

ประสิทธิภาพของเชื้อเอกทีโนไมซิสต์เอนโดไฟต์
ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มีนาคม 2560

ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์
ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว

ณภาพ แก้วกันทา

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยเชียงใหม่เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มีนาคม 2560



ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์
ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว

ณภาพ แก้วกันทา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาโรคพืช

คณะกรรมการสอบ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

 ประธานกรรมการ  อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมบัติ ศรีชวงค์) (รองศาสตราจารย์ ดร. เกวติน คุณาศักดากุล)

 กรรมการ  อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. เกวติน คุณาศักดากุล) (อาจารย์ ดร. อรุมา เรืองวงษ์)

 กรรมการ
(อาจารย์ ดร. อรุมา เรืองวงษ์)

7 มีนาคม 2560

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. เภวลิน คุณาศักดากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำชี้แนะ ข้อคิดเห็น และความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดทั้งการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งตรวจแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ ถูกต้องสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์ ประธานกรรมการสอบ อาจารย์ ดร. อรุมา เรืองวงษ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการตรวจทานแก้ไข วิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งท่านอาจารย์และบุคลากรสาขาวิชาโรคพืชทุกท่าน ที่อบรมสั่งสอนวิชาความรู้ แนะนำแนวทางการทดลอง และเป็นกำลังใจให้ตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาโรคพืช เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณฉัตรสุดา เฟือกใจแก้ว คุณศิริมาศ ชัยชม และคุณณัฐธิกา วรรณรัตน์ที่ให้คำปรึกษา ชี้แนะและความช่วยเหลือตลอดการทำวิทยานิพนธ์ และขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ นักศึกษาสาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เป็นกำลังใจ และให้คำแนะนำที่ดีตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ชาย ที่ได้ให้การสนับสนุน อบรมสั่งสอน เลี้ยงดู และให้กำลังใจตลอดการทำงานงานวิจัยนี้ ซึ่งเป็นแรงผลักดันให้ข้าพเจ้าฟันฝ่าอุปสรรคปัญหาต่าง ๆ จนงานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ณปภพ แก้วกันทา

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว
ผู้เขียน	นาย ฌปภพ แก้วกันทา
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร. อรุมา เรืองวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากข้าว (*Oryza sativa* L.) บนอาหาร Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 174 ไอโซเลท แบ่งกลุ่มไอโซเลทตามระยะเวลาในการเริ่มสร้าง aerial mycelium และการเจริญเต็มจานอาหาร คัดเลือกไอโซเลทที่มีการเริ่มสร้าง aerial mycelium ภายใน 1 วัน และเจริญเต็มจานอาหาร ภายใน 3 วัน ได้จำนวน 10 ไอโซเลท และนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร จำนวน 10 ไอโซเลท จากห้องปฏิบัติการโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว ด้วยวิธี dual culture พบว่า เชื้อจำนวน 4 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีมาก (PIRG 74.17% - 90.00%) ได้แก่ เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากสมุนไพร 2 ไอโซเลท คือ ERY2 และ POL4 และเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าว 2 ไอโซเลท คือ ORR107 และ ORR719 จึงนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลท มาจำแนกสกุลด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่า ไอโซเลท ERY2 มีความสัมพันธ์คล้ายคลึงกับ *Streptomyces werraensis* NBRC 13404 (100%) และ *Streptomyces gancidicus* NBRC 15412 (100%) ส่วน ไอโซเลท POL4 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces pseudogriseolus* NBRC 12902 (99.93%) และ *S. gancidicus* NBRC 15412 (99.93%) แต่มีตำแหน่งบนแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) แตกต่างกัน ส่วน ไอโซเลท ORR107 และ ORR719 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces albus* NBRC 13014^T ที่ 98.18 และ 97.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces leeuwenhoekii* C34/AJ621602 ที่ 98.11 และ 97.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีตำแหน่งบนแผนภูมิวิวัฒนาการแตกต่างกัน จากนั้นนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์

เอนโคไฟต์ 4 ไอโซเลท ที่คัดเลือกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวในระยะต้นกล้า ด้วยวิธีการแช่เมล็ดข้าวในสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนไมซีตส์เอนโคไฟต์แต่ละไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 1×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 วัน ก่อนปลูกลงในกระเพาะ เมื่อดันกล้าข้าวอายุ 14 วัน ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยวิธีการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรค ที่ความเข้มข้น 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นประเมินความรุนแรงในการเกิดโรคหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ไอโซเลท ERY2 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงในการเกิดโรคเท่ากับ 1.07 หรือ มีเปอร์เซ็นต์การลดความรุนแรงของโรคเท่ากับร้อยละ 77.38 แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยมีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงในการเกิดโรคเท่ากับ 4.73 นอกจากนี้จากการทดสอบความสามารถในการเข้าอาศัยในต้นกล้าข้าว โดยวิธีการแช่เมล็ด และแยกเชื้อกลับที่ระยะเวลา 1, 3, 5, 7 และ 14 วัน หลังปลูก พบว่า เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทสามารถเข้าอาศัยในต้นกล้าข้าวได้ โดยอาศัยอยู่ทั้งในส่วนของใบ ราก และเปลือกเมล็ดข้าวได้ ซึ่งพบการแยกเชื้อกลับอยู่ในช่วง 17 - 100 เปอร์เซ็นต์ และ ไอโซเลท ORR107 พบการเพิ่มปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อ



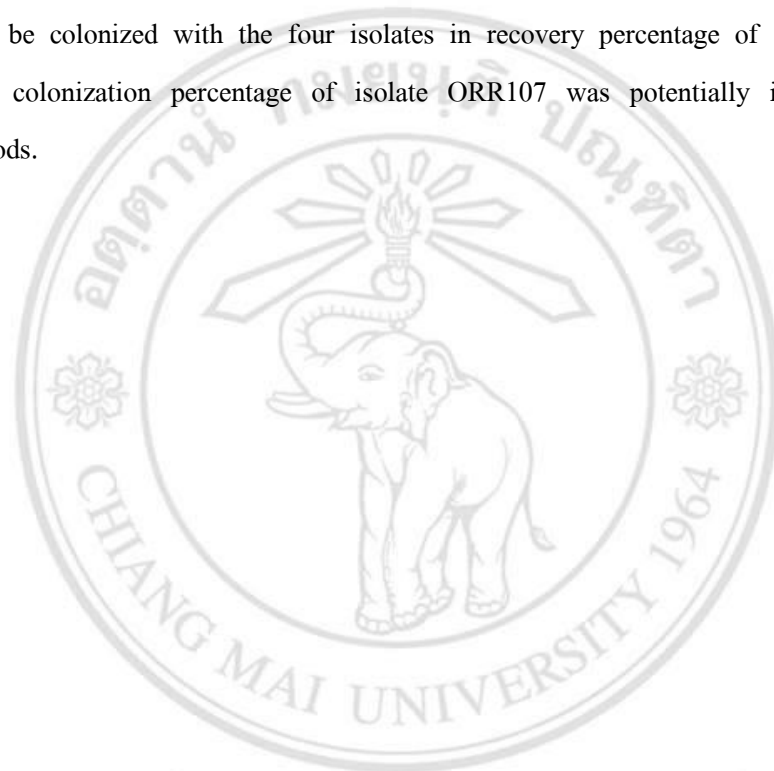
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Efficacy of Endophytic Actinomycetes in Controlling Rice Blast Disease	
Author	Mr. Napaphop Kaewkanta	
Degree	Master of Science (Plant Pathology)	
Advisory Committee	Associate Professor Dr. Kaewalin Kunasakdakul	Advisor
	Lecturer Dr. On-Uma Ruangwong	Co-advisor

ABSTRACT

One hundred and seventy-four isolates of endophytic actinomycetes were isolated from rice (*Oryza sativa* L.) on inhibitory mold agar 2 (IMA-2). The isolates were divided into groups by the periods of aerial mycelium initiation and full-plate production. According to aerial mycelium initiation in 1 day and full-plate production in 3 days, then ten isolates were selected. The other ten isolates from herb (obtaining from Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University) were also tested by dual culture method against *Pyricularia grisea* pathogen of rice blast. Four isolates gave a highest percentage inhibition of the radial growth (PIRG 74.17% - 90.00%) of plant fungi were significant showed in the testing of isolates ERY2 and POL4 from herb and isolates ORR107 and ORR719 from rice. Thus, the 4 isolates in inhibiting a very good level were selected and then identified by analysis of 16S rRNA gene sequences. Isolate ERY2 was closely related to *Streptomyces werraensis* NBRC 13404 (100%) and *Streptomyces gancidicus* NBRC 15412 (100%). Isolate POL4 were closely related to *Streptomyces pseudogriseolus* NBRC 12902 (99.93%) and *S. gancidicus* NBRC 15412 (99.93%), but from distinct phylogenetic line separated from these closely isolates. Isolate ORR107 and ORR719 were closely related to *Streptomyces albus* NBRC^T 13014 at 98.18 and 97.7%, respectively; moreover, closely related to *Streptomyces leeuwenhoekii* C34^T at 98.11 and 97.74%, respectively, but from distinct phylogenetic line separated from these closely isolates. These 4 selected isolates were applied to control rice blast disease in seedling trials using rice seed soaked in

1×10^9 cell/ml suspension of each isolate for 1 day. Fourteen-days-old rice seedlings were inoculated with the fungal pathogen at a concentration of 1×10^5 cell/ml. Evaluations of blast severities were observed after 7 days of incubation, results showed that isolate ERY2 was statistically decreased the severity of blast at 1.07 (77.38% decreased the severity) compared with 4.73 in control treatment. Additionally, colonization of the 4 isolates in rice seedling using seed soaking method were performed, after transplanting for 1, 3, 5, 7 and 14 days. Leaves, roots and husk explants of rice were found to be colonized with the four isolates in recovery percentage of 17-100 percent. Moreover, the colonization percentage of isolate ORR107 was potentially increased along incubation periods.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
ABSTRACT	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	15
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	25
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	59
เอกสารอ้างอิง	61
ภาคผนวก ก	67
ภาคผนวก ข	70
ภาคผนวก ค	74
ประวัติผู้เขียน	78

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส่วนใบและรากของข้าว 4 สายพันธุ์ หลังเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน	29
ตารางที่ 4.2 การตั้งชื่อไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าว แต่ละสายพันธุ์	30
ตารางที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ จำนวน 174 ไอโซเลท หลังเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	32
ตารางที่ 4.4 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าว ในการเริ่มสร้าง aerial mycelium ที่ช่วงเวลา 1-5 วัน และการเจริญเต็มจานอาหาร ที่ช่วงเวลา 3-7 วัน	40
ตารางที่ 4.5 ชื่อพืชอาศัยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือก จำนวน 20 ไอโซเลท	41
ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> สาเหตุโรคไหม้ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธีการ dual culture	43
ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การลดลงของระดับความรุนแรงของโรคไหม้ ของต้นกล้าข้าวที่ผ่านการแช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลทต่าง ๆ (ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml) และปลูกเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> (ความเข้มข้น 10^5 cfu/ml) สาเหตุโรคไหม้บนต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน	54
ตารางที่ 4.8 จำนวนและเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ 4 ไอโซเลท จากส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าข้าว หลังปลูกเชื้อด้วยวิธีการแช่เมล็ดแล้วปลูกข้าวเป็นเวลานาน 30 วัน	58

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 3.1 การขีดเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 ที่วางแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filters)	17
ภาพที่ 3.2 ลักษณะการวัดผลในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ต่อเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> ในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 โดยวิธี dual culture	19
ภาพที่ 3.3 การเตรียม slide culture ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ เพื่อศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2	20
ภาพที่ 3.4 เกณฑ์ประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรคใบไหม้ของข้าว 7 ระดับ ตั้งแต่ระดับ 0-6	23
ภาพที่ 4.1 ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบข้าว และลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i>	26
ภาพที่ 4.2 ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบกล้าข้าว อายุ 21 วัน หลังจากการปลูกเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> ลงบนใบกล้าข้าว เป็นเวลานาน 7 วัน	27
ภาพที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่เจริญจากส่วนใบและรากของข้าว หลังจากเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน	28
ภาพที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่แยกได้จากข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ หลังเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 และบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	31
ภาพที่ 4.5 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> สาเหตุโรคไหม้ โดยวิธีการเลี้ยงร่วมกันกับเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 10 วัน	42
ภาพที่ 4.6 ลักษณะเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ไอโซเลท ORR107	45
ภาพที่ 4.7 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ ไอโซเลท ORR107 ด้วยวิธี neighbor-joining	46
ภาพที่ 4.8 ลักษณะเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ไอโซเลท ORR719	47

ภาพที่ 4.9	แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ เอนโดไฟต์ ไอโซเลท ORR719 ด้วยวิธี neighbor-joining	48
ภาพที่ 4.10	ลักษณะเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท ERY2	49
ภาพที่ 4.11	แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ เอนโดไฟต์ ไอโซเลท ERY2 ด้วยวิธี neighbor-joining	50
ภาพที่ 4.12	ลักษณะเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท POL4	51
ภาพที่ 4.13	แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ เอนโดไฟต์ ไอโซเลท POL4 ด้วยวิธี neighbor-joining	52
ภาพที่ 4.14	ลักษณะอาการไหม้ของใบกล้าข้าวอายุ 21 วัน หลังแช่เมล็ดข้าวด้วย เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ (ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml) ไอโซเลท ERY2 POL4 ORR107 และ ORR719 เปรียบเทียบด้วยชุดควบคุม หลังปลูกเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> (ความเข้มข้น 10^7 cfu/ml) สาเหตุโรคไหม้ บนต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน	55
ภาพที่ 4.15	ลักษณะการเจริญของเชื้อออกมาจากบริเวณรอยตัดของชิ้นพืชหลังจาก ปลูกเชื้อด้วยวิธีการแช่เมล็ดแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	57

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

ข้าวเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยและของโลก ประชากรมากกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวทั้งนาปีและนาปรัง รวม 69.28 ล้านไร่ มีพื้นที่ปลูกข้าวอินทรีย์ประมาณ 131,502 ไร่ หรือคิดเป็นร้อยละ 0.20 ของพื้นที่เพาะปลูกข้าวทั้งหมด มีมูลค่าการส่งออกข้าวอินทรีย์ราว 552.25 ล้านบาท ซึ่งนับว่าเป็นประเทศที่ส่งออกข้าวอินทรีย์เป็นอันดับต้น ๆ ของโลก ประกอบกับผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศให้ความสำคัญกับสุขภาพและสิ่งแวดล้อมมากขึ้น มีการบริโภคสินค้าเกษตรอินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีทวีปอเมริกาและยุโรปเป็นผู้บริโภครายใหญ่ที่มีการบริโภครวมกันประมาณร้อยละ 96 แต่เนื่องจากการผลิตที่ไม่เพียงพอ จึงต้องนำเข้าสินค้าเกษตรอินทรีย์จากประเทศอื่น ๆ ทั่วโลก ทำให้ผลิตผลที่ได้จากการผลิตแบบอินทรีย์เป็นที่ต้องการในตลาดเพิ่มมากขึ้น และมีราคาสูงกว่าผลิตผลที่ได้จากการผลิตแบบเคมี โดยข้าวอินทรีย์ของไทยที่ได้รับความนิยมในตลาดส่งออก คือ ข้าวหอมมะลิอินทรีย์ เป็นสินค้าที่มีลักษณะเด่นในด้านความหอม และเมล็ดอ่อนนุ่ม และเป็นที่ต้องการในตลาดสหภาพยุโรป (European Union-EU) เป็นอย่างมาก โดย 96% ของข้าวอินทรีย์ที่ผลิตในไทยถูกส่งออกไปยังอียู และมีแนวโน้มในการขยายตลาดมากขึ้นในอนาคต (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) ทำให้เห็นว่าโอกาสการส่งออกสินค้าเกษตรอินทรีย์สู่ตลาดโลกยังมีช่องว่างให้เกษตรกรไทยเข้าไปมีส่วนแบ่งตลาดได้อย่างแน่นอนอนทั้งในระยะสั้นและระยะยาว แต่การผลิตข้าวหอมมะลิอินทรีย์ประสบปัญหาเรื่องสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค ส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง ซึ่งโรคที่สำคัญต่อการผลิตข้าวอินทรีย์คือ โรคไหม้ สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* สามารถทำความเสียหายในหลายพื้นที่ของประเทศไทย โดยจะทำให้เมล็ดข้าวลีบ ร่วงหล่น ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง ซึ่งอาจทำให้เกิดความเสียหายโดยอาจทำให้ผลผลิตลดลงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Ou, 1985) ปัจจุบันมีรายงานการนำชีวภัณฑ์จากเชื้อปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรคและแมลง

เพื่อตอบสนองเงื่อนไขในระบบการผลิตแบบอินทรีย์ที่ไม่สามารถใช้สารเคมีสังเคราะห์ได้ เชื้อปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยที่ให้ความสนใจศึกษา ค้นคว้า และนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์กันอย่างกว้างขวาง เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ (endophytic actinomycetes) เป็นเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียที่มีรายงานในการนำมาใช้เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชมากขึ้น เนื่องจากเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถอาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชได้โดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัย รวมทั้งสามารถผลิตสารทุติยภูมิสำคัญหลายประเภท เช่น สารปฏิชีวนะ (Araujo *et al.*, 2000) เอนไซม์ และวิตามิน ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด (Shimizu *et al.*, 2000; Franco, 2002) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตฮอร์โมนออกซินที่ช่วยกระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงและเพิ่มผลผลิตของพืช (Lahdenpera, 2000) ด้วยเหตุนี้การใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการนำมาใช้ศึกษาความสามารถในการควบคุมโรคใหม่ของข้าว เพื่อพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ใช้ในระบบผลิตข้าวอินทรีย์ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ
- 1.2.2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการควบคุมการเกิดโรคไหม้ของข้าวในระดับโรงเรือน

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 ความสำคัญของข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชที่อยู่ในสกุล (genus) *Oryza* ซึ่งมีประมาณ 23 ชนิด (species) แต่ข้าวที่นำมาปลูกเพื่อบริโภค (cultivated rice) มี 2 ชนิด คือ *O. sativa* ปลูกทั่วไปในทวีปเอเชียและแหล่งปลูกอื่น ๆ ของโลก และ *O. glaberima* ปลูกเฉพาะในแถบแอฟริกา สำหรับข้าวที่มีการขายในตลาดโลกเป็นข้าว *O. sativa* ที่ปลูกจากแถบเอเชีย โดยทรงเซวี่ (2545) กล่าวไว้ว่าสามารถแบ่งเป็น 3 สายพันธุ์ตามแหล่งปลูก ได้แก่

1) Indica เป็นข้าวที่มีเมล็ดยาวเรียวยาว ขนาดของเมล็ดยาวประมาณ 10.5 - 11 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 2.8 มิลลิเมตร และหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร เป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกอยู่ในเขตร้อน ซึ่งปลูกมากในประเทศไทย อินเดีย พม่า เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ เป็นต้น

2) Japonica เป็นข้าวที่มีลักษณะเมล็ดป้อมสั้น ขนาดของเมล็ดยาวประมาณ 7 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 3.5 มิลลิเมตร เป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกในประเทศจีนตอนเหนือและตะวันออก ญี่ปุ่น เกาหลี และประเทศอื่น ๆ ที่อยู่ในเขตอบอุ่น

3) Javanica เป็นข้าวที่มีลักษณะกึ่งกลางระหว่าง Indica และ Japonica และเป็นข้าวที่ไม่มี ความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยปลูกเฉพาะประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น

ข้าวเป็นอาหารที่สำคัญของประชากรโลก โดยเฉพาะในแถบภูมิภาคเอเชียมีความนิยมในการบริโภคข้าวมากกว่าภูมิภาคอื่น ดังนั้นการบริโภคและการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงอยู่ในทวีปเอเชีย โดยประเทศที่มีบทบาทในการค้าข้าวได้แก่ ประเทศไทย อินเดีย เวียดนาม จีน และพม่า ซึ่งประเทศไทยได้ชื่อว่าเป็นประเทศที่มีการส่งออกข้าวเป็นอันดับหนึ่ง และเป็นประเทศที่สามารถผลิตข้าวได้มีคุณภาพเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศ สภาพภูมิอากาศ ทรัพยากรดิน

และน้ำ ที่เหมาะสมแก่การปลูกข้าว ตลอดจนมีความหลากหลายของพันธุ์ข้าวที่ปลูก นอกจากนี้ เกษตรกรไทยยังมีความชำนาญในด้านการผลิตข้าวที่ถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษสู่รุ่นลูกหลานมา อย่างยาวนาน โดยในปี 2559 ประเทศไทยมีการส่งออกข้าว ปริมาณ 9,883,289 ตัน คิดเป็นมูลค่า 154,434 ล้านบาท โดยปริมาณส่งออกเพิ่มขึ้น 0.9% ขณะที่มูลค่าส่งออกลดลง 0.9% เมื่อเทียบกับปี 2558 ที่มีการส่งออกปริมาณ 9,795,781 ตัน มูลค่า 155,912 ล้านบาท (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2559) แม้ว่าประเทศไทยจะมีศักยภาพในการผลิตและการส่งออกข้าวที่มีคุณภาพและปริมาณสูง เพียงพอต่อ การบริโภคและส่งออกภายในประเทศ แต่ปัญหาสำคัญที่ประเทศไทย และประเทศอื่น ๆ ต้องเผชิญ คือ การขาดแคลนน้ำ น้ำท่วม และการระบาดของ โรคและแมลงศัตรูข้าว ซึ่งปัญหาดังกล่าวส่งผล กระทบต่อปริมาณและคุณภาพข้าว ตลอดจนต้นทุนการผลิตข้าว โดยเฉพาะปัญหาด้าน โรคข้าว นับเป็นปัญหาที่สำคัญที่เกษตรกรผู้ผลิตข้าวประสบอยู่เสมอ ซึ่งก่อความเสียหายให้แก่ข้าวเป็นอย่างมาก เมื่อเกิดการแพร่ระบาดของจะกระจายเป็นบริเวณกว้าง และสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตข้าว บางครั้ง อาจสร้างความเสียหายได้ 100 % ซึ่งมีอยู่หลายโรคที่มักพบการแพร่ระบาดอยู่เป็นประจำ หาก เกษตรกรผู้ผลิตไม่รู้จักวิธีป้องกันและดูแลรักษา ก็จะได้รับ ความเสียหายอย่างรุนแรง (บุญหงษ์, 2553)

2.2 โรคข้าวที่สำคัญของประเทศไทย

โรคข้าว หมายถึง อาการหรือภาวะผิดปกติทางกายภาพหรือทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นกับต้นข้าวทำให้ ต้นข้าวมีการเจริญเติบโตและพัฒนาในส่วนต่าง ๆ ที่ไม่สมบูรณ์ โรคข้าวอาจจะมีสาเหตุเกิดจาก สิ่งไม่มีชีวิต เช่น โรคขาดธาตุอาหาร โรคที่เกิดจากสภาวะแวดล้อมผิดปกติ หรือโรคที่เกิดจากสารพิษ เป็นต้น ในทางกลับกัน โรคข้าวก็อาจจะเกิดขึ้นได้จากสิ่งมีชีวิต ซึ่งได้แก่ เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และไส้เดือนฝอย โดยมีรายละเอียดดังนี้ (บัญญัติ, 2527)

1) โรคข้าวที่เกิดจากเชื้อรา ได้แก่ โรคไหม้ เชื้อสาเหตุ *Pyricularia grisea* โรคใบจุดสีน้ำตาล เชื้อสาเหตุ *Helminthosporium oryzae* โรคใบขีดสีน้ำตาล เชื้อสาเหตุ *Cercospora oryzae* โรคกาบใบแห้ง เชื้อสาเหตุ *Rhizoctonia solani* โรคกาบใบเน่า เชื้อสาเหตุ *Acrocyndrium oryzae* โรคใบวงสีน้ำตาล เชื้อสาเหตุ *Rhynchosporium oryzae* โรคถอดฝักดาบ เชื้อสาเหตุ *Fusarium moniliforme* โรคเมล็ดค่าง เชื้อสาเหตุ *A. oryzae*, *Curvularia lunata*, *C. oryzae*, *Fusarium semitectum* และ *H. oryzae* และ โรคดอกกระถิน เชื้อสาเหตุ *Ustilaginoidea virens*

2) โรคข้าวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ โรคขอบใบแห้ง เชื้อสาเหตุ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ โรคใบขีดโปร่งแสง เชื้อสาเหตุ *X. oryzae* pv. *oryzicola*

3) โรคข้าวที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ โรคใบสีส้ม (yellow orange leaf virus disease) แมลงพาหะ คือ เพลี้ยจักจั่นสีเขียว *Nephotettix impicticeps*, *Nephotettix nigropictus*, *Nephotettix malayanus* และ เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก *Recilia dorsalis* โรคใบหงิกหรือโรคงุ้ม (ragged stunt virus disease) แมลงพาหะ คือ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* โรคหูด (virus gall dwarf disease) แมลงพาหะ คือ เพลี้ยจักจั่นสีเขียว *N. nigropictus* และ โรคเขียวเตี้ย (virus grassy stunt disease) แมลงพาหะ คือ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *N. lugens*

4) โรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ได้แก่ โรคใบสีแสด (mycoplasma orange leaf disease) แมลงพาหะ คือ เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก *R. dorsalis* และ โรคเหลืองเตี้ย (mycoplasma yellow dwarf disease) แมลงพาหะ คือ เพลี้ยจักจั่นสีเขียว *Nephotettix virescens* และ *N. nigropictus*

5) โรคข้าวที่เกิดจากไส้เดือนฝอย ได้แก่ ไส้เดือนฝอยรากข้าว เชื้อสาเหตุ *Hirschmanniella* spp. ไส้เดือนฝอยรากปม เชื้อสาเหตุ *Meloidogyne graminicola* Chitwood ไส้เดือนฝอยรากแผล เชื้อสาเหตุ *Pratylenchus zeae* ไส้เดือนฝอยโรคปลายใบขาว เชื้อสาเหตุ *Aphelenchoides besseyi* Christie และ ไส้เดือนฝอยโรครวงลีบ เชื้อสาเหตุ *Ditylenchus angustus* Filipjev

สำหรับประเทศไทยซึ่งจัดว่าเป็นประเทศหลักในการผลิตข้าวจึงได้รับผลกระทบจากระบาดของโรคข้าวที่สำคัญ ๆ ได้แก่ โรคไหม้ ซึ่งประเทศไทยมีการปลูกข้าวอย่างต่อเนื่องตลอดทั้งปี จึงทำให้เชื้อสาเหตุโรคมักมีระบาดอย่างต่อเนื่อง และมีการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคได้ตลอดเวลา ทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อสาเหตุโรคอย่างมาก ทำให้พบการระบาดของโรคที่ระดับความรุนแรงต่าง ๆ กันทุก ๆ ปี เช่น ปี 2535 มีรายงานการระบาดอย่างรุนแรงในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะภาคเหนือพบการระบาดของโรคไหม้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ทำให้พื้นที่ปลูกข้าวได้รับความเสียหายประมาณ 1.2 ล้านไร่ (Disthaporn, 1994) และในปี 2544 มีพื้นที่ปลูกข้าวได้รับความเสียหายประมาณ 78,778 ไร่ และในปี 2553 พบการระบาดของโรคไหม้ในจังหวัดมหาสารคาม อุบลราชธานี และบุรีรัมย์ ในช่วงเดือนกันยายน ถึง ธันวาคม มีพื้นที่ได้รับความเสียหายมากกว่า 793,200 ไร่ (ศรีสวัสดิ์ และคณะ, 2553) และตามรายงานสถานการณ์ของกองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการปุ๋ย กรมส่งเสริมการเกษตร (2559) รายงานไว้ว่า ประเทศไทยพบการแพร่ระบาดของโรคไหม้ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึง เดือนพฤศจิกายน โดยพบการระบาดอย่างรุนแรงในช่วงเดือนสิงหาคม ถึง เดือนกันยายน ซึ่งตามรายงานของสำนักงานเกษตรจังหวัด รายงานว่า มีพื้นที่ปลูกข้าว จำนวน 35,549,131 ไร่ โดยพบการระบาดของโรคไหม้ในระดับรุนแรงจำนวน 2,318 ไร่ และในระดับไม่รุนแรง จำนวน 13,616 ไร่ รวมพื้นที่ระบาดทั้งหมด 15,934 ในพื้นที่ 17 จังหวัด โดยแบ่งเป็นส่วนภูมิภาค ดังนี้

- 1) ภาคกลาง จำนวน 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา และนครปฐม
- 2) ภาคตะวันออก 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา และปราจีนบุรี
- 3) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 9 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม สกลนคร มุกดาหาร นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี
- 4) ภาคเหนือ จำนวน 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดพิจิตร โลกเก่า และจังหวัดแพร่

2.3 โรคไหม้ของข้าว (บัญญัติ, 2527)

2.3.1 เชื้อราสาเหตุโรค

โรคไหม้ของข้าว (Rice blast) มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* (*P. oryzae* Cav.) มีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (perfect stage) ของเชื้อราสาเหตุนี้คือ *Magnaporthe oryzae* โดยลักษณะของเชื้อรา *P. grisea* มีการสร้างโคนิเดีย (conidia) บนก้านชูสปอร์ (conidiophore) มีผนังกันสร้างเป็นกลุ่มบนเนื้อเยื่อพืช โคนิเดีย มี 3 เซลล์ สร้าง 1-20 โคนิเดียบนก้านชูสปอร์ 1 ก้าน โคนิเดียไม่มีสี (hyaline) รูปร่างคล้ายกระสวย หัวมนท้ายแหลม (spindle) มีขนาด 8.1-10.3x19.2-27.3 ไมครอน เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างโคโลนีสีขาวต่อมาเจริญเป็นสีเทา เจริญติดผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (Ou, 1985)

โรคไหม้ของข้าวมีรายงานว่า พบครั้งแรกที่ประเทศจีน ในปี พ.ศ. 2180 และต่อมา มีรายงานพบในประเทศญี่ปุ่น ในปี พ.ศ. 2247 โดยเรียกโรคนี้นี้ว่า “Brisome” และต่อมาเมื่อมีการปลูกข้าวในประเทศอินเดีย พบรายงานความเสียหายของการปลูกข้าวที่เกิดจากโรคนี้นี้ ในปี 2456 จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ประเทศไทยเริ่มสนใจ และศึกษาโรคไหม้ ในปี 2498 จนมีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานโรคออกมามาจนถึงปัจจุบัน โรคไหม้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงระยะใกล้เก็บเกี่ยว โดยเข้าทำลายในส่วนของใบ ลำต้น ข้อต่อลำต้น และคอรวง โรคไหม้ที่ระบาดในระยะคอรวงจะทำให้ข้าวมีปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง โดยมีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดลดลง ความเสียหายจากการเข้าทำลายของโรคนี้นี้ทำให้ผลผลิตลดลงตั้งแต่ 0.4 – 100 เปอร์เซ็นต์ (ชัชวาลและชวลีพร, 2552) โรคไหม้จะเกิดขึ้นและแพร่ระบาดได้รุนแรง ถ้ามีสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ พันธุ์ข้าวอ่อนแอต่อโรค ความชื้นค่อนข้างสูง ตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป โดยเฉพาะในช่วงบ่ายถึงเช้าวันรุ่งขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส การปลูกข้าวที่หนาแน่น และใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่สูง

2.3.2 ลักษณะอาการ

ระยะกล้า ที่ใบมีแผลจุดสีน้ำตาล ลักษณะคล้ายรูปตา มีสีเทาอยู่ตรงกลางแผล มีขนาดแตกต่างกันไป ความกว้างระหว่าง 2-5 มิลลิเมตร และความยาวประมาณ 10-15 มิลลิเมตร จุดแผลนี้สามารถขยายลุกลามจนแผลรวมกันทั่วบริเวณใบ ในกรณีที่เป็น โรครุนแรงกล้าข้าวจะแห้ง และพุ่มตาย อาการคล้ายถูกไฟไหม้ (blast)

ระยะแตกกอ อาการของโรคพบได้ที่ใบ กาบใบ ข้อต่อของใบ และข้อต่อของลำต้นขนาดของแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้า แผลลุกลามติดต่อกันได้ที่บริเวณข้อต่อ ใบจะมีลักษณะแผลซ้ำสีน้ำตาลดำ และใบมักหลุดจากกาบใบเสมอ

ระยะคอรวง ถ้าข้าวเพิ่งจะเริ่มให้รวง เมื่อถูกเชื้อราเข้าทำลาย เมล็ดจะลีบหมด แต่ถ้าเป็นโรคตอนรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยว คอรวงจะปรากฏรอยแผลซ้ำสีน้ำตาล ทำให้เปราะหักพับง่าย รวงข้าวร่วงหล่นเสียหายมาก

2.3.3 การแพร่ระบาด

พบช่วงการแพร่ระบาดอยู่ระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง สิงหาคม ในแหล่งที่มีการทำนาเกินกว่าปีละครั้ง ช่วงเดือนมิถุนายน ถึง ตุลาคม และพฤศจิกายน ถึง เมษายน จะพบเห็นโรคนี้แพร่ระบาดเป็นประจำ โดยเฉพาะในแปลงนาหว่านที่ใช้ข้าวหนาแน่น อับลม ใต้น้ำในโตรเจนสูง และมีสภาพแห้งแล้งในตอนกลางวัน และชื้นจัดในตอนกลางคืน ถ้าอากาศเย็นอุณหภูมิประมาณ 22-25 องศาเซลเซียส ลมแรงจะช่วยให้โรคแพร่กระจายได้ดี เชื้อราสาเหตุโรคสามารถติดไปกับเมล็ดข้าว แพร่กระจายไปตามดิน น้ำ ลม และเศษฟางข้าว แม้ว่าจะมีข้าวบางพันธุ์ที่มีคุณสมบัติค่อนข้างต้านทานโรค แต่เชื้อราชนิดนี้ก็สามารถสร้าง races ใหม่ ที่รุนแรง เข้าทำลายข้าวพันธุ์ต้านทานเพิ่มขึ้นได้เรื่อย ๆ

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการแพร่ระบาดของเชื้อนี้จะเจริญและเข้าทำลายพืชได้ดีที่อุณหภูมิ 25 - 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และถ้าพืชอยู่ในสภาพที่อ่อนแอ เช่น ได้รับน้ำและแร่ธาตุไม่เพียงพอ หรือมีการสะสมของธาตุไนโตรเจนสูง

2.3.4 การป้องกันกำจัด

1) ไม่ควรหว่านข้าวหนาแน่นเกินไป อัตราเมล็ดพันธุ์ที่เหมาะสม คือ 15-20 กิโลกรัมต่อไร่ ควรแบ่งแปลงให้มีการระบายถ่ายเทอากาศดี และไม่ควรรดน้ำในโตรเจนสูงเกินไป ถ้าใส่มากถึง 50 กิโลกรัมต่อไร่ จะทำให้โรคไหม้ระบาดอย่างรวดเร็ว

2) ใช้พันธุ์ต้านทานที่เหมาะสมในแต่ละท้องถิ่น ปัจจุบันมีพันธุ์ที่ค่อนข้างต้านทาน ได้แก่ ในภาคกลาง ใช้พันธุ์ต้านทาน คือ กข 1 กข 9 กข 11 กข 21 สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 2 สุพรรณบุรี 60 สุพรรณบุรี 90 ชัยนาท 1 ปราจีนบุรี 1 พลายงาม พิษณุโลก 1 และคลองหลวง 1 ส่วนในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ ใช้พันธุ์ สุรินทร์ 1 เหนียวอบล 2 เหนียวแพร่ สันป่าตอง 1 หางยี 71 กุ้เมืองหลวง ขาวโปร่งไคร้ และน้ำรู เป็นต้น

3) ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราเพื่อหยุดยั้งการแพร่ระบาด หรือป้องกันการเกิดโรค โดยพิจารณาความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

(3.1) คลุกเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น คาซูกะมัซซัน อีดิเฟนฟอส เบนเลท-ที คาซุมิน ไตรไซเคลโซล คาร์เบนดาซิม โปรโครริส ตามคำแนะนำของนักวิชาการ

(3.2) ในแหล่งที่เคยมีโรคระบาด หรือพบว่าใบมีแผลคล้ายรูปดาหนาแน่น หรือพบการระบาดของโรคไหม้ 70 เปอร์เซ็นต์ของแปลงปลูก โดยเฉพาะระยะข้าวตั้งท้อง ควรฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาซุมิน เบนเลท ฮีโนซาน บีมฟูจี-วัน ซาพรอล ตามอัตราที่ระบุ หรือตามคำแนะนำของนักวิชาการ หรือหว่านโคราโทป 5 เปอร์เซ็นต์ อัตรา 5 กิโลกรัมต่อไร่ ระยะตั้งท้องเพียง 1 ครั้ง จะป้องกันโรคไหม้ระยะคอรวง

2.4 การควบคุมโรคข้าวโดยเชื้อเอกติโนไมซิสต์แอนโดไฟต์

เกษม (2532) กล่าวว่า การควบคุมโรคด้วยชีววิธี หมายถึง การควบคุมโรคโดยใช้จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นช่วยลดจำนวนประชากรของเชื้อโรค ลดการเกิดโรคหรือลดความเสียหายของพืชที่เกิดจากเชื้อโรค ซึ่งอาจรวมถึงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พันธุกรรม หรือผลผลิตจากพันธุกรรมด้วย ยกเว้นการกระทำโดยตรงของมนุษย์ต่อเชื้อโรคเท่านั้น การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีนี้เป็นวิธีการค่อนข้างใหม่สำหรับประเทศไทย แต่ในปัจจุบันเกษตรกรจำนวนมากและนักวิชาการสมัยใหม่เริ่มเห็นความสำคัญและนิยมนำมาควบคุมโรคแทนการใช้สารเคมีซึ่งมีผลต่อสภาพแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตมากขึ้น กลไกการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไม่ว่าจะเกิดเองตามธรรมชาติหรือที่นักวิชาการนำมา

เลี้ยงขยาย และผลิตให้เป็นการค้า มีวิธีการทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายรูปแบบ แต่ละรูปแบบก็มีผลแตกต่างกันออกไป

เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์และเภสัชกรรม เนื่องจากสามารถผลิตสารเมตาโบไลต์ได้หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะที่มีความสำคัญทางการเกษตรและอุตสาหกรรม อีกทั้งยังมีความสำคัญทางระบบนิเวศวิทยาอีกด้วย จึงมีผู้สนใจทำการศึกษากันอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ ยังสามารถผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เช่น phytohormone, antibiotics, siderophores และกิจกรรมของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช คือ nitrogen fixation, nutrient competition และ systemic disease resistance (Benhamou and Kloepper, 1998; Ramamoorthy *et al.*, 2001; Bailey *et al.*, 2006) เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ จึงมีความสัมพันธ์กับพืชในระบบนิเวศน์ตามธรรมชาติ เราสามารถคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่ผลิต bioactive compounds และนำไปใช้ประโยชน์ทางเกษตรกรรมในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโต และได้มีการจัดจำแนกกลุ่มของการผลิตสาร hormone-like จากเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ เช่น สาร toyocamycin หรือเรียกอีกอย่างว่า cytokinin-like สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสาร pteridic acid ซึ่งเป็นสาร auxin-like ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของราก เป็นต้น (Igarashi *et al.*, 2002)

ในปี 2002, Lee *et al.* ได้แยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ จำนวน 400 ไอโซเลท จากดินภูเขา ในประเทศเกาหลี เมื่อทดสอบการควบคุมโรคไหม้ของข้าว พบว่า ไอโซเลท BG2-53 สามารถควบคุมเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* สาเหตุโรคไหม้ของข้าวได้ดีที่สุดในระดับห้องปฏิบัติการและระดับโรงเรือน

ในปี 2546 วันวิสาข์ ได้แยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์จากข้าวในพื้นที่ปลูกต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งสามารถแยกได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาจำแนกทางลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า 15 ไอโซเลท จัดอยู่ใน จินัส *Streptomyces* sp. ส่วนอีก 1 ไอโซเลท ไม่สามารถระบุได้ว่าจัดอยู่ในสปีชีใด เมื่อนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้งหมด 16 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. oryzae* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท MN2 มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราทดสอบได้ดีที่สุดที่ 51 - 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาทดสอบผลกับการเจริญของต้นกล้าข้าว พบว่า สามารถเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้าได้สูงกว่าชุดควบคุม

ในปี 2009, Zarandi *et al.* ได้แยกเชื้อสเตรปโตไมซีสต์จากดินบริเวณสวนพืชผักและไม้ผล ในประเทศอิหร่าน พบว่า *Streptomyces sindensis* isolate 263 สามารถควบคุมเชื้อรา *M. oryzae* สาเหตุโรคไหม้ของข้าวได้ดีที่สุดในระดับห้องปฏิบัติการและระดับโรงเรือน

2.5 เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

แอกติโนไมซีสต์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบ ๆ รากพืช มีลักษณะการดำรงชีวิตแบบ saprophyte หรืออาจพบอยู่ภายในต้นพืชในลักษณะเป็นเอนโดไฟต์ สามารถผลิตเอนไซม์และสารปฏิชีวนะต่าง ๆ เพื่อกระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงต้านทานต่อโรคและแมลงได้ดีขึ้น อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุช่วยให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์ (Boudjella *et al.*, 2006) เชื้อแอกติโนไมซีสต์แตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป คือ มีปริมาณของกัวนีนกับไซโตซีน (G+C) สูง ประมาณ 55 – 78 เปอร์เซ็นต์ และลักษณะของโคโลนีที่มีลักษณะแบบทึบแสง มีเส้นใยเหนือผิวอาหารแห้ง (aerial mycelium) และมีลักษณะเป็นผงเมื่อมองด้วยตาเปล่า หรือผิวของโคโลนีอาจเรียบคล้ายหนังสัตว์ หรือเป็นรอยย่น เป็นเส้นใยสั้น ๆ คล้ายกำมะหยี่ สามารถสร้างรงควัตถุสีต่าง ๆ เช่น สีขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และสีดำ เป็นต้น (Williams *et al.*, 1989)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ โดยทั่วไปพบได้ 2 แบบ คือ mycelium fragmentation และ sporulation ซึ่งพวก *Streptomyces* spp. จะมีการสร้างเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษตามความยาวของ aerial mycelium โดยเซลล์ขนาดใหญ่และมีผนังหนาขึ้นเรียกว่า chlamyospore หรือ arthrospore มักพบแบบเดี่ยว (single spore) หรือต่อกันเป็นสายโซ่ (chain) ส่วนพวก *Acinoplanes armenicus* สามารถสร้างสปอร์ได้ 2 แบบ คือ สปอร์แบบมี flagella เรียกว่า zoospore ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และสร้างสปอร์แบบ arthrospore บน aerial mycelium ซึ่งการสร้างสปอร์แบบนี้มักขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เชื้อเจริญอยู่ เชื้อแอกติโนไมซีสต์มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการ fission ของเส้นใย แล้วพัฒนาไปเป็นสปอร์ เรียกว่า โคนิเดียม (conidia) ที่มีลักษณะคล้ายกับสปอร์ของเชื้อรา คือ มีการแตกหักของเส้นใยซึ่งสปอร์ดังกล่าวมีอยู่หลายลักษณะคือ เป็นสปอร์เดี่ยว ๆ ที่ไม่เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ได้ หรือสปอร์คู่ สปอร์จะเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ หรือบิดเป็นเกลียวคล้ายสปริง หรือเป็นถุงขนาดใหญ่ภายในบรรจุสปอร์ เรียกว่า สปอร์แรงเจีย (sporangia) (Kalakoutskii and Agre, 1976)

2.5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์

เชื้อแอกติโนไมซีสต์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลากหลาย อาหารจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ และชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) (Porter, 1971) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ อากาศ อาหาร และพืช โดยแหล่งที่พบมาก ได้แก่ บริเวณที่มีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น ดินเพาะปลูก วัตถุเน่าเปื่อย โคลน ตะกอนใต้แม่น้ำ ใต้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน หรือป่าชายเลน โดยจะพบแอกติโนไมซีสต์จำนวนมากบริเวณดินชั้นบน และลดจำนวนลงในชั้นดินที่ลึกลงไป ในดินค่อนข้างเป็นกลาง หรือค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 6.5 – 8.0 สามารถพบได้มากกว่า 100 สกุล นอกจากนี้ยังพบมากในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มของ *Streptomyces* และ *Nocardia* และในชั้นส่วนของต้นพืช (endophytic actinomycetes) ก็ยังสามารถพบเชื้อแอกติโนไมซีสต์ได้อีกหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่ใช้ในการศึกษาและพิจารณา มีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (Lechevalier, 1968)

1. การสร้างโคโลนี (formation of colonies) สร้างมาจากเส้นใย (mycelium) ซึ่งเส้นใยแบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ เส้นใยที่มีความคงสภาพและเส้นใยที่แตกหักย่อยสลายได้ โดยเส้นใยที่มีการแตกหักและมีอวัยวะที่ใช้ในการเคลื่อนที่ จะพบได้ในสกุล *Oerskovia* โดยทั่วไปเชื้อแอกติโนไมซีสต์จะสร้างเส้นใยสองชนิด ได้แก่ substrate mycelium และ aerial mycelium มีบางชนิดเท่านั้นที่มีการสร้างเส้นใยเพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง เช่น สกุล *Sporichthya* ที่สร้างเฉพาะ aerial mycelium นอกจากนี้เชื้อแอกติโนไมซีสต์อาจมีการสร้างถุงเล็ก ๆ ระหว่างปล้องของเส้นใย ที่ไม่สร้างสปอร์ภายใน เช่น สกุล *Intrasporangium* หรือมีสปอร์อยู่ภายใน เช่น สกุล *Frankia*

ลักษณะการสร้างเส้นใยของโคโลนีมีหลายแบบ ได้แก่ การยกตัวขึ้น (raised) หรือแบบเรียบ (flat) บางทีอาจสร้างในลักษณะคล้ายหนังสัตว์ (leathery layer) ซึ่งมีตั้งแต่อ่อนนุ่ม และเหนียวไปจนถึงแข็งมาก โคโลนีมีหลายสี ได้แก่ สีขาว เหลือง ส้ม แดง กุหลาบ แดง ม่วง น้ำเงิน เขียว น้ำตาล และดำ ผิวหน้าโคโลนีอาจมีลักษณะ smooth, ridged, wrinkled, granular หรือ squammos โดยขนาดของโคโลนีจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อายุ สภาพการเจริญเติบโต เป็นต้น

2. โคนิเดีย (conidia) เป็นการสร้างสปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) ไม่ใช่ chlamydospore ที่อยู่ระหว่างปล้องของเส้นใย หรือ sporangiospore โดยเชื้อแอกติโนไมซีสต์สร้างโคนิเดียได้หลายแบบ ดังนี้

- 2.1 Single conidium เป็นโคนิเดียเดี่ยว ๆ อยู่บน substrate mycelium และ aerial mycelium สามารถทนต่อความร้อนสูงได้ มักพบโดยทั่วไป เช่น สกุล *Thermoactinomyces* ส่วนสกุล

Micromonospora จะสร้างสปอร์ที่มีลักษณะอยู่บนกิ่งสั้น ๆ อาจเกิดการรวมตัวกันเป็นช่อ โดยการเกิดของ sporulation ส่วนสกุล *Saccharomonospora* จะสร้างสปอร์บน aerial mycelium ที่ sporophores ไม่มีการแตกกิ่งก้านสาขา ส่วนสกุล *Thermomonospora* จะสร้างสปอร์เดี่ยว ๆ บน aerial mycelium ตรงบริเวณปลายของ sporophores มีทั้งแบบแตกกิ่งสาขาและไม่แตกกิ่งสาขา

2.2 Pairs of conidia เป็น โคนิเดี่ยวแบบคู่ มีลักษณะเรียงตัวตามยาว พบในสกุล *Microbispora* สร้างเฉพาะบน aerial mycelium เท่านั้น แต่สกุล *Faenia* อาจมีการสร้าง โคนิเดี่ยว ทั้งบน aerial mycelium และ substrate mycelium

2.3 Short chain of conidia เป็น โคนิเดี่ยวที่เรียงตัวเป็นเส้นสาย ส่วนสายสั้นสายยาว นั้น พิจารณาจากการเรียงตัวของสปอร์ไม่เกิน 20 สปอร์ จัดว่าเป็นสายสั้น โดยเชื้อที่สร้างสปอร์ในลักษณะนี้มีอยู่หลายชนิด บางชนิดสร้างสปอร์สั้น ๆ และมีถุงมาล้อมรอบ อาจสร้างอยู่บน substrate mycelium หรือ aerial mycelium ก็ได้ เช่น สกุล *Actinomadura*, *Faenia*, *Glycomyces*, *Microtetraspora*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Saccharorionospora*, *Sporichthya* และ *Streptovercillium*

2.4 Long chain of conidia เป็น โคนิเดี่ยวที่เรียงตัวเป็นเส้นสายยาว มีสปอร์มากกว่า 20 สปอร์ต่อเส้นสาย สร้างสปอร์บน aerial mycelium โดยเชื้อแอคติโนมัยซิสต์ที่สร้างสปอร์ในลักษณะนี้มีอยู่หลายชนิด บางชนิดสร้าง โคนิเดี่ยวที่สามารถเคลื่อนที่ได้ พบในสกุล *Actinopolyspora*, *Actinosynnema*, *Amycolatopsis*, *Glycomyces*, *Kibdelosporangium*, *Kitasatospora*, *Nocardia*, *Nocardioiddes*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocadia*, *Saccharopolyspora*, *Sccharothrix*, *Streptoalloteichus*, *Streptomyces* และ *Streptovercillium* นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกลักษณะของสายสปอร์ได้ดังนี้

1) Rectiflexibles เป็นการเรียงตัวของสปอร์ในรูปแบบเส้นตรง (straight) หรือเป็นแบบโค้งงอ (flexuous) อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

2) Retinaculiaperti เป็นการเรียงตัวของสปอร์ในรูปแบบเส้นสาย คล้ายโซ่ ม้วนงอ เป็นห่วงเปิดแบบสั้น ประมาณ 1-3 วง

3) Spira เป็นการเรียงตัวของสปอร์ในรูปแบบเส้นสาย คล้ายโซ่แบบเกลียว และเกลียวอัดกันแน่น มีทั้งแบบเกลียวปิดและเกลียวเปิด

4) Verticillati เป็นการเรียงตัวของสปอร์ในรูปแบบเส้นสายคล้ายโซ่แบบเกลียว กั้นหอย และมีการแตกกิ่งก้านสาขาออกมาเหมือนร่ม

2.5 สปอร์แรงเจีย (sporangia) เป็นถุงที่บรรจุโคนิเดีย ที่เกิดจากการพัฒนาของผนังเซลล์ใน aerial mycelium พบในสกุล *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Pilimelia*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Planomonospara*, *Streptosporangium* และ *Dactylosporangium*

3. โครงสร้างอื่น ๆ ที่เชื้อแอกติโนไมซีสต์สร้างขึ้น ในบางสกุลอาจสร้าง synnemata และสร้างสปอร์อยู่ภายใน พบในสกุล *Actinosynnema* การสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า multilocular sporangia ซึ่งมีสายสปอร์ขดเป็นวงม้วนอยู่ภายใน พบในสกุล *Kibdelosporangium* ส่วนสกุล *Streptomyces* มีการสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า sclerotia คล้ายกับเชื้อรา

2.5.2 การจัดจำแนกของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลผลด้วย 16sRNA (16S rDNA sequencing)

ดีเอ็นเอ (DNA) คือ ชื่อย่อของสารพันธุกรรม มีชื่อแบบเต็มว่า กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid) ซึ่งเป็นกลุ่มกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) (กรดที่สามารถพบได้ในส่วนของใจกลางของเซลล์) ซึ่ง DNA มักพบอยู่ในส่วนของนิวเคลียสของเซลล์ โดยพันตัวอยู่บนโครโมโซม (Chromosome) DNA มักพบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ได้แก่ คน (Human) สัตว์ (Animal) พืช (Plant) เห็ดและรา (Fungi) แบคทีเรีย (Bacteria) ไวรัส (Virus) (มีคนบางกลุ่มมีความเห็นว่า ไวรัสไม่ใช่สิ่งมีชีวิตเพราะมีองค์ประกอบบางอย่างไม่ครบ) เป็นต้น DNA ทำการเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ๆ เอาไว้ ซึ่งมีลักษณะที่มีการผสมผสานมาจากสิ่งมีชีวิตรุ่นก่อน ซึ่งก็คือ รุ่นพ่อและแม่ (Parent) ที่ยังสามารถถ่ายทอดลักษณะไปยังสิ่งมีชีวิตรุ่นถัดไป ซึ่งก็คือรุ่นลูก หรือ รุ่นหลาน (Offspring) DNA มีรูปร่างเป็นเกลียวคู่ (Double helix) โดยมีพอลินิวคลีโอไทด์ (Polynucleotide) 2 สาย เรียงตัวในแนวที่ตรงกันข้ามกัน Polynucleotide สายหนึ่งเรียงตัวในทิศทางจาก 3' ไป 5' ส่วน Polynucleotide อีกสายหนึ่งเรียงตัวในทิศทาง 5' ไป 3' โดยที่ Polynucleotide ทั้ง 2 สายนี้ เอาส่วนที่เป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose sugar) ไว้ด้านนอก ส่วนที่เป็นเบสเข้าหากัน โดยเบสที่อยู่ตรงข้ามกันต้องเป็นเบสที่เข้าคู่กันได้ (Complementary) DNA จึงมีลักษณะคล้ายบันไดลิงที่บิดตัวทางขวา หรือบันไดเวียนขวา ขาหรือราวของบันไดแต่ละข้างก็คือการเรียงตัวของ Nucleotide ซึ่ง Nucleotide เป็น โมเลกุลที่ประกอบด้วยน้ำตาล Deoxyribose Sugar หมู่ฟอสเฟต (Phosphate Group) (ซึ่งประกอบด้วยฟอสฟอรัสและออกซิเจน) และไนโตรจีนัสเบส (Nitrogenous base) เบสใน Nucleotide มีอยู่สี่ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (Adenine, A) ไทมิน (Thymine, T)

ไซโตซีน (Cytosine, C) และกวีนีน (Guanine, G) ขาหรือราวของบันไดสองข้างหรือ Nucleotide ถูกเชื่อมด้วยเบส โดยที่ A จะเชื่อมกับ T ด้วยพันธะไฮโดรเจนแบบพันธะคู่ หรือ Double bonds และ C จะเชื่อมกับ G ด้วยพันธะไฮโดรเจนแบบพันธะสามหรือ Triple bonds (ในกรณีของ DNA) และข้อมูลทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เกิดขึ้นจากการเรียงลำดับของเบสใน DNA นั้นเอง (Thaibiotech, 2016)

DNA sequencing analysis คือ การตรวจหาการเรียงตัวของลำดับเบส เป็นการพิสูจน์ความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยตรง โดยการเปรียบเทียบการเรียงตัวของเบสทั้ง 4 ชนิด (A, T, C และ G) ที่เป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอ ผลที่ได้จากการทำ DNA sequence สามารถบอกได้ถึง การเปลี่ยนแปลงลำดับของเบส ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการเกิด transversion transition silent หรือ selected ของยีน และยังใช้เป็นเครื่องมือวัดระดับ nucleotide base การใช้เทคนิค DNA sequencing analysis ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกชนิดพันธุ์ รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) (นันทนา, 2549) ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับเบสมีหลายวิธีด้วยกัน โดยมีความแตกต่างกันในขั้นตอนการหาลำดับเบส ปัจจุบันวิธีที่นิยม คือ การใช้ PCR product โดยตรงในการวิเคราะห์หาลำดับเบส และการใช้ PCR product ที่ผ่านการ clone เข้าสู่เวกเตอร์ก่อนการวิเคราะห์ลำดับเบส ทั้งสองวิธีนี้มีความแตกต่างกัน และมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน โดยวิธีการใช้ PCR product โดยตรงในการวิเคราะห์หาลำดับเบสมีข้อดีว่าการ clone เพราะหาลำดับเบสที่ได้มานั้นจะไม่เกิดความเสียหาย อันเนื่องมาจากการกระบวนการทางเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิต และดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในการวิเคราะห์หาลำดับเบสสามารถเลือกใช้เฉพาะส่วนที่มีลำดับเบสที่ต้องการเท่านั้น (Gyllensten *et al.*, 1992)

สำหรับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด สามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่าง ๆ และผ่านทางอินเทอร์เน็ต เนื่องจากในปัจจุบันมีการเก็บรวบรวมข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ และโปรตีน ที่มีรายงานวิจัยไว้ในศูนย์เก็บข้อมูล ซึ่งมีเครือข่ายอินเทอร์เน็ตเป็นตัวเชื่อมโยงข้อมูล โดยข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จะถูกเก็บไว้ใน 4 ศูนย์สำคัญ ได้แก่ The Databank of Japan (DDBJ), The European Molecular Biology Laboratory (EMBL), The GenBank และ The Genome Sequence Database (GSDB) ซึ่งทั้ง 4 ศูนย์นี้ จะมีการเชื่อมโยงข้อมูลเข้าหากัน โดยผู้ที่ทำการศึกษา หรือผู้ที่สนใจเกี่ยวกับการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ สามารถเข้าไปค้นหาข้อมูลเพื่อใช้เปรียบเทียบ และอ้างอิงได้ นอกจากนี้ยังสามารถส่งข้อมูลเข้าไปเก็บไว้ในฐานข้อมูลของศูนย์ทั้ง 4 แห่งได้ (Burks, 1997)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

สุ่มเก็บตัวอย่างโรคไหม้ของข้าว จากพื้นที่เพาะปลูกในศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรมการเกษตร แม่เหิยะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ บันทึกลักษณะอาการของโรค และแยกเชื้อราสาเหตุ ด้วยวิธี single spore isolation โดยนำชิ้นส่วนของใบข้าวที่แสดงอาการเกิดโรคมาล้างน้ำไหลให้สะอาด นำไปฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างชิ้นพืชด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จำนวน 1 ครั้ง ซับให้แห้ง นำชิ้นพืชมาบ่มในกล่องชื้น (moist chamber) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเขี่ยสปอร์ของเชื้อราสาเหตุบริเวณแผลบนใบข้าวลงบนอาหาร WA (water agar) (ภาคผนวก ก) แล้ว spread plate ทิ้งไว้เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมตัดสปอร์ของเชื้อราสาเหตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคตามรายงานของ Ou (1985) จากนั้นเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว แต่ละไอโซเลทที่ได้จากการทดลองที่ 3.1 (ดัดแปลงวิธีการของ นวรัตน์และนงลักษณ์, 2557) นำมาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายเชื้อราสาเหตุเลี้ยงบนอาหาร RPA (rice polish agar) (ภาคผนวก ก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน อีกครั้ง แล้วจึงใช้แท่งแก้วรูปตัว L ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กดเส้นใยให้แนบกับผิวอาหาร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้อสงฟลูออเรสเซนซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตรวจสอบนับสปอร์ด้วย hemocytometer และปรับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยให้

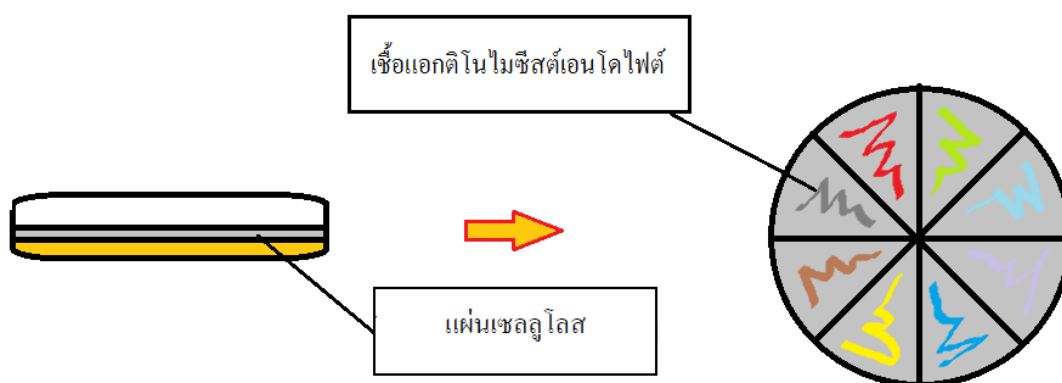
เท่ากับ 10^5 cfu/ml เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการเกิดโรค โดยนำสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเจลาติน 2% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร พ่นลงบนต้นข้าว อายุ 14 วัน บ่มไว้ในถุงพลาสติกสีดำ และเติมน้ำเพื่อเพิ่มความชื้น บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไว้ในสภาพธรรมชาติ และทำการพ่นไอน้ำทุก ๆ เช้าและเย็น เป็นเวลา 4 วัน สังเกตอาการเกิดโรคที่เกิดขึ้น และประเมินความรุนแรงในการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน เพื่อคัดเลือกเชื้อราสาเหตุไอโซเลทที่มีความสามารถในการเกิดโรคที่รุนแรงที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3 การแยกเชื้อและศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

3.3.1 การแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

แยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากข้าว (*Oryza sativa* L.) จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ กรมการข้าว 1 (กข1) กรมการข้าว 7 (กข7) ปทุมธานี 1 และ สุพรรณบุรี 1 (วิธีการแยกเชื้อดัดแปลงจากวิธีการของ Shimizu *et al.*, 2000) โดยเลือกเก็บเฉพาะต้นที่สมบูรณ์ ไม่มีการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลง หรือแสดงอาการของโรค นำตัวอย่างข้าวส่วนใบ ลำต้น และราก มาล้างในน้ำไหลให้สะอาด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผึ่งลมให้แห้ง ใช้กรรไกรตัดส่วนใบให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1 x 1 เซนติเมตร และส่วนราก ยาว 1 เซนติเมตร จากนั้นนำชิ้นพืชที่ได้มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ในเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย heritage ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ชับน้ำให้แห้ง โดยนำไปวางบนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งลมให้แห้งภายในตู้ถ่ายเชื้อ เป็นเวลา 4 วัน วางชิ้นพืชแต่ละส่วนจำนวน 15 ชิ้นต่อ 1 จานอาหาร IMA-2 (inhibitory mold agar 2) (ภาคผนวก ก) บ่มไว้ในตู้มืด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้เข็มเย็บเย็บย้ายเชื้อที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 ที่วางแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filters) (Whatman 0.22 ไมโครเมตร) (ภาพที่ 3.1) เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำแผ่นกรองเซลลูโลสออก หากเชื้อจุลินทรีย์นั้นเป็นเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ จะพบว่าเชื้อสามารถเจริญลอดผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสไปยังผิวหน้าอาหารได้ แยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้ง ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อเก็บเป็น stock culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 บ่มไว้ในตู้มืด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป จากนั้นตั้งชื่อไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ จากชื่อวิทยาศาสตร์ 2 ตัวแรกของพืชอาศัย และชื่อ 2 ตัวแรกของสายพันธุ์ข้าว ดังนี้

พืชอาศัย :	ข้าว (<i>Oryza sativa</i> L.)	= OR__ -
สายพันธุ์ข้าว :	กรมการข้าว 1 (กข1)	= ORRD1-
	กรมการข้าว 7 (กข7)	= ORRD7-
	ปทุมธานี 1	= ORPT1-
	สุพรรณบุรี 1	= ORSP1-



ภาพที่ 3.1 การฉีดเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกานัสบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 ที่วางแผ่นกรองเซลลูโลส (cellulose membrane filters)

3.3.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกานัส

นำเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกานัสที่แยกได้แต่ละไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 ด้วยวิธีการ streak plate แล้วบ่มในตู้มีดอุมทุมมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นบันทึกสีของโคโลนี (อ้างอิงหมายเลขสีจาก Manual of Color Name, 1987) ลักษณะโคโลนี การเจริญของโคโลนี ลักษณะเส้นใย การแตกแขนงของเส้นใย รูปร่างของสปอร์ และการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้

3.3.3 อัตราการเจริญและการสร้าง aerial mycelium ของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกานัส

นำเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกานัสที่แยกได้แต่ละไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 ตามวิธีการของข้อ 3.3.2 เป็นเวลา 7 วัน โดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกานัสในแต่ละวัน บันทึกและแบ่งกลุ่มของเชื้อแอสเพอริลลัสฟูมิกานัส โดยอาศัยอัตราการเจริญของ aerial mycelium ในระยะเวลา 1-5 วันหลังบ่มเชื้อ แบ่งระดับอัตราการเจริญออกเป็น 5 ระดับ และศึกษาลักษณะการเริ่มสร้าง aerial mycelium และการเจริญฟูบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในระยะเวลาสั้น โดยสังเกตและบันทึกการเริ่มสร้าง aerial mycelium ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5 วัน และการเจริญเต็มจานอาหารของ aerial mycelium ที่ระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน

	อัตราการเจริญ	การเจริญของ aerial mycelium (วัน)
ระดับ	ดีมาก	1
	ดี	2
	ปานกลาง	3
	น้อย	4
	น้อยมาก	มากกว่า 5

3.4 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าว

คัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากข้าว ที่สามารถสร้าง aerial mycelium รวดเร็วที่สุด ภายใน 1 วัน และเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 3 วัน จำนวน 10 ไอโซเลท มาเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคกับเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรที่มีรายงานงานวิจัยการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคอื่น ๆ จากห้องปฏิบัติการโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 10 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว ด้วยวิธีการ dual culture ตามวิธีการของ Shimizu *et al.* (2000) โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์บนอาหาร IMA-2 แล้วบ่มในตู้มืด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์เจริญเป็นโคโลนีที่สมบูรณ์และสร้างสารปฏิชีวนะ แล้ววางเชื้อรา *P. grisea* บริเวณตรงกันข้ามระยะห่าง 3 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.2) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมวางเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว บันทึกผลโดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุมและชุดทดสอบ เมื่อเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุมเจริญเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG)

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ

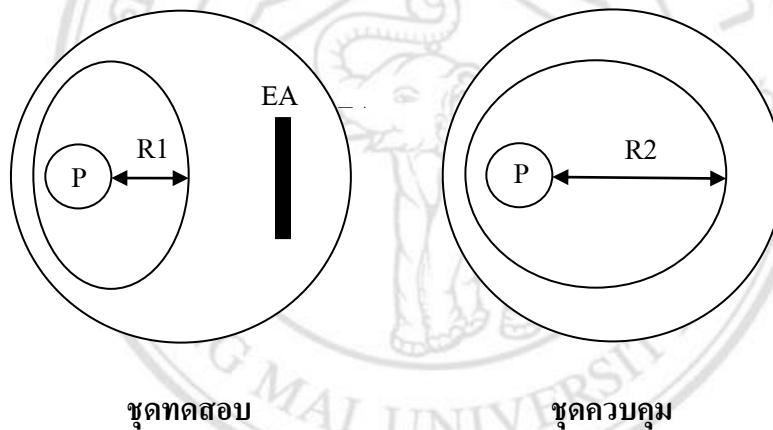
$$PIRG = \left(\frac{R1 - R2}{R1} \right) \times 100$$

R1 = รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุชุดควบคุม

R2 = รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุชุดทดสอบ

โดยประเมินประสิทธิภาพการยับยั้ง ดังนี้

>71	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
61 – 70	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
51 – 60	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
<50	เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ



ภาพที่ 3.2 ลักษณะการวัดผลในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอ็นโดไฟต์ต่อเชื้อรา *Pyricularia grisea* ในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 โดยวิธี dual culture

P: เชื้อรา *P. grisea*

EA: เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอ็นโดไฟต์

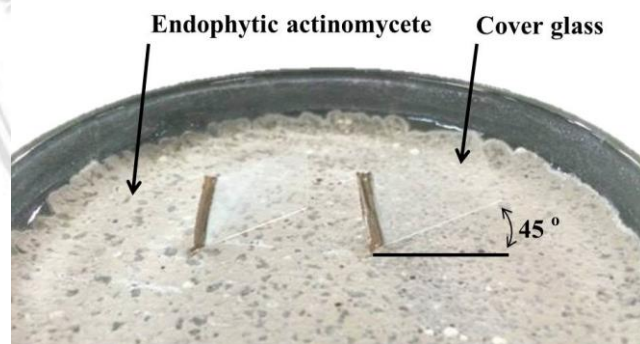
R1: รัศมีการเจริญของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดทดสอบ

R2: รัศมีการเจริญของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

3.5 การจำแนกสกุลของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

3.5.1 จำแนกสกุลของเชื้อเบื้องต้น ตามวิธีการของ Williams *et al.* (1989)

นำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.4 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ในระดับดีมาก มาจำแนกสกุลของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ด้วยวิธี slide culture โดยนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 แล้วนำแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาปิดลงบนผิวหน้าอาหารให้ทำมุม 45 องศา กับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 3.3) บ่มไว้ตู้มีด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำแผ่นปิดสไลด์ที่มีเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์เจริญติดอยู่มาย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบลักษณะเส้นใย การสร้างสปอร์ของเชื้อ และการเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ตามเอกสารของ Miyadoh *et al.* (1997) และ Stanley *et al.* (1989) เพื่อจัดจำแนกเชื้อในเบื้องต้น



ภาพที่ 3.3 การเตรียม slide culture ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2

3.5.2 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลทคัดเลือกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบส

นำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.4 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ในระดับดีมาก มาจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลผลด้วย 16S rRNA โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. สกัดดีเอ็นเอของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ โดยใช้ FavorPrep Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen) โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Non-sporulating (Flardh *et al.*, 2000; ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการขูดเชื้อให้ได้น้ำหนักประมาณ 10-25 มิลลิกรัม นำไปบดเซลล์ให้แตกด้วย micropestle โดยเติม FATG1 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมสารและเซลล์ให้เข้ากัน เติมเอนไซม์ Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำการกลับหลอดไปมาทุก ๆ 10-15 นาที หลังจากนั้นเติม FATG2 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที เพื่อย่อยสลายโปรตีน และพอลิแซคคาไรด์ จากนั้นเติมสารละลายเอทานอล (ความเข้มข้น 96-100 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนที่ใสใส่ลงไปใน FATG Mini column ที่สวมอยู่กับ collection tube นำไปเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส เติม W1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้นเติม Wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส จากนั้นนำไปบั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ส่วนของ FATG Mini column แห้ง จากนั้นเปลี่ยน collection tube เป็นหลอด microcentrifuge เติม Elution buffer หรือ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จะได้ส่วนของดีเอ็นเอออกมา นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำ PRC ในขั้นตอนต่อไป

2. เพิ่มจำนวนปริมาณยีน 16S rRNA ในหลอดทดลอง ด้วยเทคนิค (polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' และ 1525R: 5' AAGGAGGTGWTCCARCC 3' จากนั้นตรวจสอบหาขนาดของ PCR product ที่ได้ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ 120 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายใต้เครื่อง Gel Documentation โดยขนาดของยีน 16S rRNA มีขนาด 1,500 bp จากนั้นทำการบันทึกภาพและนำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ GF-1 Ambi Clean Kit

(Vivantis) ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ อีกครั้ง จากนั้นส่งตัวอย่างไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ บริษัท Frist Base Ltd., Malaysia เปรียบเทียบผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลในฐานข้อมูล Biocloud database (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม BioEdit และ MEGA 5.0 วิเคราะห์หาความสัมพันธ์แบบวิธี neighbor-joining ที่ Bootstrap = 1,000 ครั้ง

3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมการเกิดโรคไหม้ของข้าวในระดับโรงเรือน

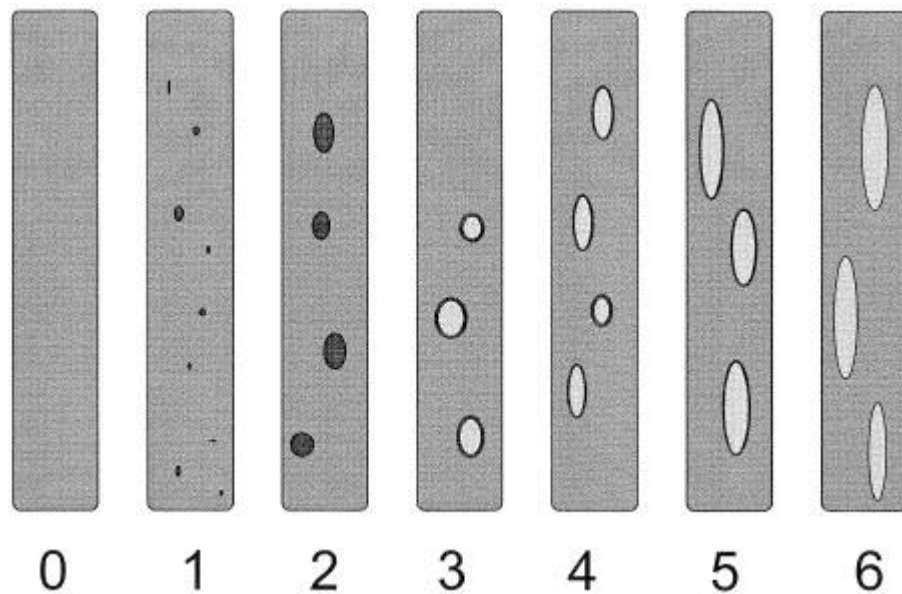
3.6.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

นำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.4 มาเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 บ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นชุดสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร ด้วยแผ่นสไลด์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำสปอร์ของเชื้อที่ได้มาผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับปริมาตรให้มีความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 1×10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ลิตร ผสมกับ tween 20 ปริมาตร 2-3 หยด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.6.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว

คัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* สูงที่สุด จำนวน 4 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว โดยแช่เมล็ดข้าวในสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ซึ่งในแต่ละกรรมวิธีทำการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ที่ความเข้มข้น 1×10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 วัน แล้วปลูกลงบนกระบะเพาะ บ่มไว้ในสภาพโรงเรือน เมื่อต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน หลังปลูก ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่ (2.46 กรัม/กระบะเพาะ) เพื่อกระตุ้นให้ข้าวอ่อนแอต่อการเกิดโรค จากนั้นพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *P. grisea* โดยใช้ความเข้มข้นที่ 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเจลาติน 2% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มไว้ในถุงพลาสติกสีดำ และเติมน้ำเพื่อเพิ่มความชื้น บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไว้ในสภาพธรรมชาติ และทำการพ่นไอน้ำทุก ๆ เช้าและเย็น เป็นเวลา 4 วัน วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้นต่อกรรมวิธี ซึ่งชุดควบคุมทำการปลูกเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว บันทึกอาการเกิดโรค และประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรค

หลังการปลูกเชื้อ 7 วัน และให้คะแนนการเกิดโรคโดยใช้ระดับคะแนนการเกิดโรค 7 ระดับ ตามรายงานของ Roumen *et al.* (1997) ดังภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 เกณฑ์ประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรคใบไหม้ของข้าว 7 ระดับ ตั้งแต่ระดับ 0-6

0 = ไม่ปรากฏแผล

1 = เกิดแผลจุดกลมสีน้ำตาลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร ไม่มีการสร้างโคนิเดีย

2 = เกิดแผลกลมหรือยาวรีเล็กน้อยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.5-1 มิลลิเมตร ไม่มีการสร้างโคนิเดีย

3 = เกิดแผลจุดเล็กๆ ขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร มีจุดสีเทาตรงกลางแผล

4 = เกิดแผลจุดขนาดประมาณ 4 มิลลิเมตร หรือยาวกว่า แผลเป็นสีเทามีขอบแผลสีน้ำตาล

5 = เกิดแผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่ม มีขอบแผลสีน้ำตาล เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

6 = เกิดแผลลูกกลมยาวติดต่อกันเป็นสีเทา ไม่มีขอบแผลที่แน่นอน เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

3.7 การศึกษาความสามารถในการเข้าอาศัยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในข้าว

คัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* สูงที่สุด จำนวน 4 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการเข้าอาศัยพืช ด้วยวิธีการแยกเชื้อกลับ (re-isolation) โดยนำเมล็ดข้าวแช่ในสปอร์แขวนลอยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ที่ความเข้มข้น 1×10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 วัน แล้วปลูกลงบนกระเพาะเพาะ บ่มไว้ในสภาพโรงเรือน จากนั้นแยกเชื้อกลับที่ระยะเวลา 1, 3, 5, 7 และ 14 วัน หลังปลูก โดยตัดต้นข้าวเป็นชิ้นเล็ก ๆ แยกเป็นส่วนใบ ลำต้น ราก และเปลือกเมล็ด นำชิ้นพืชทั้งหมดมาฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และสารละลาย heritage ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ซับชิ้นพืชให้แห้ง โดยนำมาวางบนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งลมให้แห้งภายในตู้ถ่ายเชื้อเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้น วางชิ้นพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 บ่มไว้ในตู้มืด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ตรวจสอบการเจริญของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช และนับจำนวนชิ้นพืชที่สามารถแยกเชื้อกลับได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์เอนโดไฟต์ คำนวณเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับจากสูตรดังนี้

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4

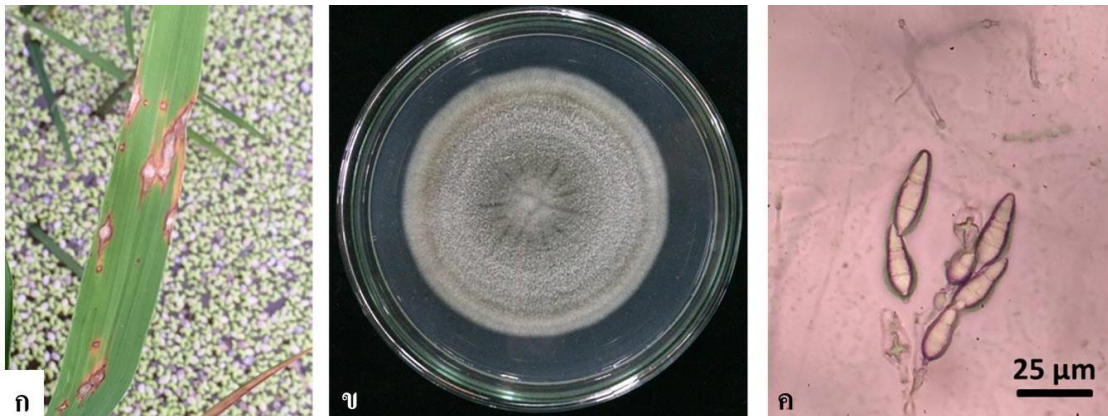
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคใหม่

เก็บตัวอย่างใบข้าวที่แสดงอาการโรคใหม่ จากพื้นที่เพาะปลูกในสถานีวิจัยไร่แม่เหิระ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ พบแผลจุดสีน้ำตาลคล้ายรูปตา บริเวณกลางแผลมีสีเทา แผลมีความกว้าง 2-5 มิลลิเมตร และความยาว 10-15 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.1ก) เมื่อนำใบข้าวที่มีแผลของโรคใหม่บ่มไว้ในกล่องขึ้น ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบกลุ่มสปอร์ของเชื้อราเจริญออกมาจากบริเวณแผล มีลักษณะคล้ายช่อ มีสีเทา เมื่อนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation จากนั้นเทียบกับรายงานของ Ou (1985) พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคนี้ คือ เชื้อรา *P. grisea*

เชื้อรา *P. grisea* ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA เส้นใยมีสีขาวต่อมาเจริญเป็นสีเทาเจริญติดผิวหน้าอาหาร เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่ออายุ 14 วัน (ภาพที่ 4.1ข) เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า พบลักษณะเส้นใยไม่มีผนังกั้น สร้าง conidia ไม่มีสี (hyaline) มี 2-3 เซลล์ รูปร่างคล้ายกระสวย หัวมนท้ายแหลม (spindle) มีขนาดความกว้าง 7.5 ไมโครเมตร และยาว 25 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.1ค)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.1 ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบข้าว และลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Pyricularia grisea*

- (ก) ลักษณะอาการไหม้บนใบข้าว
- (ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ของเชื้อรา *P. grisea* ที่อายุ 10 วัน
- (ค) ลักษณะโคนินเดียของเชื้อรา *P. grisea* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

จากผลการทดลองสามารถแยกได้เชื้อรา *P. grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว ซึ่งชนิดของเชื้อราที่พบนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ นวรัตน์และนางลักษณ์ (2557) ที่ทำการศึกษาและแยกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าวจากแปลงข้าวที่เกิดโรคไหม้ระดับภาคในประเทศไทย พบว่า เชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าว คือ เชื้อรา *P. grisea* ซึ่งเชื้อราเหล่านี้ส่วนใหญ่มักแพร่กระจายทั่วไปในอากาศ และอาจมีความแตกต่างกันของสายพันธุ์ในแต่ละแหล่งปลูก

4.2 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

จากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *P. grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าวที่แยกได้จากการทดลองข้อ 4.1 เมื่อนำมาปลูกเชื้อลงบนต้นข้าวที่อายุ 14 วัน โดยการฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรคในสภาพความชื้นสูง พบว่า หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ใบข้าวแสดงอาการเหลือง มีแผลคล้ายรูปตา ตรงกลางแผลมีกลุ่มสปอร์ของเชื้อราสีเทา (ภาพที่ 4.2ก) เมื่อนำใบข้าวที่แสดงอาการแผลดังกล่าวมาแยกเชื้อสาเหตุ สามารถแยกได้เชื้อรา *P. grisea* ที่มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 10 วัน พบเส้นใยสีขาวต่อมาเจริญเป็นสีเทาเจริญติดผิวหน้าอาหาร (ภาพที่ 4.2ข) และเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า พบลักษณะเส้นใยไม่มีผนังกัน สร้าง conidia ไม่มีสี (hyaline) มี 2-3 เซลล์ รูปร่างคล้ายกระสวย หัวมนท้ายแหลม (spindle) มีขนาดความกว้าง 7.5 ไมโครเมตร และยาว 25 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.2ค) คล้ายกับเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้จากข้อ 4.1 ทำการเก็บรักษาเชื้อสาเหตุโรคเพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป จากการทดลอง

พบว่า เชื้อรา *P. grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าวที่แยกได้นั้นเป็นเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริง ซึ่งสามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดต้นข้าวเกิดโรคได้ และเป็นเชื้อสาเหตุโรคที่มีความรุนแรงในการเกิดโรค สอดคล้องกับการรายงานของพูนศักดิ์ และคณะ (2554) ได้ทำการทดสอบความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรคไหม้จากพื้นที่เพาะปลูกในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบทางภาคเหนือมีความหลากหลายและมีความรุนแรงในการเกิดโรคในระดับปานกลางถึงรุนแรง โดยเฉพาะข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีความอ่อนแอต่อเชื้อไอโซเลทที่มีแหล่งที่มาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือมากที่สุดซึ่งเป็นพื้นที่ที่เกษตรกรนิยมปลูกข้าวพันธุ์นี้



ภาพที่ 4.2 ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบกล้าข้าว อายุ 21 วัน หลังจากการปลูกเชื้อรา *Pyricularia grisea* ลงบนใบกล้าข้าว เป็นเวลานาน 7 วัน

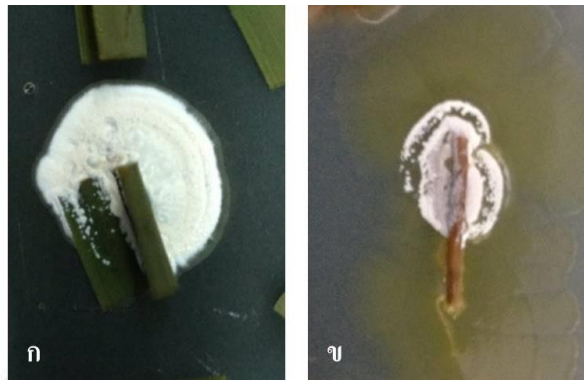
- (ก) ลักษณะอาการไหม้บนใบข้าว
- (ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อายุ 10 วัน
- (ค) ลักษณะโคนีเดียของเชื้อราสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

4.3 การแยกเชื้อและศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

4.3.1 การแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

แยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากตัวอย่างข้าวจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ กข1 กข7 ปทุมธานี1 และสุวรรณบุรี1 บนอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 30 วัน พบโคโลนีที่มีลักษณะเป็นเส้นใยเจริญบนผิวหน้าชั้นส่วนพีช (ภาพที่ 4.3) โดยสามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 174 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เกิดจากส่วนต่าง ๆ ของพีช พบว่า ส่วนใหญ่แยกได้จากใบ โดยพบเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จำนวน 139 ไอโซเลท คิด

เป็นเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อได้ 79.89 เปอร์เซ็นต์ และราก พบเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จำนวน 35 ไอโซเลท คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อได้ 20.11 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เจริญจากส่วนใบและรากของข้าวหลังจากเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน
ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เจริญออกจากใบข้าว
ข. ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เจริญออกจากรากข้าว

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวแต่ละสายพันธุ์ พบว่า ข้าวสายพันธุ์ กข1 สามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ได้มากที่สุด 75 ไอโซเลท รองลงมาคือ กข7 (42 ไอโซเลท) สุพรรณบุรี 1 (34 ไอโซเลท) และปทุมธานี 1 (23 ไอโซเลท) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อเท่ากับ 43.10, 24.14, 19.54 และ 13.22 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) และจากการเปรียบเทียบจำนวนไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของข้าวแต่ละสายพันธุ์ พบว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวสายพันธุ์ กข1 แยกได้จากส่วนใบ 61 ไอโซเลท (27.11 เปอร์เซ็นต์) ส่วนราก 14 ไอโซเลท (6.22 เปอร์เซ็นต์) ส่วนข้าวสายพันธุ์ กข7 แยกได้จากส่วนใบ 26 ไอโซเลท (11.50 เปอร์เซ็นต์) ส่วนราก 16 ไอโซเลท (7.11 เปอร์เซ็นต์) ข้าวสายพันธุ์ ปทุมธานี 1 แยกได้จากส่วนใบ 19 ไอโซเลท (8.44 เปอร์เซ็นต์) ส่วนราก 4 ไอโซเลท (1.77 เปอร์เซ็นต์) และข้าวสายพันธุ์ สุพรรณบุรี 1 แยกได้จากส่วนใบ 33 ไอโซเลท (14.67 เปอร์เซ็นต์) ส่วนราก 1 ไอโซเลท (0.44 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4.1) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า สามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ได้จากส่วนใบมากกว่าส่วนราก เนื่องจากส่วนของรากมีโอกาสของการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ค่อนข้างสูง จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เจริญออกมาแข่งขันกับเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ สอดคล้องกับรายงานของ ศิริมาศ และเกวลิน (2557) รายงานว่าสามารถแยกเชื้อกลุ่มนี้ได้จากส่วนใบของพืชสมุนไพร และพืชวงศ์กุหลาบได้มากที่สุดเช่นกัน และแสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางด้านชนิดของพืช บริเวณพื้นที่เพาะปลูก มีผลต่อปริมาณและชนิด

ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้ (Sardi *et al.*, 1992) รวมไปถึงส่วนต่างๆ ของพืชที่เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์อาศัยอยู่ในที่แตกต่างกัน เช่น ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ด เป็นต้น (Qin *et al.*, 2011) ตลอดจนขั้นตอนและเทคนิคที่ใช้ในการทดลอง เช่น การฆ่าเชื้อที่ผิวพืชมีอิทธิพลต่อชนิดและปริมาณของเชื้อด้วยเช่นกัน เนื่องจากหากไม่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวให้หมดอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่พึงประสงค์ และส่งผลให้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไม่สามารถเจริญออกมาจากชิ้นพืชได้ (Shimizu *et al.*, 2000)

ตารางที่ 4.1 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส่วนใบและรากของข้าว 4 สายพันธุ์ หลังเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

สายพันธุ์ข้าว	จำนวนไอโซเลทเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์		รวม (%) ²
	ส่วนใบ (%) ¹	ส่วนราก (%)	
กข1	61 (27.11)	14 (6.22)	75 (43.10)
กข7	26 (11.50)	16 (7.11)	42 (24.14)
ปทุมธานี1	19 (8.44)	4 (1.77)	23 (13.22)
สุพรรณบุรี1	33 (14.67)	1 (0.44)	34 (19.54)
รวม (%) ³	139 (79.89)	35 (20.11)	174

¹ เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากแต่ละชิ้นส่วนของพืช (225 ชิ้น)

² เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ

³ เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส่วนใบและรากของพืช

การเรียกชื่อไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จะเรียกตามตัวอักษรสองตัวแรกของชื่อสกุลของพืชอาศัย ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ใช้ข้าวในการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ โดยข้าวมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *O. sativa* L. ดังนั้นการเรียกชื่อไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้ คือ OR และแบ่งกลุ่มไอโซเลทตามตัวอักษรตัวแรกของสายพันธุ์ข้าวที่นำมาแยกแต่ละชนิด โดยหมายเลขของไอโซเลทเรียงตามการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากส่วนของใบและรากตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การตั้งชื่อไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่แยกได้จากข้าวแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์ข้าว	ชื่อไอโซเลท	
	ส่วนใบ	ส่วนราก
กข1	ORR101-161	ORR162-175
กข7	ORR701-726	ORR727-742
ปทุมธานี1	ORP101-119	ORP120-123
สุพรรณบุรี1	ORS101-133	ORS134

4.3.2 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์

ศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่แยกได้จากข้าว 4 สายพันธุ์ จำนวน 174 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.3) โดยศึกษาลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี การเจริญของโคโลนี ลักษณะเส้นใย การแตกแขนงของเส้นใย รูปร่างของเซลล์ และการสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ หลังจากเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่แยกได้ มีความหลากหลายของโคโลนีที่ต่างกัน เมื่อแบ่งกลุ่มรูปร่างของโคโลนีเดี่ยว พบว่ามีรูปร่าง 6 กลุ่ม ได้แก่ รูปร่างกลมมนผิวหน้าเป็นวงแหวนซ้อนกันหลาย ๆ ชั้น (circular convex concentric; 2 ไอโซเลท) รูปร่างกลมมนผิวหน้าเป็นรอยย่น (circular convex rugose; 1 ไอโซเลท) รูปร่างกลมมนผิวหน้าเรียบมีวงแหวน (circular convex smooth ring; 29 ไอโซเลท) รูปร่างกลมมนสองชั้นมีวงแหวน (circular convex umbonate ring; 52 ไอโซเลท) รูปร่างกลมมนสองชั้น (circular convex umbonate; 86 ไอโซเลท) และรูปร่างไม่แน่นอนบนผิวหน้าเป็นรอยย่น (irregular convex rugose; 4 ไอโซเลท) (ภาพที่ 4.4) สำหรับสีโคโลนีส่วนใหญ่ (55.17 เปอร์เซ็นต์) มีสี beige white (เลขสี 392) รองลงมาคือ สี pale beige (เลขสี 84) (36.22 เปอร์เซ็นต์), brownish gray (เลขสี 409) (5.17 เปอร์เซ็นต์), light gray (เลขสี 397) (1.73 เปอร์เซ็นต์), white (เลขสี 388) (0.57 เปอร์เซ็นต์), yellowish white (เลขสี 393) (0.57 เปอร์เซ็นต์) และ reddish gray (เลขสี 408) (0.57 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร IMA-2 เป็นแบบผิวเรียบคล้ายหนังสัตว์ (leather) และแบบผง (powdery) บางที่อาจสร้างลักษณะโคโลนีคล้ายหนังกำมะหยี่ เนื่องจากเกิดการอัดรวมตัวกันแน่นของสปอร์ที่สร้างบนเส้นใย aerial mycelium นอกจากนี้ยังพบว่า มีเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ จำนวน 48 ไอโซเลท (27.59 เปอร์เซ็นต์) สามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้หลายสี ได้แก่ dull yellow (เลขสี 151) (41 ไอโซเลท), yellowish brown (เลขสี 101) (6 ไอโซเลท) และ grayish yellow (เลขสี 159) (1 ไอโซเลท) (ตารางที่ 4.3) จากการทดลองพบว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่แยกได้จากข้าว จำนวน 174 ไอโซเลท มีความหลากหลายทางลักษณะพื้นฐานวิทยาที่แตกต่างกันทั้งลักษณะสีของโคโลนี รูปแบบ

การสร้างโคโลนี การสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยความแตกต่างของเชื้อที่พบอาจขึ้นอยู่กับพื้นที่ปลูกที่ต่างกัน สายพันธุ์ของพืชที่แยกเชื้อ หรืออาจจะขึ้นอยู่กับวิธีการแยกเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sardi *et al.* (1992) ที่กล่าวไว้ว่า บริเวณพื้นที่เพาะปลูก มีผลต่อปริมาณและชนิดของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้ นอกจากนี้รายงานของ Qin *et al.* (2011) ยังกล่าวไว้ว่า ความหลากหลายของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้ ขึ้นอยู่กับส่วนต่างๆ ของพืชที่เชื้ออาศัยอยู่ในที่แตกต่างกัน เช่น ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ด เป็นต้น ตลอดจนขั้นตอนและเทคนิคที่ใช้ในการทดลอง เช่น การฆ่าเชื้อที่ผิวพืชมีอิทธิพลต่อชนิดและปริมาณของเชื้อด้วยเช่นกัน (Shimizu *et al.*, 2000)



ภาพที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ หลังเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 และบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

ตารางที่ 4.3 ลักษณะสีฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ จำนวน 174 ไอโซเลท หลังเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

ไอโซเลท	สีของ Aerial mycelium	สีของ Substrate mycelium	การสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้	
			การสร้าง	สีของรงควัตถุ
ORR101	beige white	pale yellow	×	-
ORR102	beige white	pale yellow	×	-
ORR103	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR104	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR105	pale beige	pale yellow	×	-
ORR106	pale beige	pale yellow	×	-
ORR107	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORR108	brownish gray	olive gray	✓	dull yellow
ORR109	beige white	pale yellow	×	-
ORR110	beige white	soft orange	×	-
ORR111	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORR112	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR113	pale beige	pale yellow	×	-
ORR114	beige white	pale yellow	×	-
ORR115	pale beige	pale yellow	×	-
ORR116	pale beige	pale yellow	×	-
ORR117	beige white	pale yellow	×	-
ORR118	pale beige	pale yellow	×	-
ORR119	beige white	pale yellow	×	-
ORR120	beige white	pale yellow	×	-
ORR121	pale beige	pale yellow	×	-
ORR122	beige white	pale yellow	×	-
ORR123	pale beige	pale yellow	×	-
ORR124	pale beige	pale yellow	×	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลท	สีของ Aerial mycelium	สีของ Substrate mycelium	การสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้	
			การสร้าง	สีของรงควัตถุ
ORR125	beige white	pale yellow	×	-
ORR126	beige white	pale yellow	×	-
ORR127	pale beige	pale yellow	×	-
ORR128	pale beige	pale yellow	×	-
ORR129	pale beige	pale yellow	×	-
ORR130	pale beige	pale yellow	×	-
ORR131	beige white	pale yellow	×	-
ORR132	beige white	pale yellow	×	-
ORR133	beige white	pale yellow	×	-
ORR134	beige white	pale yellow	×	-
ORR135	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR136	beige white	pale yellow	×	-
ORR137	pale beige	pale yellow	×	-
ORR138	beige white	pale yellow	×	-
ORR139	beige white	pale yellow	×	-
ORR140	pale beige	pale yellow	×	-
ORR141	pale beige	pale yellow	×	-
ORR142	beige white	pale yellow	×	-
ORR143	pale beige	pale yellow	×	-
ORR144	pale beige	pale yellow	×	-
ORR145	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORR146	beige white	pale yellow	×	-
ORR147	beige white	pale yellow	×	-
ORR148	beige white	pale yellow	×	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลท	สีของ Aerial mycelium	สีของ Substrate mycelium	การสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้	
			การสร้าง	สีของรงควัตถุ
ORR149	beige white	pale yellow	×	-
ORR150	beige white	soft orange	✓	dull yellow
ORR151	beige white	pale yellow	×	-
ORR152	beige white	pale yellow	×	-
ORR153	beige white	pale yellow	×	-
ORR154	beige white	beige white	×	-
ORR155	beige white	beige white	×	-
ORR156	beige white	beige white	×	-
ORR157	pale beige	pale beige	×	-
ORR158	beige white	beige white	×	-
ORR159	beige white	beige white	×	-
ORR160	beige white	beige white	×	-
ORR161	beige white	beige white	×	-
ORR162	reddish gray	reddish gray	✓	dull yellow
ORR163	yellowish white	yellowish white	✓	dull yellow
ORR164	beige white	beige white	✓	dull yellow
ORR165	beige white	beige white	✓	dull yellow
ORR166	pale beige	pale beige	✓	dull yellow
ORR167	beige white	beige white	✓	dull yellow
ORR168	pale beige	pale beige	×	-
ORR169	beige white	beige white	×	-
ORR170	white	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORR171	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR172	beige white	soft reddish yellow	✓	dull yellow

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลท	สีของ Aerial mycelium	สีของ Substrate mycelium	การสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้	
			การสร้าง	สีของรงควัตถุ
ORR173	beige white	pale yellow	×	-
ORR174	beige white	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORR175	brownish gray	olive gray	×	-
ORR701	beige white	pale yellow	×	-
ORR702	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORR703	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR704	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR705	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORR706	pale beige	pale yellow	×	-
ORR707	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORR708	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORR709	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORR710	beige white	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORR711	beige white	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORR712	beige white	pale yellow	×	-
ORR713	pale beige	pale yellow	×	-
ORR714	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR715	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR716	beige white	soft orange	✓	dull yellow
ORR717	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR718	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR719	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR720	beige white	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORR721	beige white	soft reddish yellow	✓	dull yellow

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลท	สีของ Aerial mycelium	สีของ Substrate mycelium	การสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้	
			การสร้าง	สีของรงควัตถุ
ORR722	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR723	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORR724	pale beige	soft orange	×	-
ORR725	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORR726	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORR727	brownish gray	dark gray	✓	dull yellow
ORR728	brownish gray	olive gray	×	-
ORR729	beige white	pale yellow	×	-
ORR730	light gray	yellowish brown	✓	dull yellow
ORR731	beige white	soft orange	✓	yellowish brown
ORR732	light gray	yellowish brown	✓	dull yellow
ORR733	brownish gray	dark grayish brown	✓	dull yellow
ORR734	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORR735	beige white	soft orange	✓	yellowish brown
ORR736	brownish gray	olive gray	×	-
ORR737	brownish gray	olive gray	✓	grayish yellow
ORR738	beige white	soft orange	✓	yellowish brown
ORR739	pale beige	soft reddish yellow	✓	yellowish brown
ORR740	beige white	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORR741	beige white	soft orange	✓	yellowish brown
ORR742	beige white	soft reddish yellow	✓	yellowish brown
ORP101	beige white	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORP102	pale beige	pale yellow	×	-
ORP103	pale beige	soft reddish yellow	×	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลท	สีของ Aerial mycelium	สีของ Substrate mycelium	การสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้	
			การสร้าง	สีของรงควัตถุ
ORP104	beige white	pale yellow	×	-
ORP105	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORP106	beige white	pale yellow	×	-
ORP107	pale beige	pale yellow	×	-
ORP108	pale beige	pale yellow	×	-
ORP109	beige white	pale yellow	×	-
ORP110	pale beige	pale yellow	×	-
ORP111	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORP112	beige white	pale yellow	×	-
ORP113	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORP114	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORP115	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORP116	pale beige	pale yellow	×	-
ORP117	beige white	pale yellow	×	-
ORP118	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORP119	beige white	pale yellow	×	-
ORP120	brownish gray	olive gray	×	-
ORP121	light gray	yellowish brown	✓	dull yellow
ORP122	brownish gray	olive gray	×	-
ORP123	beige white	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORS101	pale beige	pale yellow	×	-
ORS102	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORS103	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORS104	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลท	สีของ Aerial mycelium	สีของ Substrate mycelium	การสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้	
			การสร้าง	สีของรงควัตถุ
ORS105	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORS106	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORS107	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORS108	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORS109	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORS110	pale beige	soft orange	✓	dull yellow
ORS111	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORS112	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORS113	pale beige	pale yellow	×	-
ORS114	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORS115	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORS116	pale beige	pale yellow	×	-
ORS117	pale beige	pale yellow	×	-
ORS118	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORS119	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORS120	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORS121	beige white	soft orange	✓	dull yellow
ORS122	beige white	soft orange	✓	dull yellow
ORS123	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORS124	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORS125	beige white	soft orange	✓	dull yellow
ORS126	beige white	soft reddish yellow	×	-
ORS127	beige white	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORS128	pale beige	pale yellow	×	-

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลท	สีของ Aerial mycelium	สีของ Substrate mycelium	การสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้	
			การสร้าง	สีของรงควัตถุ
ORS129	pale beige	pale yellow	×	-
ORS130	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORS131	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORS132	pale beige	soft reddish yellow	×	-
ORS133	pale beige	soft reddish yellow	✓	dull yellow
ORS134	beige white	soft reddish yellow	×	-

4.3.3 การเจริญและการสร้าง aerial mycelium ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าว 4 สายพันธุ์ จำนวน 174 ไอโซเลท โดยศึกษาลักษณะเริ่มสร้าง aerial mycelium และเจริญฟูบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในระยะเวลาสั้น โดยสังเกตการเริ่มสร้าง aerial mycelium ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5 วัน และการเจริญเต็มจานอาหารของ aerial mycelium ที่ระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน พบว่า เมื่อจัดกลุ่มตามการสร้าง aerial mycelium ที่เจริญฟูเต็มจานอาหารภายในระยะเวลาอันสั้น สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่สร้าง aerial mycelium เจริญฟูเต็มจานอาหารภายใน 3 วัน (61 ไอโซเลท), 5 วัน (87 ไอโซเลท) และ 7 วัน (26 ไอโซเลท) (ตารางที่ 4.4) จากนั้นคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่สร้าง aerial mycelium ได้รวดเร็วที่สุดภายใน 1 วัน มาจำนวน 10 ไอโซเลท เพื่อใช้ทดลองต่อไป สำหรับการคัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถสร้าง aerial mycelium ได้ในระยะเวลาอันสั้น จะสามารถเร่งกระบวนการในการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญต่างๆ ได้ไวยิ่งขึ้น เนื่องจากกระบวนการผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อปฏิปักษ์ จะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโตของ aerial mycelium (Chater, 2006) อีกทั้งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตสารชีวภัณฑ์จากเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่สามารถลดต้นทุนการผลิต และ ระยะเวลาในการผลิตลงได้

ตารางที่ 4.4 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่แยกได้จากข้าวในการเริ่มสร้าง aerial mycelium ที่ช่วงเวลา 1-5 วัน และการเจริญเต็มจานอาหารที่ช่วงเวลา 3-7 วัน

เจริญเต็ม จานอาหาร (วัน)	จำนวนไอโซเลทเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์					รวม (%)
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	
3	10	37	14	0	0	61 (35.06)
5	13	39	34	0	1	87 (50.00)
7	7	6	7	3	3	26 (14.94)

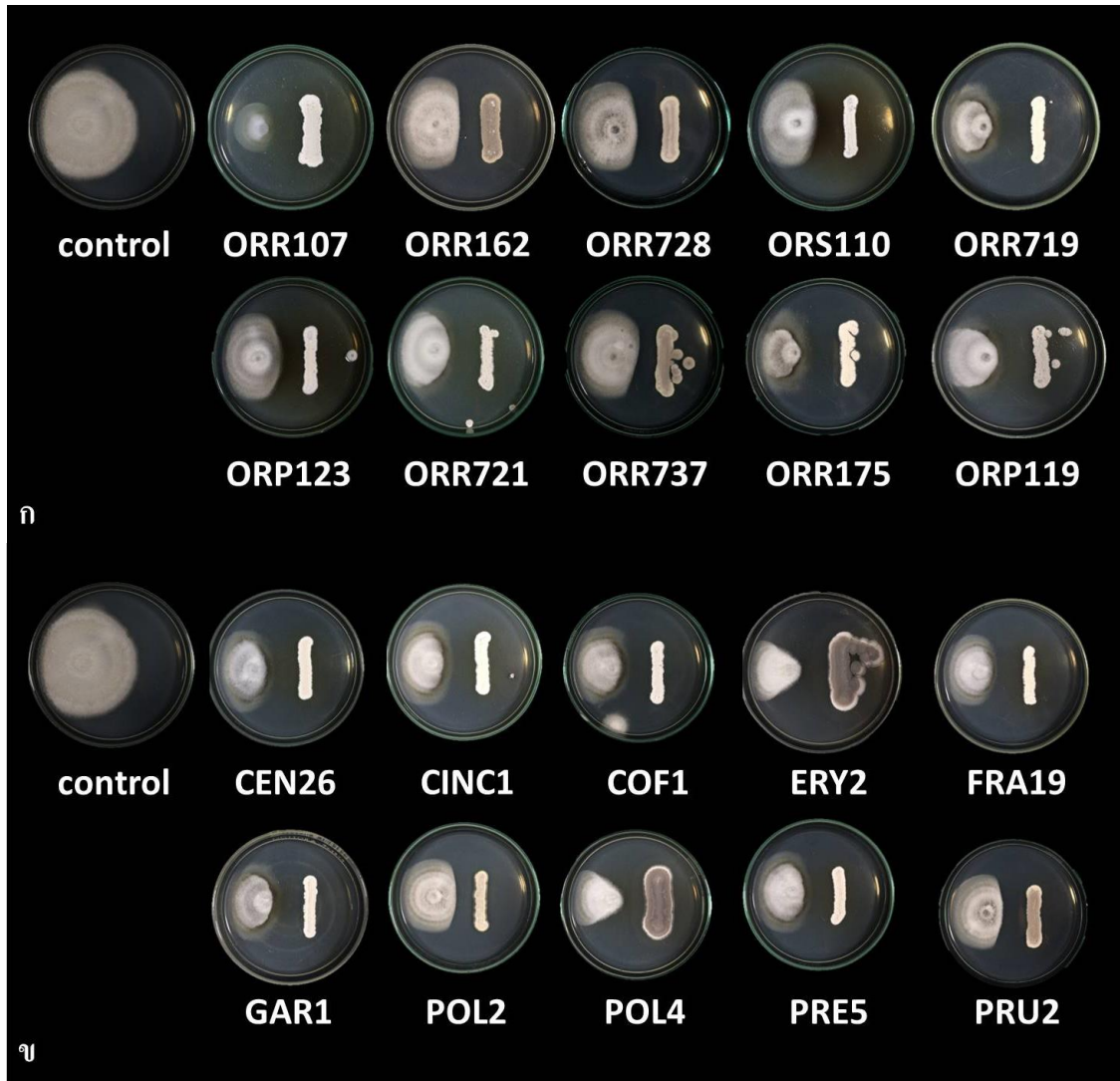
4.4 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าว

จากการคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์จากข้าว ที่สามารถสร้าง aerial mycelium รวดเร็วที่สุด ภายใน 1 วัน และเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 3 วัน พบเชื้อ จำนวน 10 ไอโซเลท ที่สามารถ ได้แก่ ORR107, ORR162, ORR175, ORR719, ORR721, ORR728, ORR737, ORP119, ORP123 และ ORS110 และเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์จากห้องปฏิบัติการโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ CEN26, CINC1, COF1, ERY2, FRA19, GAR1, POL2, POL4, PRE5 และ PRU2 (ตารางที่ 4.5) มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าว ด้วยวิธีการ dual culture บนอาหาร IMA-2 พบว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์แต่ละไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าวได้แตกต่างกัน (ภาพที่ 4.5) โดยพบเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุอยู่ในระดับดีมากจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท ERY2 POL4 ORR107 และ ORR719 โดยไอโซเลท ERY2 และ POL4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 90.00 85.00 78.35 และ 74.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท ORP119 ORR721 CEN26 ORS110 PRU2 GAR1 และ ORR175 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอยู่ในระดับปานกลาง มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 70.00 69.17 65.84 65.00 65.00 64.17 และ 61.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท FRA19 ORR728 CINC1 PRE5 COF1 และ ORR737 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอยู่ในระดับน้อย มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 60.00 60.00 59.17 59.17 58.34 และ 55.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไอโซเลท ORR162 POL2 และ

ORP123 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอยู่ในระดับน้อยที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 50.00 48.34 และ 48.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) จากนั้นคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซิสต์เอ็นโดไฟต์ จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท ERY2 POL4 ORR107 และ ORR719 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ในระดับที่ดีมาก มาจำแนกสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซิสต์เอ็นโดไฟต์ ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.5 ชื่อพืชอาศัยของเชื้อแอคติโนมัยซิสต์เอ็นโดไฟต์ที่คัดเลือก จำนวน 20 ไอโซเลท

ไอโซเลท	พืชอาศัย	
	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์
ORR107	ข้าว กข 1	<i>Oryza sativa</i> L.
ORR162	ข้าว กข 1	<i>Oryza sativa</i> L.
ORR175	ข้าว กข 1	<i>Oryza sativa</i> L.
ORR719	ข้าว กข 7	<i>Oryza sativa</i> L.
ORR721	ข้าว กข 7	<i>Oryza sativa</i> L.
ORR728	ข้าว กข 7	<i>Oryza sativa</i> L.
ORR737	ข้าว กข 7	<i>Oryza sativa</i> L.
ORP119	ข้าว ปทุมธานี 1	<i>Oryza sativa</i> L.
ORP123	ข้าว ปทุมธานี 1	<i>Oryza sativa</i> L.
ORS110	ข้าว สุพรรณบุรี 1	<i>Oryza sativa</i> L.
CEN26	ผักแว่น	<i>Centella asiatica</i>
CINC1	การบูร	<i>Cinnamomum camphora</i> L.
COF1	กาแฟ	<i>Coffea arabica</i> L.
ERY2	ผักชีฝรั่ง	<i>Eryngium foetidum</i> L.
FRA19	สตรอว์เบอร์รี่	<i>Fragaria ananassa</i>
GAR1	กระเทียม	<i>Allium sativum</i>
POL2	ผักไผ่	<i>Polygonum odoratum</i> Lour.
POL4	ผักไผ่	<i>Polygonum odoratum</i> Lour.
PRE5	ตีปติ	<i>Piper retrofractum</i>
PRU2	นางพญาเสือ	<i>Prunus cerasoides</i>



ภาพที่ 4.5 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคไหม้ โดยวิธีการเลี้ยงร่วมกันกับเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 10 วัน

(ก) เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ไอโซเลทจากข้าว

(ข) เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ไอโซเลทจากพืชสมุนไพร

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว แอกลินไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลตต่าง ๆ ด้วยวิธีการ dual culture

ระดับการยับยั้ง ¹	ไอโซเลต	% เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ²
ดีมาก	ERY2	90.00 ^{A3}
	POL4	85.00 ^A
	ORR107	78.35 ^B
	ORR719	74.17 ^{BC}
ปานกลาง	ORP119	70.00 ^{CD}
	ORR721	69.17 ^{CDE}
	CEN26	65.84 ^{DEF}
	ORS110	65.00 ^{DEFG}
	PRU2	65.00 ^{DEFG}
	GAR1	64.17 ^{EFGH}
	ORR175	61.67 ^{FGHI}
น้อย	FRA19	60.00 ^{GHIJ}
	ORR728	60.00 ^{GHIJ}
	CINC1	59.17 ^{HIJ}
	PRE5	59.17 ^{HIJ}
	COF1	58.34 ^{IJ}
	ORR737	55.84 ^J
น้อยมาก	ORR162	50.00 ^K
	POL2	48.34 ^K
	ORP123	48.33 ^K
LSD _{0.05}		5.4181
CV (%)		5.95

¹ ดีมาก: 71.00-80.00 %, ปานกลาง: 61.00-70.00 %, น้อย: 51.00-60.00 %, น้อยมาก: น้อยกว่า 50.00 %

² ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

³ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญในระดับปานกลาง มีเพียงบางไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญสูงมาก และบางไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญที่น้อยมาก หรือไม่ยับยั้งการเจริญ อาจเป็นเพราะเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลท มีการผลิตสารปฏิชีวนะที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อราสาเหตุโรคที่แตกต่างกัน จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sardi *et al.* (1992) ที่รายงานว่า การผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์แต่ละชนิดนั้น สามารถผลิตสารทุติยภูมิจำพวกสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีผลต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับรายงานของ Zarandi *et al.* (2009) ที่สามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในกลุ่มของ *Streptomyces* spp. ได้จากดิน และเมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* พบว่า เชื้อ *Streptomyces* แต่ละไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ที่แตกต่างกัน

4.5 การจำแนกสกุลของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

จากการนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ จำนวน 4 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ในระดับที่ดีมาก มาจำแนกสกุลของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ โดยศึกษาลักษณะเส้นใย การสร้างสปอร์ของเชื้อ และการเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า (Miyadoh *et al.*, 1997; Stanley *et al.*, 1989) และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนบริเวณ 16S rRNA พบว่า ดีเอ็นเอของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ มีขนาดประมาณ 1,500 bp และจากการส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล Biocloud Database สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อในสกุลสเตรปโตมัยซีส (*Streptomyces*) ได้ทั้ง 4 ไอโซเลท จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ด้วยโปรแกรม BioEdit และ MEGA 5.0 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ ด้วยวิธี neighbor-joining ที่ Bootstrap = 1,000 ครั้ง

เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนหรือความต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่ละไอโซเลทพบว่า มีสีของโคโลนี การเจริญของโคโลนี ลักษณะโคโลนี การสร้างรงควัตถุ และรูปแบบการการเรียงตัวของสปอร์ (spore chains) ที่แตกต่างกัน ซึ่งได้แก่ การเรียงตัวของสปอร์แบบ Rectiflexibiles type คือการเรียงตัวของสปอร์ที่ต่อกันเป็นเส้นตรงหรือโค้งเล็กน้อย แบบ Retinaculiaperti type คือ การเรียงตัวของสปอร์บริเวณปลายเส้นสาย ม้วนงอเป็นวงคล้ายตะขอ ประมาณ 2-3 รอบ และแบบ Spira type คือ การเรียงตัวของสปอร์ที่มีบริเวณปลายเส้นสายของสปอร์บิดเป็นเกลียว (Miyadoh *et al.*, 1997;

Stanley *et al.*, 1989) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Shimizu *et al.* (2000) ฉัตรสุดา (2551) ศิริมาศ (2556) และชัยพร (2557) โดยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลท มีลักษณะดังนี้

เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท ORR107 มีลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 มีสี pale beige (เลขสี 84) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ streak ลักษณะโคโลนีสายผงแป้ง ขอบโคโลนีหนา มีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยสีขาว ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ โคโลนีใต้ผิวหน้าอาหารมีสี soft reddish yellow (เลขสี 146) เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ประมาณ 20 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์เป็นแบบ Retinaculiaperti type บริเวณปลายเส้นสายของสปอร์มีวนเป็นวงคล้ายตะขอ (ภาพที่ 4.6) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของไอโซเลท ORR107 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Biocloud Database พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้เคียงกับเชื้อ *S. albus* NBRC 13014 โดยมีความเหมือน 98.18% และ เชื้อ *S. leeuwenhoekii* C34/AJ621602 โดยมีความเหมือน 98.11% (ภาพที่ 4.7)



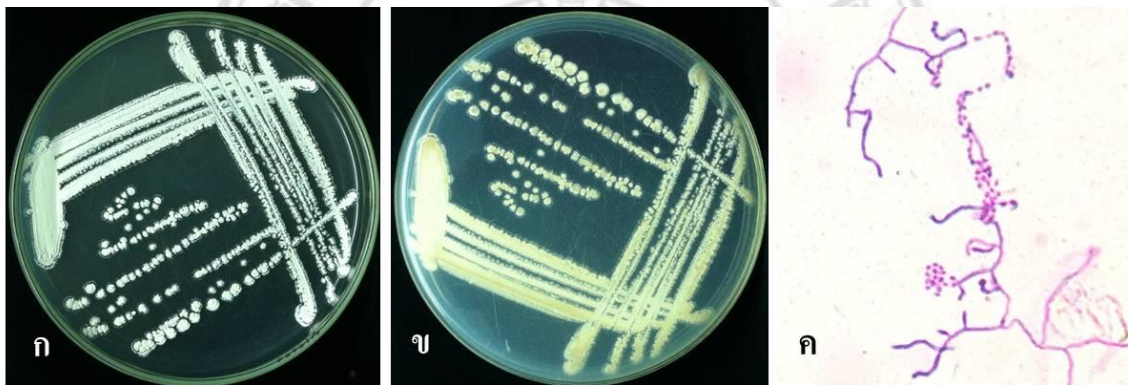
ภาพที่ 4.6 ลักษณะเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท ORR107
(ก) ลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 14 วัน
(ข) ลักษณะโคโลนีใต้ผิวหน้าอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 14 วัน
(ค) การเรียงตัวของสปอร์แบบ Retinaculiaperti type ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า



ภาพที่ 4.7 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอ็นโดไฟต์ ไอโซเลท ORR107 ด้วยวิธี neighbor-joining

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ ไอโซเลท ORR719 มีลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 มีสี beige white (392) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ streak ลักษณะโคโลนีคล้ายผงแป้ง ขอบโคโลนีหนา มีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา ไม่สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ โคโลนีใต้ผิวหน้าอาหารมีสี soft reddish yellow (เลขสี 146) เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ประมาณ 20 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์เป็นแบบ Spira type ที่สายของสปอร์ เรียงต่อกันเป็นเส้นตรง โค้งเล็กน้อย และบิดเป็นเกลียว (ภาพที่ 4.8) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของไอโซเลท ORR719 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Biocloud Database พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้เคียงกับเชื้อ *S. albus* NBRC 13014 โดยมีความเหมือน 97.75% และ เชื้อ *S. leeuwenhoekii* C34/AJ621602 โดยมีความเหมือน 97.74% (ภาพที่ 4.9)



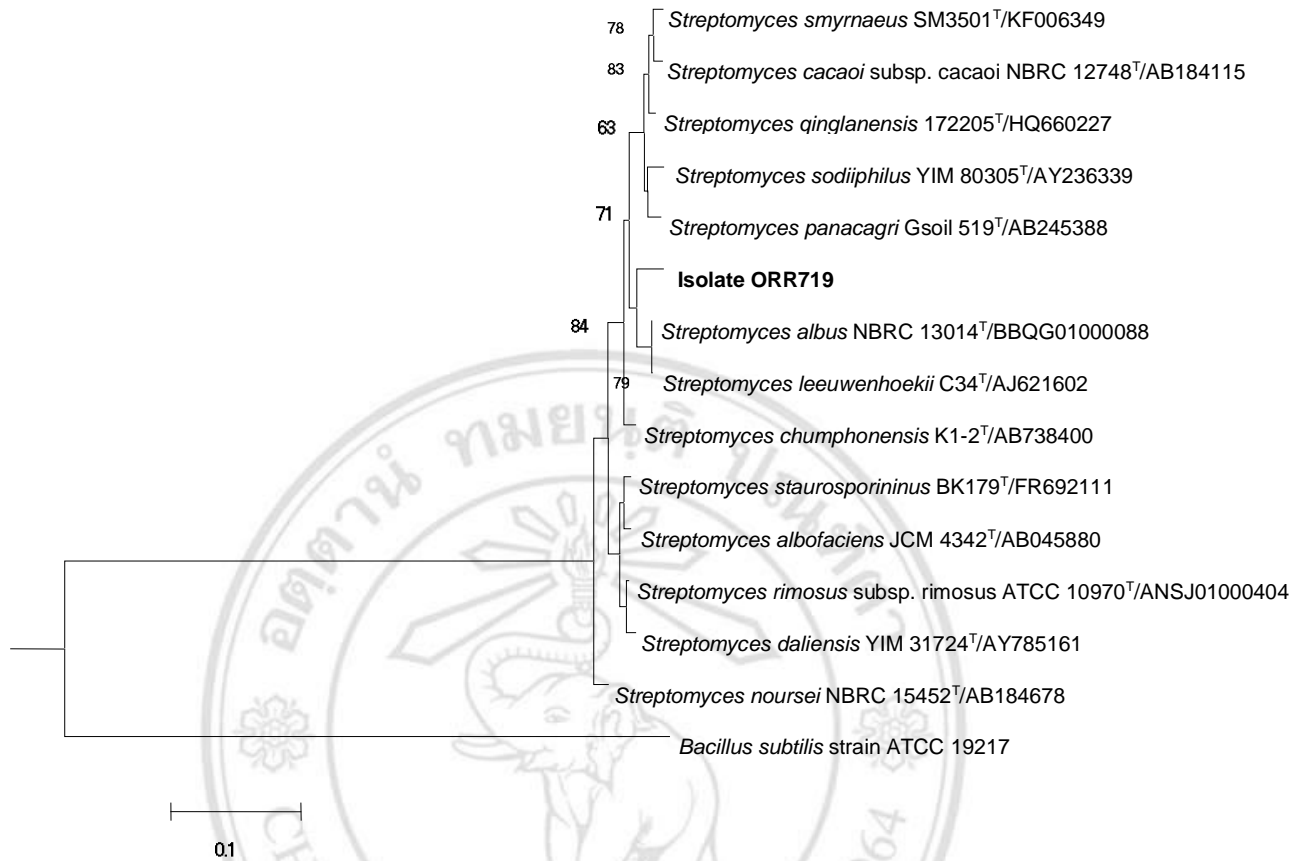
ภาพที่ 4.8 ลักษณะเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ ไอโซเลท ORR719

(ก) ลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะโคโลนีใต้ผิวหน้าอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 14 วัน

(ค) การเรียงตัวของสปอร์แบบ Spiral type ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.9 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลต ORR719 ด้วยวิธี neighbor-joining

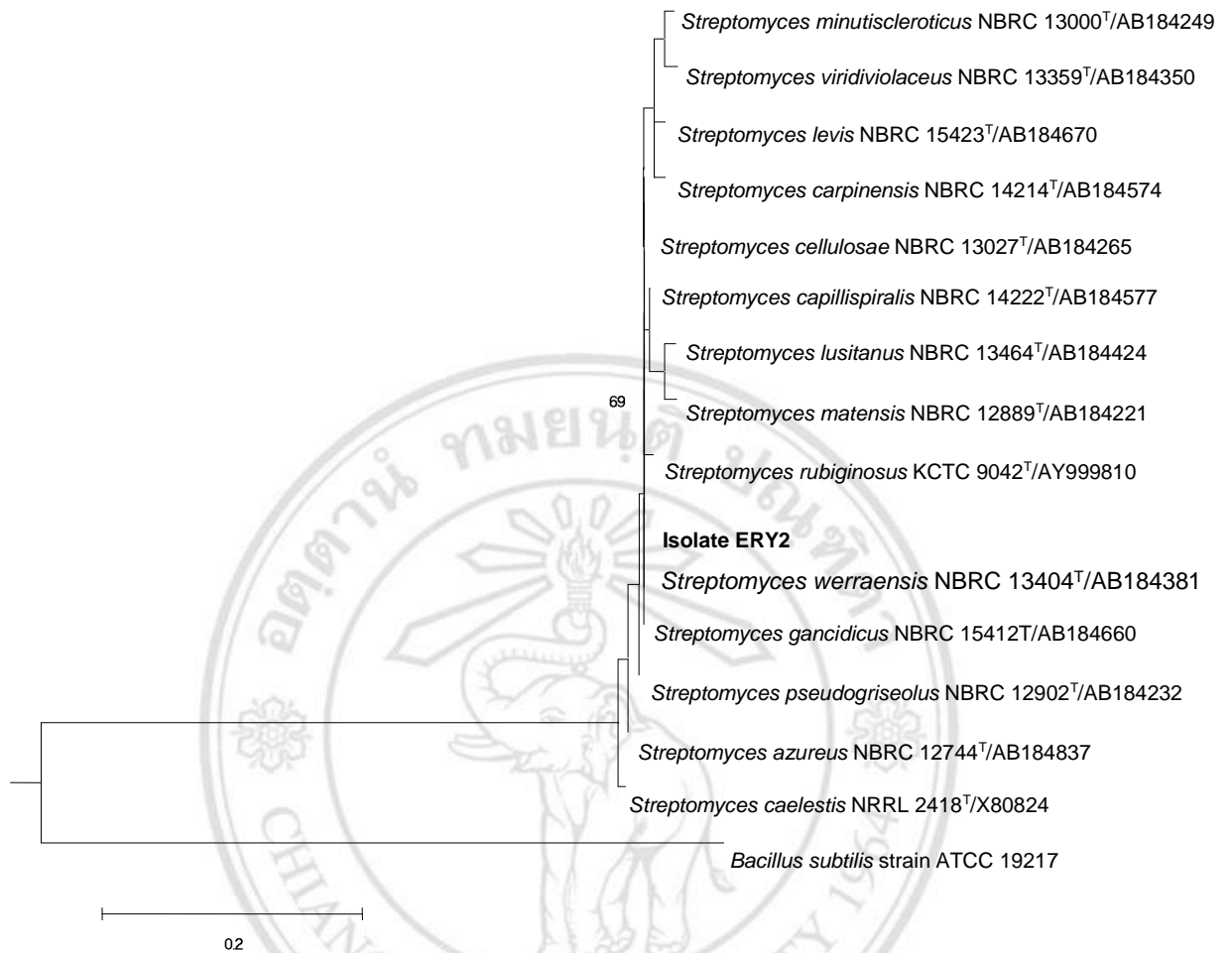
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท ERY2 มีลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 มีสี brownish gray (เลขที่ 409) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ streak ลักษณะโคโลนีคล้ายผงแป้ง ขอบโคโลนีหน้ามีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี soft yellow (เลขที่ 147) โคโลนีใต้ผิวหน้าอาหารมีสี grayish brown (เลขที่ 119) เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ประมาณ 20 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์เป็นแบบ Rectiflexibiles type เรียงต่อกันเป็นเส้นตรงและโค้งเล็กน้อย และแบบ Retinaculiaperti type บริเวณปลายเส้นสายของสปอร์ม้วนเป็นวงคล้ายตะขอ (ภาพที่ 4.10) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของไอโซเลท ERY2 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Biocloud Database พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้เคียงกับเชื้อ *S. werraensis* NBRC 13404 โดยมีความเหมือน 100% และเชื้อ *S. gancidicus* NBRC 15412 โดยมีความเหมือน 100% (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.10 ลักษณะเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท ERY2

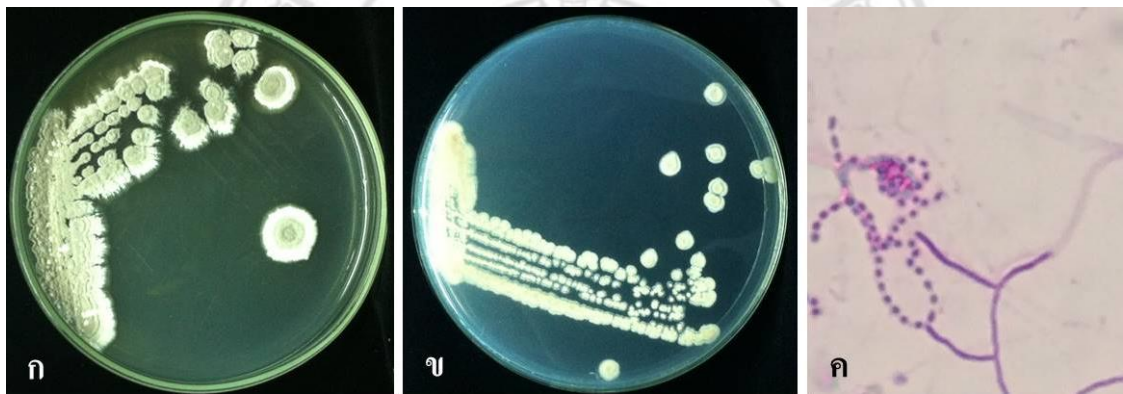
- (ก) ลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีใต้ผิวหน้าอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 14 วัน
- (ค) การเรียงตัวของสปอร์แบบ Rectiflexibiles type และ Retinaculiaperti type ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า



ภาพที่ 4.11 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท ERY2 ด้วยวิธี neighbor-joining

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

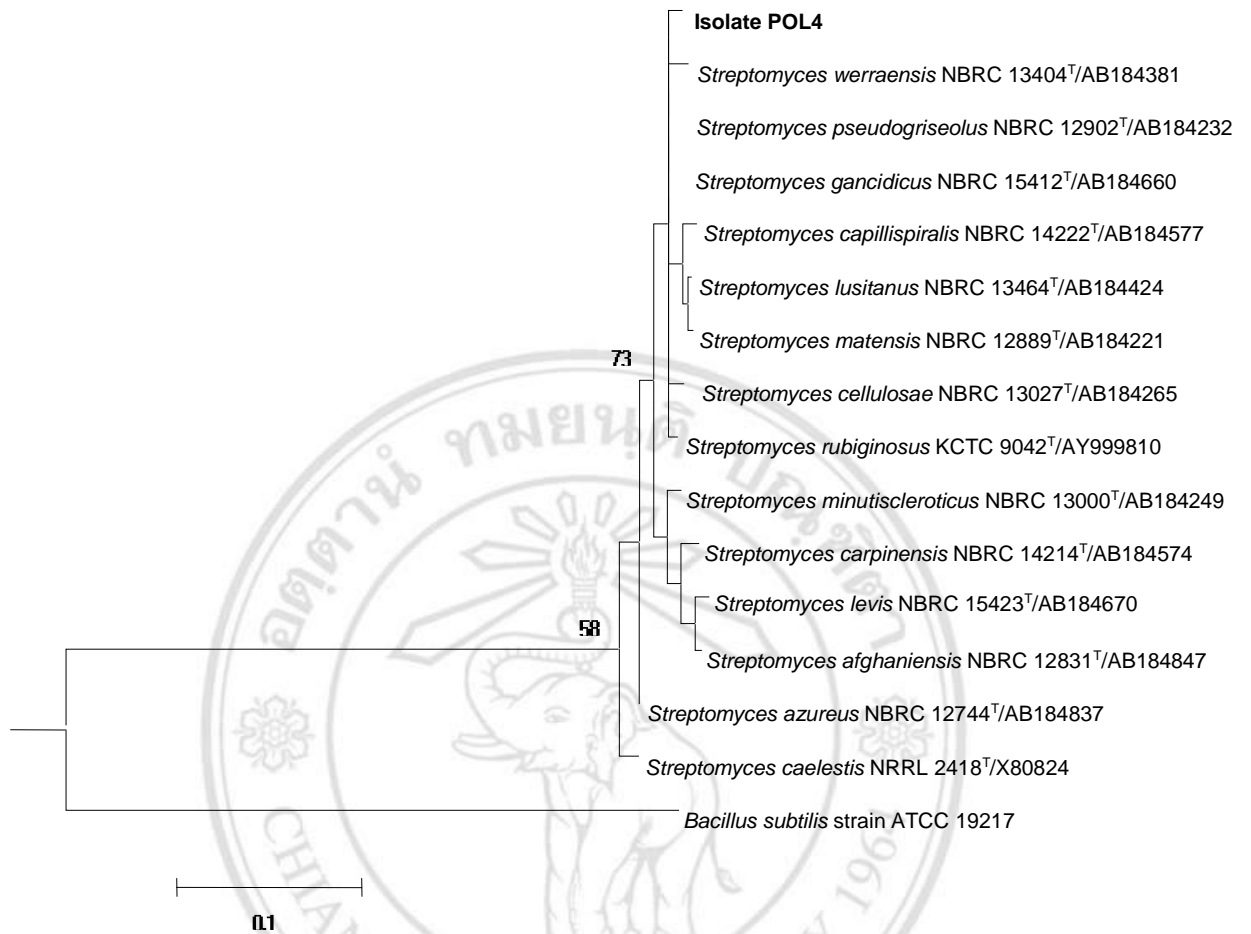
เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ ไอโซเลท POL4 มีลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 มีสี purplish gray (414) เจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ streak ลักษณะโคโลนีคล้ายผงแป้ง ขอบโคโลนีหนา มีลักษณะเป็นเส้นคล้ายเส้นใยเชื้อรา สร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำสี light yellow (133) โคโลนีใต้ผิวหน้าอาหารมีสี dark brownish gray (419) เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายลูกโซ่ประมาณ 20 สปอร์ขึ้นไป ลักษณะเส้นสายของสปอร์เป็นแบบ Rectiflexibiles type เรียงต่อกันเป็นเส้นตรงและโค้งเล็กน้อย (ภาพที่ 4.12) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของไอโซเลท POL4 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Biocloud Database พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้เคียงกับเชื้อ *S. pseudogriseolus* NBRC 12902 โดยมีความเหมือน 99.93% และ เชื้อ *S. gancidicus* NBRC 15412 โดยมีความเหมือน 99.93% (ภาพที่ 4.13)



ภาพที่ 4.12 ลักษณะเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ไอโซเลท POL4

- (ก) ลักษณะโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะโคโลนีใต้ผิวหน้าอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 14 วัน
- (ค) การเรียงตัวของสปอร์แบบ Rectiflexibiles type ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.13 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท POL4 ด้วยวิธี neighbor-joining

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

การจัดจำแนกสกุลของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่า มีการเรียงตัวของสปอร์ 3 แบบ ได้แก่ แบบ Rectiflexibiles type คือ เรียงต่อกันเป็นเส้นตรงและโค้งเล็กน้อย แบบ Retinaculiaperti type คือ บริเวณปลายเส้นสายของสปอร์ม้วนเป็นวงคล้ายตะขอ และแบบ Spira type คือ บริเวณปลายเส้นสายของสปอร์บิดเป็นเกลียว ซึ่งเป็นลักษณะการเรียงตัวของสปอร์ของเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* ตามการจัดจำแนกของ Pridham *et al.* (1958) และจากการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในฐานข้อมูลที่มีการรายงานไว้ โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อบริเวณ 16S rRNA พบว่า ทุกไอโซเลทมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับเชื้อแอกติโนไมซีสต์ในสกุล *Streptomyces* ซึ่งจากผลการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sardi (1992), Cao *et al.* (2005), Verma *et al.* (2009) และ Zhao *et al.* (2011) ที่พบว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* เช่นกัน

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ในการควบคุมการเกิดโรคไหม้ของข้าวในระดับโรงเรือน

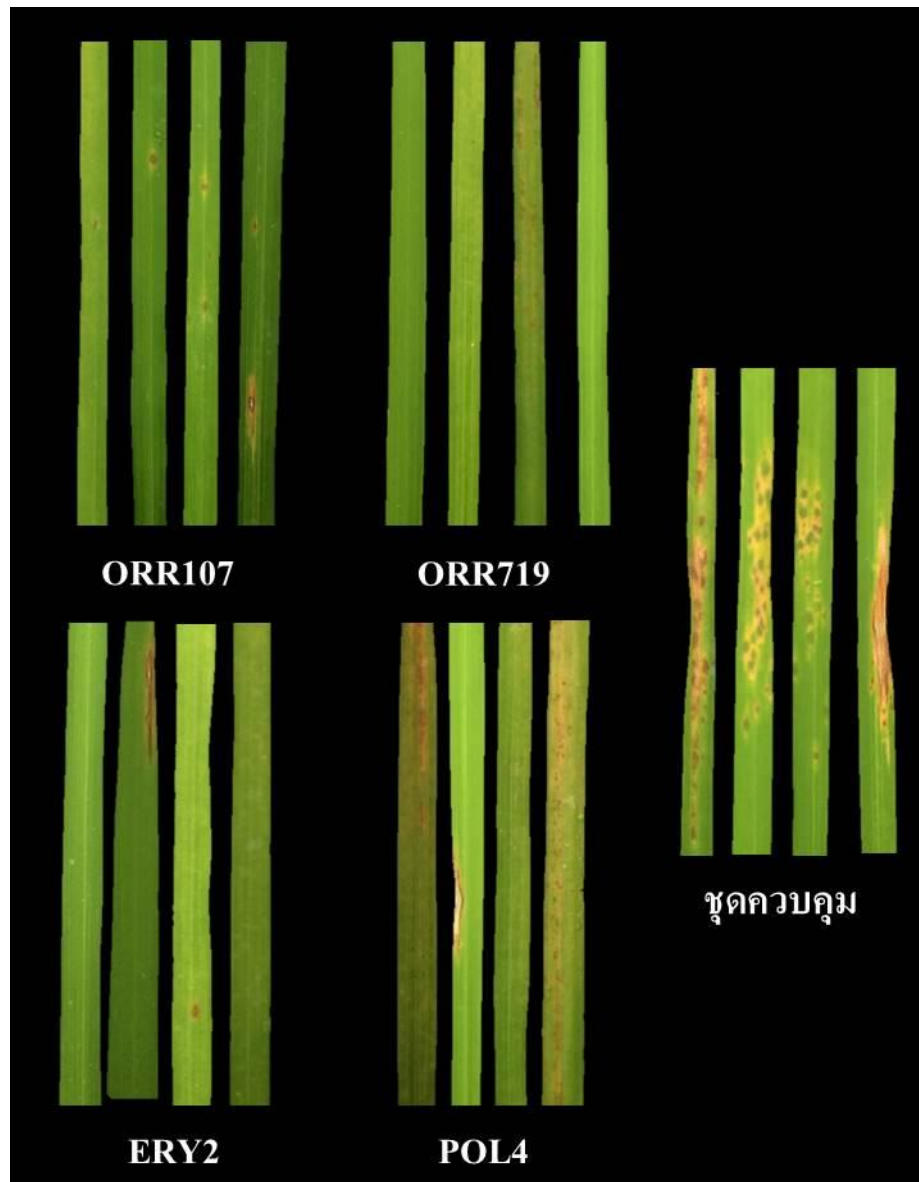
การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว โดยวิธีการแช่เมล็ดข้าวในสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ERY2 POL4 ORR107 และ ORR719 เมื่อปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ บนต้นกล้าข้าวที่อายุ 14 วัน และประเมินโรคหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน พบว่า ต้นกล้าข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลท มีระดับความรุนแรงในการเกิดโรค ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เฉลี่ยเท่ากับ 1.07 1.47 1.47 และ 1.20 ตามลำดับ แต่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว ที่มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงเท่ากับ 4.73 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ยเท่ากับ 77.38 68.90 68.90 และ 74.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7 และ ภาพที่ 4.14)

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การลดลงของระดับความรุนแรงของโรคไหม้ ของต้นกล้าข้าวที่ผ่านการแช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ เอนโดไฟต์ 4 ไอโซเลท (ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml) และปลุกเชื้อรา *Pyricularia grisea* (ความเข้มข้น 10^5 cfu/ml) สาเหตุโรคไหม้ บนต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค	เปอร์เซ็นต์การลดลงของโรคที่ลดลง (%) ²
ORR107	1.47 ^{B1}	68.90
ORR719	1.20 ^B	74.60
ERY2	1.07 ^B	77.38
POL4	1.47 ^B	68.90
ชุดควบคุม	4.73 ^A	0.00
LSD _{0.05}	0.6775	
CV (%)	18.74	

¹ ค่าที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

² เปอร์เซ็นต์การลดลงของความรุนแรงของโรคเมื่อเทียบกับชุดควบคุม



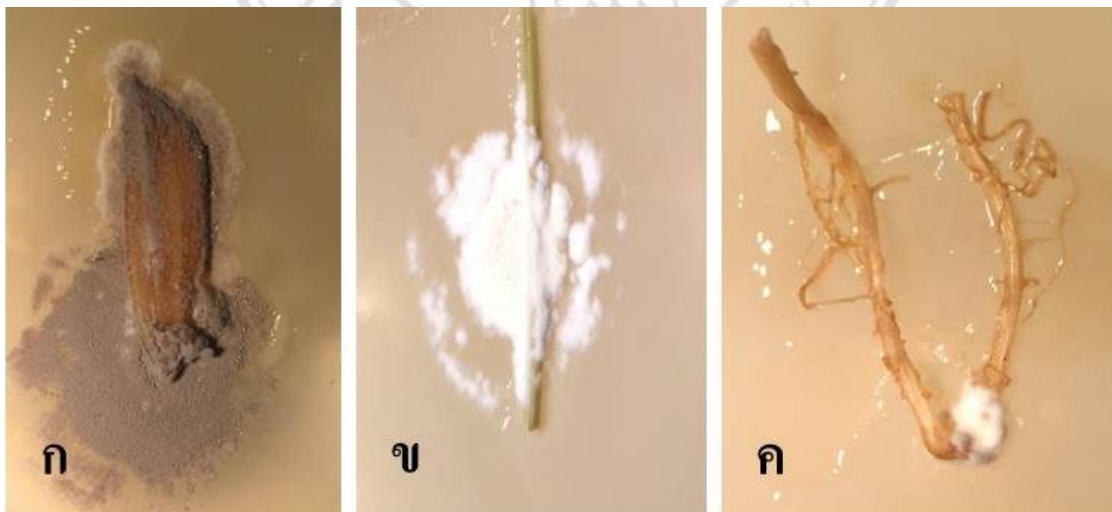
ภาพที่ 4.14 ลักษณะอาการใหม่ของใบกล้าข้าวอายุ 21 วัน หลังแช่เมล็ดข้าวด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ เอนโดไฟต์ (ความเข้มข้น 10^9 cfu/ml) ไอโซเลท ERY2 POL4 ORR107 และ ORR719 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังปลูกเชื้อรา *Pyricularia grisea* (ความเข้มข้น 10^5 cfu/ml) สาเหตุโรคไหม้ บนต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* สาเหตุโรคไหม้ ในระดับห้องปฏิบัติการ สามารถควบคุมโรคไหม้ของข้าวในสภาพโรงเรือนได้ ทั้ง 4 ไอโซเลท โดยเฉพาะ ไอโซเลท ERY2 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ดีที่สุด อาจเนื่องจากเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถผลิตสารทุติยภูมิจำพวกสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungal) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค และเพิ่มความต้านทานต่อการเกิดโรคให้กับพืช ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jonete *et al.* (2000), Shimizu *et al.* (2001), Cao *et al.* (2004) และ El-Tarabily *et al.* (2009) นอกจากนี้ Hasegawa *et al.* (2006) รายงานว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์สามารถสร้างไฟโตฮอร์โมน (phytohormone) ช่วยให้พืชทนต่อการเกิดโรค (disease resistance) และสามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้อีกด้วย จึงอาจทำให้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ สามารถเข้าอาศัย (colonization) ในต้นกล้าข้าว หลังการแช่เมล็ดข้าวด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ และชักนำให้ต้นกล้าข้าวเกิดความต้านทานต่อโรคไหม้เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ นัตรสุดา (2551) ที่สามารถควบคุมโรคเน่าคอดินของพืชกลุ่มผักกาดได้ หลังจากคลุกเมล็ดด้วยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ อีกทั้งรายงานของศิริมาศ (2556) ที่สามารถชักนำให้ต้นกล้าสตรอว์เบอร์รี่เกิดการต้านทานโรคทางใบในสตรอว์เบอร์รี่ภายหลังปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร และพืชวงศ์กุหลาบลงบนต้นกล้า และรายงานของ ชัยพร (2557) ที่สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าของผลลำไยได้ในระดับห้องปฏิบัติการ หลังจากพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ลงบนผลลำไย

4.7 การศึกษาความสามารถในการเข้าอาศัยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในข้าว

จากการทดสอบการเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อของข้าว ด้วยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท ERY2 POL4 ORR107 และ ORR719 โดยวิธีแยกเชื้อกลับจากใบ ลำต้น ราก และเปลือกเมล็ดของข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ พบว่า เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าวได้ นอกจากนี้ การเจริญของเชื้อจากบริเวณรอยตัดของชิ้นพืชส่วนใบ ลำต้น ราก และเปลือกเมล็ดข้าว หลังจากบ่มไว้ในที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน (ภาพที่ 4.15) พบว่า ไอโซเลท ORR107 มีแนวโน้มการแยกเชื้อกลับเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อ ที่ 1, 3, 5, 7 และ 14 วัน เท่ากับ 40.00, 63.33, 76.67, 80.00 และ 90.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ ไอโซเลท ERY2 และ ORR719 ส่วน ไอโซเลท POL4 มีการแยกเชื้อกลับได้เปอร์เซ็นต์น้อยที่สุด เท่ากับ 16.67 16.67 20.00 46.67 และ 26.67 หลังการปลูกเชื้อ ที่ 1, 3, 5, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่ได้จากการแยกเชื้อกลับจากต้นกล้าข้าว หลังจากรับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลท พบว่า มีลักษณะ โคลโลนิ

สีโคโลนี การสร้างรงควัตถุ และรูปแบบการเรียงตัวของสปอร์เหมือนกัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ทั้ง 4 ไอโซเลท อาจเป็นเชื้อไอโซเลทเดียวกัน และอาจเป็นข้อพิสูจน์เบื้องต้นว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่แยกได้จากข้าว สามารถเข้าอาศัยกลับพืชเดิมได้ และสามารถสร้างสารทุติยภูมิจำพวกสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค และเพิ่มความต้านทานต่อการเกิดโรคให้กับพืชได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shimizu *et al.* (2000) ที่แยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์จากพืช *Rhododendron* แล้วสามารถปลูกเชื้อกลับเข้าอาศัยในพืชอาศัยเดิมได้ และสอดคล้องกับการทดลองของ Meguro *et al.* (2004) ที่รายงานว่า *Streptomyces padanus* AOK-30 ซึ่งแยกได้จากต้น Mountain Laurel (*Kalmia latifolia* L.) สามารถเข้าอาศัย (colonize) ภายในต้น Mountain Laurel และสามารถป้องกันต้นกล้าจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pestalotiopsis sydowiana* ได้ และเมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่แยกเชื้อกลับในแต่ละช่วงเวลา 1 3 5 7 และ 14 วัน หลังปลูกเชื้อ พบว่า ไอโซเลท ORR107 มีแนวโน้มการแยกเชื้อกลับเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อ เนื่องจากเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์เป็นเชื้อแบคทีเรีย สามารถแบ่งตัวได้รวดเร็ว ส่งผลให้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์เพิ่มปริมาณในต้นพืชได้มากขึ้นเรื่อย ๆ สอดคล้องกับรายงานของ Meguro *et al.* (2004) ที่สามารถแยกเชื้อกลับ หลังจากการปลูกเชื้อ *Streptomyces padanus* AOK-30 บนพืช Mountain Laurel ได้ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นแปรตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อ



ภาพที่ 4.15 ลักษณะการเจริญของเชื้อออกมาจากบริเวณรอยตัดของชิ้นพืชหลังจากปลูกเชื้อด้วยวิธีการแช่เมล็ดแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน
 (ก) เปลือกเมล็ดข้าว
 (ข) ลำต้น
 (ค) ราก

ตารางที่ 4.8 จำนวนและเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ 4 ไอโซเลท จากส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าข้าว หลังปลูกเชื้อด้วยวิธีการแช่เมล็ดแล้วปลูกข้าวเป็น เวลานาน 30 วัน

ไอโซเลท	หลังการ ปลูกเชื้อ (วัน)	จำนวนเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์			รวม (%) ²
		ใบลำต้น	ราก	เปลือกเมล็ด	
ORR107	1	1 ¹	2	9	12 (40.00)
	3	4	5	10	19 (63.33)
	5	7	8	8	23 (76.67)
	7	5	10	9	24 (80.00)
	14	9	9	9	27 (90.00)
ORR719	1	2	4	10	16 (53.33)
	3	6	9	10	25 (83.33)
	5	9	10	10	29 (96.67)
	7	8	6	10	24 (80.00)
	14	7	8	9	24 (80.00)
ERY2	1	8	6	10	24 (80.00)
	3	9	10	9	28 (93.33)
	5	10	10	10	30 (100.00)
	7	9	6	9	24 (80.00)
	14	10	10	10	30 (100.00)
POL4	1	0	2	3	5 (16.67)
	3	2	1	2	5 (16.67)
	5	0	3	3	6 (20.00)
	7	5	2	7	14 (46.67)
	14	1	0	7	8 (26.67)

¹ เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์กับชิ้นส่วนของพืชแต่ละส่วน จำนวน 10 ชิ้นส่วน

² เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลทของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์กับชิ้นส่วนของพืชแต่ละ ไอโซเลท จำนวน 30 ชิ้นส่วน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากข้าว จำนวน 4 สายพันธุ์ พบเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ 174 ไอโซเลท โดยสามารถแยกได้จากส่วนใบมากที่สุด จำนวน 139 ไอโซเลท และส่วนรากน้อยที่สุด จำนวน 35 ไอโซเลท หากแยกตามสายพันธุ์ข้าวที่แยกเชื้อ ข้าวสายพันธุ์ กข 1 แยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ได้มากที่สุด จำนวน 75 ไอโซเลท รองลงมาคือ กข 7 สุพรรณบุรี 1 และปทุมธานี 1 จำนวน 42, 34 และ 23 ไอโซเลท ตามลำดับ และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าว จำนวน 174 ไอโซเลท พบว่า เชื้อมีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันทั้งลักษณะสีของโคโลนี รูปแบบการสร้างโคโลนี การสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้

การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่สร้าง aerial mycelium ได้รวดเร็วที่สุดภายใน 1 วัน และเจริญเต็มจานอาหารภายใน 3 วัน จำนวน 10 ไอโซเลท และจากพืชสมุนไพร จำนวน 10 ไอโซเลท ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ พบเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งในระดับสูงที่สุด จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ERY2 POL4 ORR107 และ ORR719 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 90.00 85.00 78.35 และ 74.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และศึกษาลักษณะการสร้างและการเรียงตัวของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* และจากการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลทคัดเลือกโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนบริเวณ 16sRNA พบว่า ไอโซเลท ORR107 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *S. albus* NBRC 13014 (98.18%) ไอโซเลท ORR719 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *S. albus* NBRC 13014 (97.75%) ไอโซเลท ERY2 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *S. werraensis* NBRC 13404 (100%) *S. gancidicus* NBRC 15412 (100%) และ *S. pseudogriseolus* NBRC 12902 (100%) และ ไอโซเลท POL4 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *S. pseudogriseolus* NBRC 12902 (99.93%) และ *S. gancidicus* NBRC 15412 (99.93%)

การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว โดยวิธีการแช่เมล็ดข้าวในสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ที่คัดเลือกได้ พบว่า ต้นข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ไอโซเลท ERY2 POL4 ORR107 และ ORR719 มีระดับความรุนแรงในการเกิดโรค ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เฉลี่ยเท่ากับ 1.07 1.47 1.47 และ 1.20 ตามลำดับ แต่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว ที่มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงเท่ากับ 4.73

การทดสอบการเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าว ด้วยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ไอโซเลท ERY2 POL4 ORR107 และ ORR719 โดยวิธีแยกเชื้อกลับจากใบลำต้น ราก และเปลือกเมล็ดของข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ พบว่า เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าวได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับอยู่ในช่วง 17-100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น ไอโซเลท ORR107 สามารถเพิ่มปริมาณในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อ

จากการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ไอโซเลท ORR107 ที่แยกได้จากข้าว กข 1 ไอโซเลท ORR719 ที่แยกได้จากข้าว กข 7 ไอโซเลท ERY2 ที่แยกได้จากฝักชิฝรั่ง และ ไอโซเลท POL4 ที่แยกได้จากฝักไผ่ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและควบคุมโรคไหม้ของเชื้อรา *P. grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว และสามารถนำมาประยุกต์เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการปลูกข้าวแบบอินทรีย์ หรือแบบผสมผสานได้ โดยหากเกษตรกรแช่เมล็ดข้าวด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ เป็นเวลา 1 วันก่อนปลูก จะสามารถทำให้ต้นกล้าข้าวที่เจริญออกมามีความแข็งแรงและทนทานต่อโรคไหม้ได้ดีในระดับหนึ่ง ซึ่งถือว่าเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรอย่างมากในการลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช อีกทั้งยังทำให้เกษตรกรลดต้นทุนและมีสุขภาพที่ดีอีกด้วย และเหมาะสมต่อการศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป ดังนั้นการใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี และใช้เป็นปัจจัยหนึ่งในการผลิตข้าวแบบอินทรีย์เพื่อการส่งออกต่อไป

สำหรับข้อเสนอแนะในการประยุกต์ใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์จากข้าวในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว ควรทำการปลูกเชื้อตั้งแต่ขั้นตอนการแช่เมล็ด เนื่องจากในระยะต้นกล้าเป็นระยะที่สำคัญที่สุดในการเพาะปลูก หากต้นกล้าไม่แข็งแรง มีการปนเปื้อนหรือเข้าทำลายของโรค จะทำให้ต้นกล้าอ่อนแอ เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายได้ง่ายหรืออาจจะทำให้ต้นกล้าตายก่อนที่จะย้ายไปปักดำ ส่วนในระยะอื่น ๆ ของข้าว อาจพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโคไฟต์ได้เช่นเดียวกับการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา แต่อาจพ่นบ่อยกว่าการใช้สารเคมี ซึ่งจากการทดลองพบว่าสามารถลดการเกิดโรคไหม้ของข้าวได้

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2559. รายงานสถานการณ์การระบาดของแมลงศัตรูข้าว. (ระบบออนไลน์).
แหล่งข้อมูล: http://www.ppsf.doae.go.th/the_pest_outbreak/report_pest_2560/Report_pest_infestations_rbph.html (28 มกราคม 2560).
- เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการอาหาร สถาบัน เทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 326 หน้า.
- นัทรสุดา เพือกใจแก้ว. 2551. ประสิทธิภาพของเชื้อสเตรปโตมัยซีสเอน โคไฟท์จากพืชสมุนไพรในการควบคุมโรคเน่าคอดินของกลุ่มผักกาด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 100 หน้า.
- ชัชวาล จันทราสุริยรัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2552. โรคไหม้ใน ข้าวและสถานการณ์ปัจจุบันของงานวิจัยด้านยีนต้านทาน โรคไหม้ในข้าว. เกษตร 37: 69-78.
- ชัยพร ชัดสงคราม. 2557. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอน โคไฟท์เพื่อควบคุมโรคผลเน่าของลำไย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 80 หน้า.
- ทรงเชาว์ อินสมพันธ์. 2545. พืชไร่สำคัญของประเทศไทย. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 64 หน้า.
- นวรรตน์ ใจหอม และนงลักษณ์ เกรินทองค์. 2557. เอกสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 วันที่ 4-7 กุมภาพันธ์ 2557: สาขาพืช เรื่อง “การประเมินความหลากหลายและการจัดกลุ่มความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวที่เก็บรวบรวมในประเทศไทย”. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 8 หน้า.
- นันทนา จันทร์แก้ว. 2549. จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรและการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางโมเลกุล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีศาสตร์). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 117 หน้า.

- บัญญัติ สมยะ. 2527. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับโรคใบไหม้ของข้าวไร่. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 44 หน้า.
- บุญหงส์ จงคิด. 2553. ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิต คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี. 184 หน้า.
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ วราพงษ์ ชมาฤกษ์ จิรพงศ์ ใจรินทร์ อุไรวรรณ คชสถิต อนุชาติ คชสถิตย์ บุญรัตน์ จงดี สมใจ สาลีโท วีระศักดิ์ หอมสมบัติ อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และพนัสนิภา ยาใจ. 2554. ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้กับการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้ หน้า 249-266. ในการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว เนื่องในโอกาสวันข้าวและชาวนาแห่งชาติ ครั้งที่ 2 วันที่ 3-4 มิถุนายน 2554. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- วันวิสาข์ เฟ่งพีก. 2546. การคัดเลือกแอคติโนไมซีทเอนโดไฟต์ในข้าวเพื่อควบคุมโรคใบไหม้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 81 หน้า.
- ศรีสวัสดิ์ ชันทอง, ชัชวาล จันทราสุริยรัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2553. โรคไหม้และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้โดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. Thai Journal of Genetics 3(2): 106-119.
- ศิริมาศ ชัยชม. 2556. การใช้เชื้อแอคติโนไมซีตเอนโดไฟต์และเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชักนำให้เกิดความต้านทานโรคทางใบในสตรอว์เบอร์รี่. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 82 หน้า.
- ศิริมาศ ชัยชม และ เกวลิน คุณาศักดากุล. 2557. การใช้เชื้อแอคติโนไมซีตเอนโดไฟต์ชักนำให้เกิดความต้านทานโรคทางใบของสตรอว์เบอร์รี่ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารเกษตร 30(2): 141-150.
- สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2559. สถิติการส่งออกข้าว ปี 2559. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.thairiceexporters.or.th/default_th.htm (28 มกราคม 2560).
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. เศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้า ปี 2558. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <http://www.oae.go.th/economiccon.html> (25 ตุลาคม 2559).

- Araujo, J.M. de, A.C. da Silva and J.L. Azevedo. 2000. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 43: 447- 451.
- Bailey, B. A., H. Bae, M.D. Strem, D.P. Roberts, S.E. Thomas, J. Crozier, G.J. Samuels, L.Y. Choi and K. A. 2006. Holmes: Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224 : 1449-1464.
- Benhamou, N. and J. W. Kloepper. 1998. Tszun: Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* 204 : 153-168.
- Boudjella, H., K. Bouti, A. Zitouni, F. Mathieu, A. Lebrihi and N. Sabaou. 2006. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of Streptosprangium Sg 10 isolates from a Saharan soil. *Microbiological Research* 161: 288-298.
- Burks, C. 1997. Molecular Biology Databases *In* Richwood, D. and B. D. Hames, B. D. (eds.). DNA and Protein Sequence Analysis. Oxford University Press, Oxford. pp. 1 -30.
- Cao, L., Z. Qiu, J. You, H. Tan and S. Zhou. 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Letters in Applied Microbiology* (39): 425 - 430.
- Cao, L., Z. Qiu, J. You, H. Tan, and S. Zhou. 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiology Letters* 247: 147 - 152.
- Chater K.F. 2006. Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Science* 361(1469): 761–768.
- Disthaporn, S. 1994. Current rice blast epidemics and their management in Thailand. pp. 333-442. *In*: R.S. Zeigler, S.A. Leong, and P.S. Teng (eds) Rice Blast Disease. CAB Int., Wallingford, U.K.

- El-Tarabily, K.A., A.H. Nassar, G.E.S.J. Hardy and K. Sivasithamparam. 2009. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology* 106: 13 - 26.
- Flardh, K., E. Leibovitz, M.J. Buttner and K.F. Chater. 2000. Generation of a non-sporulating strain of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by the manipulation of a developmentally controlled *ftsZ* promoter. *Molecular Microbiology* 38: 737-749.
- Franco, C. 2002. The role of actinomycetes in plant growth and development. (Online). Available: http://www.bio.flinders.edu.au/biotech/staff/cmmf_res.htm. (29 September 2016).
- Gyllensten, B., M. Allen and A. Josefsson. 1992. Sequencing of in vitro amplified DNA. pp.1-15. *In* Ellingboe, J. (ed.). *The PCR technique: DNA sequencing*. Eaton Publishing Co., London.
- Hasegawa, S., A. Meguro, M. Shimizu, T. Nishimura and H. Kunoh. 2006. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetologica* 20: 72–81.
- Igarashi, Y., T. Iida, R. Yoshida and T. Furumai. 2002. Pteridic acids A and B , novel plant growth promote with auxin-like activity from *Streptomyces hygrosopicus* TP-A0451. *Journal of Antibiotic* 55: 764-767.
- Kalakoutskii, L.V. and N. Agre. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological Review* 40(2): 469-524.
- Jonete, M., A. C. Silva and J. L. Azevedo. 2000. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Arquivos de Biologia E Tecnologia* 28(6): 303 - 310.
- Lahdenpera, M.L. 2000. How Mycostop® acts in the control of fungal plant diseases. Info letter (Online). Available: <http://www.yankeegrower.uconn.edu/2002.doc.pdf> (29 September 2016).
- Lechevalier, H.A. 1968. Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance. *Journal of Laboratory Clinic of Medicine* 71: 934 - 944.
- Lee, C.H., B.J. Kim, G.J. Choi, K.Y. Cho, H. Yang, C. Shin, S. Min and Y. Lim. 2002. *Streptomyces* with antifungal activity against rice blast causing fungus, *Magnaporthe grisea*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 12(6): 1026–1028.

- Meguro, A., S. Hasegawa, M. Shimizu, T. Nishimura and H. Kunoh. 2004. Induction of disease resistance in tissue-cultured seedlings of mountain laurel after treatment with *Streptomyces padanus* AOK-30. *Actinomycetologica* 18(2): 48-53.
- Miyadoh, S., M. Hamada, K. Hotta, T. Kudo, A. Seino, G. Vobis and A. Yokpya. 1997. Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan. 233 p.
- Manual of Color Name. 1987. Japan Color Enterprise Co., Ltd., Tokyo.
- Ou, S.H. 1973. Breeding Plants for Disease Resistance Concepts and Applications. The Pennsylvania State University Press. Pennsylvania. pp. 91-109.
- Ou, S.H. 1985. Rice Disease. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. 380 p.
- Porter, J.N. 1971. Prevalence and distribution of antibiotic – producing actinomycetes. *Advances in Applied Microbiology* 14 : 73-92.
- Pridham, T.G., C.W. Hesseltine and R.G. Benedict. 1958. A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Classification of Streptomyces* 6: 52 - 79.
- Qin, S., K. Xing, J. H. Jiang, L. H. Xu and W. J. Li. 2011. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(3): 457–473.
- Ramamoorthy, V. R. Viswanathan, T. Raguchander and R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plant against pests and diseases. *Crop Protection* 20: 1-11.
- Roumen E., M. Levy and J.L. Nottoghem. 1997. Characterisation of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis. *European Journal of Plant Pathology* 103(4): 363-371.

- Sardi, P., M. Saracchi, S. Quaroni, B. Petrolini, G. E. Borgonovi and S. Merli. 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-steriled roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58(8): 2691 – 2693.
- Shimizu, M., Y. Nakagawa, Y. Sato, T. Furumai, Y. Igarashi, H. Onaka, R. Yoshida and H. Kunoh. 2000. Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolated from *Rhododendron* and its antifungal activity. *Journal of General Plant Pathology* 66(4): 360-366.
- 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.
- Stanley, T.W., M.E. Sharpe, J.G. Holt, R.G.E. Murray, J.D. Brenner and J.G. Holt. 1989. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Volume 4*. Baltimore, MD; William&Wilkins. 2648 p.
- Thaibiotech. 2016. What is DNA. (Online). Available: <http://www.thaibiotech.info/what-is-dna.php> (10 November 2016).
- Verma, V.C., S.K. Gond, A. Kumar, A. Mishra, R.N. Kharwar and A.C. Gange. 2009. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, Diversity, and Anti-microbial Activity. *Microbial Ecology* 57(4): 749 - 756.
- Williams S.T., M. Goodfellow and G. Alderson. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339^{AL}. pp. 2452-2492. *In*: S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, vol. 4. Baltimore: Williams and Willkins.
- Zarandi, M.E., G.H. S. Bonjar, F.P. Dehkaei, S.A.A. Moosavi, P.R. Farokhi and S. Aghighi. 2009. Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. *American Journal of Applied Sciences* 6(1): 194-199.
- Zhao, K., P. Penttinen, T. Guan, J. Xiao, Q. Chen, J. Xu, K. Lindström, L. Zhang, X. Zhang and G.A. Strobel. 2011. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. *Current Microbiology* 62: 182 - 190.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Water agar (WA)

ส่วนประกอบ

Agar	17	กรัม
น้ำ	1000	มิลลิลิตร

นำวุ้นมาละลายในน้ำกรอง ต้มจนวุ้นใส เติมน้ำปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไ้ความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. Potato dextrose agar (PDA)

ส่วนประกอบ

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose (หรือ Sucrose)	20	กรัม
Agar	17	กรัม
น้ำ	1000	มิลลิลิตร

หั่นมันฝรั่งให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ นำไปต้มในน้ำกรอง ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ให้สุกประมาณ 10 นาที แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง นำวุ้นและน้ำตาลมาละลายในน้ำกรอง 500 มิลลิลิตร ต้มจนวุ้นใส ผสมรวมกันกับส่วนแรก เติมน้ำปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไ้ความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

3. Rice polish agar (RPA)

ส่วนประกอบ

รำข้าวละเอียด	20.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
Agar	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไ้ความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

4. Inhibitory mold agar-2 (IMA-2)

ส่วนประกอบ

Glucose	5.0	กรัม
Soluble starch	5.0	กรัม
Beef extract	1.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
NZ-case (enzyme hydrolyzed casein)	2.0	กรัม
NaCl	2.0	กรัม
CaCO ₃	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไ้ความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

5. Non-sporulating

ส่วนประกอบ

Protein hydrolysate ampicase	20.0	กรัม
Soluble Starch	20.0	กรัม
yeast extract	4.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีสเอนโคไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea* ด้วยวิธีการ dual culture

Statistix 8.0
10:28:17

17/7/2015,

Completely Randomized AOV for Data

Source	DF	SS	MS	F	P
TR	19	9443.4	497.023	33.9	0.0000
Error	60	880.4	14.674		
Total	79	10323.8			

Grand Mean 64.376 CV 5.95

Bartlett's Test of Equal Variances	Chi-Sq	DF	P
	27.0	19	0.1053
Cochran's Q	0.2272		
Largest Var / Smallest Var	24.056		

Component of variance for between groups 120.587
Effective cell size 4.0

TR	Mean	TR	Mean
1	69.168	11	90.000
2	65.000	12	59.168
3	61.665	13	48.335
4	48.332	14	85.000
5	74.165	15	65.000
6	50.000	16	59.168
7	55.835	17	58.335
8	60.000	18	64.168
9	70.000	19	65.835
10	78.335	20	60.003

Observations per Mean 4
Standard Error of a Mean 1.9153
Std Error (Diff of 2 Means) 2.7086

LSD All-Pairwise Comparisons Test of Data by TR

TR	Mean	Homogeneous Groups
11	90.000	A
14	85.000	A
10	78.335	B
5	74.165	BC
9	70.000	CD
1	69.168	CDE
19	65.835	DEF
2	65.000	DEFG
15	65.000	DEFG
18	64.168	EFGH
3	61.665	FGHI
20	60.003	GHIJ
8	60.000	GHIJ
12	59.168	HIJ
16	59.168	HIJ
17	58.335	IJ
7	55.835	J
6	50.000	K
13	48.335	K
4	48.332	K

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.7086
 Critical T Value 2.000 Critical Value for Comparison 5.4181
 There are 11 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

2. ข้อมูลทางสถิติของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีสเอนโคไฟต์ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวในสภาพโรงเรือน

Statistix 8.0
18:30:56

13/10/2016,

Completely Randomized AOV for SI

Source	DF	SS	MS	F	P
TR	4	28.6507	7.16267	51.7	0.0000
Error	10	1.3867	0.13867		
Total	14	30.0373			

Grand Mean 1.9867 CV 18.74

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.58	4	0.4657
Cochran's Q	0.4038		
Largest Var / Smallest Var	21.000		

Component of variance for between groups 2.34133
Effective cell size 3.0

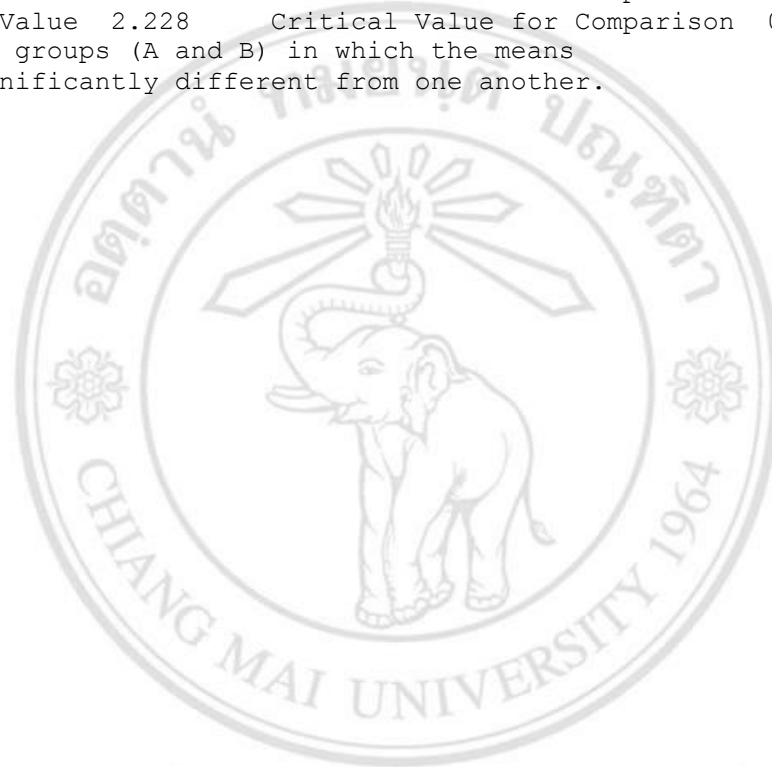
TR	Mean
1	4.7333
2	1.2000
3	1.4667
4	1.0667
5	1.4667
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.2150
Std Error (Diff of 2 Means)	0.3040

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LSD All-Pairwise Comparisons Test of SI by TR

TR	Mean	Homogeneous Groups
1	4.7333	A
5	1.4667	B
3	1.4667	B
2	1.2000	B
4	1.0667	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3040
Critical T Value 2.228 Critical Value for Comparison 0.6775
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียไมซีสต์เอนโดไฟต์

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต ORR107

TGCAGTCGACGATGAAGCCGCTTCGGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGG
GCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGGGATC
GCATGGTCTCCGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGG
GGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
GCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGC
GAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGG
TGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCGGATGTGAAA
GCCCCGGGCTTAACCCCGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGCAGGGGAGATTGGA
ATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTG
GGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGCGGCATTCCACGTGTCGTCGTCGCGCAGCTAACGCATTA
AGTGCCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGG
AAAGCCGTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCAACTCCTTT
CAGGAAGGTTGGGACTCACGGAAGACTGCCGGGTCAACTCGAAGGAAGGTGGGGACAACGTCA
AGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCAATG
CCGTGAGGTGAAGCAAATCTCAAAAAGCCGGTCTCATTTCGAATTGGGGTCTGCAACTCAACCCCAT
AAAGTCGAAGTCGCTAGTAATCGCAAATCAGCATTGCTGCGGTAAATACGTCCCAGGCTTGTACA
CACCGCCCGTCACGTCACAAAAGTCGGTAACACCCAAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAAGGA
AATCGTCAAAGGTGGAAGTGGCAATTGGAACAAATTC

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท ORR719

TCGACGATGAAGCCGCTTCGGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAAT
CTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGGGATCGCATG
GTCTCCGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCAGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGA
TGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
GACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCGAGTG
ACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA
GCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCGGATGTGAAAGCCCG
GGGCTTAACCCGGGTCTGCATTGATACGGGCAGGCTAGAGTTTCGGCAGGGGAGATTGGAATTCCT
GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGA
TACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCGCATTCCACGTGTCCTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCC
CCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCG
GAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAACCCGAAAGCC
GTAGAGATACGGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCAACTCCTTTCAGGA
AGGTTGGGAACTCACGGAAAACCTGCCGGGGTCAACTCGAAGGAAGGTGGGAACAACGTCAAGTCAT
CATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGAACAATGAGCTGCAATGCCGTGA
GGTGAAGCAAATCTCAAAAAGCCGGTCTCATTTCGAATTGGGGTCTGCAACTCAACCCATAAAGTC
GAAGTCGCTAGTAATCGCAAATCAGCATTGCTGCGGTAATACTTTCCCGGCCTTGTACACACCGC
CCGTCACGTCACAAAAGTCGGTAACACCCAAACCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAAGGAAATCTTC
AAAGGTGGAAGTGGCAATTGGAACAAA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนขงยีน 16S rRNA ของไอโซเลท ERY2

ATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTG
GAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCATCTTGGGCATCCTTGGTGATCGAAAGCTCCGGCGGTG
CAGGATGAGCCCCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAG
CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTT
CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGCTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGAT
ACGGGCAGGCTAGAGTTCCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATAT
CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGA
CATTCCACGTGTCGTCGCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGC
TAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAAC
GCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAACCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTC
GGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGA
GCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGG
GTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGT
GCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTC
AGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATT
GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGAACACCC
GAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAG
TCGTAACAAGGTAACC

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท POL4

CAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCA
ATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCATCTTGGGC
ATCCTTGGTGATCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCCGGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGT
AATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCA
GCGACGCCCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAG
TGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGC
GAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTGCGTTCGGTTGTGAAAGCC
CGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATT
CCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGC
CGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGT
GCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
GCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAA
ACCCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTG
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTG
GTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAT
CATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGA
GGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCACGTCACG

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นาย ฌปภ แก้วกันทา
วัน เดือน ปี เกิด	17 กุมภาพันธ์ 2535
ประวัติการศึกษา	ปีการศึกษา 2552 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนนวมินทราชูทิศ พายัพ จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2556 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ทุนการศึกษา	ปีการศึกษา 2559 ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประสบการณ์	ปี 2557-2559 ผู้ประสานงานและผู้ช่วยนักวิจัยโครงการเสริมสร้างศักยภาพและขีดความสามารถในการแข่งขันด้านการตลาดของสินค้าหัตถ์กระเทียมไทย หอมแดงไทย และเมล็ดพันธุ์หอมหัวใหญ่ไทยปลอดโรค ภายใต้ความตกลงการเปิดเสรีทางการค้า



เชียงใหม่
ight © by Chiang Mai University
rights reserved