

การแยกเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากหญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides*)
และประสิทธิภาพการยับยั้ง *Fusarium moniliforme* และ *Pyricularia grisea*
Isolation of Endophytic Actinomycetes from Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides*)
and Their Antagonist to *Fusarium moniliforme* and *Pyricularia grisea*

นันทิชา แสงสุวรรณ และ นพรัตน์ วรรณเทศ*
Nanticha Sangsuwan and Nopparat Wannathes*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทร 055-267000 ต่อ 4228 โทรสาร 055-267058 E-mail: wnopparat@gmail.com

บทคัดย่อ

คัดแยกเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากรากและใบหญ้าแฝกโดยเตรียมเนื้อเยื่อด้วยวิธี surface sterilization แล้วทำการคัดแยกเชื้อ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 บดเนื้อเยื่อหญ้าแฝกในสารละลาย ¼ Ringer แล้วเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร S และวิธีที่ 2 วางชิ้นเนื้อเยื่อหญ้าแฝกบนอาหาร S สามารถคัดแยกเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท โดยคัดแยกได้จาก ราก 13 ไอโซเลท และใบ 2 ไอโซเลท นำเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว 2 ชนิด ได้แก่ *Fusarium moniliforme* และ *Pyricularia grisea* โดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีท 10 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคข้าวได้อย่างน้อย 1 ชนิด โดยเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทไอโซเลท L1-1 ที่คัดแยกได้จากใบมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคข้าวได้ดีที่สุด คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อ *F. moniliforme* และ *P. grisea* สูงถึง 45.8 เปอร์เซ็นต์ และ 70.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคข้าวได้ พบว่ามีลักษณะโคนิเดีย 3 รูปแบบ ได้แก่ closed spiral, open loops และ open spirals ซึ่งยังไม่สามารถระบุสกุลที่ชัดเจนได้

Abstract

Endophytic actinomycetes were isolated from roots and leaves of Vetiver grass. Plant tissues were prepared by surface sterilization method. Endophytic actinomycetes were isolated by two methods; one is ground tissue with ¼ Ringer solution then spreaded on S medium and another method is directly placed the plant tissue on S medium. A total of 15 isolates of

endophytic actinomycetes was isolated from plant tissues. Thirteen isolates were isolated from roots and two isolates were isolated from leave of Vetiver grass. All endophytic actinomycetes were tested for antagonistic activity to against two species of rice pathogenic fungi; *Pyricularia grisea* and *Fusarium moniliforme* by dual culture method. The results showed that 10 isolates of endophytic actinomycetes inhibited the growth of at least one fungus. Isolate L1-1 shown maximum percentage of inhibition with 45.8% against *F. moniliforme* and 70.0% against *P. grisea*. Three conidial forms (closed spiral, open loops and open spirals) were investigated from those endophytic actinomycetes that shown antagonistic activity. There characteristic is insufficiency of genus identification, therefore more investigations are required.

1. บทนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย และยังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2557) ในปัจจุบันข้าวมักเป็นโรคต่าง ๆ ทำให้ได้ผลผลิตตกต่ำ เช่น โรคยอดฝักดาบและโรคไหม้ เป็นต้น ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Pyricularia grisea* ตามลำดับ เกษตรกรจึงมักใช้สารเคมีในการกำจัดโรคข้าวมากขึ้น ซึ่งการใช้สารเคมีต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน ๆ อาจทำให้สารเคมีสะสมอยู่ในดิน ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน เช่น รา แบคทีเรีย แอกติโนมัยซีท และสิ่งมีชีวิต

อื่น ๆ มีจำนวนลดลง และก่อให้เกิดมลพิษทางดินและน้ำ ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของคนในชุมชนอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่าเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ชีวภาพอื่น ๆ หลากหลายชนิด คาดกันว่าสองในสามของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มนุษย์เราใช้ประโยชน์อยู่นั้นผลิตมาจากแอคติโนมัยซีท (Inderiati and Verma, 2009) หากพิจารณาถึงการควบคุมโรคพืชในทางการเกษตรด้วยชีววิธี เอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีทเป็นตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจมาก เนื่องจากเป็นแอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช เช่น ส่วนของราก ลำต้น ใบ และผล โดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชและยังทำให้พืชแข็งแรง โดยช่วยป้องกันพืชจากการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ก่อโรคต่าง ๆ ได้แก่ รา แบคทีเรีย และไวรัส นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชอีกด้วย (Tan and Zou, 2001) งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานผลการศึกษาเอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีทในข้าว กล้วย มะเขือเทศ และสะเดา พบว่าเอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกได้นั้นสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งราและแบคทีเรียบางชนิดได้ (Cao et al, 2004; Franco, 2008; Inderiati and Verma, 2009; Tian et al, 2004) แต่ยังไม่มียารายงานการคัดแยกเอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากหญ้าแฝก

หญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides*) เป็นพืชตระกูลหญ้าเขตร้อน พบกระจายอยู่ทั่วไปและมีการนำไปปลูกในหลายพื้นที่ของโลก (วิฑูร ชินพันธุ์, 2541) เป็นพืชที่มีรากจำนวนมาก ระบายรากลึกสามารถแผ่ลงลึกได้มากกว่า 3 เมตร (Hellin and Haigh, 2002) จึงทนแล้งได้ดีและนิยมนำมาใช้ในการอนุรักษ์ดินและน้ำ หญ้าแฝกจึงเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการคัดแยกหาเอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารต้านเจริญของรากก่อโรคข้าว เนื่องจากแฝกเป็นพืชตระกูลหญ้าเหมือนกับข้าวและมีความแข็งแรงทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี

2. วิธีการ

เก็บตัวอย่างหญ้าแฝกจากแนวหญ้าแฝกปลูกริมคลองหน้าคณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

1. การคัดแยกเอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากรากและใบหญ้าแฝก

1.1. การกำจัดจุลินทรีย์ที่ผิวเนื้อเยื่อแฝก (surface sterilization)

1.1.1. ล้างใบหรือรากหญ้าแฝกให้สะอาดด้วยน้ำประปาแล้วนำไปแช่ในสารละลาย Tween 80 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ตามด้วยแช่ในเอทานอลเข้มข้น 70

เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที แล้วแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ตามลำดับ

1.1.2. ล้างชิ้นตัวอย่างใบหรือรากหญ้าแฝกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง เพื่อกำจัดสารเคมีในขั้นแรกให้หมด ตรวจสอบขั้นตอนการกำจัดจุลินทรีย์ที่ผิวเนื้อเยื่อพืช โดยดูน้ำล้างรากครั้งสุดท้าย 200 ไมโครลิตร ทำ spread plate บนอาหาร S บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

1.2 การคัดแยกเอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากเนื้อเยื่อแฝกโดยวิธีการบด ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของรัชนิ (2552) ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะและหรือเปลี่ยนชนิดของสารปฏิชีวนะที่ใช้

1.2.1. ตัดรากหรือใบที่ผ่านขั้นตอนการกำจัดจุลินทรีย์ที่ผิวให้เป็นชิ้นยาวประมาณชิ้นละ 1 เซนติเมตร แล้วบดในสารละลาย ¼ Ringer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในโถงที่ปราศจากเชื้อ

1.2.2. ตูตสารแขวนลอยรากหรือใบปริมาตร 100 ไมโครลิตร spread plate บนอาหาร S ที่เติม nalidixic acid 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ cycloheximide 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ สารละลาย sodium propionate เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและรา ตามลำดับ

1.2.3. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-4 สัปดาห์

1.2.4. แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค streak plate

1.3 การคัดแยกเอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีทจากเนื้อเยื่อแฝกโดยวิธีวางเนื้อเยื่อบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของรัชนิ มิ่งมา (2552) ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะและหรือเปลี่ยนชนิดของสารปฏิชีวนะที่ใช้

1.3.1. ตัดรากหรือใบที่ผ่านขั้นตอนการกำจัดจุลินทรีย์ที่ผิวให้เป็นชิ้นยาวประมาณชิ้นละ 1 เซนติเมตร ใส่ในโถงที่ปราศจากเชื้อและกดรากหรือใบให้แบนเล็กน้อย

1.3.2. ย้ายชิ้นเนื้อเยื่อพืชจากข้อ 3.1 ไปวางบนอาหาร S ที่เติม nalidixic acid 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ cycloheximide 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ สารละลาย sodium propionate เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและรา ตามลำดับ

1.3.3. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 สัปดาห์

1.3.4. แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิค streak plate

2. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *Fusarium moniliforme* และ *Pyricularia grisea* ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของศรีสกุล ชนะพันธ์ (2553) และ Taechowisan et al.

(2005) โดยการเพิ่มระยะเวลาในการบ่มเชื้อและควบคุมอุณหภูมิ การบ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส

2.1. เลี้ยงเชื้อราทดสอบบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

2.2. ย้ายเชื้อราโดยใช้ cork borer เจาะเส้นใยรา แล้วย้าย ไปวางในจานอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโน- มัยซีทบนอาหาร ISP-2 นาน 7 วัน โดยวางห่างจากโคโลนีของ เชื้อแอกติโนมัยซีท 6 เซนติเมตร

2.3. ทำจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละคู่ทดสอบ

2.4. บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน

2.5. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (PIRG) ของเชื้อ เอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทกับเชื้อราก่อโรค

$$\text{Percentage inhibition of radial growth} = \left(\frac{R1-R2}{R1} \right) \times 100$$

กำหนดให้ R1 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราในจานชุด ควบคุม

R2 คือ รัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราในจานชุด ทดลอง

3. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโน- มัยซีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium moniliforme* และ *Pyricularia grisea* ได้

3.1. ทำ slide culture ของเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีท บน ISP-2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หรือ จนกว่าเชื้อจะมีการสร้างสปอร์

3.2 ย้ายกระจกปิดสไลด์ออกมาแล้วย้อมสีด้วย crystal violet

3.3 ศึกษาลักษณะของเส้นใยและโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3. ผลและอภิปราย

1. การคัดแยกเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากรากและใบ หนุ่กล้วย

คัดแยกเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากรากและใบหนุ่กล้วย ได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) โดยวิธีการบดชิ้นส่วนรากใน ¼ Ringer ได้ 11 ไอโซเลท ใบ 2 ไอโซเลท และการวางชิ้นส่วน ของเนื้อเยื่อรากบนผิวหน้าอาหาร S ได้ 2 ไอโซเลท ส่วนใบไม่ สามารถคัดแยกเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทได้

ตารางที่ 1 เอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากรากและใบ หนุ่กล้วย

ชิ้นส่วนพืช	วิธีการ	
	วางชิ้นเนื้อเยื่อพืช	บดใน ¼ Ringer
รากหลัก	TRM4-1,	RM1-1, RM1-2,
	TRM4-2	RM3-1, RM4-1, RM4-2, RM4-3, RM4-4
รากแขนง	-	RB1-1, RB1-2, RB4-1, RB4-2
ใบ	-	L1-1, L1-2

RM = เอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากรากหลัก โดยการบด

TRM = เอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากรากหลักโดยการ วางชิ้นเนื้อเยื่อ

RB = เอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากรากแขนง โดยการบด

L = เอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากใบโดยการบด

จากผลการคัดแยกเชื้อข้างต้นพบว่าสามารถคัดแยกเอ็นโด- ไฟติกแอกติโนมัยซีทโดยวิธีการบดใน ¼ Ringer ได้จำนวน 13 ไอโซเลท (ร้อยละ 86.7) ซึ่งมากกว่าวิธีการใช้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อ วางบนผิวหน้าอาหาร S ซึ่งแยกเชื้อได้เพียง 2 ไอโซเลท (ร้อยละ 13.3) เนื่องจากวิธีการบดทำให้เชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีท มีการกระจายตัวและสัมผัสกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีกว่า การวางชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งส่งผลให้มีการ เจริญของแอกติโนมัยซีทมากตามไปด้วย เมื่อพิจารณาถึงจำนวน ไอโซเลทที่แยกเชื้อได้ พบว่ามีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับพืชใน กลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่น เช่น ข้าว มีรายงานว่าสามารถคัดแยก เอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากข้าวได้ถึง 33 ไอโซเลท (Tian et al, 2004) จึงคาดว่าจำนวนเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่คัดแยก ได้อาจมีจำนวนน้อยกว่าที่เป็นจริง เนื่องจากในงานวิจัยนี้พบว่ามี การเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนจำนวนมากในขั้นตอนการ แยกเชื้อ ซึ่งเป็นผลมาจากการฆ่าเชื้อที่ผิวเนื้อเยื่อพืชทำได้ไม่ สมบูรณ์ เพราะตัวอย่างรากหนุ่กล้วยมีลักษณะพรุนดูดซับน้ำได้ มาก แม้จะได้เพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีและระยะเวลาในการ ฆ่าเชื้อที่ผิวเนื้อเยื่อแล้วก็ตาม ด้วยเหตุนี้เอ็นโดไฟติกแอกติโน- มัยซีทกลุ่มที่โตช้าจึงอาจไม่เจริญ (Araújo et al, 2000)

นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของโครงสร้างพืชมีผลต่อจำนวนของ เอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีท คือ สามารถแยกเชื้อเอ็นโดไฟติก- แอกติโนมัยซีทจากรากได้มากกว่าใบ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ งานวิจัยก่อนหน้านี้หลายงาน (Tian et al, 2007; Verma et

al, 2009; Zin et al, 2010) และสนับสนุนข้อมูลที่ว่ารากพืชเป็นโครงสร้างที่พบเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟได้หลากหลายและมีจำนวนมากที่สุด (Shimizu, 2011) เนื่องจากรากเป็นโครงสร้างที่สัมผัสกับดินโดยตรงทำให้แอกติโนมัยซีฟที่อยู่ในดินรอบ ๆ รากมีโอกาสที่เข้าสู่เนื้อเยื่อรากได้ (Conn and Franco, 2004; Zinniel et al, 2002) ทำให้เนื้อเยื่อส่วนนี้พบเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟมากกว่าโครงสร้างส่วนอื่น ๆ ของพืช

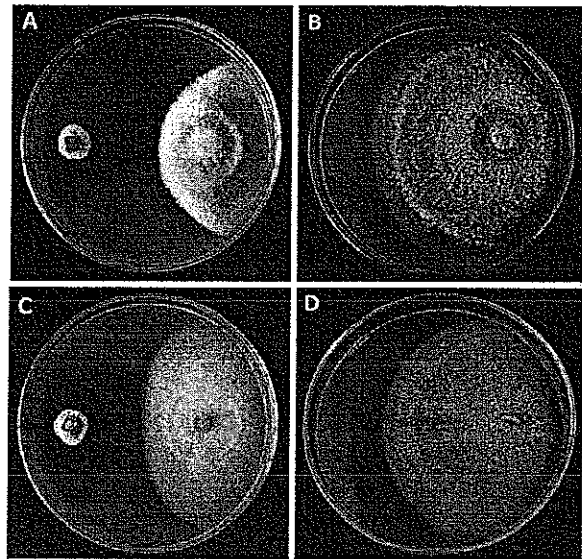
2. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟกับ *F. moniliforme* และ *P. grisea*

พบว่าเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟที่คัดแยกได้จากหญ้าแฝกทั้งหมด 15 ไอโซเลท มี 8 ไอโซเลท ที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคข้าวได้ทั้ง 2 ชนิด และมี 2 ไอโซเลท ที่ต้านการเจริญของเชื้อ *P. grisea* ได้เพียงชนิดเดียว (ตารางที่ 2) โดยเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟที่ผลิตสารชีวภาพมีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของ *F. moniliforme* ได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลท L1-1 (รูปที่ 1 C) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 45.8 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟที่ผลิตสารชีวภาพมีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของ *P. grisea* ได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลท L1-1 (รูปที่ 1 A) และ ไอโซเลท RM4-3 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 70.0 และ 68.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งทั้งสองค่านี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟต่อเชื้อ *F. moniliforme* และ *P. grisea*

ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคข้าว (%±SD)	
	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Pyricularia grisea</i>
RM3-1	31.6±5.77 ^c	60.00±4.00 ^{cd}
RM4-1	12.50±0.00 ^e	57.33±4.61 ^d
RM4-2	13.33±1.44 ^e	56.66±3.05 ^d
RM4-3	39.16±1.44 ^b	68.66±2.30 ^a
RM4-4	39.16±2.88 ^b	64.66±4.16 ^{abc}
RB4-2	22.50±4.33 ^d	62.00±3.46 ^{bcd}
L1-1	45.83±1.44 ^a	70.00±0.00 ^a
L1-2	41.66±1.44 ^{ab}	64.00±4.00 ^{abc}
TRM4-1	-	68.00±3.46 ^{ab}
TRM4-2	-	30.00±0.00 ^e

* ในแต่ละคอลัมน์อักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p < 0.05)



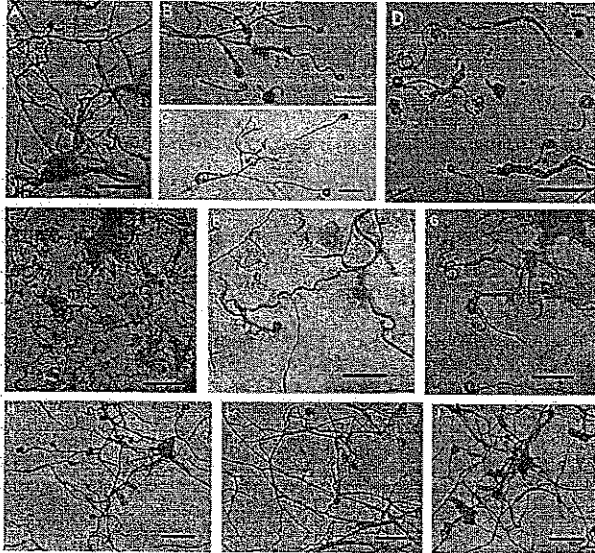
รูปที่ 1 การยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟ ไอโซเลท L1-1 กับเชื้อราก่อโรคข้าว (A) การยับยั้งการเจริญของแอกติโนมัยซีฟไอโซเลท L1-1 ต่อเชื้อ *P. grisea*, (B) ชุดควบคุมการเจริญของเชื้อ *P. grisea*, (C) การยับยั้งการเจริญของแอกติโนมัยซีฟไอโซเลท L1-1 ต่อเชื้อ *F. moniliforme*, (D) ชุดควบคุมการเจริญของเชื้อ *F. moniliforme*

จากผลการทดสอบข้างต้นพบว่าเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟ ไอโซเลท L1-1 ซึ่งแยกเชื้อได้จากใบหญ้าแฝกมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *F. moniliforme* ราสาเหตุโรคยอดผักตบ และ *P. grisea* ราสาเหตุโรคไหม้ในข้าวได้ดีที่สุด หากต้องการศึกษาถึงความสามารถในการป้องกันควบคุมเชื้อราโรคข้าวในแปลงทดลองของเชื้อเอ็นโดไฟติก แอกติโนมัยซีฟไอโซเลทนี้ จำเป็นต้องทำการทดลองเพิ่มเติมในสภาพเรือนทดลองต่อไป ดังงานวิจัยของวันวิสาข์ แฟงพิง (2546) ที่คัดแยกเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟจากข้าว แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโรคไหม้ของข้าวในสภาพเรือนทดลอง พบว่าสามารถยับยั้งโรคไหม้ของข้าวได้เป็นอย่างดี

3. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *F. moniliforme* และ *P. grisea*

จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟกับเชื้อราก่อโรคข้าว 2 ชนิด พบว่ามีเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟ 10 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคข้าวได้ จึงนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟต่อโดยวิธีการทำ slide culture พบว่าโคนเดียวของเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีฟไอโซเลท RM4-1, L1-1, L1-2, TRM4-1, RM4-2, RB4-2 และ TRM4-2 เป็น

แบบ open loops คือ โคนิเดียต่อกันเป็นสายโซ่ยาวและมันที่ปลาย(รูปที่ 2 A-G) ไอโซเลท RM4-3 และ RM3-1 เป็นแบบ closed spiral คือ โคนิเดียบิดเป็นเกลียวสั้น ๆ (รูปที่ 2 H-I) และ ไอโซเลท RM4-3 เป็นแบบ open spirals คือ โคนิเดียบิดเป็นเกลียวยาวอัดแน่น (รูปที่ 2 J)



รูปที่ 2 ลักษณะโคนิเดียของแอกติโนมัยซีทภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (A-G) open loops, (H-I) closed spiral, (J) open spirals (scale bar =10 um)

จากลักษณะโคนิเดียของแอกติโนมัยซีทที่พบในเบื้องต้นคาดว่าเชื้อที่คัดแยกได้นี้อยู่ใน สกุล *Streptomyces* เนื่องจากลักษณะของโคนิเดียที่พบเป็นโคนิเดียที่มีกพบในสกุลดังกล่าว อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้ยังไม่เพียงพอสำหรับจัดจำแนกสกุล เนื่องจากต้องอาศัยการตรวจสอบชนิดของกรดอะมิโนภายในผนังเซลล์ และชนิดของน้ำตาลภายใน whole cell hydrolysate ร่วมด้วย (Lechevalier and Lechevalier, 1970) หรือใช้เทคนิคด้านอนุชีววิทยา (Cook and Meyers, 2003) เป็นต้น

4. บทสรุป

การคัดแยกเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทจากรากและใบของหญ้าแฝกพบว่าคัดแยกได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท มี 10 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคข้าวได้ โดยไอโซเลท L1-1 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคข้าวได้ดีที่สุด และควรมีการศึกษาความสามารถในการป้องกันควบคุมราก่อโรคข้าวในแปลงทดลองของเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีท ไอโซเลทนี้ต่อไป โดยสืบสวนวิทยาของเชื้อเอ็นโดไฟติก-

แอกติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคข้าวได้นั้นมีการสร้างโคนิเดียอยู่ 3 ลักษณะ คือ closed spiral, open loops และ open spirals หากต้องการระบุสกุลที่แน่ชัดของแอกติโนมัยซีทจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมทางเคมีและชีววิทยาระดับโมเลกุลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ช่วยเหลืองานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ชาคริต บุญอยู่. (2553). การวิเคราะห์ลักษณะและติดตามแอกติโนมัยซีทเอ็นโดไฟต์ที่คัดแยกจากกระถินณรงค์ (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. Ex Benth.) โดยเทคนิคทางโมเลกุล. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชณี มิ่งมา. (2552). แอกติโนมัยซีทจากรากและดินรอบรากพืชตะกั่ว. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์).

วันวิสาข์ แฟงพัก. (2546). การคัดเลือกแอกติโนมัยซีทเอ็นโดไฟต์ในข้าวเพื่อควบคุมโรคใบไหม้. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วิฑูร ชินพันธุ์. (2541). ความรู้เรื่องหญ้าแฝก. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ศรีสกุล ชนะพันธ์. (2553). การแยกและคัดกรองเชื้อเอ็นโดไฟติกแอกติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบและการประยุกต์ใช้. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. (2557). สถานการณ์การค้าข้าวของโลกในปี 2557. ข้าวสมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย 4 (พิเศษ). 2-3.

Araújo, J.M., Silva, A.C. and Azevedo, J.L. (2000). Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Braz Arch Biol Technol.* 43: 441-457.

- Cao, L., Qiu, Z., Dia, X., Tan, H., Lin, Y. and Zhou, S. (2004). Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *World J Microb Biot.* 20: 501–504.
- Conn, V.M. and Franco, C.M.M. (2004). Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Appl Environ Microbiol.* 70:1787–1794.
- Cook, A.E. and Meyers, P.R. (2003). Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *Int J Syst Evol Micr.* 53: 1907–1915.
- Hellin, J. and Haigh, M.J. (2002). Better land husbandry in Honduras: towards the new paradigm in conserving soil, water and productivity. *Land Deg Dev.* 13: 233–250.
- Inderiati, S. and Franco, C.M.M. (2008). Isolation and Identification of Endophytic Actinomycetes and their Antifungal Activity. *Journal of Biotechnology Research in Tropical Region.* Vol. 1.
- Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol.* 20: 435–443.
- Shimizu, M. (2011). Endophytic Actinomycetes: Biocontrol Agent and Growth Promoters, In Maheshwari D.K., *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Respornses*. DOI 10.1007/978-3-642-20332-9_10, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. (2005). 4-Arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Ann Microb.* 55(1): 63–66.
- Tan, R.X. and Zou, W.X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep.* 18: 448–459.
- Tian, X.L., Cao, L.X., Tan, H.M., Han, W.Q., Chen, M., Liu, Y.H. and Zhou, S. (2007). Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. *Microb Ecol.* 53: 700–707.
- Tian, X.L., Cao, L.X., Tan, H.M., Zeng, Q.G., Jia, Y.Y., Han, W.Q and Zhou, S.N. (2004). Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from Rice and their antipathogenic activities *in vitro*. *World J Microb Biot.* 20: 303–309.
- Verma, V., Gond, S. K., Kumar, A., Mishra, A., Kharwar, R. and Gange, A. C. (2009). Endophytic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, Diversity, and Anti-microbial Activity. *Microbial Ecol.* 57: 749–756.
- Zin, N.M., Loi, C.S., Sarmin, N.M. and Rosli, A.N. (2010). Cultivation-dependent characterization of endophytic actinomycetes. *Res J Microbiol.* 5: 717–724.
- Zinnie,I D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G. and Vidaver, A.K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environ Microbiol.* 68: 2198–2208.