ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสจากดินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 3

Efficacy of Soil Actinomycetes in Inhibiting Growth of Fungal Pathogen Causing Dirty Panicle Disease in Rice cv. Suphan Buri 3

เจนธิรา ไทยกรณ์[1, 2] และ สรัญยา ณ ลำปาง[1,2,3]
Jentira Thaikorn [1, 2] and Sarunya Nalumpang[1,2,3]

Abstract

Efficiency of soil actinomycetes; NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 and NSP6, against three strains of fungal pathogen (*Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum* and *Helminthosporium oryzae*) causing dirty panicle disease was evaluated. The results found that all isolation of actinomycetes showed the high mycelial growth inhibitory effect against pathogen fungi. Spore germination effect was studied after treat 6 hr. The result found that all isolate of actinomycetes absolutely affected to spore germination of *F. semitectum*. Whilst actinomycetes isolate NSP4 NSP5 and NSP1 showed the highest inhibitory effect spore germination of *C. lunata*. and actinomycetes isolate NSP3 NSP2 NSP1 and NSP6 showed the highest inhibitory effect spore germination of *H. oryzae*. Moreover, the actinomycetes effected to abnormally appearance germ tubes.

Keywords: Actinomycetes, dirty panicle disease, Rice cv. Suphan Buri 3

บทคัดย่อ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีส จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia lunata, Fusarium semitectum* และ *Helminthosporium oryzae* สาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างได้ดี และได้ศึกษาผลต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา พบว่า 6 ชั่วโมงหลังจากการทดสอบ เชื้อแอกติโนไมซีสทุกไอโซเลท สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. semitectum* ได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่เชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP4 NSP5 และ NSP1 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *C. lunata* ได้ 74.34, 69.98 และ 61.38% ตามลำดับ สำหรับไอโซเลท NSP3, NSP2, NSP1 and NSP6 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *H. oryzae* ได้ 65.13, 52.83, 49.49 และ 33.33% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสมีผลทำให้สปอร์ที่งอกในชุดทดสอบมีลักษณะผิดปกติ

คำสำคัญ: เชื้อแอกติโนไมซีส โรคเมล็ดด่าง ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 3

คำนำ

ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 3 มีความอ่อนแอต่อโรคเมล็ดด่าง ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Curvularia lunata, Fusarium semitectum* และ *Helminthosporium oryzae* เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *C. lunata* ที่พบทั่วไปบนเมล็ดพันธุ์ข้าวจากภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย (สมศักดิ์และคณะ, 2539) โดยเมื่อเชื้อราเข้าไปทำลายตั้งแต่ข้าวเริ่มติดเมล็ดและพัฒนาต่อไปจนทำให้เกิดอาการเมล็ดด่าง และเมล็ดลีบในช่วงใกล้เก็บเกี่ยว ส่งผลทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพ สูญเสียความงอก จนเสียคุณภาพของการเป็นเมล็ดพันธุ์ หากมีการระบาดอย่างหนักจะทำให้ผลผลิตลดลงหรือไม่สามารถนำผลผลิตจากแปลงนั้นมาใช้ทำเมล็ดพันธุ์ข้าวได้ (กรมการข้าว, 2554) การป้องกันกำจัดศัตรูในเมล็ดพันธุ์ นิยมใช้วิธีการคลุกเมล็ด (seed treatment) ด้วยสารเคมี เช่น metalaxyl, tri-fluxystroloin, mefenoxam, fludioxonil, thiram, mancozeb และ carboxin เป็นต้น ซึ่งทำให้สารเคมีตกค้างในข้าว การควบคุมโรคพืชทางชีววิธีโดยการใช้เชื้อแอกติโนไมซีสที่มี

[1] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
[1] Postharvest Technology Research Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200
[2] ศูนย์นวัตกรรมหลังการเก็บเกี่ยว, สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา, กรุงเทพ 10400
[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Bangkok 10400
[3] ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่ 50200
[3] Department of Entomology and Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

การสร้างสารปฏิชีวนะหรือเอนโซม์ เช่น hydrolytic enzyme ที่มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อจุลินทรีย์สาเหตุของโรคพืช จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและนำมาศึกษาทดลอง เพื่อช่วยลดปัญหาจากการใช้สารเคมีเกิดความปลอดภัยต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าวสุพรรณบุรี 3

สุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวจากแปลงของเกษตรกรผู้ปลูกเมล็ดพันธุ์ข้าว อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ตรวจหาชนิดของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวโดยใช้วิธีการเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้น (agar method) ตามวิธีมาตรฐานสากลของ International seed testing association (ISTA, 1999)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีส

เชื้อแอกติโนไมซีสที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 6 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณป่าอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6

2.1 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค

นำเชื้อราสาเหตุทุกชนิดที่แยกได้จากการทดลองที่ 1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Dual culture method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract-malt extract agar (GYM) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2°C) จนกระทั่งชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหาร บันทึกการเจริญของเชื้อราสาเหตุ และวัดรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุ เพื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth; PIRG) โดยใช้สูตรเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = [(R1-R2)/R1] × 100 เมื่อ R1 และ R2 คือ ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม และในชุดทดสอบ ตามลำดับ

2.2. ประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค

เตรียมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสโดยดูดสารละลายแขวนลอยสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีส (10^5 spores/ml) 0.5 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enzyme production medium (EPM) ที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาตร 50 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดตามระยะเวลา นำอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสผสมกับสารแขวนลอยสปอร์ (10^5spore/ml) ของเชื้อราสาเหตุทุกชนิดที่แยกได้จากการทดลองที่ 1 อย่างละ 1 ml เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปริมาตร 0.1 ml เกลี่ย (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ตัดชิ้นอาหารให้มีขนาด 1×1 cm วางบนกระจกสไลด์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28±2°C) ตรวจดูการงอก และความยาว germ tube ของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าวสุพรรณบุรี 3

พบเชื้อราที่ปนเปื้อนในเมล็ดข้าว 3 ชนิด เมื่อศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จำแนกตามหลักเกณฑ์ของ Mew and Gonzales (1994) พบว่าคือเชื้อรา *Curvularia lunata, Fusarium semitectum* และ *Helminthosporium oryzae*

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีส

2.1 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค

เชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. lunata* ในช่วง 54.67 - 65.33% ยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *F. semitectum* ในช่วง 59.33 - 68.00% และยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *H. oryzae* ในช่วง 58.00 - 64.67% (Table 1) สอดคล้องกับการทดลองของวันวิสาข์ (2546) ที่พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีส (*Streptomyces* sp.) มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* และ *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคใบไหม้ของข้าวได้ดี

Table 1 Efficacy of actinomycetes six isolates on inhibiting the mycelial growth of fungal pathogen causing dirty panicle disease on glucose yeast extract-malt extract agar (7 day)

Type of pathogen	Percent inhibition of colony growth[a]					
	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	NSP6
Curvularia lunata	61.33±1.33 a	65.33±1.76 a	61.33±0.66 a	60.67±1.33 a	54.67±2.50 b	54.67±1.76 b
Fusarium semitectum	68.00±2.30 a	59.33±6.76 a	66.00±1.15 a	63.33±1.76 a	64.67±0.67 a	62.67±2.40 a
Helminthosporium oryzae	62.67±3.52 a	58.00±4.16 a	64.00±1.15 a	64.67±1.76 a	62.00±2.00 a	60.67±2.40 a

a The results are presented as means of three replicated plates ± standard error. Values of each row (a,b,c) followed by different letter indicate significant difference ($p<0.05$) according to LSD test

2.2. ประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค

อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทุกไอโซเลทที่เวลา 6 ชั่วโมงภายหลังการทดสอบ สามารถยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *F. semitectum* ได้อย่างสมบูรณ์ (100%) ในขณะที่อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP4, NSP5 และ NSP1 ยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อ *C. lunata* ได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกเท่ากับ 74.34, 69.98 และ 61.38% ตามลำดับ และอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP3, NSP2, NSP1 และ NSP6 ยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *H. oryzae* ได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกเท่ากับ 65.13, 52.83, 49.49 และ 33.33% ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Inhibitory percentage of actinomycetes six isolates culture medium on conidial germination of fungal pathogen causing dirty panicle disease on potato dextrose agar (6hr)

Type of pathogen	Percent inhibition of germination (%)[a]					
	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	NSP6
Curvularia lunata	61.38±1.54 ab	50.95±4.52 b	55.78±2.32 b	74.34±8.72 a	69.98±5.60 a	0.00±0.00 d
Fusarium semitectum	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a
Helminthosporium oryzae	49.49±2.49 ab	52.83±6.58 a	65.13±1.94 a	23.61±6.05 bc	23.81±12.60 bc	33.33±16.67 ab

[a] The results are presented as means of three replicated ± standard error. Values of each row (a,b,c) followed by different letter indicate significant difference ($p<0.05$) according to LSD test

จากการเปรียบเทียบความยาว germ tube ของชุดทดลองต่อชุดควบคุม พบว่าอัตราส่วนความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคที่ทดสอบด้วยอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทุกไอโซเลทในชั่วโมงที่ 6 และ 9 และบางไอโซเลท ในชั่วโมงที่ 12 และ 24 มีค่าน้อยกว่า 1 โดยที่ชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งหมายความว่า germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดทดลองมีความยาวน้อยกว่า germ tube ของสปอร์เชื้อราในชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสมีผลในการชะลอการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคทั้งสามชนิด (Table 3) นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส มีผลทำให้สปอร์ที่งอกในชุดทดสอบมีลักษณะผิดปกติ โดยปรากฏลักษณะบวมโป่ง หงิกงอ บิดเบี้ยว และมีความยาวสั้นกว่าในชุดควบคุม ซึ่งการยับยั้งการงอก และลักษณะการงอกที่ผิดปกติอาจเป็นผลมาจากเชื้อแอกติโนไมซีสมีการสร้างสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ (Isaac and Jennings, 1995) เช่น glucanase (Macagnan *et al*., 2008) และ chitinase (พรนภา และคณะ, 2554)

Table 3 Inhibitory effect of actinomycetes six isolates culture medium to germ tube length formation of fungal pathogen causing dirty panicle disease on potato dextrose agar (6hr)

Type of pathogen	Time of incubation (hr)	The ratio of the length of germ tube infection compared to the control.(treatment / control)[a]						
		control	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	NSP6
Curvularia lunata	6	1.00±0.00	0.50±0.11	0.56±0.10	0.31±0.41	0.26±0.04	0.58±0.12	0.86±0.30
	9	1.00±0.00	0.65±0.09	0.49±0.08	0.41±0.05	0.19±0.01	0.56±0.09	0.43±0.04
	12	1.00±0.00	0.95±0.08	0.43±0.06	0.26±0.04	0.73±0.07	0.81±0.07	0.89±0.09
	24	1.00±0.00	1.20±0.20	0.58±0.06	0.96±0.13	0.66±0.12	1.09±0.07	0.67±0.09
Fusarium semitectum	6	1.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	9	1.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.69±0.32	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	12	1.00±0.00	1.84±0.21	0.52±0.05	1.12±0.11	0.00±0.00	0.75±0.09	0.73±0.07
	24	1.00±0.00	4.01±0.37	0.99±0.07	1.67±0.23	1.06±0.09	1.52±0.03	1.39±0.13
Helminthosporium oryzae	6	1.00±0.00	0.61±0.55	0.66±0.16	0.61±0.09	0.78±0.10	0.92±0.11	0.87±0.13
	9	1.00±0.00	0.46±0.06	0.32±0.07	0.25±0.05	0.43±0.07	0.88±0.11	0.77±0.15
	12	1.00±0.00	0.50±0.04	0.55±0.14	0.21±0.02	0.54±0.04	0.70±0.07	0.73±0.07
	24	1.00±0.00	0.76±0.04	0.73±0.10	0.62±0.06	1.24±0.03	2.02±0.06	1.45±0.08

a The length of germ tube infection compared to the control ; 1=germ tube length formation of treated treatment were equal to control, >1= germ tube length formation of treated treatment were longer than to control, <1= germ tube length formation of treated treatment were less than to control.

สรุปผลการทดลอง

เชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่าง (*F. semitectum, C. lunata* และ *H. oryzae*) ได้ในช่วง 54.67 - 68.00% นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการชะลอการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค รวมถึงมีผลทำให้สปอร์เชื้อราสาเหตุโรคมีลักษณะผิดปกติต่างจากชุดควบคุมคือ บวมโป่ง หงิกงอ บิดเบี้ยว และมีความยาว germ tube สั้นกว่าในชุดควบคุม

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ศูนย์นวัตกรรมหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและทุนในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมการข้าว. 2554. โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา:http://www.brrd.in.th/rkb/data_005/rice_xx205_newDisease007.html. (24 กรกฎาคม 2556)

พรนภา โทตรี, ชาติชาย โขนงนุช และสรัญยา ณ ลำปาง. 2554. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุของโรคแอนแทรกโนสของพริก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 42(1 พิเศษ): 163-166

วินวิสาข์ แฟงฟัก. 2546. การคัดเลือกแอคทิโนไมซีทเอนโดไฟท์ในข้าวเพื่อควบคุมโรคใบไหม้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 81 น.

สมศักดิ์ ทองดีแท้, กรรณิการ์ พรหมพันธุ์ใจ, สุภาพร จันทร์บัวทอง, ลือชัย อารยะรังสฤษฎ์ และสมคิด ดิสถาพร. 2539. สิ่งเจือปนและคุณภาพเมล็ดพันธุ์ข้าวของเกษตรกรในภาคต่างๆ, หน้า 119. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการปี 2539. ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี, สถาบันวิจัยข้าว, กรมวิชาการเกษตร.

Isaac, S. and D.Jennings. 1995. Microbial Culture. Bios Scientific. Publishers UK. 133 p.

ISTA. 1999. International rules for seed testing. International Seed Testing Association Annexes 1976. Seed Science and Technology 4: 3-49.

Macagnan, D., R. da S.Romerio, A. W. V. Pomella and J. T. deSouza. 2008. Production of lytic enzymes and siderophores and inhibition of germination of basidiospores of Moniliophthora (ex Crinipellis) perniciosa by phylloplane actinomycetes. Biological Control 47 (3): 309-314.

Mew, T.W. and P.Gonzales. 1994. A Manual of Rice Seed Borne Fungi. International Rice Research Institute (IRRI). Philippines. 83 pp.