในชุดควบคุมและชุดทดสอบ จากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial Growth: PIRG) (Gamliel, A. et al, 1989: 101-105) ดังนี้

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

R1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

โดยประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งจากค่า PIRG (ร่มสุรีย์ มนตรีภักดี และสรัญยา ณ ลำปาง, 2559: 188) ดังนี้

> 75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูงมาก

> 61-75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูง

> 51-60 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับปานกลาง

< 50 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับต่ำ

5. ผลการวิจัย

5.1 ผลการเก็บตัวอย่างดิน และการคัดแยกแอคติโนมัยสีท

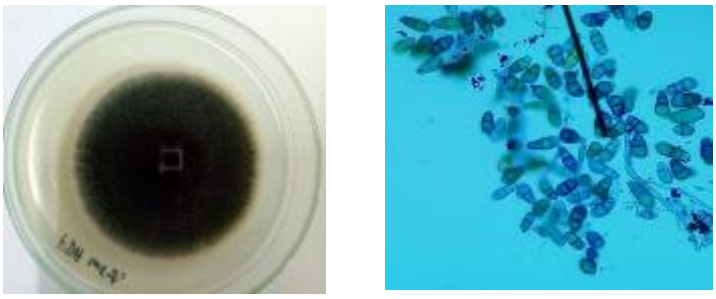
การเก็บตัวอย่างดินจำนวน 9 แหล่ง ดังนี้ ดินตำบลท่าเสา อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี 3 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณสวนมะกรูด ดินบริเวณไร่มันสำปะหลัง และดินบริเวณไร่มะเขือเปราะ ดินตำบลโพรงมะเดื่อ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 1 แหล่ง คือ ดินบริเวณนาข้าว ดินตำบลทุ่งกระพังโหม อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 2 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณแปลงปลูกพืชผักสวนครัว และดินบริเวณสวนดอกไม้ ดินตำบลวังหว้า อำเภอศรีประจันต์ จังหวัดสุพรรณบุรี 3 แหล่ง ได้แก่ ดินบริเวณใต้ต้นหมาก ดินบริเวณใต้ต้นน้อยหน่า และดินบริเวณใต้ต้นสน สามารถคัดแยกแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมดจำนวน 50 ไอโซเลท ได้แก่ 2 10 12 3 10 1 3 5 และ 4 ไอโซเลท ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการคัดแยกแอคติโนมัยสีท

แหล่งเก็บตัวอย่างดิน	ลักษณะเนื้อดิน	ค่า pH	รหัสไอโซเลท	จำนวนไอโซเลท
ดินบริเวณสวนมะกรูด	ดินเหนียว	5.5	CS4 CS5	2
ดินบริเวณไร่มันสำปะหลัง	ดินร่วนปนทราย	7.6	CS6 CS7 CS8 CS9 CS10 CS11 CS12 CS13 CS14 CS15	10
ดินบริเวณไร่มะเขือเปราะ	ดินร่วนปนทราย	6.8	CS39 CS40 CS41 CS42 CS43 CS44 CS45 CS46 CS47 CS48 CS49 CS50	12
ดินบริเวณนาข้าว	ดินเหนียว	5.0	CS1 CS2 CS3	3
ดินบริเวณแปลงปลูกพืชผักสวนครัว	ดินร่วน	7.7	CS16 CS17 CS18 CS19 CS20 CS21 CS22 CS23 CS24 CS25	10
ดินบริเวณสวนดอกไม้	ดินเหนียว	5.5	CS38	1
ดินบริเวณใต้ต้นหมาก	ดินเหนียว	5.8	CS26 CS27 CS28	3
ดินบริเวณใต้ต้นน้อยหน่า	ดินเหนียว	5.8	CS29 CS30 CS31 CS32 CS33	5
ดินบริเวณบริเวณใต้ต้นสน	ดินเหนียว	4.0	CS34 CS35 CS36 CS37	4

5.2 ผลการคัดแยกเชื้อราก่อโรค

เมื่อนำเมล็ดที่เป็นโรคมาทำการคัดแยกเชื้อ พบว่า เชื้อรามีลักษณะของเส้นใยเจริญหนาแน่นและฟู โคโลนีมีสีเทา เมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีสีเข้มจนเห็นเป็นสีดำ มีลักษณะของสปอร์รูปร่างโค้งมี 3-4 เซลล์ เซลล์ตรงกลางมีขนาดใหญ่ และเซลล์ตรงกลางจะมีสีเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย เกิดบนก้านโคนิดิโอฟอร์ ดังภาพที่1 ระบุว่าเป็นเชื้อรา *Curvularia* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมล็ดด่างในนาข้าว



(ก) (ข)

ภาพที่ 1 เชื้อรา *Curvularia sp.*

(ก) ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Curvularia* sp. บนอาหาร PDA

(ข) ลักษณะโคนิเดีย *Curvularia* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 40 เท่า

5.3 ผลการศึกษาความสามารถของแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia* sp.

จากแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลท พบว่า มีเพียง 9 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Curvularia* sp. ได้ โดยไอโซเลท CS40 มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 72.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ CS43 และ CS47 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากับ 69.00 และ 63.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่อีก 6 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *Curvularia* sp. ได้ในระดับปานกลาง - ต่ำ ได้แก่ CS49 CS25 CS8 CS14 CS9 และ CS1 มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญเท่ากับ 60.00 36.00 36.00 33.00 33.00 และ 30.00 ตามลำดับดังตารางที่ 2 และภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia* sp. โดยแอคติโนมัยสีทเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

รหัสไอโซเลท	**รัศมีการยับยั้ง (cm.)**	**เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia* sp. (%)**	**แหล่งเก็บตัวอย่างดิน**
CS40	2.4	72	ดินบริเวณไร่มะเขือเปราะ
CS43	2.3	69	ดินบริเวณไร่มะเขือเปราะ
CS47	2.1	63	ดินบริเวณไร่มะเขือเปราะ
CS49	2.0	60	ดินบริเวณไร่มะเขือเปราะ
CS25	1.2	36	ดินบริเวณแปลงปลูกพืชผักสวนครัว
CS8	1.2	36	ดินบริเวณไร่มันสำปะหลัง
CS14	1.1	33	ดินบริเวณไร่มันสำปะหลัง
CS9	1.1	33	ดินบริเวณไร่มันสำปะหลัง
CS1	1.0	30	ดินบริเวณนาข้าว

หมายเหตุ : control ไม่เกิดรัศมีการยับยั้ง

(ก) (ข)

ภาพที่ 2 การยับยั้งการเจริญของ *Curvularia* sp. โดยแอคติโนมัยสีทไอโซเลท CS40 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2
(ก) control
(ข) dual culture technique

6. สรุปผลการวิจัย

จากตัวอย่างดินจำนวน 9 แหล่ง สามารถคัดแยกได้แอคติโนมัยสีที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลท พบว่ามีเพียง 9 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Curvularia* sp. ได้ โดยไอโซเลท CS40 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งระดับสูงที่สุดเท่ากับ 72.00 เปอร์เซ็นต์

7. อภิปรายผลการวิจัย

7.1 การคัดแยกแอคติโนมัยสีทในดิน

จากการคัดแยกแอคติโนมัยสีทในดิน พบว่าสภาพดินที่แตกต่างกัน มีผลทำให้จำนวนและปริมาณของแอคติโนมัยสีท มีความแตกต่างกัน โดยทั่วไปแอคติโนมัยสีทมักจะเจริญอยู่บริเวณผิวดินที่ไม่ลึกเกินกว่า 4 เซนติเมตร แต่ถ้าในดินที่มีสภาพเป็นด่างจะพบแอคติโนมัยสีทในจำนวนมากกว่า สภาพแวดล้อมที่เหมาะแก่การเจริญของแอคติโนมัยสีท ได้แก่ บริเวณทุ่งหญ้าธรรมชาติ ทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ ซึ่งในดินที่ทำการเกษตรจะพบน้อย แต่จะไม่พบในดินที่ค่อนข้างเป็นกรด (ชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา และคณะ, 2546: 363-370) ดินบริเวณไร่มะเขือเปราะ จะพบจำนวนของแอคติโนมัยสีทมากที่สุด อีกทั้งยังเป็นบริเวณเดียวกับที่พบไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง *Curvularia* sp ได้สูงสุด ทั้งนี้เนื่องจากดินบริเวณดังกล่าวมีลักษณะเป็นดินร่วน มี pH เท่ากับ 6.8 ซึ่งเหมาะต่อการเจริญของแอคติโนมัยสีท

7.2 ความสามารถของแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia* sp.

การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าแอคติโนมัยสีทสามารถยับยั้ง การเจริญของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิไลลักษณ์ โคมพันธุ์ และสมเกียรติ ทับทิม (2559) ที่ได้ศึกษาผลของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบรากพริกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสพริก เชื้อรา *Curvularia lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างในข้าว และเชื้อรา *Fusarium solani* สาเหตุโรคเร่งตายในถั่วเหลือง พบว่าประสิทธิภาพของแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบรากพริกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดี ซึ่งกลไกการยับยั้งของแอคติโนมัยสีทต่อเชื้อรา เกิดจากการที่เชื้อแอคติโนมัยสีทสร้างเอนไซม์ไคติเนสมาทำลาย หรือย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล และชนิดาภา นวะพิฒ, 2555: 10-22)

8. ข้อแสนอแนะ

ศึกษาแนวทางในการประยุกต์ใช้แอคติโนมัยสีทในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia* sp. ในแปลงนาข้าว

9. เอกสารอ้างอิง

กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน. (2555). **ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน**. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี. 1-82.

กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน. (2558). การคัดแยกและระบุหาแอคติโนมัยสีทจากดินอุทยานแห่งชาติภูลังกา จังหวัดนครพนม. **วารสารนเรศวรพะเยา**. 8 (1), 21-24.

จิตรา น้อยพันธ์. (2557). **ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์กลาย BB165-M3 ในการเพิ่มผลผลิตและลดโรคเมล็ดด่างในข้าว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1-120.

ชนินทร์ สุริยกุล ณ อยุธยา, น้ำฝน ป้อมทอง, จรัญ เจตนะจิตร, พัชรี สุนทรนันท์ และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. (2546). เชื้อแอคติโนมัยสีทจากดินป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรังบริเวณสถานีวิจัยสัตว์ป่านางรำ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. ใน **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41: สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. วันที่ 3-7 กุมภาพันธ์ 2546**. 363-370.

นราวรรณ ปั้นงาม, อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และกรรณิการ์ ดวงมาลย์. (2554). แอคติโนมัยสีทจากดินนาและความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคข้าว. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49** วันที่ 1-4 ก.พ. 2554. 234-241.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล และชนิดาภา นวะพิฆ. (2555). การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยเชื้อแอคติโนมัยสีท *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24 ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนส. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**. 14 (1), 10-22.

ปิยาภรณ์ ทองบ้านไทร, ธิติ ทองคำงาม และถนิมนันต์ เจนอักษร. (2559) การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia lunata* สาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว (*Oryza sativa* L.). **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. 47 (3), 59-62.

ร่มสุรีย์ มนตรีภักดี และสรัญยา ณ ลำปาง. (2559). ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในการควบคุมเชื้อรา. **วารสารวิชาการเกษตร**. 34 (2), 184-195.

วิไลลักษณ์ โคมพันธ์ และสมเกียรติ ทับทิม. (2559). ผลของแอคติโยมัยสีทที่คัดแยกจากดินรอบรากพริกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* เชื้อรา *Curvularia lunata* และเชื้อรา *Fusarium solani*. **วารสารแก่นเกษตร**. 44 (1), 942-947.

Gamliel, A., Katan, J. and Cohen, E. (1989). Toxicity of chlornitrobenzenes to Fusarium oxysporum and Rhizoctonia solani as related to their structure. **Phytoparasitica**.17: 101-105.

Mew, T.W., and Misra, J. K. (1994). **A manual of rice seed health testing.** International rice research institute, Manila, The Phillippines. 113 pp.

Ningthoujam, D.S., Sanasam, S., Tamreihao, K. and Nimaichand, S. (2009). Antagonistic activities of local actinomycete isolates against rice fungal pathogens. **African Journal of Microbiology Research**. 3 (11): 737-742.

Janaki, T., Nayak, BK and Ganesan, T. (2015). Antibacterial activity of soil actinomycetes from the mangrove *Avicennia marina*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.** 5 (1): 267-271.