

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคใบไหม้ข้าวจากเชื้อแอคติโนมัยสีท

PRODUCT DEVELOPMENT FOR RICE BLAST DISEASE CONTROL
FROM ACTINOMYCETES



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-SC-M-020-033

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคใบไหม้ข้าวจากเชื้อแอคติโนมัยซีท

PRODUCT DEVELOPMENT FOR RICE BLAST DISEASE CONTROL
FROM ACTINOMYCETES



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2560

KMITL-2017-SC-M-020-033

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCT DEVELOPMENT FOR RICE BLAST DISEASE CONTROL
FROM ACTINOMYCETES



NARISSARA KUMKAEW

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
YEAR 2017
KMITL-2017-SC-M-020-033

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2017

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

“การพัฒนาผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคใบไหม้ข้าวจากเชื้อแอคติโนมัยซีท”
(PRODUCT DEVELOPMENT FOR RICE BLAST DISEASE
CONTROL FROM ACTINOMYCETES)

ชื่อนักศึกษา

นางสาวนริศรา กำแก้ว

รหัสประจำตัว

58605051

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการ ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง) ผศ.ภญ.ดร.วีณา นกุลการ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ รศ.ดร.จิตติ ท่าไฉ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	

วัน/ เดือน/ ปี ที่สอบ 4 กรกฎาคม พ.ศ. 2560 เวลา 13.00 - 16.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง 308 อาคารพระจอมเกล้า

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุชนิ ธนะบริพัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่.../4...เดือน.../คต...พ.ศ. 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคใบไหม้ข้าวจากเชื้อแอคติโนมัยซีท
ชื่อนักศึกษา	นริศรา กำแก้ว
รหัสประจำตัว	58605051
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. จิตติ พ่าไฉ

บทคัดย่อ

แอคติโนมัยซีท จำนวน 15 ไอโซเลต ถูกแยกมาจากต้นข้าวและดินบริเวณรอบๆรากข้าวและถูกนำมาวิเคราะห์ลักษณะทางอนุกรมวิธานด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าแอคติโนมัยซีทเหล่านี้เป็นสมาชิกของแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Amycolatopsis* และ *Actinomadura* จากการคัดกรองสำหรับกิจกรรมการต้านเชื้อก่อโรคใบไหม้ข้าว (*anti-Pyricuraria grisea*) พบเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ AT1L-8, AT1S-8 และ SLB1-1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าวได้ดี จึงถูกคัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลว 3 ชนิด ได้แก่ Potato dextrose broth (PDB), Yeast extract Malt extract broth (YM) และ Glycerol molasses peptone broth (GMP) เพื่อหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Pyricuraria grisea* ที่ดี พบว่าสายพันธุ์ AT1S-8 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร GMP สามารถยับยั้งเชื้อ *Pyricuraria grisea* ได้สูงที่สุด จากนั้นนำผงน้ำหมักของเชื้อ AT1S-8 มาทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าวโดยทำการทดลอง 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v) ซึ่งแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งได้ 90.52, 92.94, 94.38, 97.94 และ 99.33 % ตามลำดับ จากการทดลองนี้พบว่า ความเข้มข้นที่ระดับ 0.4 และ 0.5 %w/v สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าวได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงเลือกความเข้มข้นที่ระดับ 0.4 %w/v มาทำการขึ้นตำรับผลิตภัณฑ์โดยการเติมสารลดแรงตึงผิว 4 ชนิด ได้แก่ Np9, Tergitol (15-S-5), Tergitol (15-S-7) และ Triton (X-100) เพื่อทดสอบการป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ข้าวในระดับโรงเรือน พบว่าตำรับผลิตภัณฑ์ที่ผสม Tergitol (15-S-7) ความเข้มข้น 0.1 %w/v (Anti-*P. grisea* product I) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricuraria grisea* ได้สูงที่สุด จึงนำตำรับนี้ไปใช้ทดสอบในระดับแปลงนา และพบว่าตำรับผลิตภัณฑ์ที่ระดับความเข้มข้น 2 เท่าสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งและป้องกันโรคใบไหม้ข้าวได้เทียบเท่ากับสารเคมีกำจัดเชื้อรามาตรฐาน carbendazim ที่ระดับความเข้มข้น 0.1%

คำสำคัญ : การควบคุมโรคแบบชีววิธี พัฒนาผลิตภัณฑ์ โรคใบไหม้ข้าว แอคติโนมัยสีท



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Product development for rice blast disease control from actinomycetes
Student Name	Narissara Kumkaew
Student ID	58605051
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
Year	2017
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Chitti Thawai

Abstract

Fifteen endophytic actinomycete strains were isolated from the stem of rice and rhizosphere soils and were taxonomically determined using a procedure with the combination of morphological and the 16S rRNA gene sequence analyses. The results showed that the actinomycete strains were classified into 4 genera, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Amycolatopsis* and *Actinomadura*. The result of the preliminary screening for anti-rice blast disease activity (anti-*Pyricularia grisea*) revealed that three actinomycete strains, AT1L-8, AT1S-8 and SLB1-1 exhibited the strong anti-rice blast disease activity against *Pyricularia grisea*. With this reason, these three strains were selected to cultivate in three culture broths, Potato dextrose broth (PDB), Yeast extract Malt extract broth (YM) and Glycerol molasses peptone broth (GMP). The result showed that the glycerol molasses peptone broth cultivating with strain AT1S-8 exhibited the best capacity to inhibit the growth of *Pyricularia grisea*. After that, five concentrations, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5% w/v of the freeze dried powder of this fermentation broth were tested for anti-rice blast disease activity. The result revealed that the concentration of 0.4 and 0.5 %w/v of the fermentation powder showed no significantly statistic difference for anti-rice blast disease activity. Consequently, the 0.4% fermentation powder was formulated for Anti-*P. grisea* product using four different surfactant, Np9, Tergitol (15-S-5), Tergitol (15-S) -7) and Triton (X-100), for evaluating the anti-rice blast disease activity (preventive and curative tests) in the green house. This study found that the mixture solution preparing from 0.4% freeze-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

dried fermentation powder in water supplemented with 0.1% Tergitol 15-S-7 (Anti-*P. grisea* product I) revealed the highest antifungal activity against *P. grisea*. Therefore, the Anti-*P. grisea* product I was used for testing the inhibition capacity for the growth of *P. grisea* in paddy field. Finally, we found that the 2X Anti-*P. grisea* product I had the anti-*P. grisea* efficiency which was closed to 0.1% carbendazim, the commercial antifungal product.

Keywords : Biological control, Product development, Blast disease, Actinomycetes



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจากหลายท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.จิตติ ท่าไผ่ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ระหว่างการดำเนินการค้นคว้าวิจัย ให้ความอนุเคราะห์ทั้งอุปกรณ์ สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง และอำนวยความสะดวกในการวิจัยตลอดจนตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความถูกต้อง และสมบูรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา และ ดร.นงลักษณ์ เภรินทวงศ์ อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าว เมล็ดพืชพืช เชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าว และสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ดุสิต เอื้ออำนวย อาจารย์ภาควิชาการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือในการทดสอบความเป็นพิษต่อปลาและให้ความรู้ตลอดการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์ อาจารย์ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์สถิติในทุกการทดลอง

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวศิริเรือง ที่ให้การสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ทั้งการทดลองควบคุมโรคใบไหม้ข้าวในระดับโรงเรียนและแปลงนาระบบเปิด จนทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์สำเร็จได้ด้วยดี

นริศรา กำแก้ว

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ข้าว.....	3
2.2 โรคที่เกิดขึ้นในข้าวที่สำคัญ.....	4
2.3 การแก้ปัญหาและการควบคุมโรคใบไหม้ในข้าว.....	7
2.3.1 วิธีทางเคมี.....	7
2.3.2 วิธีทางชีวภาพและสารผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์.....	8
2.4 การนำเชื้อแอคติโนมัยสีทมาใช้ควบคุมเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าว.....	13
2.4.1 ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยสีท.....	13
2.4.2 การจัดจำแนกแอคติโนมัยสีท.....	15
2.4.3 การนำแอคติโนมัยสีทมาใช้ยับยั้งเชื้อก่อโรค.....	17
2.5 สารที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมทางชีวภาพ.....	20
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	26
3.1 เครื่องมือ.....	26
3.2 วิธีการวิจัย.....	27
3.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา.....	27
3.2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยสีท.....	27
3.2.3 การคัดเลือกเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบไหม้และแบคทีเรียทดสอบ.....	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.4 การศึกษาชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้	32
3.2.5 การผลิตผลิตภัณฑ์ควบคุมเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าวจากสารออกฤทธิ์ของ แอสติโนมัยสีที่คัดเลือก	33
3.2.6 การทดสอบผลิตภัณฑ์ในการควบคุมโรคใบไหม้ข้าวในโรงเรือน	35
3.2.7 การทดสอบผลิตภัณฑ์ในการควบคุมโรคใบไหม้ข้าวในแปลงนาระบบเปิด.....	36
3.2.8 การทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ต่อสัตว์น้ำและต่อเซลล์.....	37
3.2.9 การทดสอบผลิตภัณฑ์ในการป้องกันกำจัดวัชพืช	38
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	40
4.1 การเก็บตัวอย่างการแยกเชื้อ และเชื้อที่ใช้ในการศึกษา	40
4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอสติโนมัยสี	65
4.3 การคัดเลือกเชื้อแอสติโนมัยสีที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์	70
4.4 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าว (<i>P. grisea</i>) จากเชื้อ แอสติโนมัยสีโดยใช้วิธี dual culture	71
4.5 การศึกษาชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้.....	73
4.6 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำหมักจากเชื้อแอสติโนมัยสีแบบผง (Powder of cell-free culture filtrate)	75
4.7 การผลิตผลิตภัณฑ์ควบคุมเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าวจากสารออกฤทธิ์ของเชื้อ แอสติโนมัยสีที่คัดเลือก	75
4.8 การประเมินผลการควบคุมโรคใบไหม้ข้าวด้วยตำรับผลิตภัณฑ์น้ำหมักจาก แอสติโนมัยสีในโรงเรือน.....	77
4.9 การประเมินผลการควบคุมโรคใบไหม้ข้าว ด้วยน้ำหมักจากเชื้อแอสติโนมัยสี ในแปลงนาระบบเปิด.....	86
4.10 การทดสอบความเป็นพิษของตำรับผลิตภัณฑ์ต่อสัตว์น้ำและความเป็นพิษต่อเซลล์	91
4.11 ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์ในการกำจัดวัชพืชและการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว..	91
4.12 ผลการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในสภาวะเร่ง	95
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	97
5.1 สรุปผลการวิจัย	97
5.2 ข้อเสนอแนะ	98
เอกสารอ้างอิง	99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก.....	103
ภาคผนวก ก.....	104
ภาคผนวก ข.....	109
ภาคผนวก ค.....	110
ประวัติผู้เขียน.....	111



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม แอคติโนมัยสีท ที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	24
3.1	ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	29
3.2	วงจรพีซีอาร์ (PCR cycles)	29
3.3	ส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene.....	30
3.4	โปรแกรม Big dye	30
3.5	ตำรับผลิตภัณฑ์น้ำหมักจากเชื้อแอคติโนมัยสีท	34
4.1	รายละเอียดของตัวอย่าง และเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการศึกษา	41
4.2	การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar cross streak.....	70
4.3	ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าว (<i>P. grisea</i>) ของ แอคติโนมัยสีทโดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน.....	72
4.4	ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ (<i>P. grisea</i>)	73
4.5	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราก่อโรค (<i>P. grisea</i>) ด้วยน้ำหมักจากเชื้อแอคติโน มัยสีทในอาหาร GMP รูปแบบผงความเข้มข้นต่างๆ	74
4.6	ตำรับผลิตภัณฑ์ควบคุมเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าว.....	75
4.7	อัตราการเกิดโรคใบไหม้ข้าวในการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้ของตำรับ ผลิตภัณฑ์	78
4.8	อัตราการเกิดโรคใบไหม้ข้าวในการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ของตำรับ ผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I ในแปลงนาระบบเปิด	87
4.9	แสดงอัตราการเกิดโรคใบไหม้ข้าวในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบไหม้ของตำรับ ผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I ในแปลงนาระบบเปิด	87
4.10	ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I ต่ออัตราการกำจัดวัชพืชและการยับยั้ง การงอกของเมล็ดข้าว	92
4.11	ผลการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราก่อโรคของผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I.....	95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การจัดหมวดหมู่แอกติโนแบคทีเรียของ Zhi (2009)	17
2.2 สูตรโครงสร้าง alkyloxypolyethyleneoxyethanol.....	20
3.1 ทดสอบโดยวิธี dual culture technique	32
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต 51B-9-11	41
4.2 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต 51B-9-11 บน phylogenetic tree	42
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต AT1L-8	43
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต AT1S-8	44
4.5 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AT1L-8 และ AT1S-8 บน phylogenetic tree.....	45
4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต SLB1-1.....	46
4.7 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต SLB1-1 บน phylogenetic tree	47
4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต CP2R-9-A1	48
4.9 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CP2R9-A1 บน phylogenetic tree.....	49
4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต DCWR-9-1.....	50
4.11 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต DCWR-9-1บน phylogenetic tree.....	51
4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต DCWR-9-8-2.....	52
4.13 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต DCWR-9-8-2 บน phylogenetic tree.....	53
4.14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต 51B-4-3.....	54
4.15 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต 51B-4-3 บน phylogenetic tree.....	55
4.16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6	56
4.17 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 บน phylogenetic tree.....	57
4.18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต 51B-9-11.....	58
4.19 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต 51B-9-1 บน phylogenetic tree	59
4.20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PP2R-9-A1	60
4.21 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PP2R-9-A1 บน phylogenetic tree.....	61
4.22 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต SL3-70	62
4.23 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต SL3-70 บน phylogenetic tree	63
4.24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต U47BR-9-6.....	64
4.25 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต U47BR-9-6 บน phylogenetic tree	65
4.26 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต UHR-9-5.....	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ญ

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.27 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต UHR-9-5 บน phylogenetic tree	67
4.28 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต UT1R-9-4.....	69
4.29 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต UT1R-9-4 บน phylogenetic tree.....	68
4.30 ผลการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยใช้แอคติโนมัยซีทด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงร่วมกัน	72
4.31 ประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ข้าวในระดับโรงเรือนของผลิตภัณฑ์ตำรับต่างๆเปรียบเทียบกับสารเคมียับยั้งเชื้อราทางการค้า (Carbendazim) หลังผ่านไป 72 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมง.....	80
4.32 ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบไหม้ข้าวในระดับโรงเรือนของผลิตภัณฑ์ตำรับต่างๆเปรียบเทียบกับสารเคมียับยั้งเชื้อราทางการค้า (Carbendazim) หลังผ่านไป 72 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมง.....	81
4.33 ประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ของผลิตภัณฑ์จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต AT1S-8 ตำรับต่างๆ หลังผ่านการปลูกเชื้อไป 72 ชั่วโมง	82
4.34 ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบไหม้ของผลิตภัณฑ์จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต AT1S-8 ตำรับต่างๆ หลังผ่านการปลูกเชื้อไป 72 ชั่วโมง.....	84
4.35 ประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ข้าวในแปลงนาระบบเปิดของตำรับผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I เปรียบเทียบกับสารเคมียับยั้งเชื้อราทางการค้า (Carbendazim)	88
4.36 ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบไหม้ข้าวในแปลงนาระบบเปิดของตำรับผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I เปรียบเทียบกับสารเคมียับยั้งเชื้อราทางการค้า (Carbendazim)	88
4.37 ประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ตำรับของผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I ในแปลงนาระบบเปิดในวันที่ 3 และวันที่ 7.....	89
4.38 ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบไหม้ของตำรับผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I ในแปลงนาระบบเปิดในวันที่ 3 และวันที่ 7.....	90
4.39 ประสิทธิภาพการกำจัดเมล็ดหญ้าข้าวนอกของผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I.....	93
4.40 ประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าวของผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I....	94
4.41 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคใบไหม้จากผลิตภัณฑ์ที่ผ่านสภาวะเร่ง ..	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันการทำนาข้าวไม่เพียงแต่บริโภคเท่านั้น การค้าขายที่มากขึ้นในยุคสมัยที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้ต้องทำนาหลายครั้งในรอบปี โดยเกษตรกรส่วนใหญ่มุ่งที่จะทำนาเพื่อขายข้าวเป็นหลัก จึงมีการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่เข้ามาใช้มากขึ้น เพื่อให้ได้ผลผลิตที่รวดเร็วและมากที่สุดแต่คุณภาพกลับสวนทางกับผลผลิต เมื่อมีการระบาดของโรคเกิดขึ้นในนาข้าวเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคอย่างแพร่หลาย ซึ่งก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในข้าวและสิ่งแวดล้อม เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและเกษตรกรเอง ปัญหาของโรคระบาดในนาข้าวที่พบเป็นประจำ ได้แก่ โรคใบชیدن้ำตาล โรคใบจุดน้ำตาล โรคกาบใบแห้ง โรคกาบใบเน่า โรคถอดฝักดาบ โรคใบไหม้ โรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญมากอันดับหนึ่งของข้าว เชื้อนี้สามารถทำลายต้นข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง (Chin, 1994) ซึ่งปัจจัยที่เอื้ออำนวยต่อการระบาดของโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง ได้แก่ พันธุ์ข้าวที่อ่อนแอ โดยเฉพาะพันธุ์ข้าว กข 6, ข้าวดอกมะลิ 105 และ กข 15 รวมถึงการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในระดับสูง อีกทั้งสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งในการระบาดของโรค สารเคมีกำจัดโรคไหม้ของข้าวที่นิยมใช้ เช่น isoprothiolane (Fuji one), tricyclazole (Beam 75% wp), Azoxystrobin + Difenconazole (Ortiva 32 SC) และ Carbendazim (Cardazin-F) (ธีระวัชและจำรัส, 2557) แต่หากใช้ในปริมาณมากอย่างต่อเนื่องหรือใช้เกินความจำเป็นจะก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับระบบนิเวศรวมถึงการกลายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณสารเคมีในการกำจัด

ปัจจุบันมีการนำเชื้อแอคติโนมัยสีทมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการควบคุมแบบชีววิธี (biocontrol) มากขึ้น เนื่องจากเป็นกลุ่มที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิต่างๆ และ/หรือผลิตสารที่กระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงต้านทานโรคและแมลงได้ ด้วยเหตุนี้การวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะนำแอคติโนมัยสีทมาประยุกต์ใช้และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ข้าวและคาดหวังให้เป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการทดลอง
- 2) ศึกษาอาหารที่เหมาะสมเพื่อให้แอคติโนมัยสีทสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคใบไหม้ในข้าวที่ดีที่สุด
- 3) ศึกษาการขึ้นตำรับ (formulation) ที่เหมาะสมในการทำผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคใบไหม้ข้าวของแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคใบไหม้ในข้าว จากผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ โรงเรือนควบคุม และแปลงปลูกระบบเปิด

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยซีทที่ถูกแยกมาจากดินบริเวณรอบรากข้าวและภายในรากข้าว

2) ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราใบไหม้ข้าว (*Pyricularia grisea*) เบื้องต้นของแอคติโนมัยซีท

3) คัดเลือกแอคติโนมัยซีท 3 ไอโซเลต ที่สร้างสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราใบไหม้ข้าวที่ดีที่สุด จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดคือ potato dextrose broth (PDB), yeast extract malt extract broth (ISP2), glycerol molasses peptone broth (GMP) คัดเลือกชนิดที่ดีที่สุดมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์

4) ศึกษาตำรับ (formulation) ที่เหมาะสมในการทำผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคใบไหม้ข้าว โดยเตรียมสารให้อยู่ในรูปสารละลายเข้มข้น (Soluble concentrate (SC)) ที่ผสมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ชนิดต่างๆ 4 ชนิด คือ Np9, Tergitol (15-S-5), Tergitol (15-S-7) และ triton (X-100)

5) ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตำรับผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาได้กับสารควบคุมโรคใบไหม้ข้าวทางการค้า (Carbendazim) ในระดับโรงเรือน โดยศึกษาทั้งประสิทธิภาพในป้องกันโรค และยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ข้าว คัดเลือกตำรับผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุดมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

6) เลือกตำรับที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากในระดับโรงเรือนไปศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาได้กับสารควบคุมโรคใบไหม้ข้าวทางการค้า (Carbendazim) ในแปลงนา ระบบเปิด โดยศึกษาทั้งประสิทธิภาพในป้องกันโรค และยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ข้าว

7) นำผลิตภัณฑ์มาทดสอบความเป็นพิษต่อปลาและความเป็นพิษต่อเซลล์

8) นำผลิตภัณฑ์มาศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งวัชพืชทดสอบ

9) นำผลิตภัณฑ์มาทดสอบความคงตัว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบข้อมูลอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยซีทที่ใช้ในการทดลอง

2) สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคใบไหม้ในข้าวที่ดี

3) ได้ตำรับผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคใบไหม้ในข้าวจากแอคติโนมัยซีท

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว

ข้าวเป็นพืชตระกูลหญ้า (Family Gramineae) ลำต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน มีใบเลี้ยงเดี่ยว และส่วนใหญ่เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุได้เพียง 1 ปี มีรากเป็นระบบรากฝอย เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน และเขตอบอุ่น สามารถปลูกได้ทั้งในที่ที่มีและไม่มีน้ำขังก็ได้ เจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ตามสภาพแวดล้อมแต่ละแห่ง จึงนับได้ว่าข้าวเป็นพืชที่มีความสามารถในการพัฒนาและปรับตัวให้เหมาะกับสภาพภูมิประเทศได้อย่างกว้างขวาง ในประเทศไทยมีพันธุ์ข้าวที่ใช้ปลูกอยู่มากกว่า 3,500 พันธุ์ ข้าวที่นิยมนำมาปลูกเพื่อบริโภคแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ *Oryza sativa* L. ซึ่งปลูกในทวีปเอเชีย และ *Oryza glaberrima* Steud. ซึ่งปลูกในทวีปแอฟริกา ข้าวที่ผลิตเพื่อการค้าขายในตลาดโลกเป็น *Oryza sativa* เกือบทั้งหมด แบ่งเป็น 3 ชนิดย่อย (subspecies) คือ

1. ข้าวอินดิกา (Indica) หรือข้าวเจ้า เป็นข้าวที่มีลักษณะเมล็ดเรียวยาวรี ลำต้นสูง ตั้งชื่อมาจาก แหล่งที่ ค้นพบครั้งแรกในประเทศอินเดีย เป็นข้าวที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชียเขตร้อน ตั้งแต่ จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย ไปจนถึงอินเดียและศรีลังกา และแพร่กระจายไปทั้งเขตอุษาคเนย์ตั้งแต่หลัง พ.ศ. 1000 ทั้งเขตลุ่มน้ำอิระวดี และต่อมาแพร่ขยายเพาะปลูกในทวีปอเมริกา เฉพาะในเมืองไทย ข้าวอินดิกา นิยมเพาะปลูก ในบริเวณที่ราบลุ่มตอนใต้ของแม่น้ำเจ้าพระยา เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว แทนข้าวเหนียวที่เคยปลูก ซึ่งคนไทยสมัยนั้นเรียกข้าวอินดิกาที่มาจากต่างประเทศ ว่า “ข้าวของเจ้า” แล้วเรียกกันสั้นลงเหลือเพียง “ข้าวเจ้า” มาถึงทุกวันนี้

2. ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวเหนียวเมล็ดป้อม กลมรี มีแหล่งกำเนิดจากทางภาคเหนือ แล้วผ่าน มาทางลุ่มแม่น้ำโขง ในสมัยก่อนพุทธศตวรรษที่ 20 หลังจากนั้นลดจำนวนลงไปแพร่หลาย ในเขตอบอุ่นที่ ญี่ปุ่น เกาหลี รัสเซีย ยุโรป และอเมริกา

3. ข้าวจาวานิกา (Javanica) เป็นข้าวลักษณะเมล็ดป้อมใหญ่สันนิษฐานว่า เป็นข้าวพันธุ์ผสมระหว่าง ข้าวอินดิกาและจาปอนิกา นิยมเพาะปลูกใน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน หมู่เกาะริวกิว และญี่ปุ่น แต่ไม่ ค่อยได้รับความนิยมนักเพราะให้ผลผลิตต่ำ ประเทศต่างๆในโลกต่างก็มีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวใหม่ เพิ่มพื้นที่การเพาะปลูกข้าวและวิธีการปลูกข้าวให้ได้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้น ในขณะที่ตำนานเกี่ยวกับข้าวของแต่ละชาติต่างก็มีประวัติศาสตร์อันยาวนาน

ข้าวมีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากต่อสังคมไทยซึ่งมีวัฒนธรรมการรับประทานข้าวเป็นอาหารหลัก และเป็นสินค้าส่งออกที่มีความสำคัญอย่างมากต่อเศรษฐกิจของประเทศ ข้าวถือเป็นสินค้าเกษตร ที่มีมูลค่าการส่งออกเป็นอันดับ 2 รองจากยางธรรมชาติ โดยมีมูลค่าการส่งออกของข้าวและผลิตภัณฑ์เท่ากับ 180,727 ล้านบาท ในปี 2553 และประเทศไทยมีผลผลิตข้าวต่อไร่เท่ากับ 35.584 ล้านตัน เป็นอันดับที่ 7 ของโลก ในปี 2553 โดยประเทศไทยมีพื้นที่ที่ใช้เพาะปลูกข้าวประมาณ

80.676 ล้านไร่ คิดเป็นพื้นที่เกือบครึ่งหนึ่งของพื้นที่เพาะปลูกทั้งประเทศ (151.923 ล้านไร่) (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ข้าวเป็นธัญพืชซึ่งประชากรโลกบริโภคเป็นอาหารสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย จากข้อมูลปี 2553 ข้าวเป็นธัญพืชซึ่งมีการปลูกมากที่สุดเป็นอันดับสองทั่วโลก รองจากข้าวโพด (กลุ่มถ่ายทอดวิทยาการผลิตเมล็ดพันธุ์ดี ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวขอนแก่น, 2553) ข้าวเป็นธัญพืชสำคัญที่สุดในด้านโภชนาการและการได้รับแคลอรีของมนุษย์ เพราะข้าวโพดส่วนใหญ่ปลูกเพื่อจุดประสงค์อื่น มิใช่ให้มนุษย์บริโภค ทั้งนี้ ข้าวคิดเป็นพลังงานกว่าหนึ่งในห้าที่มนุษย์ทั่วโลกบริโภค (Smith, 1998) สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทยได้รายงานราคาขายปลีกข้าวสารในตลาดกรุงเทพฯ ประจำวันที่ 22-28 กุมภาพันธ์ 2560 ไว้ว่าข้าวสารเจ้าชนิด 100% (ข้าวหอม) ราคาอยู่ที่ 580-650 บาทต่อ 15 กิโลกรัม เป็นราคาซื้อขายข้าวตามมาตรฐานกระทรวงพาณิชย์ (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2560) แสดงให้เห็นว่าข้าวเป็นสินค้าที่มีความสำคัญอย่างมากของไทย อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญที่ส่งผลต่อผลผลิตโดยรวมของข้าวมีอยู่ด้วยกันหลายด้าน เช่น ปัญหาเรื่องการชลประทาน ปัญหาเรื่องคุณภาพดิน และที่สำคัญคือปัญหาที่เกิดขึ้นจากการบุกทำลายโดยศัตรูพืชทั้งที่เป็นสัตว์ เชื้อไวรัส เชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย ปัญหาต่างๆ เหล่านี้หากจะแก้ไขต้องเสียค่าใช้จ่ายที่มากขึ้นและอาจไม่คุ้มกับการลงทุน โดยปกติแล้วหากปล่อยให้ต้นข้าวเป็นโรคจะยากต่อการรักษา ดังนั้นจึงควรเน้นในเรื่องการป้องกันก่อนเกิดโรค การเตรียมพื้นที่ให้เหมาะสมสำหรับการปลูกข้าวช่วยแก้ปัญหาเรื่องคุณภาพของดิน ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของข้าว โดยปรับสภาพดินให้เหมาะสมกับการงอกของเมล็ดข้าว การเจริญเติบโตของข้าวรวมถึงการช่วยควบคุมวัชพืช โรค แมลงศัตรูข้าวและสัตว์ศัตรูข้าวที่อาศัยอยู่ในดิน

2.2 โรคที่เกิดขึ้นในข้าวที่สำคัญ

โรคข้าว หมายถึง ความผิดปกติที่ต้นข้าวแสดงออก (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2550) สาเหตุของโรคอาจเกิดจากสิ่งมีชีวิตหรือไม่มีชีวิต อาจเกิดขึ้นเดี่ยวๆ หรือเกิดร่วมกันก็ได้ สิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรคจะเรียกว่า เชื้อโรค เชื้อสาเหตุของโรคข้าวอาจเกิดจาก เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไฟโตพลาสมา และไส้เดือนฝอย จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถทำให้ต้นข้าวแสดงอาการผิดปกติได้ชัดเจนที่ใบ ลำต้น กาบใบ รวงหรือเมล็ด ลักษณะอาการของโรค อาจแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ดังนี้

1. ต้นเตี้ยแคระแกรน
2. ใบมีสีผิดปกติ เช่น เหลือง หรือต่างชนิด
3. ตายเป็นจุดๆ ตามเนื้อเยื่อ เช่น ใบจุด ใบขีด หรือใบแห้ง
4. อาการเหี่ยวเนื่องจากการอุดตันของท่อน้ำท่ออาหาร
5. ส่วนของพืชผิดปกติ เช่น โรคดอกกระถิน โรครากปม ฯลฯ

โรคข้าวที่สำคัญแบ่งตามเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเป็น 3 ประเภท ดังนี้ 1). โรคที่เกิดจากเชื้อรา (fungus) ที่สำคัญคือ โรคกาบใบแห้ง (sheath blight) เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(*Thanatephorus cucumeris*), โรคไหม้ (rice blast) ที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia oryzae*, โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown leaf spot) เกิดจากเชื้อ *Helminthosporium oryzae*, โรคใบขีดสีน้ำตาล (narrow brown leaf spot) เกิดจากเชื้อ *Cercospora oryzae*, โรคถอดฝักดาบหรือโรคข้าวตัวผู้ (bakanae disease) เกิดจากเชื้อ *Gibberella fujjuroi*, โรคกาบใบเน่า (sheath rot) เกิดจากเชื้อ *Acrocyndrium oryzae*, โรคดอกกระถิน (false smut) เกิดจากเชื้อ *Ustilagoideae virens* 2). โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (bacteria) ที่สำคัญคือ โรคขอบใบแห้ง (bacteria leaf blight) เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae*, โรคใบขีดโปร่งแสง (bacteria leaf streak) เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas translucens* 3). โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส (virus) และมัยโคพลาสมา (*Mycoplasma*) ที่สำคัญคือ โรคใบสีส้ม (yellow orange leaf virus disease) เกิดจากเชื้อไวรัส โดยมีเพลี้ยจักจั่นหลายชนิดเป็นพาหะ เช่น เพลี้ยจักจั่นสีเขียว (*Nephotettix virescens* และ *Nephotettix nigropictus*) เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก (*Recilia darsalis*), โรคจู๋ หรือใบหงิก (ragged stunt disease) เกิดจากเชื้อไวรัส โดยมีเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*) เป็นพาหะ, โรคเหลืองเตี้ย (yellow dwarf disease) เกิดจากเชื้อ *Mycoplasma* โดยมีเพลี้ยจักจั่นสีเขียว (*N. virescens*, *N. nigropictus* และ *Nephotettix cincticeps*) เป็นพาหะ, โรคเขียวเตี้ย (grassy stunt disease) เกิดจากเชื้อ *Mycoplasma* โดยมีเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*) เป็นพาหะ

โรคกาบใบแห้ง (Sheath blight) เกิดขึ้นจากการบุกรุกของเชื้อรา *R. solani* โดยเชื้อราชนิดนี้ก่อให้เกิดอาการกาบใบแห้ง ต้นพืชจะเริ่มแสดงอาการของโรคในระยะแตกกอจนถึงระยะใกล้เก็บเกี่ยว อาการของโรคจะรุนแรงมากขึ้นในกรณีที่ดินข้าวมีการแตกกอเป็นจำนวนมาก เนื่องจากมีการติดต่อกันระหว่างต้นในกอเดียวกัน ลักษณะบริเวณที่เกิดโรคจะมีแผลเป็นสีเขียวปนเทา ขนาดกว้างประมาณ 1 x 2 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 4 x 10 มิลลิเมตร ปรากฏตามกาบใบตรงบริเวณใกล้ระดับน้ำ (ศุภนย์เมธิต์พันธุ์ข้าวขอนแก่น, 2555) แผลนี้สามารถขยายขนาดได้อย่างไม่จำกัดและแพร่ไปยังส่วนใบของข้าวได้ ในกรณีของข้าวที่เป็นพันธุ์ไม่ต้านทานโรค แผลสามารถลุกลามไปจนถึงใบธงและกาบหุ้มรวงข้าว ทำให้ใบและกาบใบเหี่ยวแห้ง ส่งผลให้เมล็ดข้าวไม่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ โดยเฉพาะเมล็ดที่อยู่ทางด้านล่างของรวงข้าว และนำไปสู่การลดลงของอัตราการผลิตของเมล็ดพันธุ์ข้าว (Vidhyasekaran P., 1997) การแพร่ระบาด เชื้อราสามารถสร้างสปอร์และขยายพันธุ์ในตอซังหรือวัชพืชที่อยู่ได้นานในท้องนา และมีชีวิตข้ามฤดูหมุนเวียนทำลายข้าวได้ตลอดฤดูกาลทำนา (ศุภนย์เมธิต์พันธุ์ข้าวขอนแก่น, 2555)

โรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease) เป็นโรคที่มีการแพร่ระบาดไปในพื้นที่เพาะปลูกในภาคต่างๆ ทั่วประเทศ โดยเฉพาะพื้นที่ที่อยู่ใกล้ถนน หรือที่ลุ่มที่มีน้ำขังเป็นเวลานาน สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* ซึ่งบุกรุกเข้าทำลายต้นข้าวผ่านทางแผลที่เกิดขึ้นในใบ หรือรากพืช ต้นข้าวที่อยู่ในระยะแตกกอ และออกรวงเป็นระยะที่แสดงอาการของโรคอย่างรุนแรง

โดยต้นพืชจะมีแสดงอาการเป็นแผลซ้ำสีเทาในส่วนของใบในระยะแตกกอและใบธงในระยะออกรวง แผลนี้จะเกิดขึ้นที่บริเวณขอบและปลายของใบแล้วลุกลามขยายไปยังส่วนที่เป็นข้อต่อของใบ ใบของข้าวสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานโรคชนิดนี้จะแสดงอาการเป็นโรคจนแห้งตายไปทั้งใบ (ประภาส, 2526)

โรคใบไหม้ข้าว (rice blast disease) เป็นโรคที่มีความสำคัญทำให้ผลผลิตของข้าวเสียหายได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เชื้อนี้สามารถเข้าทำลายพืชตระกูลหญ้าได้หลายชนิด ตั้งแต่ข้าว (*Oryza sativa* L.) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) และพืชตระกูลมิลเล็ท (*Eleusine* spp., *Echinochloa* spp., *Panicum* spp. และ *Setaria* spp.) (Asuyama, 1965; พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) เชื้อรานี้มีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศซึ่งพบทั่วไปเชื้อที่เข้าทำลายข้าวมีชื่อเรียกว่า *P. grisea* Sacc. (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2552) และเรียกชื่อเชื้อโรคใบไหม้ข้าวในระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศว่า *M. grisea* Barr. (Rossman *et al.*, 1990) ความเสียหายจากโรคนี้ทำให้ผลผลิตลดลงได้ 0.4 – 100 เปอร์เซ็นต์ ประเทศไทยพบการระบาดของโรคใหม่ทำให้ผลผลิตข้าวเสียหาย 60 เปอร์เซ็นต์ (Disthaporn, 1994; ชัชวาล และ สุธีพร, 2552) พบมากในนาข้าวในในพื้นที่เพาะปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมืองไวต่อช่วงแสง โรคนี้ระบาดทั่วไป ในทุกภาคของประเทศไทย (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 3) โรคใบไหม้ข้าวเกิดขึ้นในพื้นที่เพาะปลูกกว่า 85 ประเทศที่มีการเพาะปลูกข้าวทั้งข้าวนาและข้าวไร่ แม้ว่าความเสียหายส่วนมากได้รับอิทธิพลมาจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมแต่โรคนี้ถูกยอมรับว่าเป็นหนึ่งในโรคที่ร้ายแรงของการเพาะปลูกข้าวจากทั่วโลก (Kato, 2001) พบโรคใหม่ของข้าวครั้งแรกในประเทศจีนปี ค.ศ. 1637 ต่อมาจามีรายงานพบโรคนี้ในประเทศญี่ปุ่นเมื่อปี ค.ศ. 1704 และในประเทศอิตาลี เมื่อปี ค.ศ. 1828 โรคนี้เรียกว่า “Brisome” ต่อมาเมื่อมีการนำข้าวไปปลูกที่ประเทศสหรัฐอเมริกา จึงมีการพบโรคนี้เมื่อปี 1906 และพบความเสียหายอย่างมากจากโรคนี้ในปี ค.ศ. 1913 ที่ประเทศอินเดีย สำหรับประเทศไทยเริ่มศึกษาโรคใบไหม้ของข้าวในปี พ.ศ. 2498 ในเวลาต่อมาได้มีการศึกษาถึงการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค (วันวิสาข์, 2546) อาการของโรคใบไหม้ ในระยะกล้าที่ใบมีแผลจุดสีน้ำตาล ลักษณะคล้ายรูปตามีสีเทาอยู่ตรงกลางแผล มีขนาดแตกต่างกันความกว้างของรอยโรคอยู่ระหว่าง 2-5 มิลลิเมตร ความยาวประมาณ 10-15 มิลลิเมตร สามารถลุกลามจนเต็มทั่วทั้งใบ ในกรณีที่โรครุนแรงกล้าข้าวจะแห้งและพับตาย (Hajime, 2001) ระยะแตกกอ อาการพบได้ที่ใบ ข้อต่อของใบ และข้อต่อของ ลำต้น ขนาดแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้า แผลลุกลาม ติดต่อกันได้ที่บริเวณข้อต่อ ใบจะมีลักษณะแผลซ้ำสีน้ำตาลดำ และมักหลุดจากกาบใบเสมอ ระยะคอรวง (ระยะออกรวง) ถ้าข้าวเพิ่งจะเริ่มให้รวง เมื่อถูกเชื้อราเข้าทำลาย เมล็ดจะลีบหมด แต่ถ้าเป็นโรคตอนรวงข้าวแก่ ใกล้เคียงเกี่ยว จะปรากฏรอยแผลซ้ำสีน้ำตาลที่บริเวณคอรวง ทำให้เปราะ หักง่าย รวงข้าว ร่วงหล่นเสียหายมาก การแพร่ระบาด พบโรคในแปลงที่ต้นข้าวหนาแน่น ทำให้อับลม ถ้าใส่ปุ๋ยอัตราสูงและมีสภาพแห้งในตอนกลางวันและชื้นจัดในตอนกลางคืน ถ้าอากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิประมาณ 22 - 25 องศาเซลเซียส ลมแรง จะช่วยให้โรคแพร่กระจายได้ดี (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานสถานการณ์ศัตรูข้าวจากกรมการข้าว ระหว่างวันที่ 16-22 กุมภาพันธ์ 2560 ได้ระบุเกี่ยวกับโรคใบไหม้ข้าวไว้ ดังนี้ สภาพอากาศเหมาะสมกับการระบาดในภาคกลางและภาคเหนือ และค่อนข้างเหมาะสมกับการระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ควรสำรวจติดตามในพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรค เช่น พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, กข 6 และพันธุ์พื้นเมือง แปลงที่ปลูกข้าวแน่น และใส่ปุ๋ยไนโตรเจนสูง โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีรายงานค่าความเสี่ยงของสภาพอากาศในการเกิดโรคสูง ได้แก่ จังหวัดราชบุรี ชัยนาท สุโขทัย และจังหวัดเชียงราย และพื้นที่ที่มีรายงานการระบาดของกรมส่งเสริมการเกษตร ได้แก่ กรุงเทพมหานคร อุทัยธานี และจังหวัดปราจีนบุรี ในกรณีที่พบโรคไหม้มีอาการรุนแรงและพื้นที่ใบเสียหายจากการเป็นโรคถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ในข้าวระยะกล้าถึงแตกกอเต็มที่ และ 5 เปอร์เซ็นต์ ในข้าวระยะตั้งท้อง หรือพบแผลโรคไหม้ที่ใบธง ให้ควบคุมด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช ตามคำแนะนำของกรมการข้าว เช่น ไตรโซคลาโซล หรือ ไอโซโปรโธโอเลน หรือ คาร์เบนดาซิม

2.3 การแก้ปัญหา และการควบคุมโรคใบไหม้ในข้าว

การทำนาในประเทศไทยประสบปัญหาโรคไหม้ของข้าว เกิดการระบาดของศัตรูพืช และพาหะของเชื้อราสาเหตุของโรคไหม้ของข้าวทำให้ผู้ปลูกข้าวได้รับความเดือดร้อนไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ เกษตรกรส่วนใหญ่จึงนิยมแก้ไขปัญหการระบาดของโรคด้วยสารเคมีเพราะได้ผลดี สะดวก และทันการณ์ แต่สารเคมีก่อให้เกิดผลเสียตามมามากมาย อาทิ สารพิษตกค้างในดินและน้ำบริเวณพื้นที่ทำการเกษตร ตลอดจนผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (ชัชวาล และสุริพร, 2552) ซึ่งปัจจุบันการใช้สารจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดโรคพืชเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่สามารถนำมาพัฒนาใช้ทดแทนสารเคมีที่มีพิษสูงได้ (จินตนา และคณะ, 2559)

2.3.1 วิธีทางเคมี

สารเคมีที่นิยมใช้ป้องกันกำจัดเชื้อราจะมีมากกว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อแบคทีเรีย และไส้เดือนฝอย ทั้งนี้เพราะโรคพืชส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา ปัจจุบันได้มีการพัฒนาสารป้องกันกำจัดเชื้อรามากกว่า 300 ชนิด สารป้องกันกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (Bactericides) ประมาณ 18 ชนิด และสารฆ่าไส้เดือนฝอย (Nematicides) ประมาณ 40 ชนิด ส่วนโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสยังไม่มีสารเคมีในการป้องกันกำจัด (ธรรมศักดิ์, 2543) โดยมีวิธีป้องกันและกำจัดโรคใบไหม้ข้าว ดังนี้ ในแหล่งที่เคยมีการระบาดควรคลุกหรือแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยสารเคมีก่อนปลูก เช่น คาร์เบนดาซิม คาชูก้าไมซิน ไตรโซคาร์โซล คาร์เบนดาซิม แมนโคเซ็บ โดยคลุกเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยสารเคมี ก่อนปลูกในอัตราส่วนสารเคมีประมาณ 20-30 กรัมต่อข้าว 1 ถัง (10 กิโลกรัม) คลุกแล้วเก็บไว้นาน 2-3 สัปดาห์จึงนำไปปลูก หรือ แช่เมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยสารเคมีก่อนปลูกในอัตราส่วนสารเคมี 10-15 กรัมต่อน้ำ 5 ลิตร โดยแช่ทิ้งไว้ประมาณ 24-48 ชั่วโมง จึงนำไปปลูก เมื่อต้นข้าวอยู่ในระยะแตกกอสูงสุด หรือระยะให้รวงเมื่อพบโรครุนแรง ควรฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดเชื้อรา เช่น ไตรโซคาร์โซล คาร์เบนดาซิมบีโนมิล ไซแรมไตรโพรลิน ไอปีพี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชทุกชนิดควรมีความระมัดระวัง เพราะอาจเกิดอันตรายแก่ผู้ใช้ได้หากปฏิบัติไม่ถูกต้อง การใช้สารป้องกันกำจัดโรคใหม่ให้ได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้นแตกต่างกันไปแต่ละสถานที่ และฤดูกาลปลูกที่ต่างกัน เกษตรกรควรได้รับการแนะนำให้มีการเปลี่ยนหมุนเวียนของการใช้สารกำจัดเชื้อราอยู่เสมอต่อการป้องกันการพัฒนาของเชื้อที่สามารถทนต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดนั้น (Nasruddin and Amin, 2009)

ธีระวัชและจำรัส (2557) ศึกษาอิทธิพลของการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคไหม้คอรวงในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ซึ่งโรคไหม้เกิดจากเชื้อรา *P. grisea* (Cooke) Sacc. การทดลองนี้พบว่าเมื่อพ่นสารป้องกันกำจัดโรคไหม้ isoprothiolane (Fuji one) tricyclazole (Beam 75%wp) Azoxystrobin Difenconazole (Ortiva 32 SC) และ Carbendazim (Cardazin-F) ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไหม้ลดลง และผลผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแปลงที่ไม่พ่นสารเคมีและพ่นสารเคมี การทดลองนี้พบว่า สารเคมี Azoxystrobin Difenconazole มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไหม้สูงสุด ทำให้เมล็ดลีบน้อยที่สุด และได้ผลผลิตมากที่สุดคือ 669.11 กิโลกรัมต่อไร่ และมีค่าการเกิดโรคต่ำสุด และยังพบว่าแปลงที่ไม่พ่นสารป้องกันกำจัดโรคไหม้ทำให้ผลผลิตลดลง 50.90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับแปลงที่ให้ผลผลิตสูงสุด

2.3.2 วิธีการชีวภาพและสารผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์

เนื่องด้วยเกษตรกรขาดความรู้ความเข้าใจจึงแก้ไขปัญหาโรคใบไหม้โดยการใช้สารเคมีในปริมาณสูงอย่างต่อเนื่อง ใช้สารเคมีหลายชนิดผสมกัน และใช้ไม่ถูกต้องตามหลักวิชาการ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง และ เกิดผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกรรวมทั้งสิ่งแวดล้อม จากสถานการณ์ดังกล่าวจึงมีความจำเป็นยิ่งใน การนำเทคโนโลยีการจัดการโรคและแมลงศัตรูพืชที่ไม่ก่อปัญหาสารพิษตกค้างปลอดภัย และมีประสิทธิภาพสูงมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตทดแทนสารเคมี ซึ่งที่ได้รับความสนใจศึกษาและนำมาประยุกต์ใช้กันมาก คือ จุลินทรีย์ และสารสกัดหยาบจากพืช ดังนี้

จุลินทรีย์ในกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย รา โดยเฉพาะเชื้อแอคติโนมัยซีตจัดเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญที่สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ที่สำคัญเช่นกัน (Strobel *et al.*, 2004) ในกลุ่มของจุลินทรีย์ทั้งหมดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีตจัดเป็นกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด (Berdy, 2005) ทำให้มีการศึกษาทางด้านผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติจากเชื้อแบคทีเรียกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะการนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตรและทางการแพทย์ เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจัดได้ว่ามีความหลากหลายในแง่ของรูปแบบโครงสร้างของสารมากกว่าสารที่ได้จากการสังเคราะห์จากกระบวนการหรือปฏิกิริยาทางเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคทั้งในมนุษย์ สัตว์ และพืช (Takagi and Shin-Ya, 2012) ในปัจจุบันที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีกันอย่างแพร่หลายและนำไปสู่การดื้อยาหรือสารเคมีที่ใช้ ทำให้ต้องใช้สารเคมีปริมาณและความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตโดยตรง ความหลากหลายทางโครงสร้างที่สูงของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านั้นเกิดการปรับตัวได้ยากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติยังมีข้อดีที่เหนือกว่าการใช้สารเคมีสังเคราะห์อีกประการหนึ่งคือ สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินั้นมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าสารเคมีสังเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืชที่เป็นแมลงและจุลินทรีย์ในงานทางด้านเกษตรกรรม เนื่องจากสารเคมีเหล่านี้มีโอกาสสูงในการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และถูกส่งผ่านมายังมนุษย์ผ่านทางห่วงโซ่อาหาร (Strobel *et al.*, 2004) จากคุณสมบัติต่างๆ ดังกล่าว การศึกษาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงนับว่ามีความสำคัญอย่างมาก จุลินทรีย์เป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่นิยมนำมาใช้ศึกษาตรวจสอบเพื่อค้นหาสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ แหล่งที่อยู่อาศัยของแบคทีเรียนอกจากดินแล้วอีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจคือเนื้อเยื่อพืชจากส่วนต่างๆ เช่น ราก ลำต้น ใบ เป็นต้น โดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชและไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคหรืออันตรายกับพืชถูกเรียกรวมกันว่าแบคทีเรีย endophyte (Mei and Flinn, 2010) สาเหตุที่แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นประโยชน์เนื่องมาจากรายงานการวิจัยจำนวนมากที่ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืชได้ นอกจากนี้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ผลิตโดยแบคทีเรีย endophyte บางชนิดยังถูกพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ก่อโรคในคน สัตว์ และ พืชได้อีกด้วย (Ryan *et al.*, 2008) ลักษณะของพืชซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรีย endophyte ที่เหมาะสมต่อการศึกษาเพื่อค้นหาแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์มีอยู่ 5 ประการด้วยกัน ได้แก่ 1. พืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ที่อุดมสมบูรณ์ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง เช่นในประเทศในเขตร้อนชื้น 2. พืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ที่มีลักษณะเฉพาะ เช่นพื้นที่ที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ หรือพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารเคมีหรือโลหะหนัก พื้นที่รูปแบบนี้เปรียบได้กับกลไกการคัดเลือกทางธรรมชาติรูปแบบหนึ่ง พืชที่สามารถเจริญอยู่ได้จึงอาจมีการพึ่งพาแบคทีเรีย endophyte ให้สามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมดังกล่าวได้ 3. พืชที่ถูกปลูกในพื้นที่ที่มีการบุกรุกของเชื้อโรคแต่ไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่แบคทีเรีย endophyte ที่อยู่ในพืชนั้นอาจส่งเสริมให้เกิดกลไกการป้องกันตัวเองของพืชจากศัตรูพืชได้ดีขึ้น หรือแบคทีเรีย endophyte อาจมีการสร้างสารที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้ 4. พืชที่มีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นยาสมุนไพรโดยมนุษย์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชเหล่านี้อาจมีแบคทีเรีย endophyte ที่มีการผลิตสารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชและมนุษย์อยู่ด้วย และ 5. พืชที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในพื้นที่จำกัดพื้นที่หนึ่งมาเป็นช่วงระยะเวลายาวนาน ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะพบแบคทีเรีย endophytes ที่มีการวิวัฒนาการที่จำเพาะเจาะจงร่วมกับพืชชนิดนั้นๆ (Yu *et al.*, 2010) กลุ่มของแบคทีเรีย endophyte ที่ถูกพบว่ามีการสร้างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มแบคทีเรีย non-แอคติโนมัยสีท ตัวอย่างเช่นแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Pseudomonas*, *Burkholderia* และ *Bacillus* (Ryan *et al.*, 2008) และกลุ่มแบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท เช่นแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* และ *Micromonospora* เป็นต้น (Qin *et al.*, 2011) แบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกลุ่ม แอคติโนมัยสีท จัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาตรวจสอบการสร้างสรรค์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียและกลุ่มเชื้อรา เนื่องมาจากการวิจัยที่ผ่านมามีพบว่าประมาณร้อยละ 50 ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ค้นพบนั้นมาจากแบคทีเรียในกลุ่ม แอคติโนมัยสีท (Kurtböke, 2012) นอกจากนี้ยังมีผลงานมากมายที่แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับพืช (epiphytic bacteria) จะมีแบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมอยู่ด้วยบริเวณเนื้อเยื่อของพืชที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์เหล่านี้มีความสามารถต่อต้านและควบคุมเชื้อราเหตุโรคบริเวณใบพืชได้ดี (Andrews, 1992) สำหรับการควบคุมโรคไหม้ของข้าวโดยชีววิธีมีรายงานว่าแบคทีเรีย *Ps. fluorescens* สายพันธุ์ 7-14 ผลิตสารปฏิชีวนะ AB1 และ AB2 สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดียของเชื้อรา *P. oryzae* และลดการเกิดโรคไหม้ของข้าวในระยะกล้าได้ 90-92 เปอร์เซ็นต์ (Gnanamanickam and Mew, 1990) นอกจากนี้มีงานทดลองที่แยกเชื้อราจากฟางข้าวบาร์เลย์ และตัวอย่างดิน มาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าวพบว่าเชื้อ *T. roseum*, *Chaetomium globosum*, *Micromonospora* sp. และ *T. harzianum* สามารถลดการเกิดโรคไหม้ของข้าวได้ 77.5 เปอร์เซ็นต์ ถึง 91.6 เปอร์เซ็นต์ (Sy et al., 1994) ในประเทศไทยมีรายงานการใช้รา *Chaetomium cupreum* เพื่อควบคุมโรคไหม้ของข้าวพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันการเกิดโรคไหม้ในระยะต้นกล้า โดยการใส่สปอร์และสารสกัดของรา *Ch. cupreum* คลุกเมล็ดข้าวสายพันธุ์ IR 442-2-58 สามารถช่วยลดการเกิดโรคได้ใกล้เคียงกับการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราประเภท captan (เกษม, 2532) มีผู้ที่สนใจศึกษาและนำไปสู่การประยุกต์ใช้ เช่น รัชมี และคณะ (2546) ศึกษาการควบคุมโรคใบไหม้โดยชีววิธีโดยแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อาศัยร่วมกับต้นข้าวจำนวน 3 ไอโซเลต คือ หมายเลข B-059 หมายเลข B-097 และหมายเลข B-125 มาทดสอบประสิทธิภาพควบคุมโรคไหม้บนใบข้าวหลอดทดลองและในพืช โดยการยับยั้งเชื้อ *P. grisea* โดยใช้วิธี dual culture method และมีประสิทธิภาพควบคุมโรคบนใบข้าว โดยใช้ detached leaf method และนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลตมาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคไหม้ของข้าวในสภาพแปลงนา ในรูปของเซลล์แขวนลอย (bacterial suspension) ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคข้อต่อใบเน่าและเน่าคอรวงได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ และเพื่อให้สะดวกต่อการใช้งานจึงผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในรูปผง (powder formulation) ที่สามารถเก็บได้นานและนำไปละลายน้ำฉีดพ่นต้นข้าวเพื่อควบคุมโรคได้สะดวกมากกว่ารูปของสารแขวนลอย โดยผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีส่วนผสมของ carboxymethyl cellulose 2.5 เปอร์เซ็นต์ talcum 25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อประสิทธิภาพในการควบคุมโรคจะพ่นผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4-5 ครั้ง หรือใช้ร่วมกับการคลุกเมล็ดพันธุ์ข้าวด้วยผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนปลูก นอกจากนี้เชื้อราในกลุ่ม *Trichoderma* ได้รับความสนใจและมีการศึกษาวิจัยมายาวนานหลายสิบปี สามารถป้องกันกำจัดโรคของข้าวได้หลายโรค เช่น โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown spot) ที่เกิดจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา *Bipolaris oryzae* (Gomathinayagam *et al.*, 2010; Gamal *et al.*, 2007) โรคกาบใบเน่า (sheath rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Sarocladium oryzae* (Kalaiselvi and Panneerselvam, 2011) โรคกาบใบแห้ง (sheath blight) ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (Mana, 1994; Nagendra Prasad and Reddi Kumar. 2011) และโรคใบไหม้ (blast) ที่เกิดจากเชื้อรา *P. oryzae* (Gouramanis, N/A Year) โดยมีการพัฒนาชีวภัณฑ์ชนิดผงละลายน้ำ (wetable powder – WP) จากเชื้อรา *Trichoderma virens* และ *T. harzianum* และงานวิจัยของ สุขุมวัฒน์และญาติ (2550) คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus spp.*, *Ps. fluorescens* และ *Serratia marcescens* จากดินรอบรากข้าว ดินรอบพีช ใบพีช จากจังหวัดพิษณุโลก และจังหวัดตาก เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* สาเหตุของโรคไหม้ของข้าว, *H. oryzae* สาเหตุของโรคใบจุดสีน้ำตาล, *R. solani* สาเหตุของโรคกาบใบแห้ง และแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *Oryzae* สาเหตุของโรคขอบใบแห้งของข้าวโดยทดสอบในห้องปฏิบัติการ ผลการทดสอบพบว่า *Bacillus spp.* ไอโซเลต BK5 ที่แยกจากดินรอบรากข้าว, *P. fluorescens* ไอโซเลต CT1 แยกจากดินรอบต้นจามจุรี และ *S. Marcescens* ไอโซเลต SM022 แยกจากรากข้าว สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้ 66.67, 38.89 และ 56.11 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้จุลินทรีย์แล้วยังมีพืชสมุนไพรที่ Mi-Young Yoon และคณะ (2011) ศึกษาการต้านเชื้อรา *M. oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ข้าวจากสาร decursin และ decursinol angelate ที่สกัดจากรากไม้เกาหลี่ (*Angelica giga*) ซึ่งเป็นสมุนไพรพื้นบ้านของเกาหลีใต้ การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับ kasugamycin พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเส้นใยก่อโรคน้อยกว่าแต่อย่างไรก็ตามสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อร่าก่อโรคใบไหม้ได้มากกว่า kasugamycin และเมื่อนำสารสกัดหยาบมาทำให้อยู่ในรูปผงผสมน้ำ (wetable powder) และทดสอบบนต้นข้าวสามารถยับยั้งอาการใบไหม้มีประสิทธิภาพมากกว่า kasugamycin และนอกจากที่กล่าวมาเชื้อจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีการนำมาศึกษา คือ *Staphylococcus* sp. ดังที่ Qin และคณะ (2013) ทำการศึกษาลักษณะและการประเมินผลของเชื้อ *Staphylococcus* sp. สายพันธุ์ LZ16 ที่แยกจากน้ำทะเลเพื่อควบคุมโรคใบไหม้ข้าวที่เกิดจากเชื้อ *M. oryzae* ด้วยวิธี ทิ้งน้ำหมักจากแอคติโนมัยสีทและตัวเซลล์สามารถยับยั้งเชื้อร่าก่อโรคใบไหม้ได้โดยสังเกตจากการงอกของสปอร์เชื้อราถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญหลังรักษาด้วยเซลล์ *Staphylococcus* sp. สายพันธุ์ LZ16 ทำการแยกสารออกมาโดยใช้ Phenyl-Sepharose CL-4B and Sephacryl S-200 High resolution columns และระบุว่าคือสาร purine nucleoside phosphorylase (PNP) ด้วย Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. แล้วทำการศึกษารหัสพันธุกรรม deoD encoding PNP แสดงออกในเชื้อ *E.coli* พบว่าสาร purine nucleoside phosphorylase (PNP) เกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อรา สำหรับการทดสอบในแปลงนา พบว่าสารสกัดจากแบคทีเรียสามารถป้องกันและลดความรุนแรงของโรคใบไหม้ได้ นอกจากนี้ การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันจากการกินในหนูทดลองพบว่าเป็นพิษเฉียบพลันที่ระดับ >5000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mg/Kg ผลทดลองการชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ LZ16 และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของมันมีแนวโน้มในการพัฒนาสารกำจัดศัตรูพืชหรือใช้เป็นเชื้อปลูกถ่ายสำหรับควบคุมโรคใบไหม้ทางชีวภาพ และยังมีรายงานการศึกษาเอนไซม์และการส่งเสริมการเจริญของพืช โดย อนันต์ (2557) ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าวในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้ 232 ไอโซเลต จัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัยฐานฐานวิทยาได้ 57 ชนิด การศึกษาผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าว 6 ชนิด ได้แก่ *M. grisea*, *Fusarium* sp. FSK1, *Fusarium* sp. FSK2, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata* และ *R. solani* ด้วยเทคนิค dual culture assay พบว่า มี 12 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด จากการศึกษาพบว่า ราเอนโดไฟต์ไอโซเลต GR03 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วน ITS1-ITS2 ของ rDNA คล้ายคลึงกับ *T. harzianum* สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคข้าวทดสอบได้ทุกชนิดโดยมีประสิทธิภาพมากกว่า 75% ขึ้นไป นอกจากนี้ยังพบว่า ไอโซเลต GR03 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย (chitinase, protease และ cellulase) และผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญของพืช (Indole-3-Acetic Acid และการละลายฟอสเฟต) ได้ จากการทดสอบการควบคุมโรคกล้าเนาด้วยวิธี blotter test พบว่า เมล็ดที่แช่สปอร์แขวนลอยไอโซเลต GR03 ลดการเกิดโรคกล้าเนาที่เกิดจากเชื้อ *B. oryzae*, *C. lunata* และ *Fusarium* sp. FSK2 ได้ 87%, 93.3% และ 47.5% ตามลำดับ จากการศึกษาการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้าข้าวในสภาพเรือนทดลองพบว่า เมล็ดที่แช่สปอร์แขวนลอย GR03 สามารถเพิ่มความยาวราก ความสูงลำต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้น และดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้าข้าวได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต GR03 มีศักยภาพในการนำมาควบคุมโรคข้าวโดยชีววิธี สำหรับการใช้อย่างมีประสิทธิภาพ ควบคุมโรคพืชอีกตัวอย่างหนึ่งที่น่าสนใจ คือการศึกษาของจินตนา และคณะ (2559) เปรียบเทียบวิธีการควบคุมเชื้อ *P. grisea* สาเหตุของโรคไหม้ในข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ วิธีการควบคุมประกอบด้วย สองกลุ่ม คือ การควบคุมทางเคมี ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมและซาสารเคมีป้องกันเชื้อราโรคพืช Cabendazim และการควบคุมทางชีวภาพ ได้แก่ *B. subtilis* และ *Trichoderma* spp. งานวิจัยนี้ทำการเปรียบเทียบการควบคุม เชื้อราระหว่างกลุ่มและภายในกลุ่มทดลองด้วย Poison Food Technique Method ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน บันทึกบริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร) เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ การยับยั้งการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. grisea* พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง สิ่งทดลอง โดยเชื้อ *B. subtilis* สามารถควบคุมได้ดีที่สุด และไม่พบความแตกต่างระหว่างการใช้ Cabendazim และ เชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การนำเชื้อแอกติโนมัยสีทมาใช้ควบคุมเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าว

2.4.1 ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยสีท

แอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดอยู่ในคลาส (class) *Actinobacteria* ในซับคลาส (subclass) *Actinobacteridae* และถูกจัดไว้ในอันดับ (order) *Actinomycetales* ปัจจุบันมีสมาชิกมากกว่า 40 แฟมิลี และมากกว่า 200 สกุล มีลักษณะแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไปคือ มีปริมาณของเบสกวีนีนและเบสไซโตซีน (G+C) สูงประมาณ 57-75 mol% (Dhananjeyan, Selvan and Dhanapal, 2010; Naikpatil and Rathod, 2011) แอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียคล้ายราที่มีการสร้างเส้นใย สามารถสร้างสปอร์ได้ เมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสม มีลักษณะต่างจากเชื้อราคือ เซลล์ของแอกติโนมัยสีทไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และเส้นใยมีขนาดเล็กกว่าเชื้อราถึง 3 เท่า (Coyne, 1999) เมื่อเจริญบนอาหารแข็งจะแตกกิ่งออกไปเป็นเส้นสายชนิดเดียว หรือสองชนิด ที่เรียกว่า substrate mycelium และ aerial mycelium ตามลำดับ substrate mycelium จะเกิดขึ้นก่อน และสร้างเส้นใยลงลึกไปในอาหารเพื่อดูดซึมไปใช้ เมื่อโคโลนีเจริญขึ้น aerial mycelium จะเกิดขึ้น ภายหลังเจริญยื่นยาวออกไปในอากาศมีหน้าที่หลักคือสืบพันธุ์ aerial mycelium จะสร้างขึ้นในสภาวะขาดแคลนหรือสภาวะพิเศษ เช่น ขาดน้ำ ขาดอาหาร หรือมีการสะสมของ inhibition compound ดังนั้นจึงต้องมี hydrophobic sheath เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ แอกติโนมัยสีทสืบพันธุ์โดยวิธีการ fission สร้างสปอร์ได้ ลักษณะสำคัญที่จัดแอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียคือ มีเซลล์แบบ prokaryote และผนังเซลล์ประกอบด้วย peptidoglycan แยกความแตกต่างของแต่ละจีโนมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบของผนังเซลล์ (วันวิสาข์, 2546) เส้นใยเหนือผิวนอาหารมีการเจริญแตกกิ่งก้านยึดเกาะกันไปมา ทำให้เห็นโคโลนีมีลักษณะคล้ายแผ่นหนังและเจริญฝังแน่นลงในเนื้ออาหารส่วนโคโลนีที่มีลักษณะอ่อนนุ่มและร่วน เกิดจากเส้นใยแตกหักเป็นรูปท่อนหรือทรงกลม โคโลนีของแอกติโนมัยสีทหลายสกุล เช่น *Streptomyces* จะปกคลุมไปด้วยเส้นใยเหนือผิวนอาหารที่ห่อหุ้มด้วยชั้นของผิวที่เป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และเจริญขึ้นสู่ด้านบน ในระยะเริ่มแรกเส้นใยเหนือผิวนอาหารมีสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีต่างๆ เมื่อเริ่มมีการสร้างสปอร์ ทำให้เห็นโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งหรือคล้ายกำมะหยี่ (Williams, 1989) สีของเส้นใยใต้ผิวนอาหาร (substrate mycelium) มีหลายสี ได้แก่ สีขาว น้ำตาล เหลือง ส้ม ชมพู ดำ เทา และแดง เป็นต้น บางชนิดสามารถสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำแพร่ออกมาในอาหารและมีสีต่างๆ

แบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยสีทมีความสามารถในการสร้างสารแอนติไบโอติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา ไวรัส โปรโตซัวรวมทั้งสามารถต้านเซลล์มะเร็ง หรือเซลล์เนื้องอก ส่วนใหญ่เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยสีท จะมีถิ่นอาศัยในดิน แต่ก็พบแพร่กระจายในปุ๋ยหมัก น้ำโคลนตม และบริเวณรากพืช เป็นต้น การแยกแอกติโนมัยสีทจากตัวอย่างต่างๆ เช่น ดิน มักจะพบเชื้อ *Streptomyces* อยู่เป็นจำนวนมาก ประมาณ 70-95% ของแอกติโนมัยสีททั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากแอกติโนมัยสีทชนิดอื่น ๆ มีปริมาณน้อย และเจริญได้ช้ากว่าจึงจัดแอก

คติโนมัยสีทอื่นๆนอกเหนือจากสกุล *Streptomyces* เป็นแอคติโนมัยสีท ที่หายาก ซึ่งได้แก่สกุล *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Microtetraspora*, *Microbiospora*, *Streptosporangium*, *Dectylosporangium* และ *Actinoplanes* เป็นต้น (Hayakawa, Kenya and Hideo, 1988)

แอคติโนมัยสีท เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์และเภสัชกรรม เนื่องจากสามารถผลิตสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ และมีความสำคัญทางการเกษตร อุตสาหกรรม อีกทั้งยังมีความสำคัญทางนิเวศวิทยา นอกจากนี้แอคติโนมัยสีทเอนโดไฟท์ ยังสามารถผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เช่น phytohormone, antibiotics, siderophores และกิจกรรมของแอคติโนมัยสีทที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช คือ nitrogen fixation, nutrient competition และ systemic disease resistance (Bailey *et al.*, 2006; Benhamou, Joseph and Sadik, 1998) สามารถจัดจำแนกกลุ่มของการผลิตสาร hormone-like จากแอคติโนมัยสีทเอนโดไฟท์ เช่น สาร toyocamycin หรือเรียกอีกอย่างว่า cytokinin-like สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และสาร periodic acid ซึ่งเป็นสาร auxin-like ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของราก เป็นต้น (Igarashi *et al.*, 2002) เนื่องจากการเพาะปลูกต้องอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ในการปรับปรุงดิน โดยแอคติโนมัยสีททำหน้าที่คล้ายเชื้อราในดิน ช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์ของซากพืชซากสัตว์เพื่อให้พืชสามารถนำมาใช้เป็นแร่ธาตุอาหารได้ โคลินีของแอคติโนมัยสีทจะสร้างเส้นใยอย่างแน่นหนาคลายกับรากเพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ แอคติโนมัยสีทในดินบางชนิด เช่น *Frankia* อาศัยอยู่ในรากพืชช่วยในการตรึงไนโตรเจน (Servin, 2008) แอคติโนมัยสีทเป็นหนึ่งในฟิลัมแบคทีเรียที่โดดเด่นและมีหนึ่งในจีนัสที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุด คือ *Streptomyces* (Ghai, 2011) แอคติโนมัยสีทจีนัส *Streptomyces* และจีนัสอื่น ๆ ที่มีส่วนสำคัญในการเป็นบัฟเฟอร์ชีวภาพของดิน (biological buffering of soils) (C. Michael Hogan, 2010) มันยังเป็นแหล่งที่มาของยาปฏิชีวนะจำนวนมาก (Ningthoujam *et al.*, 2010) เชื้อ *Streptomyces* แพร่กระจายทั่วไปทั้งบนบกและในน้ำ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและเป็นแอโรบิกแบคทีเรีย (aerobic) ซึ่งเป็นแอคติโนมัยสีทที่มีการสร้างสปอร์ มีการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะทาง สัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ ผนังเซลล์ประกอบด้วย LL-diaminopimelic acid และไม่พบ น้ำตาลในผนังเซลล์ (Anderson and Elizabeth, 2001) สเตรบโตมัยซีมีเส้นใยแตกแขนงเป็นกิ่งก้านทั้ง substrate mycelia และ aerial mycelia (Locci, 1989 ; Lee *et al.*, 2005) เส้นใย (vegetative hyphae) มีขนาด 0.5-2.0 ไมโครเมตร สามารถแตกกิ่งแขนงได้มากแต่ไม่ค่อยแตกหักเป็นท่อน aerial mycelia ที่เจริญเต็มที่ จะสร้างสปอร์ตั้งแต่สามถึงหลายสปอร์ต่อกันเป็นสายโซ่ น้อยชนิดมากที่สามารถสร้างสปอร์ต่อเป็นสายสั้นๆที่ substrate mycelia บางชนิดอาจสร้างโครงสร้างที่คล้ายสเคลอโรเทีย (sclerotia) พิคนินเดีย (pycnidia) อับสปอร์ (sporangia) และซินนีมาตา (synnemata) ได้ สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่มี โคลินีหลายแบบซึ่งอาจเป็นชนิด discrete, lichenoid หรือโคลินีคล้ายหนังสัตว์ ทั้ง substrate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mycelia และ aerial mycelia สามารถสร้างรงควัตถุได้หลายสีและอาจมีรงควัตถุที่สามารถแพร่ลงในอาหารได้ด้วย บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารแอนติไบโอติกหนึ่งชนิดหรือมากกว่า สร้างเอนไซม์คาตาเลส สามารถรีดิวซ์ NO^3 ให้เป็น NO^2 ได้ และสามารถ สลายอะดีนีน เอสคิวลีน เคซีน เจลาติน ไฮแซนธิน แป้ง และ แอลโทโรซิน ปริมาณของกัวนีนกับไซโตซีนมีประมาณ 69-78 mol% อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25 -35 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่า ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 6.5-8.0 ไม่มีกรดไมโคลิก พบอยู่ทั่วไปในดินรวมทั้งซากเน่าเปื่อย มีน้อยชนิดที่ทำให้เกิดโทษในคนและสัตว์ แต่ในบางชนิดอาจก่อให้เกิดโรคในพืชได้ (รัตนภรณ์, 2548) สปอร์ของ Streptomyces จะสามารถดูดซึมสารเกาลิน (kaolin) ได้ทันทีแต่ไม่สามารถดูดซึมสารมอนท์มอริลโลไนท์ (montmoillonite) นอกจากในดินจะมีค่า pH ต่ำ และจากการศึกษาของ Mara และ Oragui ในปี 1981 พบว่าเมื่อการเติมสารแคลเซียมมอนท์มอริลโลไนท์หรือสารแคลเซียมฮิวเมต (calcium humate) ลงไปในอาหารที่เลี้ยง Streptomyces ก็สามารถเร่งการเจริญและเร่งการหายใจได้ มีบทบาทสำคัญสามารถย่อยสลายซากพืชและซากสิ่งมีชีวิตต่างๆได้ดี มันสามารถย่อยสลายเซลลูโลส และลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) Streptomyces หลายชนิด สามารถย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของหญ้า ไม้เนื้ออ่อน และไม้เนื้อแข็ง รวมทั้งสามารถย่อยสลายไคติน เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เคอราติน เปคติน รวมทั้งผนังเซลล์ของรา ยาฆ่าวัชพืช พลาสติก สารพวกโพลีฟีนอลิก แทนนิน และกรดฮิวมิก นอกจากนี้ Streptomyces ยังสามารถสร้างเมลานินซึ่งเป็นรงควัตถุคล้ายกรดฮิวมิก ซึ่งอาจช่วยให้มีการสร้างฮิวมิกในดินด้วย (สุจรรยา, 2556) ด้วยคุณสมบัติที่สามารถสร้างแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อราได้ Streptomyces ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบๆรากพืชจึงสามารถปกป้องรากให้ปลอดภัยจากการทำลายของเชื้อราได้ แต่ก็ยังมีความเห็นที่ตรงข้ามว่า Streptomyces นั้นไม่สร้างสารแอนติไบโอติกเมื่ออยู่ในดินตามธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตามมีหลักฐานว่า Streptomyces มีส่วนช่วยควบคุมโรคเชื้อราได้เมื่อนำเมล็ดพืชหรือต้นอ่อนมาเติมเชื้อ Streptomyces ลงไปก่อนที่จะนำไปปลูก (Sing และ Mehrotra, 1980; Rothrock และ Gotlieb, 1981; Williams, Goodfellow and Alderson, 1989)

2.4.2 การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีท (จิตติ, 2557)

แอกติโนมัยซีท เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอตจัดอยู่ในโดเมนแบคทีเรีย (Domain Bacteria) การจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในปัจจุบันใช้ข้อมูลของ 16S rRNA gene และ 23S rRNA gene นำมาวิเคราะห์สายวิวัฒนาการด้วยการสร้างต้นไม้แห่งสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) และนิวคลีโอไทด์ลายเซ็น (signature nucleotide) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาและจีโนมไทป์ที่หลากหลาย จึงเป็นการยากที่จะจัดจำแนกตำแหน่งอนุกรมวิธานที่แน่นอน ตลอดจนปัจจุบันได้มีการรายงานการค้นพบเชื้อชนิดใหม่อยู่ตลอดเวลา จึงทำให้ตำแหน่งอนุกรมวิธานในระดับวงศ์ (family) สกุล (genus) และสปีชีส์ (species) มีการเคลื่อนไหวอยู่ตลอดเวลา การจัดหมวดหมู่แอกติโนมัยซีทในปัจจุบันยึดถือตามหนังสือ Bergey's Manual of

Systematic Bacteriology(ปรับปรุงครั้งที่ 2ปี ค.ศ. 2012) โดยจัดอยู่ในเล่มที่ 5 (volume 5) ภายใต้ไฟลัมแอคตินอบแอกทีโนแบคทีเรีย (Phylum Actinobacteria) มีรายละเอียดเกี่ยวกับข้อมูลของไฟลัมแอคตินอบแอกทีโนแบคทีเรียโดยสังเขป ดังนี้

ไฟลัม (Phylum) Actinobacteria ประกอบด้วยสมาชิกทั้งหมด 6 คลาส (class) คือ

1. คลาส (Class) Actinobacteria
2. คลาส (Class) Acidimicrobiia (class. nov.)
3. คลาส (Class) Coriobacteriia (class. nov.)
4. คลาส (Class) Nitriliruptoria (class. nov.)
5. คลาส (Class) Rubrobacteria (class. nov.)
6. คลาส (Class)Thermoleophilia (class. nov.)

ซึ่งแตกต่างจากการจัดกลุ่มแบบเดิมที่ Zhi(2009) เคยจัดไว้คือ

ไฟลัม (Phylum) Actinobacteria [1คลาส(Class)]

 คลาส (Class) Actinobacteria [4 คลาสย่อย (Subclasses)]

 คลาสย่อย (Subclass) Acidimicrobiidae [1 อันดับ (order) 1 วงศ์ (family) 1 สกุล (genus)]

 คลาสย่อย (Subclass) Coriobacteridae [1 อันดับ (order)1 วงศ์ (family) 10 สกุล (genera)]

 คลาสย่อย (Subclass) Rubrobacteridae [1 อันดับ (order) 5 วงศ์ (families) 5 สกุล (genera)]

 คลาสย่อย (Subclass)Actinobacteridae [2 อันดับ (orders)]

 อันดับ (Order) Bifidobacteriales [1 วงศ์ (family) 7สกุล(genera)]

 อันดับ (Order) Actinomycetales [13 อันดับย่อย (suborders) 42วงศ์ (families) 219สกุล (genera)]

 โดยการจัดหมวดหมู่ของZhi (2009) ได้ทำการจัดแอคตินอมัยซีที่อยู่ในอันดับ(order) Actinomycetales แต่การจัดหมวดหมู่แอคตินอบแอกทีโนแบคทีเรียล่าสุดตามหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (ปรับปรุงครั้งที่ 2) ได้ยกเลิกการจัดหมวดหมู่ในระดับคลาสย่อย (subclass) โดยการเลื่อนระดับคลาสย่อย (subclass) ทั้ง 4 มาจัดอยู่ในระดับคลาส (class) และเพิ่มคลาส (class) Nitriliruptoria กับคลาส (class) Thermoleophilia ที่ค้นพบใหม่ลงไป

เชื้อจุลินทรีย์เมื่อทดสอบในหลอดทดลอง และในจำนวนนี้มีแบคทีเรียมากถึง 17 สายพันธุ์ที่ช่วยลดความรุนแรงของโรคในพืชที่ถูกทำให้เกิดโรคด้วยเชื้อทั้งสองชนิด โดยแบคทีเรีย 17 สายพันธุ์นี้จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces*, *Micromonospora* และ *Nocardioideis* (Coombs et al., 2004) งานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยสิต จำนวน 29 ไอโซเลตที่แยกได้จากรากแตงกวาแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลตสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าคอดิน (damping-off disease) ในต้นอ่อนและราก และโรคโคนเน่า (crown rot) ในแตงกวาได้ ในกลุ่มแบคทีเรีย 12 ไอโซเลตนี้มี 3 ไอโซเลตได้แก่ *Actinoplanes campanulatus*, *Micromonospora chalcea* และ *Streptomyces spiralis* ที่ได้รับการตรวจสอบแล้วพบว่ามีการสร้างเอนไซม์ β -1,3, β -1,4 และ β -1,6-glucanase ในปริมาณสูง ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* โดยการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราชนิดนี้ นอกจากนี้การปลูกเชื้อทั้งสามชนิดลงบนต้นแตงกวายังช่วยลดความรุนแรงของโรคเน่าคอดินและโรคโคนเน่าได้อีกด้วย (El-Tarabily et al., 2009) งานวิจัยชิ้นนี้จึงแสดงให้เห็นว่าพืชที่ถูกบุกรุกโดยเชื้อจุลินทรีย์ก็อาจเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของแบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถนำมาใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อโรคพืชได้เช่นกัน มีรายงานเกี่ยวกับเชื้อแอกติโนมัยสิตเอนโดไฟท์ที่แยกมาจากพืชหลากหลายชนิด เช่น วัชพืช (2546) ทำการแยกหาเชื้อแอกติโนมัยสิตเอนโดไฟท์จากตัวอย่างใบ ลำต้น และรากของต้นข้าวที่สมบูรณ์ แข็งแรงมีการเจริญเติบโตดี จากแหล่งปลูกต่างๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลต นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าจัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* จำนวน 15 ไอโซเลต และอีก 1 ไอโซเลตไม่สามารถจำแนกชนิดได้ เมื่อนำทุกไอโซเลตมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่างๆ จำนวน 5 จีนัส คือ *P. oryzae*, *Colletotricum gloeosporioides*, *Phytophthora infestans*, *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* และ *R. solani* ด้วยวิธี Dual Culture Method พบว่าแอกติโนมัยสิตไอโซเลต MN2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราที่ใช้ทดสอบได้ดีที่สุด (51-90 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลต KMST3 และ WM105 ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้น้อยกว่า 50 % จึงคัดเลือกแอกติโนมัยสิตไอโซเลต MN2 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคใบไหม้ข้าวในสภาพเรือนทดลอง จากการทดสอบผลของ *Streptomyces* ไอโซเลต MN2 ต่อการงอกของต้นกล้าข้าว พบว่าเชื้อดังกล่าวไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดข้าว แต่สามารถส่งเสริมการเจริญของกล้าข้าว ทำให้มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงกว่าชุดควบคุม เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคไหม้ของข้าวในระยะกล้า พบว่าเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต MN2 สามารถยับยั้งโรคใบไหม้ของข้าวได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบที่ถูกทำลายน้อยกว่าต้นข้าวชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และการคัดแยกจากดินที่อุดมสมบูรณ์ก็เป็นแหล่งแอกติโนมัยสิตที่ดีมีการทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสิตจากดินนาข้าวใน 16 จังหวัดของประเทศไทย นำมาจัดจำแนกได้ 47 กลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยา เมื่อศึกษาชนิดของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

diaminopimelic acid (DAP) ในเซลล์ที่ถูกย่อยพบว่า มีจำนวน 198 ไอโซเลต จัดอยู่ในกลุ่มของสเตรปโตมัยซิสและที่เหลือ 49 ไอโซเลต เป็นกลุ่มที่ไม่ใช่สเตรปโตมัยซิส นำไอโซเลตที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว 3 ชนิด ได้แก่ *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium oryzae* และ *Rhizoctonia solani* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยใช้วิธี dual culture พบว่ามีจำนวน 17 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพยับยั้งราทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด ซึ่งไอโซเลต RF-12 มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคข้าวทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด จึงนำมาทดสอบผลต่อการงอกของเมล็ดข้าวที่มีเชื้อก่อโรค *F. moniliforme* โดยเฉพาะเลี้ยงบนกระดาษชาน เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS ตามวิธี Least Significant Difference (LSD) พบว่าการใช้สปอร์แขวนลอยไอโซเลต RF 16-12 ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดข้าว ความยาวราก เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และการใช้สปอร์แขวนลอยไอโซเลต RF 16-12 ร่วมกับสปอร์แขวนลอย *F. moniliforme* ทำให้การงอกของเมล็ดข้าว ความยาวราก เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับการแช่เมล็ดข้าวในสปอร์แขวนลอย *F. moniliforme* เพียงอย่างเดียว เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ ไอโซเลต RF 16-12 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces albiflavinigier* NRRL B-1356^T (99.86 เปอร์เซ็นต์)(นราวรรณ, 2554) แม้แต่ในพื้นที่แหล่งแล้งก็พบแอคติโนมัยซิสอาศัยอยู่ดังรายงานของ Boudemagh และคณะ (2005) ทำการคัดแยกและทดสอบสารต้านเชื้อราจากแอคติโนมัยซิสหายากจากดินทะเลทรายซาฮารา การศึกษาครั้งนี้พบ 2 ไอโซเลตที่มีความสำคัญมากในการต่อต้านเส้นใยเชื้อราและยีสต์ ได้แก่ *C. tropicalis* R2 UMIP 1275.81, *C. albicans* UMIP 48.72, *C. albicans* UMIP 884.65, *F. oxysporum* UMIP 625.72, *A. fumigatus* UMIP 1082.74 และ *A. niger* ATCC 16404 จัดจำแนกสองไอโซเลตนี้อยู่ในจีนัส *Streptomyces* จะเห็นว่าจีนัสนี้มีสมาชิกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีจึงมีการศึกษาเพิ่มเติมโดย Usama R. A. และคณะ (2014) ได้รวบรวมข้อมูลสารทุติยภูมิที่สร้างโดยแอคติโนมัยซิส โดยส่วนมากสร้างจากเชื้อในจีนัส *Streptomyces* ได้แก่ Unknown antibiotics against *B. subtilis* (Yamanaka et al., 2005), Actinorhodin, Prodiginine, Desferrioxamine E (Moody, 2014), Istamycin (Slattery et al., 2001) Enniatin B1 (Ola et al., 2013) และ Undecylprodiginin (Zhu et al., 2014) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแอคติโนมัยซิสเป็นทรัพยากรที่อุดมไปด้วยสรรพคุณทางด้านยาในธรรมชาติ และการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ ยิ่งเป็นเชื้อชนิดใหม่จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากเชื้อเดิม ดังการค้นพบของ Bo Xu และคณะ (2015) ทำการคัดแยกและศึกษาผลของจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อราก่อโรคในพืชด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต N2 ซึ่งเป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่สามารถต้านเชื้อ *R. solani* ได้ โดยเกิดบริเวณยับยั้งขนาด 26.85 ± 1.35 mm และทำการแยกสารต้านเชื้อราจาก *Streptomyces* sp. ไอโซเลต N2 แล้วทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสารต้านเชื้อรานี้คือ 3-methyl-3,5-amino-4-vinyl-2-pyrone ($C_6H_7O_2N$) ตรวจสอบพบว่าเป็นชีวสาร (biosubstance) ชนิดใหม่ และผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนี้ไม่เพียงแต่ยับยั้งเชื้อราในหลอดทดลอง เช่น *R.*

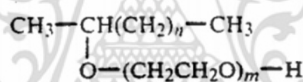
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

solani, *P. grisea*, *F. oxysporum* f. *Sp. niveum*, *F. oxysporum* f. *sp. vasinfectum*, *Penicillium Italicum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* แต่ยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกซ์โนส (anthracnose) ในผลองุ่นที่เกิดจาก *C. gloeosporioides* ผลลัพธ์ข้างต้นชี้ให้เห็นว่า *Streptomyces* sp. ไอโซเลต N2 เป็นหนึ่งในสารที่มีแนวโน้มสำหรับควบคุมทางชีวภาพของโรคพืชจากเชื้อรา เนื่องจากออกฤทธิ์ในวงกว้างและมีประสิทธิภาพต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชต่างๆ

ตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญ ศักยภาพ และความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากเชื้อแบคทีเรีย ในกลุ่มแอคติโนมัยสิท ในการควบคุมการเกิดโรคในพืชในการเกษตรกรรมดัง ตารางที่ 2.1

2.5 สารที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมทางชีวภาพ

ในปี 1989 Browning ได้จดสิทธิบัตรการค้นพบว่าสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุชนิดหนึ่งชื่อ *alkyloxypolyethyleneoxyethanol* สามารถใช้ควบคุมศัตรูพืช เช่น เชื้อรา ไร หนอน ไล่เดือน ผอย และแมลงอื่นๆ โดยมีสูตรโครงสร้าง ดังนี้



wherein n is from 9 to 15 and m is from 3 to 40.

รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้าง *alkyloxypolyethyleneoxyethanol* ที่มา ; Browning (1989)

alkyloxypolyethyleneoxyethanol เป็นสารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุและสามารถย่อยสลายได้ (biodegradable nonionic surfactants) ประกอบไปด้วย ethoxylates of secondary alcohols มีคาร์บอน 9 ถึง 15 อะตอม ใน aliphatic hydrophobic และมี ethylene oxide 3,5,7, 9, 12, 15, 20, 30 หรือ 40 moles ตามลำดับ วัตถุประสงค์ที่เป็นตัวแทนองค์ประกอบที่มีอยู่ในเชิงพาณิชย์คือ TERGITOL 15-S series อนุพันธ์ของเอทิลีนออกไซด์ที่ผลิตโดยยูเนียนคาร์ไบด์คอร์ปอเรชั่น (ตัวอย่าง เช่น 15-S-3, L5-S-5, 15-S-7, 15-S-9 15-S-12 และ 15-5-15) แม้สารนี้จะสามารถกำจัดศัตรูพืชหากใช้เดี่ยวๆได้ แต่การนำไปผสมกับสารอื่นก็สามารถเป็นตัวช่วยขนย้าย (carriers) สู่เป้าหมายได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับ ต้นพืช ใบพืช และสัตว์ได้ นอกจากนี้ยังมีสารช่วยขนย้าย(carriers) ราคาถูกที่นิยมใช้ เช่น น้ำและน้ำมันพืช และสารอื่นๆที่มีราคาแพงขึ้น สารลดแรงตึงผิวข้างต้นจะนำไปใช้ประมาณ 8 ออนซ์ ถึง 16 ออนซ์ ต่อ เอเคอร์ ปริมาณของน้ำหรือน้ำมันพืชที่ใช้เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารช่วยขนย้าย(carriers) จะแตกต่างกันเพราะน้ำมันพืชมีความสามารถในการฟอร์มตัวเป็นละอองเล็กกว่าใช้น้ำ ตัวอย่างการใช้สารละลาย TERGITOL 15-S-9 อัตราส่วน 16 ออนซ์ ต่อน้ำ 250 แกลลอนฉีดพ่นลงบนต้นมะนาวพื้นที่ 1 เอเคอร์ อุณหภูมิ 60 องศาฟาเรนไฮด์ หลังจากนั้นสังเกตเห็นซากราสนิมตายในพุ่มของใบไม้ นอกจากนี้การฉีดพ่นเพียง 15 แกลลอนต่อเอเคอร์ก็มีประสิทธิภาพกำจัดราสนิมได้เช่นเดียวกัน การประยุกต์ใช้เป็นสารกำจัดเชื้อราที่มีอัตราส่วน TERGITOL 15-S-9 ปริมาตร 8 ออนซ์ต่อน้ำ 5 แกลลอน สารละลายนี้ถูกใช้ควบคุมเชื้อราในถั่วลิสง โดยในระหว่าง 1 ปีนั้นไม่มีการใช้สารเคมีอื่นๆ จนกระทั่งสองสัปดาห์ก่อนที่จะเพาะปลูกได้ใช้ผลิตภัณฑ์ตรา BRAVO ฉีดพ่นตามอัตราส่วนที่แนะนำ พบว่าใบไม้เป็นโรค และผลผลิตที่ได้มากกว่า 1.75 ตันต่อเอเคอร์

ในปี 2001 Staats จดสิทธิบัตรองค์ประกอบและวิธีการการรักษาต้นไม้และพืชเพื่อป้องกันจุลินทรีย์เข้าทำลาย เกี่ยวข้องกับการต้านไวรัส ป้องกันแบคทีเรีย กำจัดเชื้อรา และอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อเป็นองค์ประกอบสำหรับการใช้ฉีดพ่นภายนอกและระบบลำเลียงของพืชสำหรับป้องกันเชื้อโรคที่เป็นอันตราย โดยมีส่วนประกอบของสารต่อไปนี้เพียงชนิดเดียวหรือมากกว่าหนึ่งชนิด ได้แก่

1. quaternary ammonium compounds กลุ่มที่เป็นที่นิยมได้แก่ BenZalkonium Chloride; Myristalkonium chloride และ Quaternium 14 (BTC 2125M)
2. สารประกอบไนโตรเจน N-Didecyl-N,N-dimethylammonium chloride และ N-Alkyl-N, N-dimethyl-N-benzylammonium chloride (FMB 1210-8 Quat,manufactured by LonZa Inc.) Diisobutylphenoxyethoxy ethyl dimethylbenzylammonium chloride monohydrate (HYAMINE 1622-50%, manufactured by LonZa Inc.)
3. สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่นิยมใช้ เช่น NP 9, Triton X-100 และ Makon
4. 1-3, butylene glycol
5. drying agent คือ aluminum sulfat
6. hydrophilic film forming agent คือ GantreZ ES 225
7. hydrophobic Water proofing agent ได้แก่ Copolymers 934, 940, or 734; และ Ganax V220
8. น้ำ

ส่วนประกอบเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในรูปแบบการเคลือบผิวภายนอกเพื่อป้องกันโรคติดต่อและยังใช้รักษาบาดแผลของพืชที่ถูกทำลายเซลล์และระบบลำเลียงเมื่อถูกบุกรุกด้วยเชื้อก่อโรค ต่อมา Xixuan และคณะ (2007) ได้ประยุกต์ใช้ค่า hydrophilic-lipophilic balance (HLB) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพสารแขวนลอยของ Beauveria bassiana สายพันธุ์ N18 และ GHA ซึ่งสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมจะแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อและขึ้นอยู่กับความสามารถของสารลดแรงตึงผิวในการรักษาหน้าสัมผัสกับพื้นผิวของแข็ง (wetting times) ค่า HLB ของสารลดแรงตึงผิว TDA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(polyoxyethylene tridecyl ether) ที่เหมาะสมสำหรับ *B. bassiana* สายพันธุ์ NI8 เท่ากับ HLB 8 และสำหรับสายพันธุ์ GHA เท่ากับ HLB 10 สารลดแรงตึงผิว TDA มี wetting times น้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ เช่น Triton X-100, Span 80, และ Tween 80. การผสมสารแขวนลอยของเชื้อของ *B. bassiana* สายพันธุ์ NI8 กับ TDA HLB 8 และ TDA HLB 10 มีการงอกของสปอร์เพิ่มมากขึ้นมากกว่าสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ สารแขวนลอยเชื้อรานี้ได้รับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยการตรวจกับมวนแดง (*Lygus lineolaris*) ระบุว่าไม่มีนัยสำคัญความแตกต่างในอัตราการตายเนื่องจากการลดแรงตึงผิว ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับค่า HLB และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Qili Li และคณะ (2011) ศึกษาหน้ำหมักจากแอกติโนมัยสีท *S. globisporus* JK-1 ในการยับยั้ง *M. oryzae* การทดสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหารแข็งพบว่าเชื้อนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *M. oryzae*, *Bipolaris maydis* และ *Cryphonectria parasitica* และการทดสอบบนใบข้าวพบว่าสามารถระงับการงอกของสปอร์เชื้อรา 10^5 spores/ml แต่ไม่สามารถยับยั้งได้เมื่อมีเชื้อรา 10^6 และ 10^7 spores/ml การทดสอบในเรือนทดลองพบว่าการแช่เมล็ดข้าว 2 ชั่วโมงด้วยน้ำหมักจากแอกติโนมัยสีท *S. globisporus* JK-1 ก่อนปลูก สามารถลดการเกิดโรคไหม้ได้ 88.3% และใบข้าวที่ฉีดพ่นด้วยน้ำหมักจากแอกติโนมัยสีท 3 ชั่วโมงก่อนปลูกเชื้อก่อโรคสามารถลดการสร้างโคนิเดียของสปอร์เชื้อราก่อโรคใบไหม้ ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่าสารต้านเชื้อราในน้ำหมักจากแอกติโนมัยสีทของ *S. globisporus* JK-1 สามารถแสดงผลยับยั้ง *M. oryzae* และปราบโรคไหม้ของข้าว

Xiangkun และคณะ (2015) พัฒนาเชื้อแบคทีเรียสูตรผงแห้ง (Dry flowable formulations) โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ T429 เพื่อต่อต้านโรคใบไหม้ในข้าวที่เกิดจากเชื้อ *M. grisea* ด้วยวิธีการฉีดพ่นผงแห้งของ *B. subtilis* สายพันธุ์ T429 ที่ผสม wetting agent AEO-5, dispersant NNO, disintegrant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, และ adhesive CMC-Na อัตราส่วน 1%, 9%, 5%, และ 1% ตามลำดับ จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยฉีดพ่นทราย การทดสอบในแปลงข้าวพบว่าสูตรที่มีความเข้มข้น 50 และ 75 กรัม ต่อ 667 ตารางเมตร มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้ในข้าวถึง 77.6 และ 78.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับยากำจัดเชื้อรา tricyclazole 750 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (79.5 เปอร์เซ็นต์) ทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่าสามารถควบคุมโรคใบไหม้ข้าวแบบชีววิธีด้วยสูตรผงแห้งของ *B. subtilis* สายพันธุ์ T429 ได้

Yoshihiro และคณะ (2014) คิดค้นวิธีใหม่ในการควบคุมโรคใบไหม้ข้าวในแปลงนาโดยใช้แรงลมจากพัดลมไฟฟ้า (กำลังไฟ 5 กิโลวัตต์, เส้นผ่านศูนย์กลางใบพัด 110 เซนติเมตร) ตั้งอยู่ในนาข้าวสูงจากพื้นดิน 5 เมตร ใช้สร้างลมวันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที เวลา 23.00 น. และ 04.00น.ของ

ทุกวัน โดยแบ่งนาข้าวเป็น 6 โซน ตามแรงลมที่ได้รับและระยะห่างจากพัดลม อัตราเร็วลมอยู่ในช่วง 2.0 ถึง >7.3 เมตรต่อวินาทีพบว่ารอยโรคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างโซนอัตราเร็วลม 2.0 และ 7.3 เมตรต่อวินาที โดยอัตราเร็วลมที่มากกว่า 7.3 เมตรต่อวินาที ได้รับผลกระทบจากโรคใบไหม้จากหลายๆปัจจัย แต่อัตราเร็วลมที่ 2.0 เมตรต่อวินาทีสังเกตได้ชัดเจนว่าไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้ข้าว ต่อมาจึงทำการทดลองครั้งที่ 2 โดยปรับอัตราเร็วลมให้เหลือ 3.0 และ 6.0 เมตรต่อวินาที ทำให้ความรุนแรงของโรคใบไหม้ลดลงทั้งบริเวณใบ รวงข้าว และคอรวง ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพการใช้แรงลมที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารฆ่าเชื้อราควบคุมโรคใบไหม้ข้าว

Hongying และคณะ (2013) ศึกษาการควบคุมโรคใบไหม้ด้วย phenaminomethylacetic acid ที่ผลิตโดย *Bacillus methylotrophicus* สายพันธุ์ BC79 ซึ่งแยกมาจากดินในป่าบนภูเขา คิวินหลิง (Qinlong) ของจีน เชื้อนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิดที่ใช้ในการทดลองเพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหารแข็ง นอกจากนี้การศึกษารอกฤทธิ์ทางชีวภาพยังได้ทำการหาสภาวะการหมัก *B. methylotrophicus* สายพันธุ์ BC79 สาร phenaminomethylacetic acid ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นสกัดและแยกสารโดยใช้ TLC และ HPLC ในการทดลองในระดับโรงเรือนที่ฉีดพ่นน้ำหมักจากแอคติโนมัยสีย (culture filtrate) ของ *B. methylotrophicus* สายพันธุ์ BC79 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อ *M. oryzae* มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อก่อโรค 89.87% เมื่อผ่านไป 10 ทำการตรวจหาเชื้อ *B. methylotrophicus* สายพันธุ์ BC79 ในต้นข้าวและเนื้อเยื่อพบว่าในใบข้าวมีเชื้อ 1.65×10^8 CFU/g ซึ่งมากกว่าในลำต้นที่มีเชื้อ 6.78×10^7 CFU/g และรากมีเชื้อ 3.56×10^7 CFU/g สำหรับการทดลองในแปลงนานั้นพบว่า น้ำหมักจากแอคติโนมัยสีย BC79 ($4000\text{g}/667\text{m}^2$) มีประสิทธิภาพยับยั้ง *M. oryzae* สูงสุด (84.8%) ตามด้วยสารสกัด 15% phenaminomethylacetic acid extract (75.5%) และ 20% tricyclazole (76.1%) ในระยะต้นกล้าและก่อนเพาะปลูกเหมาะสำหรับการใช้ BC79 ควบคุมโรคใบไหม้มากที่สุด จากการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า *B. methylotrophicus* สายพันธุ์ BC79 มีศักยภาพอย่างมากในการใช้ควบคุมโรคใบไหม้ทางชีวภาพ

Marta และคณะ (2011) ศึกษาการยับยั้งโรคใบไหม้และศักยภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าวจากแบคทีเรียบริเวณรอบรากข้าวจากป่าเมซอนในประเทศบราซิล การทดสอบในระดับโรงเรือนโดยวิธีวัดด้วยสารละลายเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียก่อนจะปลูกเชื้อ *M. oryzae* ในการคัดกรองเบื้องต้นจาก 148 ไอโซเลต เพื่อกระตุ้นการเจริญของต้นข้าวพบว่า 12.7 เปอร์เซ็นต์สามารถกระตุ้นความสูงของพืชได้ ในขณะที่ 52.0 % เพิ่มความยาวราก มวลราก และมวลรวม จากการทดลองนี้นำไปสู่การทดสอบเชื้อ 18 ไอโซเลต ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า ไอโซเลตทั้งหมดนี้สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ตั้งแต่ 16 ถึง 95% และมีสองไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือ Rizo-46 และ Rizo-55 จึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหม่ในระดับโรงเรือน โดยใช้ 3 วิธีคือ 1. ใช้รดดินเพาะปลูก 15 วัน ก่อนปลูกเชื้อก่อโรค 2. ใช้รดดินเพาะปลูก 2 วัน ก่อนปลูกเชื้อก่อโรค และ 3. ฉีดพ่น 2 วัน ก่อนปลูกเชื้อก่อโรค พบว่าดินที่รดด้วยไอโซเลต Rizo-55 15 วันก่อนปลูกเชื้อก่อโรคลดการเกิดโรคใบไหม้ได้ 90% ในขณะที่ Rizo-46 ใช้ 2 วันก่อนปลูกเชื้อก่อโรค สามารถลดการเกิดโรคได้ถึง 95% ดังนั้นความเหมาะสมในการนำไปใช้งานขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังทดสอบเอนไซม์ที่เป็นตัวกระตุ้นของ proteins related to pathogenesis (PRPs) ในระหว่างขั้นตอนชักนำให้เกิดความต้านทานด้วยแบคทีเรียบริเวณรอบรากข้าว พบว่าการทำงานของเอนไซม์ peroxidase, β -1,3-glucanase และ chitinase เพิ่มขึ้นอย่างมากและสอดคล้องกับการทดสอบในโรงเรือนในการยับยั้งโรคใบไหม้

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม แอคติโนมัยสีท ที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (วันวิสาข์, 2546 ; El-Tarabily *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2011; Qili Li *et al.*, 2011; Bo Xu *et al.*, 2015)

แอกติโนมัยสีท	พืชเจ้าบ้าน/ แหล่งที่พบ	สารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพ	ประเภทของสาร	ฤทธิ์ทาง ชีวภาพ
<i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30562	<i>Kennedia nigriscans</i>	Munumbicins A-D	Peptides	ยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์
<i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30562	<i>Grevillea pteridifolia</i>	Kakadumycins	Peptides	ยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์
<i>Streptomyces</i> sp. MSU-2110	<i>Monstera</i> sp.	Coronamycins	Peptides	ยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์
<i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30562	<i>K. nigriscans</i>	Munumbicins E4 และ E5	Peptides	ยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์
<i>Streptomyces Albidoflavus</i>	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	Antimycin A ₁₈	Macrolides	ยับยั้งเชื้อรา
<i>Streptomyces</i> sp. ls9131	<i>Maytenus hookeri</i>	Dimeric dinactin และ Dimeric nonactin	Macrotetrolide Alkaloids	ยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม แอคติโนมัยสีท ที่มีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ... (ต่อ) (วันวิสาข์, 2546 ; El-Tarabily *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2011; Qili Li *et al.*, 2011; Bo Xu *et al.*, 2015)

แอคติโนมัยสีท	พืชเจ้าบ้าน/ แหล่งที่พบ	สารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพ	ประเภทของสาร	ฤทธิ์ทาง ชีวภาพ
<i>Streptomyces Globisporus JK-1</i>	soil	β -1,3, β -1,4 และ β -1,6-glucanase	Enzyme	ยับยั้งเชื้อรา
<i>Actinoplanes campanulatus</i>	<i>Cucumis sativus</i> L.	β -1,3, β -1,4 และ β -1,6-glucanase	Enzyme	ยับยั้งเชื้อรา
<i>Micromonospora chalcae</i>	<i>Cucumis sativus</i> L.	β -1,3, β -1,4 และ β -1,6-glucanase	Enzyme	ยับยั้งเชื้อรา
<i>Streptomyces spiralis</i>	<i>Cucumis sativus</i> L.	β -1,3, β -1,4 และ β -1,6-glucanase		ยับยั้งเชื้อรา
<i>Streptomyces</i> sp. MN2	<i>Oryza sativa</i> L.			ยับยั้งเชื้อรา
<i>Streptomyces</i> sp. RF16-12	Soil			ยับยั้งเชื้อรา
<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0595	<i>Allium tuberosum</i>			ยับยั้ง เชื้อจุลินทรีย์
<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0456	<i>Cryptomeria japonica</i>	Cedarmycins A และ B	Butyrolactones	ยับยั้งเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

- 1) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PB 3002 บริษัท Mettler Toledo ประเทศไทย
- 2) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น SI-234 บริษัท Denver ประเทศอังกฤษ
- 3) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น HM-35V บริษัท Hung Ta Instrument ประเทศไทย
- 4) เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น Genie 2 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 5) เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (automatic pipette)
- 6) กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CX31 บริษัท Olympus
- 7) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น UC4-1320 ประเทศไทย
- 8) ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น LF BH-120 บริษัท Unitech Science ประเทศไทย
- 9) ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น ULE-500 บริษัท memmert ประเทศเยอรมนี
- 10) ตู้แช่แข็ง (freezer) รุ่น DLT-21V-85V12 บริษัท Harris ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 11) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SG-120 Steris ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 12) เครื่องเขยาควนควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น Kuhner ISF-1-X บริษัท Kuhner ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 13) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Sorvall RC5C plus
- 14) เครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer) รุ่น Modulyo 98 บริษัท Edwards
- 15) เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (vacuum evaporator) รุ่น Hei-VAP Precision บริษัท Heidolph ประเทศเยอรมนี
- 16) เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (polymerase chain reaction : PCR) รุ่น ALD-1244 บริษัท MJ Research
- 17) เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (NanoDrop spectrophotometer) รุ่น Nanodrop ND-1000 บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

3.2.1.1 แอคติโนมัยสีทที่ใช้ในการศึกษา

แอคติโนมัยสีท 15 ไอโซเลต ได้แก่ AT1S-8, AT1L-8, 51B-9-11, SLB1-1, DCWR-9-1, 51B-4-3, PCWR-4-6, 51B-9-11, PP2R-9-A1, UHR-9-5, UTIR-9-4, U47BR-9-6, DCWR-9-8-2, CP2R-9-1 และ SL3-70 แยกจากภายในรากข้าว ใบข้าว และดินบริเวณรอบๆรากข้าว โดยนายสุขเกษม คงสันต์ และเก็บรักษาเชื้อภายใต้ความเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation) ในกลีเซอรอล 20% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.1.2 เชื้อรากล่อโรโคไปไหม้ข้าว

เชื้อรากล่อโรโคไปไหม้ข้าว (*Pyricularia grisea*) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง แล้วทำการเก็บรักษาเชื้อราด้วยกระดาษกรอง (Filter paper storage) โดยนำกระดาษกรองที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หยดน้ำกลั่น ปลอดเชื้อลงบนกระดาษกรอง 2-3 หยด แล้วจึงตัดชิ้นวัชที่เลี้ยงรวางลงบนกระดาษกรอง นำไปป่มที่ 25 องศาเซลเซียส จนราเจริญขึ้นปกคลุมกระดาษกรอง แล้วทิ้งไว้จนกระดาษกรองแห้งสนิทจึงตัดเป็นชิ้นเล็กด้วยวิธีปลอดเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยสีท

3.2.2.1 ลักษณะทางฟีโนไทป์

3.2.2.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีทพิจารณาจาก ลักษณะสปอร์และเส้นใยที่เจริญบนอาหารสูตรดัดแปลงชอยเอ็กแทรกท์ เอกการ์ (soil extract agar, modified) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ถึง 28 วันตรวจดูลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์ส่องระยะไกล (long-working distance) กำลังขยาย 400 เท่า

3.2.2.1.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของแอคติโนมัยสีท

ลักษณะการเจริญของแอคติโนมัยสีทจะมีลักษณะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอาหารแต่ละชนิดโดยอาหารที่ใช้ศึกษา มีดังนี้ อาหารกลูโคสแอส พาราจีน เอกการ์ (glucose asparagines agar) อาหารซาเป็กซูโครส เอกการ์ (czapek's sucrose agar) อาหารนิวเทรียนท์ เอกการ์ (nutrient agar) และอาหารต่างๆ ตาม International *Streptomyces* Project (ISP) (Shirling และ Gottlieb, 1966) ซึ่งได้แก่ อาหารยีสต์เอ็กแทรกท์-มอลท์เอ็กแทรกท์ เอกการ์ (yeast extract - malt extract agar, ISP2) อาหารโอทมีล เอกการ์ (oatmeal agar, ISP3) อาหารอินออร์แกนิค ซอลท์-สตาร์ชเอกการ์ (inorganic salts - starch agar, ISP4) อาหารกลีเซอรอล-แอสพาราจีน เอกการ์ (glycerol - asparagine agar, ISP5) อาหารเปปโตเน-ยีสต์เอ็กแทรกท์ ไอรอน เอกการ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(peptone-yeast extract iron agar, ISP6) และอาหารไทโรซีน เอการ์ (tyrosine agar, ISP7) โดยการทำให้เป็นสารละลายสปอร์ (spore suspension) แล้วหยดลงบนอาหารต่างๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ สีของเส้นใยอาหาร สีของเส้นใยอากาศ และสีของรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ โดยเทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The NBS-ISCC color system) (Kelly, 1964)

3.2.2.2 ลักษณะทางจีโนมไทป์

3.2.2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลวกลูโคส-ยีสต์เอ็กแทรกท์ (glucose-yeast extract broth) บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บเซลล์โดยนำน้ำหนักที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ข) 1 ครั้ง เติมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 380 ไมโครลิตร เติมไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมีล แอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol) อัตราส่วน 25 : 24 : 1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยมือ เป็นเวลา 5 นาที นำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดทดลองอันใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ (3M sodium acetate) ปริมาตร 1 ใน 10 ส่วนของสารละลายส่วนใสที่ได้ แล้วเติมเอทานอลที่แช่เย็นจนเย็นจัด ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ได้ ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อพันสายดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้จนดีเอ็นเอแห้ง แล้วนำไปละลายในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 50 ถึง 100 ไมโครลิตร (Yukphan. 2006)

3.2.2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

(polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) โดยนำสารที่มีความเข้มข้นและปริมาณดังตารางที่ 3.1 ใส่ลงในหลอดขนาดเล็ก ผสมให้เข้ากัน นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเทอร์มอลไซเคลอร์ (thermal cycler) ซึ่งจะมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ตั้งเอาไว้ ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ แสดงในตารางที่ 3.2 (Yukphan และคณะ. 2005)

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

	ความเข้มข้น	ปริมาตร
primer : 20F*	10 pmol/ μ l	4.0 μ l
primer : 1500R*	10 pmol/ μ l	4.0 μ l
dNTP	2.0 mM	10.0 μ l
10X Taq buffer	10X	10.0 μ l
MgCl ₂	25.0 mM	8.0 μ l.
Taq DNA Polymerase	5 Unit/ μ l	0.5 μ l
Milli Q water	-	59.5 μ l
Template DNA	100-200 ng/ μ l	4.0 μ l
รวม		100.0

*primer : 20F (5' GAG TTT GAT CCT GC TCA G 3')

*primer : 1500R (5' GTT ACC TTG TTA CGA CTT 3')

ตารางที่ 3.2 วงจรพีซีอาร์ (PCR cycles)

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)	ขั้นตอน
94 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	denaturation step
94 องศาเซลเซียส	1 นาที	25	
50 องศาเซลเซียส	1 นาที		annealing step
72 องศาเซลเซียส	2 นาที		extension step
72 องศาเซลเซียส	3 นาที	1	
รวมเวลาทั้งสิ้น : 2 ชั่วโมง 30 นาที			

3.2.2.2.3 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ให้มีความบริสุทธิ์

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ 16S rRNA gene ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit ของบริษัท Geneaid ซึ่งทำโดยละลายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี PB solution ปริมาตร 450 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ QIA quick column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวส่วนที่ตกลงมาจากคอลัมน์ทิ้ง เติมน้ำล้าง buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวส่วนที่ตกลงมาจากคอลัมน์ทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์อันใหม่ เติมน้ำ EB เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตรใส่ลงตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

3.2.2.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene (DNA sequencing)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene โดยใช้ bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit (applied biosystem) โดยส่วนประกอบที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3.3 ส่วนอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ แสดงดังตารางที่ 3.4 (Yukphan และคณะ.2005)

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene

	ความเข้มข้น (Diluted reaction 0.5X)	ปริมาตร(μ l)
Big dye terminator	-	4.0
5X sequencing Buffer	5 เท่า	2.0
Sequencing Primer*	3.2 (pmol/ μ l)	2.0
น้ำปราศจากไอออน	-	10.0
ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	-	2.0
รวม		20

*Primer 27F: AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG
 800R : GGY TAC CTT GTT ACG ACT T
 520R : CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG
 1492R : TAC CAG GGT ATC TAA TCC

ตารางที่ 3.4 โปรแกรม Big dye

อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ (cycle)
96 องศาเซลเซียส	3 วินาที	1
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	25
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 วินาที	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.2.5 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

ทำการจัดเรียง (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่คัดเลือก (selected sequences) จากฐานข้อมูล genbank / EMBL / DDBJ โดยใช้ alignment software ซึ่งในวิทยานิพนธ์นี้ใช้ CLUSTAL W program package จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้างแผนภาพสายวิวัฒนาการ (phylogenetic trees) ด้วยโปรแกรมใน MEGA version 6

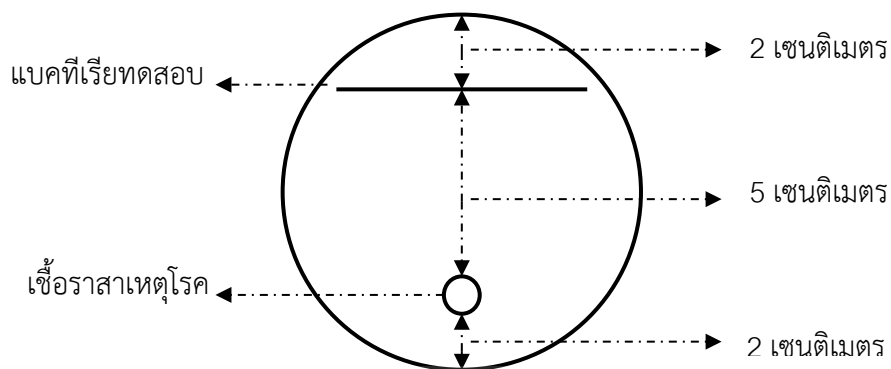
3.2.3 การคัดเลือกเชื้อที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบไหม้และแบคทีเรียทดสอบ

3.2.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น

นำเชื้อแอกติโนมัยสีทมาเลี้ยงบนอาหารยีสต์เอ็กแทรกซ์-มอลท์เอ็กแทรกท์เอการ์ (yeast extract-malt extract agar, ISP2) โดยขีดเชื้อเป็นเส้นยาวบนผิวอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบมาขีดในแนวตั้งฉากกับโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยสีท โดยขีดให้ชิดกับขอบโคโลนี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ส่วนยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบมี 6 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Micrococcus luteus*

3.2.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าว

ทดสอบโดยวิธี dual culture technique โดยนำแอกติโนมัยสีทแต่ละไอโซเลตมาต่อเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกับ เชื้อสาเหตุโรค ดังภาพที่ 3.1 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28° c จนกระทั่งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับ ตัวควบคุม คือ จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค (*P. grisea*) แบ่งกลุ่มการเป็นปฏิปักษ์จากค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง คือสูง (ค่าการยับยั้ง > 66%), ปานกลาง (ค่าการยับยั้ง 33-66%) และต่ำ (ค่าการยับยั้ง < 33%) เมื่อทราบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแล้วจะทำการคัดเลือกเชื้อที่แสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุด 3 ไอโซเลตมาทดสอบในขั้นต่อไป



รูปที่ 3.1 ทดสอบโดยวิธี dual culture technique

3.2.4 การศึกษาชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้

3.2.4.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อที่คัดเลือกมาจากการทดสอบเบื้องต้นแต่ละไอโซเลตมาต่อเชื้อแล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Glycerol Peptone Molasses (GPM broth), Yeast extract-Malt extract (ISP2) และ Potato Dextrose Broth (PDB) ในสถานะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3.2.4.2 การเตรียมสารจากน้ำหมักเชื้อ

หลังจากเลี้ยงเชื้อครบ 14 วัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที แยกเฉพาะส่วนใสของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมารองเซลล์แบคทีเรียด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm ให้ได้น้ำหมักจากแอคติโนมัยซีท (cell-free culture filtrate) มาทำให้อยู่ในรูปแบบผงแห้งโดยทำแห้งเยือกแข็งแบบสุญญากาศ หรือ “ฟรีซดราย” (Freeze dried) เพื่อให้ได้สารที่เข้มข้นขึ้น

3.2.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าว

3.2.4.4.1 ทดสอบฤทธิ์ของน้ำหมักจากแอคติโนมัยซีท (cell-free culture filtrate)

ทำการคัดเลือกชนิดอาหารที่ส่งเสริมฤทธิ์การต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าวโดยเพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ผสมน้ำหมักจากเชื้อแอคติโนมัยซีทจากอาหารชนิดต่างๆ คือ Glycerol Peptone Molasses (GPM broth), Yeast extract-Malt extract (ISP2) และ Potato Dextrose Broth (PDB) ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 % ปริมาตรโดยปริมาตร เตรียมอาหาร PDA ที่ปริมาตร 100, 95, 90, 85 และ 80 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องออโตเครบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นรอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 50 องศาเซลเซียส แล้วนำน้ำหมักจากเชื้อแอคติโนมัยซีทมาผสมตามอัตราส่วนความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้น ลงไปในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร PDA ให้ปริมาตรทั้งหมดครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำอาหารนี้เทลงใส่จานเพาะเชื้อเพื่อในไปเพาะเลี้ยงเชื้อราก่อโรคใบไหม้ โดยวาง Mycelium plug ของเชื้อ *P. grisea* ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ในแต่ละเพลท ชุดควบคุมที่ใช้เป็นอาหาร PDA ที่ปราศจากน้ำหมักจากเชื้อแอกติโนมัยสัท บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้ววัดรัศมีของเส้นใยที่เจริญขึ้นแล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งและนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's Multiple Range test (DMST) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % การศึกษาหัวข้อนี้จะทราบถึงอาหารที่เหมาะสมกับแอกติโนมัยสัทแต่ละไอโซเลต เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาขั้นต่อไป

3.2.4.4.2 ทดสอบฤทธิ์ของน้ำหมักจากแอกติโนมัยสัทแบบผง (cell-free culture filtrate)

เตรียมอาหาร PDA ที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 6 ขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นรอให้อุณหภูมิของอาหารลดลงถึง 50 องศาเซลเซียส แล้วนำน้ำหมักจากแอกติโนมัยสัทแบบผงที่เตรียมไว้มาซึ่งปริมาณ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัม ผสมลงไปในอาหาร PDA แต่ละขวด เขย่าให้ละลายเข้ากันดี แล้วนำอาหารนี้เทลงใส่จานเพาะเชื้อเพื่อในไปเพาะเลี้ยงเชื้อราก่อโรคใบไหม้ โดยวาง Mycelium plug ของเชื้อ *P. grisea* ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ในแต่ละเพลท ชุดควบคุมที่ใช้เป็นอาหาร PDA ที่ปราศจากน้ำหมักจากเชื้อแอกติโนมัยสัท บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้ววัดรัศมีของเส้นใยที่เจริญขึ้นแล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งจากสูตร

$$\% \text{ การยับยั้ง} = 100 - [(r^2/R^2) \times 100]$$

โดยที่ r = รัศมีของเชื้อราก่อโรคบนอาหาร PDA ที่ผสมน้ำหมักจากเชื้อแอกติโนมัยสัท,

R = รัศมีของตัวควบคุม

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's Multiple Range test (DMST) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อศึกษาหัวข้อนี้แล้วจะเลือกเชื้อที่ดีที่สุดและอาหารที่เหมาะสม มาศึกษาขั้นต่อไป

3.2.5 การผลิตผลิตภัณฑ์ควบคุมเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าวจากสารออกฤทธิ์ของแอกติโนมัยสัทที่คัดเลือก

3.2.5.1 การเตรียมสารออกฤทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเชื้อไอโซเลตที่คัดเลือกได้จากการทดสอบข้างต้นมาต่อเชื้อแล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ส่งเสริมประสิทธิภาพการสร้างสารออกฤทธิ์ของเชื้อนั้นที่ทดสอบในหัวข้อ 3.2.4 เพาะเลี้ยงในสถานะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที แยกเฉพาะส่วนใสของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมากรองเซลล์แบคทีเรียด้วยกระดาษกรองรูพรุนขนาด 0.45 μm ให้น้ำหมักจากแอกติโนมัยสิต (cell-free culture filtrate) แล้วนำมาทำให้อยู่ในรูปแบบผงแห้งโดยทำแห้งเยือกแข็งแบบสุญญากาศ หรือ “ฟรีซดราย” (Freeze dried) เพื่อนำไปพัฒนารูปผลิตภัณฑ์

3.2.5.2 การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ในการควบคุมโรคใบไหม้ข้าว

ทำการพัฒนารูปผลิตภัณฑ์น้ำหมักจากเชื้อแอกติโนมัยสิตจำนวน 11 ตำรับ โดยนำผงน้ำหมักจากเชื้อแอกติโนมัยสิตมาทำให้อยู่ในรูปสารละลายตามความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบไหม้สูงที่สุดในการทดลองหัวข้อ 3.2.4.3.2 แล้วผสมสารลดแรงตึงผิวความเข้มข้นดังตารางที่ 3.5 โดยนำผงน้ำหมักจากเชื้อแอกติโนมัยสิตมาผสมกับสารลดแรงตึงผิวมาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อตามความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 3.5 ตำรับผลิตภัณฑ์น้ำหมักจากเชื้อแอกติโนมัยสิต

ตำรับ	สารสกัด(g)	ส่วนผสม		น้ำกลั่น(g)
		สารลดแรงตึงผิว		
		ชนิด	ปริมาณ (g)	
1	x	Tergitol (15-S-5)	0.1	q.s. 100
2	x		1.2	q.s. 100
3	x	Tergitol (15-S-7)	0.1	q.s. 100
4	x		1.2	q.s. 100
5	x	triton (X-100)	3	q.s. 100
6	x		5	q.s. 100
7	x		6	q.s. 100
8	x	Np 9	1	q.s. 100
9	x		2	q.s. 100
10	x		5	q.s. 100
11	x		6	q.s. 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6 การทดสอบผลิตภัณฑ์ในการควบคุมโรคใบไหม้ข้าวในโรงเรือน

นำผลิตภัณฑ์สูตรต่างๆมาทดสอบการควบคุมโรคใบไหม้ข้าวแบบป้องกันการเกิดโรค (preventive test) และแบบยับยั้งการเกิดโรค (curative test) โดยมีวิธีการดังนี้

3.2.6.1 การเตรียมต้นข้าว

ปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใส่กระถางภายในโรงเรือน โดยแช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นห่อเมล็ดข้าวด้วยผ้าชุมน้ำต่ออีก 2 คืน จะมีรากสั้นๆออกจากเมล็ดข้าว แล้วจึงนำเมล็ดข้าวไปหว่านลงในกระถาง ดูแลรดน้ำในกระถางให้น้ำท่วมขังตลอดเวลาและไม่ใส่ปุ๋ยเคมี เมื่อต้นข้าวมีอายุครบ 30 วันจะนำมาใช้ในการทดลอง

3.2.6.2 การเตรียมสารละลายเชื้อก่อโรค

เลี้ยงเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าว (*P. grisea*) บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นขูดเส้นใยเชื้อรามาชกน้ำให้เกิดสปอร์โดยนำสารละลายเซลล์เลี้ยงบนเมล็ดข้าวจนจะมีการสร้างสปอร์ จากนั้นนำเมล็ดข้าวไปบดให้ละเอียด เพื่อใช้เป็นผงเชื้อก่อโรค

3.2.6.3 การทดสอบสารลดแรงตึงผิวต่อการเจริญของข้าว

นำสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด ได้แก่ Tergitol (15-S-5) , Tergitol (15-S-7), triton (X-100) และ Np9 มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของข้าว นำข้าวขาวดอกมะลิ 105 อายุ 30 วัน มาฉีดพ่นสารลดแรงตึงผิวปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงบนใบข้าวที่ปลูกในกระถาง ดังนี้ Tergitol (15-S-5) ความเข้มข้น 0.1% และ 1.2% Tergitol (15-S-7) ความเข้มข้น 0.1% และ 1.2% (Browning, 1991), triton (X-100) ความเข้มข้น 3% 5% และ 6% Np9 ความเข้มข้น 1% 2% 5% และ 6% (Staats, 2001) โดยสารทุกชนิดใช้น้ำกลั่นในการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของใบข้าวที่เกิดขึ้นทุกๆ 24 ชั่วโมง

3.2.6.4 การทดสอบการป้องกันโรคใบไหม้ (preventive test)

ฉีดพ่นผลิตภัณฑ์สูตรต่างๆทั้ง 11 สูตรลงบนใบข้าวปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อต้น รวมถึงสารเคมีป้องกันกำจัดโรคใบไหม้ข้าว คือ Carbendazim 0.1 % ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อต้น ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกในการวัดประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ กำหนดให้ต้นข้าวที่ถูกฉีดพ่นเฉพาะเชื้อก่อโรคเป็นตัวควบคุมเชิงลบ หลังจากนั้น 12 ชั่วโมง ทำการฉีดพ่นเชื้อก่อโรคใบไหม้ข้าว (*P. grisea*) ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อต้น โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ เมื่อครบ 72 ชั่วโมงประเมินความรุนแรงและอัตราการเกิดโรค โดยติดตามผลและให้คะแนน (rate scale) แบ่งเกณฑ์คะแนนตาม the standard evaluation system of IRRI (1996)

3.2.6.5 การทดสอบการยับยั้งโรคใบไหม้ (curative test)

ฉีดพ่นเชื้อก่อโรคใบไหม้ข้าว (*P. grisea*) ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อต้น หลังจากนั้น 12 ชั่วโมง ฉีดพ่นผลิตภัณฑ์สูตรต่างๆทั้ง 23 สูตรลงบนใบข้าวปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อต้น

รวมถึงสารเคมีป้องกันกำจัดโรคใบไหม้ข้าว คือ Carbendazim 0.1 % ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อต้น ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกในการวัดประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ กำหนดให้ต้นข้าวที่ถูกฉีดพ่นเฉพาะเชื้อก่อโรคเป็นตัวควบคุมเชิงลบ แต่ละทรีทเมนต์ทำการทดลอง 5 ซ้ำ เมื่อครบ 72 ชั่วโมง ประเมินความรุนแรงและอัตราการเกิดโรค นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's Multiple Range test (DMST) ที่ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อทราบถึงผลผลิตพันธุ์สุทธที่ดีที่สุดต่อการควบคุมโรคใบไหม้ข้าว จะนำสุทธที่ดีที่สุดนั้นมาทดสอบการควบคุมโรคในแปลงนาระบบเปิด

3.2.7 การทดสอบผลผลิตพันธุ์ในการควบคุมโรคใบไหม้ข้าวในแปลงนาระบบเปิด

นำผลผลิตพันธุ์สุทธที่ดีที่สุดในการทดลองในโรงเรือนมาทดสอบการควบคุมโรคใบไหม้ข้าวแบบป้องกันการเกิดโรค (preventive test) และแบบยับยั้งการเกิดโรค (curative test) ในแปลงนาระบบเปิด โดยมีวิธีการดังนี้

3.2.8.1 การเตรียมต้นข้าว

ปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในแปลงนาขนาด 1 ตารางเมตร ให้น้ำท่วมขังตลอดเวลาและไม่ใส่ปุ๋ยเคมี เมื่อต้นข้าวมีอายุครบ 30 วันจะนำมาใช้ในการทดลอง โดยใช้เชือกฟางแบ่งเป็นช่องเล็ก ๆ ขนาด 20x50 เซนติเมตร จำนวน 10 ช่องสำหรับแต่ละทรีทเมนต์

3.2.8.2 การทดสอบการป้องกันโรคใบไหม้ (preventive test)

ฉีดพ่นผลผลิตพันธุ์สุทธที่ได้รับการคัดเลือกจากในระดับโรงเรือนลงบนใบข้าวในแปลงนาที่แบ่งไว้ขนาด 20 x 50 เซนติเมตร จำนวน 5 ช่อง ดังนี้ ช่องที่ 1 เป็นต้นข้าวปกติไม่ฉีดพ่นสารใดใด ช่องที่ 2 ฉีดพ่นสารเคมี Carbendazim 0.1 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อช่อง ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกในการวัดประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ ช่องที่ 3 ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบโดยจะฉีดพ่นเชื้อก่อโรคหลังจากนี้ ช่องที่ 4 ฉีดพ่นผลผลิตพันธุ์สุทธที่ได้รับการคัดเลือกความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อช่อง และช่องที่ 5 ฉีดพ่นผลผลิตพันธุ์สุทธที่ได้รับการคัดเลือกความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อช่อง เมื่อครบ 12 ชั่วโมงหลังจากฉีดพ่นสารต่างๆ จึงฉีดพ่นเชื้อก่อโรคใบไหม้ข้าวปริมาตรช่องละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ช่อง โดยเว้นช่องที่ 1 ไว้เพื่อดูลักษณะของต้นข้าวปกติ ประเมินความรุนแรงและอัตราการเกิดโรคเมื่อครบ 3 วัน ไปจนครบ 7 วัน

3.2.8.3 การทดสอบการยับยั้งโรคใบไหม้ (curative test)

ฉีดพ่นเชื้อก่อโรคใบไหม้ข้าวปริมาตรช่องละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ช่อง โดยเว้นช่องที่ 1 ไว้เพื่อดูลักษณะของต้นข้าว ช่องที่ 2 ฉีดพ่นสารเคมี Carbendazim 0.1 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อช่อง ช่องที่ 3 ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบโดยจะไม่ฉีดพ่นสารอื่นๆนอกจากเชื้อก่อโรค ช่องที่ 4 ฉีดพ่นผลผลิตพันธุ์สุทธที่ได้รับการคัดเลือกความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อช่อง และช่องที่ 5 ฉีดพ่นผลผลิตพันธุ์สุทธที่ได้รับการคัดเลือกความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อช่อง ประเมินความรุนแรงและอัตราการเกิดโรคเมื่อครบ 3 วัน ไปจนครบ 7 วัน โดยติดตามผลและให้

คะแนน (rate scale) แบ่งเกณฑ์คะแนนตาม the standard evaluation system of IRRI (1996) ดังนี้

- 0 : ไม่เกิดบาดแผลบนใบข้าว
- 1 : เกิดรอยแผลเป็นจุดสีน้ำตาลเล็กขนาดเท่าหัวเข็ม
- 2 : เกิดบาดแผลเป็นจุดสีน้ำตาลไหม้ขนาดใหญ่ขึ้น
- 3 : เกิดบาดแผล เป็นจุดกลมรีขนาด 1-2 มิลลิเมตร มีขอบสีเหลืองหรือน้ำตาล
- 4 : เกิดบาดแผลรอยไหม้รูปไข่ 2 เซนติเมตรขึ้นไป
- 5 : เกิดบาดแผลลักษณะรอยไหม้ น้อยกว่า 10% ของพื้นที่ใบ
- 6 : เกิดบาดแผลลักษณะรอยไหม้ คิดเป็น 10-25 % ของพื้นที่ใบ
- 7 : เกิดบาดแผลลักษณะรอยไหม้ คิดเป็น 26-50 % ของพื้นที่ใบ
- 8 : เกิดบาดแผลลักษณะรอยไหม้ คิดเป็น 51-75 % ของพื้นที่ใบ
- และ 9 : ลักษณะใบไหม้ทั้งใบ

สูตรที่ใช้สำหรับคำนวณ

$$\text{อัตราการเกิดโรค} = \frac{\sum(\text{ระดับของการเกิดโรค} \times \text{จำนวนใบข้าวในระดับที่เกิดโรค})}{(\text{จำนวนใบข้าวทั้งหมด} \times 9)}$$

$$\text{ประสิทธิภาพการควบคุมโรค} = \frac{(\text{อัตราการเกิดโรคของตัวควบคุมเชิงลบ} - \text{อัตราการเกิดโรคของทรีทเมนต์}) \times 100}{\text{อัตราการเกิดโรคของตัวควบคุมเชิงลบ}}$$

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA)

และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธีของ Duncan's Multiple Range test (DMST) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3.2.9 การทดสอบความเป็นพิษของตำรับผลิตภัณฑ์ต่อสัตว์น้ำ และความเป็นพิษต่อเซลล์

3.2.10.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อปลาไนล์

กำหนดความเข้มข้นของตำรับผลิตภัณฑ์ในลักษณะ log scale ให้อยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ 100 – 10,000 ppm เพื่อให้ได้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองช่วงแคบเพื่อหา LC₅₀ ต่อไป โดยนับจำนวนอัตราการตายของปลาไนล์ทุก 24 ชั่วโมง การวิเคราะห์ข้อมูลใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS โดยวิธี Probit analyze นำข้อมูลการตายสะสมของสัตว์ทดลองมาวิเคราะห์ หาค่า LC_{50} โดยใช้โปรแกรม spss regression probit analysis

3.2.10.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ปลูกเซลล์ไตของลิง (African Green Monkey Kidney cell: Vero cell) จำนวน 5×10^4 cell/ml ลงใน 96-well plate ปริมาตร 100 บ่มเซลล์ในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารออกจากแต่ละหลุมแล้วเติมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1,000, 500, 250, 125 และ 62.5 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 100 $\mu\text{g/well}$ เมื่อบ่มเซลล์ครบกำหนดเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml , 10 $\mu\text{g/well}$ บ่มเซลล์ในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 นาน 4 ชั่วโมง แล้วดูดสารละลาย MTT ทิ้ง แล้วเติมสารละลายผลึก Formazan ในที่นี้ใช้ 100% DMSO : 10% SDS อัตราส่วน 9:1 ปริมาตร 150 $\mu\text{l/well}$ วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 nm ตั้งโปรแกรมเขย่า 5 นาทีก่อนวัดค่า OD คำนวณ % Cytotoxicity โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [(A-B)/A] \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารละลายตัวอย่างแต่ละชนิด

3.2.11 การทดสอบต้านผลผลิตภัณฑ์ในการป้องกันกำจัดวัชพืช

ทำการทดลองประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของเมล็ดหญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.) โดยทำการละลายผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากกรรมวิธีข้างต้น และทดสอบผลในการยับยั้งการงอกกับพืชทดสอบทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์เท่ากัน ใช้กระดาษเพาะเมล็ดเป็นวัสดุเพาะในจานทดลอง วางจานทดลองในตู้เพาะเลี้ยง (Growth chamber) ที่ควบคุมให้มีแสง 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่มีแสง 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกผล และการวิเคราะห์ผลการทดลอง นับจำนวนการงอกของเมล็ดวันที่ 7 หลังจากเริ่มเพาะเมล็ด โดยกำหนดให้เมล็ดที่มีรากอ่อนงอกออกมาจากเปลือกหุ้มเมล็ดอย่างน้อย 2 มิลลิเมตร เป็นเมล็ดที่งอก นับเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต วัดความยาวราก และความยาวต้น นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's Studentized Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3.2.12 การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์

ศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ ทดสอบด้วยวิธีการเก็บในที่ร้อนสลับเย็น (heating and cooling cycle) โดย 1 รอบ คือ เก็บในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำทั้งหมด 5 รอบ เปรียบเทียบพฤติกรรมด้านเชื้อราก่อโรคในแต่ละรอบโดยนำผลิตภัณฑ์มาผสมในอาหาร PDA โดยวาง Mycelium plug

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อ *P. grisea* ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ในแต่ละเพลท ชุดควบคุมที่ใช้เป็นอาหาร PDA ที่ปราศจากน้ำหมักจากเชื้อแอสเพอร์จิลลัสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้ววัดรัศมีของเส้นใยที่เจริญขึ้นแล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ยั้ง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่างการแยกเชื้อ และเชื้อที่ใช้ในการศึกษา

การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อแอกติโนมัยสปีทที่ใช้ในการทดลองดำเนินการโดยนายสุขเกษม คงสันต์ ซึ่งทำการแยกเชื้อจากลำต้น ใบข้าว และดินบริเวณรอบๆรากข้าว และเก็บรักษาเชื้อภายใต้ความเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation) ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 20% ที่อุณหภูมิ -20 °C การศึกษาครั้งนี้นำเชื้อจำนวน 15 ไอโซเลตมาทำการศึกษาดังรายละเอียดในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 รายละเอียดของตัวอย่าง และเชื้อแอกติโนมัยสปีทที่ใช้ในการศึกษา

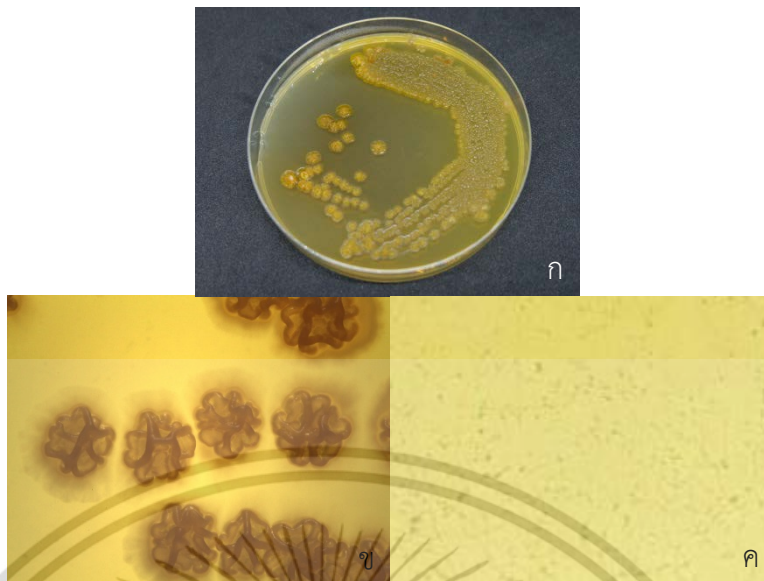
ชนิดของตัวอย่าง	จังหวัด	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อ (15 ไอโซเลต)
ใบข้าวพันธุ์ กข 31	สิงห์บุรี	SL	SL3-70
ใบข้าวพันธุ์ตอง 1	ปทุมธานี	AT1L	AT1L-8
ลำต้นข้าวพันธุ์ตอง 1	ปทุมธานี	AT1S	AT1S-8
ดินรอบรากข้าวพันธุ์ตอง 1	ปทุมธานี	UT1R, SLB	UT1R-9-4, SLB1-1
ดินรอบรากข้าวพันธุ์ กข 47	ฉะเชิงเทรา	U47BR	U47BR-9-6
ดินรอบรากข้าวพันธุ์ กข 51	ฉะเชิงเทรา	51B	51B-9-11, 51B-4-3, 51B-9-1
ดินรอบรากข้าวพันธุ์ขวัญชัย	สุพรรณบุรี	DCWR	DCWR-9-1, DCWR-9-8-2, PCWR-4-6
ดินรอบรากข้าวพันธุ์หอมปทุม	ลพบุรี	UHR	UHR-9-5
ดินรอบรากข้าวพันธุ์ พิษณุโลก 2	พิษณุโลก	CP2R	CP2R-9-1, PP2R-9-A1

4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสปีท

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยสปีทจำนวน 15 ไอโซเลต มีลักษณะดังนี้

ไอโซเลต 51B-9-11 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสปีทที่มีโคโลนีสีน้ำตาลอ่อนยึดเกาะแน่นติดกับผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ผิวโคโลนีขรุขระ ไม่สร้างเส้นใยอากาศ สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอ่อน และสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้สีน้ำตาลบนอาหาร ISP2 เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า พบสปอร์ขนาดเล็กต่อกันเป็นสายตรงสั้น (รูปที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต 51B-9-11
 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
 (ค) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์
 ส่องระยะใกล้ กำลังขยาย 400 เท่า

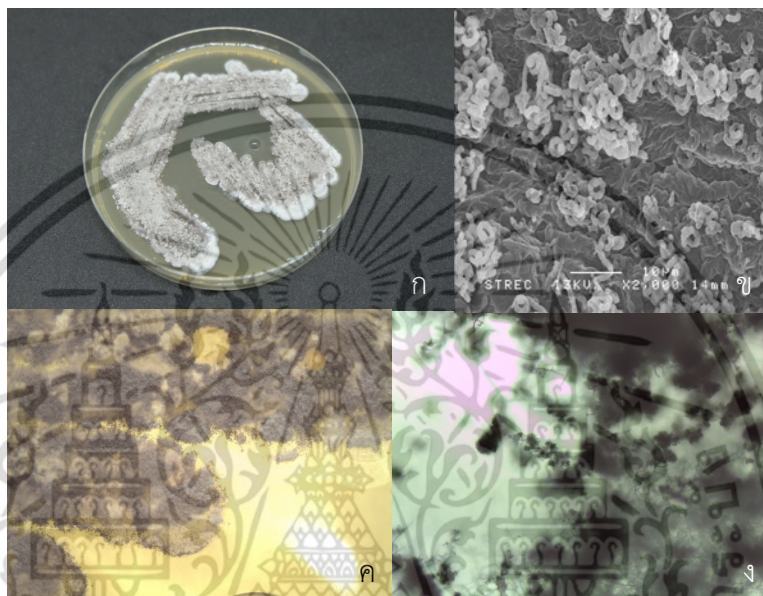
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลต 51B-9-11 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces bungsensis* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.93 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 86 (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต 51B-9-11 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

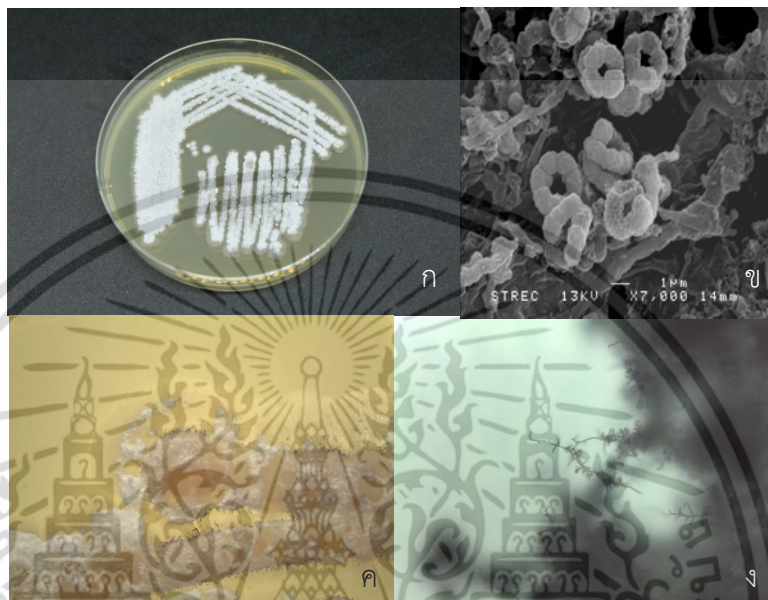
ไอโซเลต AT1L-8 ลักษณะโคโลนีมีสีเทา เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอ่อนยึดเกาะแน่นกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์ เส้นใยอากาศมีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาวปกคลุมด้านบนและเปลี่ยนเป็นสีเทาดำเมื่ออายุมากขึ้น เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบสปอร์ต่อซดกันเป็นเกลียว (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต AT1L-8
 (ก และ ค) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
 (ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า
 (ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลต AT1L-8 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces samsunensis* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.86 ที่ระดับความเชื่อมั่นของbootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 76 (รูปที่ 4.5)

ไอโซเลต AT1S-8 ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอ่อนยึดเกาะแน่นกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างสปอร์ เส้นใยอากาศมีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาวปกคลุมด้านบนของเส้นใย เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่าและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบสปอร์ต่อซดกันเป็นเกลียว (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต AT1S-8

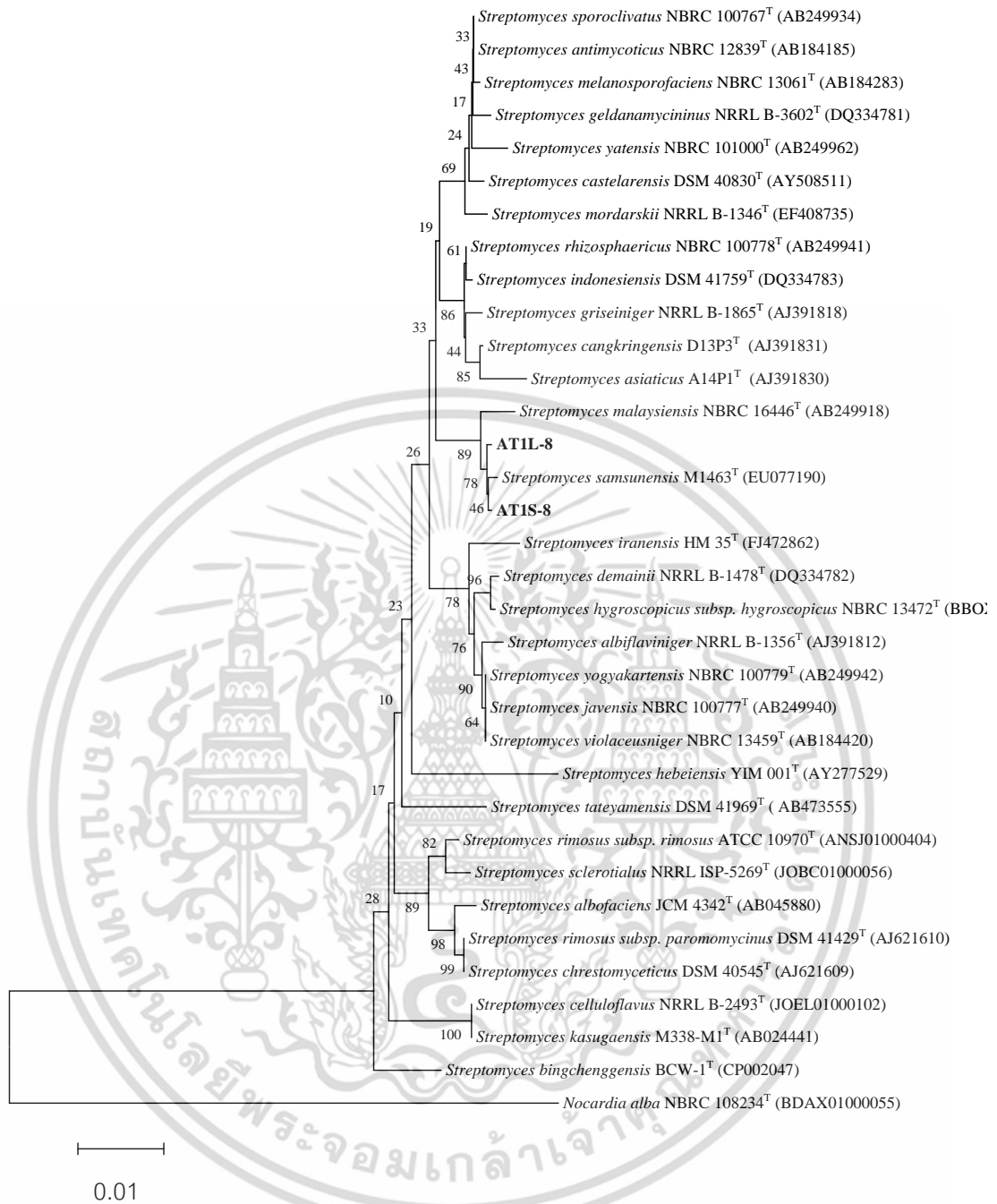
(ก และ ค) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอสเพอริลลัส ไอโซเลต AT1L-8 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces samsunensis* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.86 ที่ระดับความเชื่อมั่นของbootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 48 (รูปที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต AT1L-8 และ AT1S-8 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

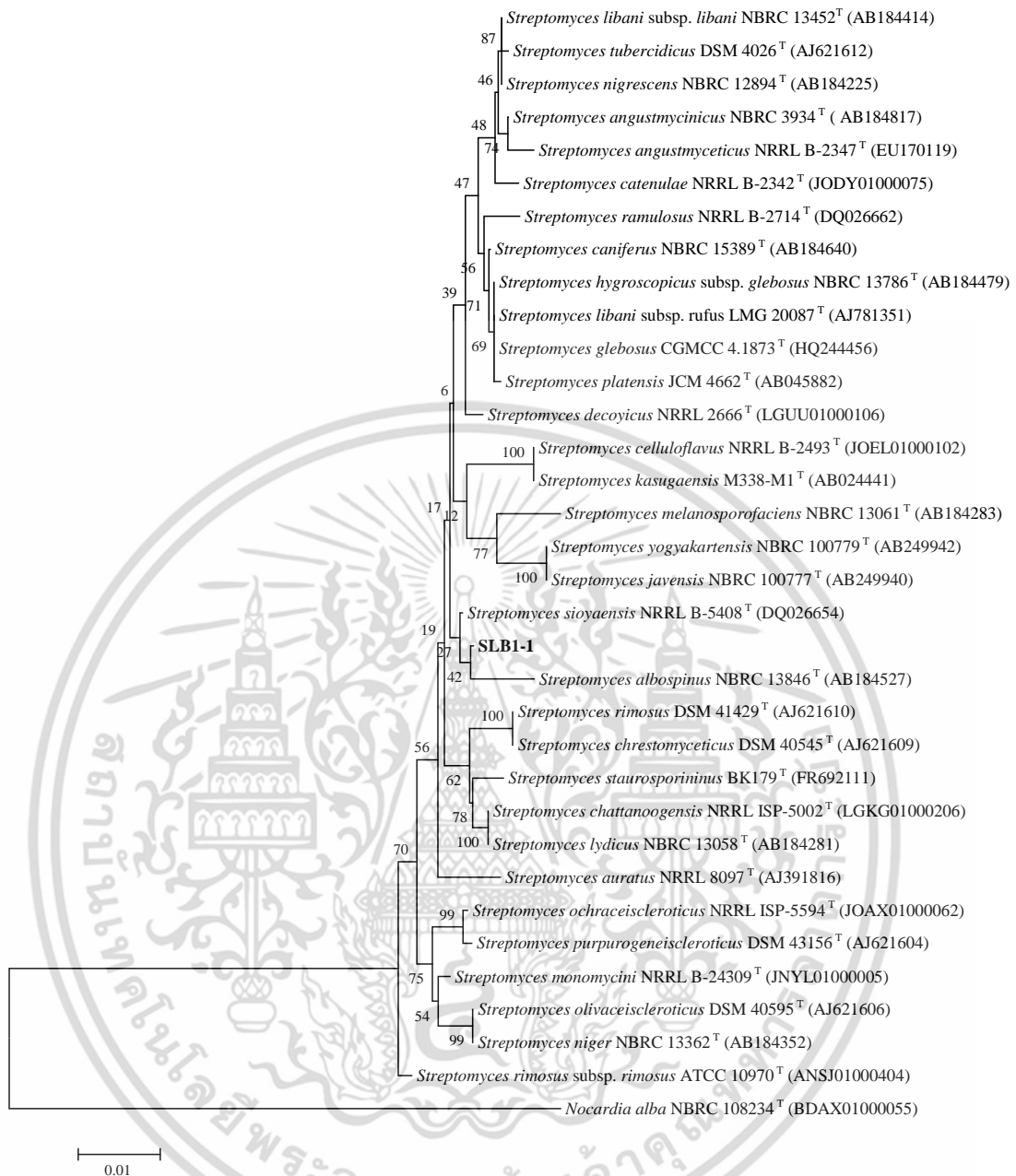
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต SLB1-1 ลักษณะโคโลนีมีสีดำเทา เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอ่อน สร้างเส้นใยอากาศสีขาวบนเส้นใยอาหารและจะเปลี่ยนเป็นสีเทาดำเมื่อถึงระยะการสร้างสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบสปอร์ต่อขดกันเป็นเกลียว (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต SLB1-1 (ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน (ค) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

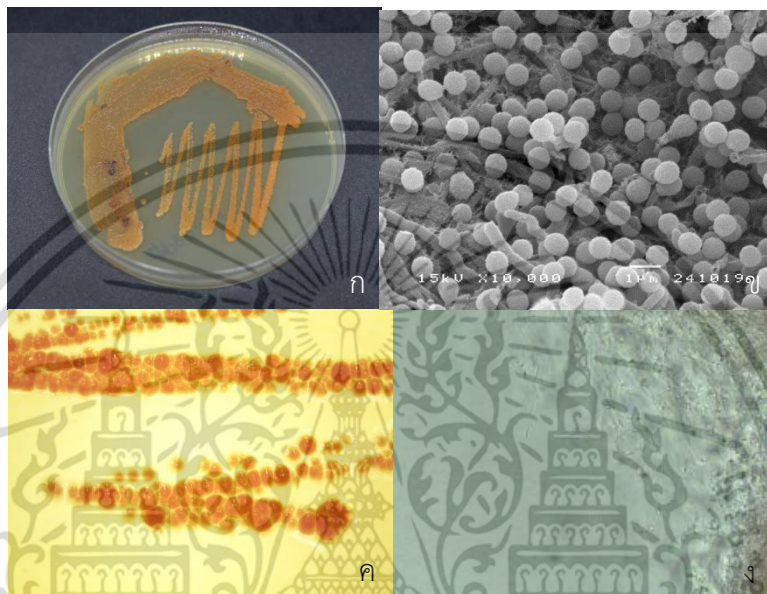
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลต SLB1-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces sioyaensis* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.69 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 27 (รูปที่ 4.7)



รูปที่ 4.7 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต SLB1-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต CP2R-9-A1 ลักษณะโคโลนีมีสีส้มแกมน้ำตาลเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร ISP2, ISP3 และ ISP4 ไม่สร้างเส้นใยอากาศในทุกอาหารทดสอบ และสร้างรงควัตถุละลายน้ำสีน้ำตาลอ่อนบนอาหาร ISP3 เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหารโดยตรง (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต CP2R-9-A1
 (ก และ ค) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
 (ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า
 (ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลต CP2R-9-A1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora harpali* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.93 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 99 (รูปที่ 4.9)

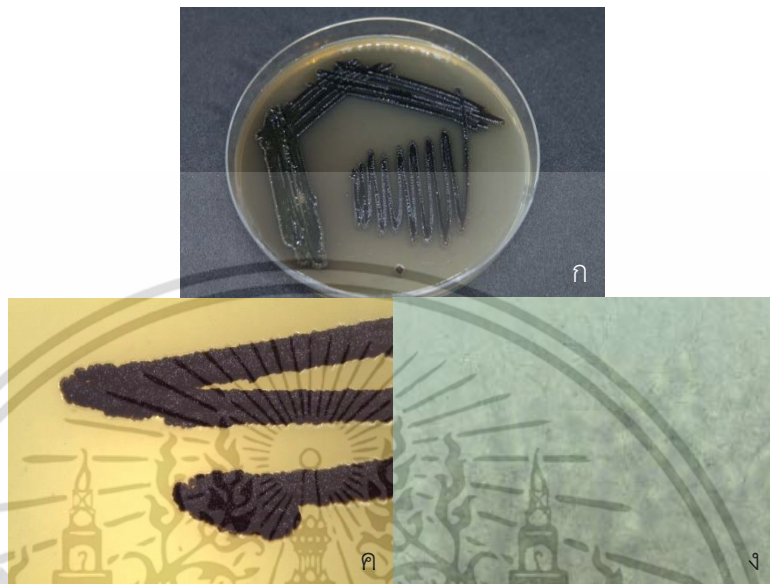
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CP2R9-A1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต DCWR-9-1 ลักษณะโคโลนีมีสีดำยืดยาวแน่นกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่สร้างเส้นใยอากาศ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทสร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหารโดยตรง (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต DCWR-9-1

(ก และ ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ค) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลต DCWR-9-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora humi* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 98.63 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 44 (รูปที่ 4.11)

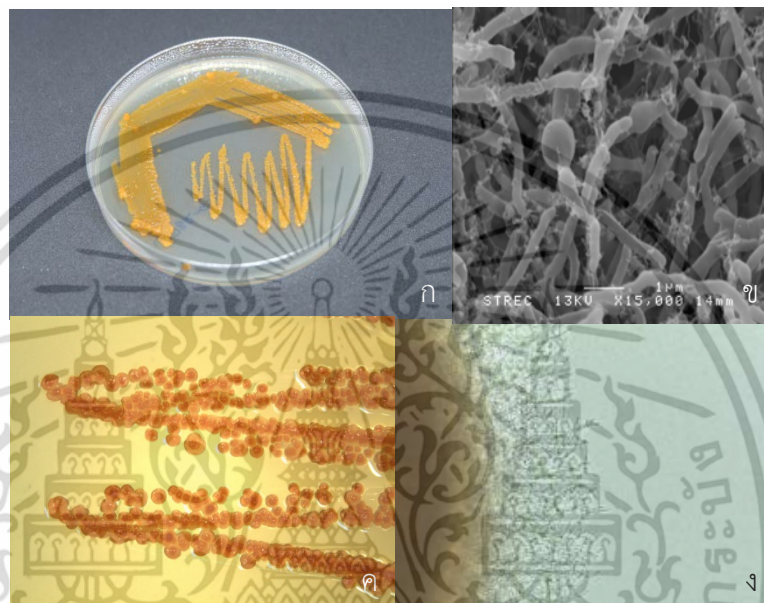
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต DCWR-9-1บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต DCWR-9-8-2 ลักษณะโคโลนีมีสีส้มไม่สร้างเส้นใยอากาศ และสร้างรงควัตถุ ละลายน้ำสีเหลืองส้มบนอาหาร ISP2 เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่อง ระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่าและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเชื้อ ไอโซเลตนี้สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหารโดยตรง (รูปที่ 4.12)

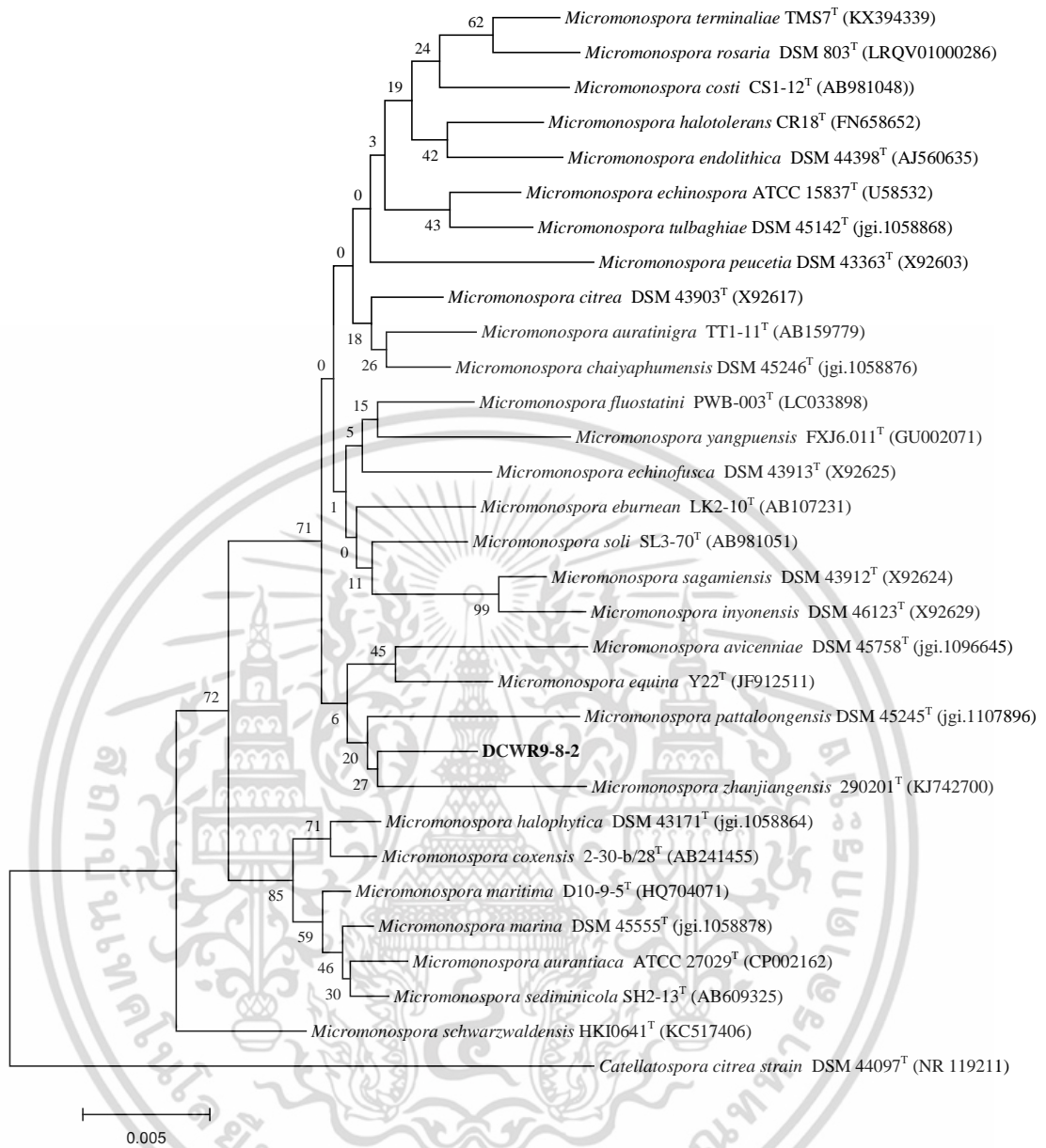


รูปที่ 4.12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต DCWR-9-8-2

- (ก และ ค) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่อง กราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า
- (ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยสีท ไอโซเลต DCWR-9-8-2 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora zhanjiangensis* มากที่สุดด้วยค่า ร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 98.61 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 27 (รูปที่ 4.13)

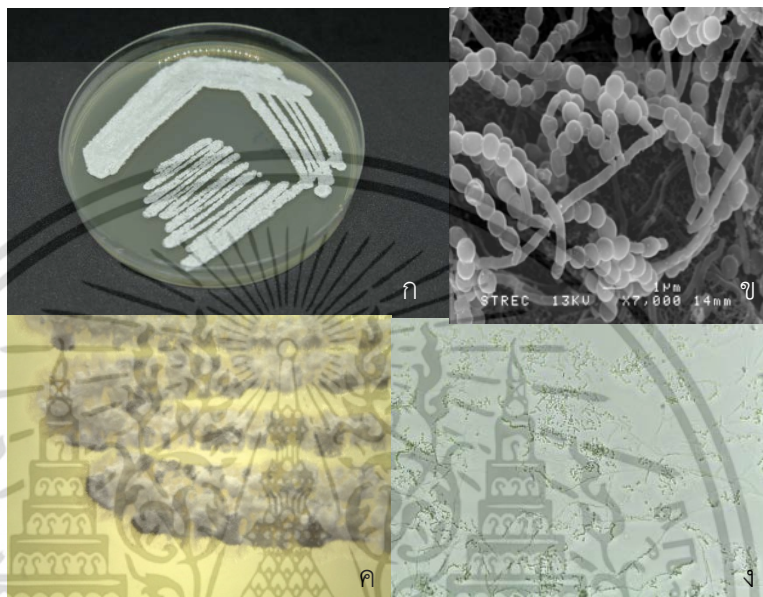
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต DCWR-9-8-2 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต 51B-4-3 ลักษณะโคโลนีมีสีขาว สร้างเส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อนยึดเกาะแน่นกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ พบเส้นใยอากาศสีขาวปกคลุมที่โคโลนีและจะเปลี่ยนเป็นสีเทาเมื่อถึงระยะการสร้างสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่าและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเชื้อไอโซเลตนี้สร้างสปอร์รูปร่างกลมต่อกันเป็นเส้นตรงสายสั้นบนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.14)

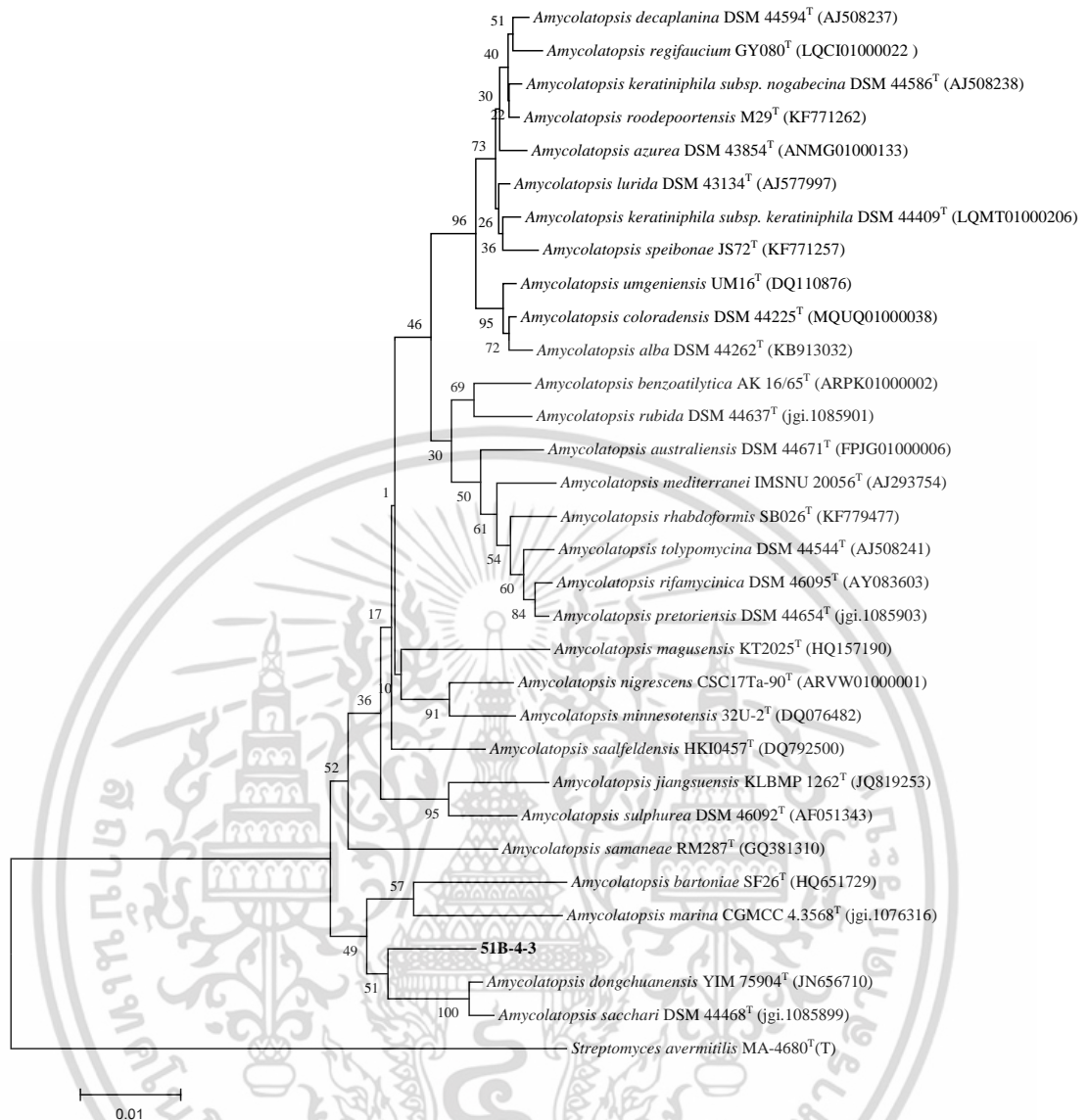


รูปที่ 4.14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต 51B-4-3

- (ก และ ค) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า
- (ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลต 51B-4-3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Amycolatopsis dongchuanensis* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 97.92 ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 51 (รูปที่ 4.15)

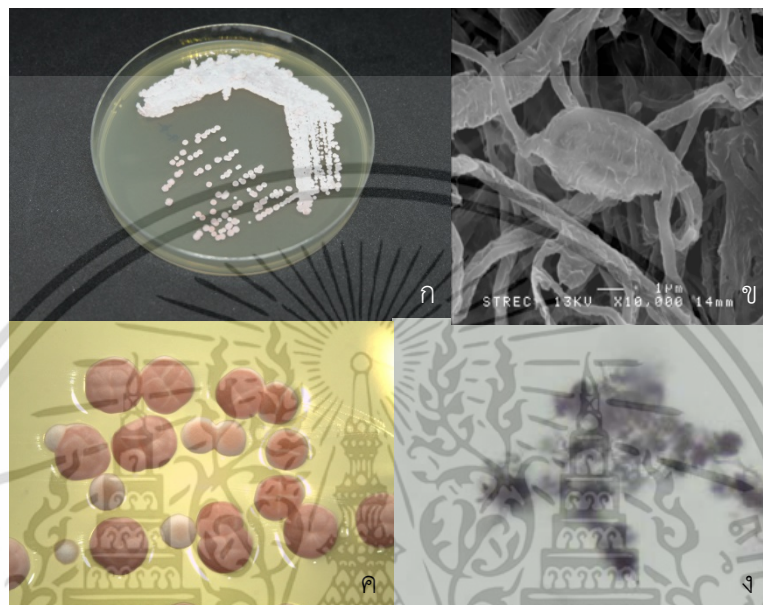
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต 51B-4-3 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PCWR-4-6 สร้างเส้นใยอาหารสีชมพู และพบเส้นใยอากาศสีขาวขึ้นปกคลุมเมื่ออายุมากขึ้น เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่าและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเชื้อไอโซเลตนี้สร้างขึ้นส่วนที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมรีขนาดใหญ่บนเส้นใยอากาศ (รูปที่ 4.16)



รูปที่ 4.16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6

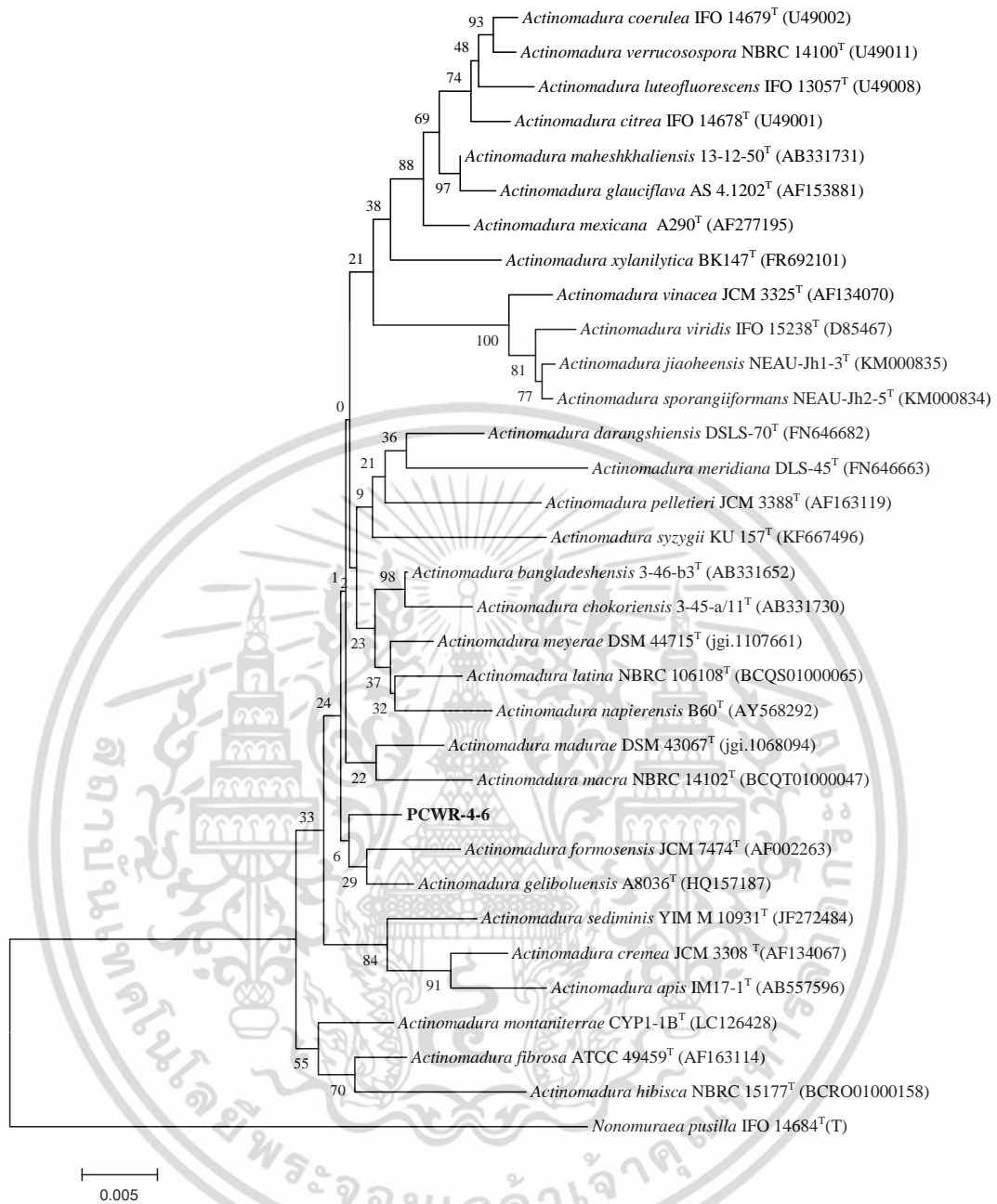
(ก และ ค) ลักษณะโคโลนิบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลต PCWR-4-6 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Actinomadura maheshkhaliensis* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 98.82 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 6 (รูปที่ 4.17)

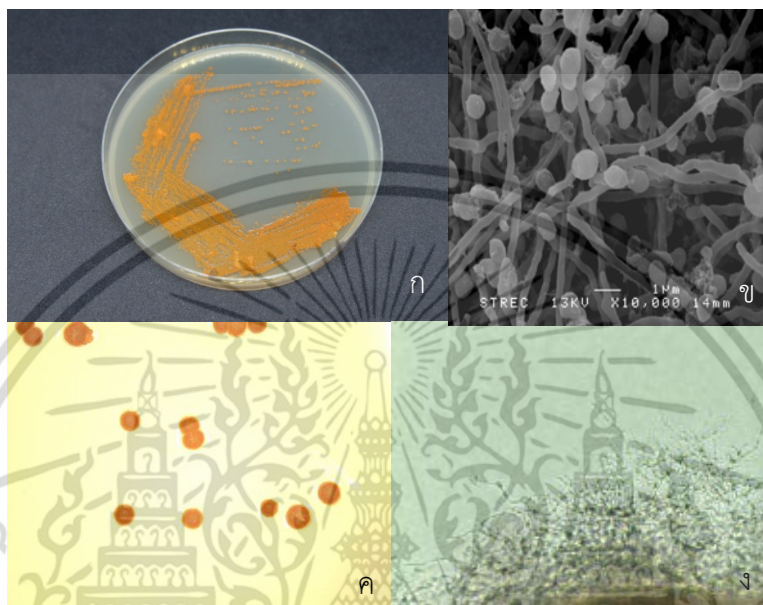
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PCWR-4-6 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต 51B-9-11 ลักษณะโคโลนีมีสีส้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศในทุกอาหารทดสอบ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่าและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเชื้อไอโซเลตนี้สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหารโดยตรง (รูปที่ 4.18)



รูปที่ 4.18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต 51B-9-11

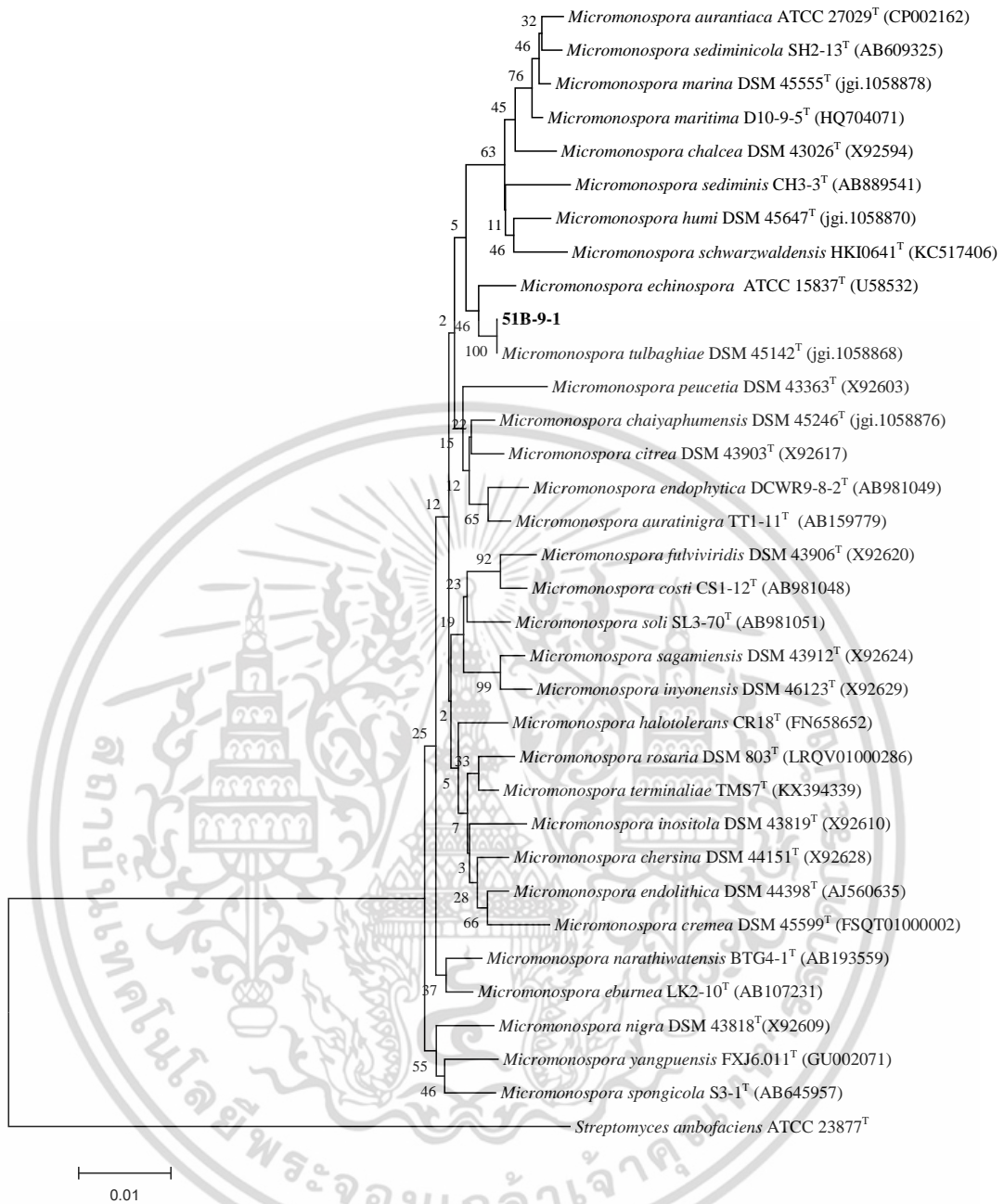
(ก และ ค) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลต 51B-9-11 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora tulbaghia* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.93 ที่ระดับความเชื่อมั่นของbootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 100 (รูปที่ 4.19)

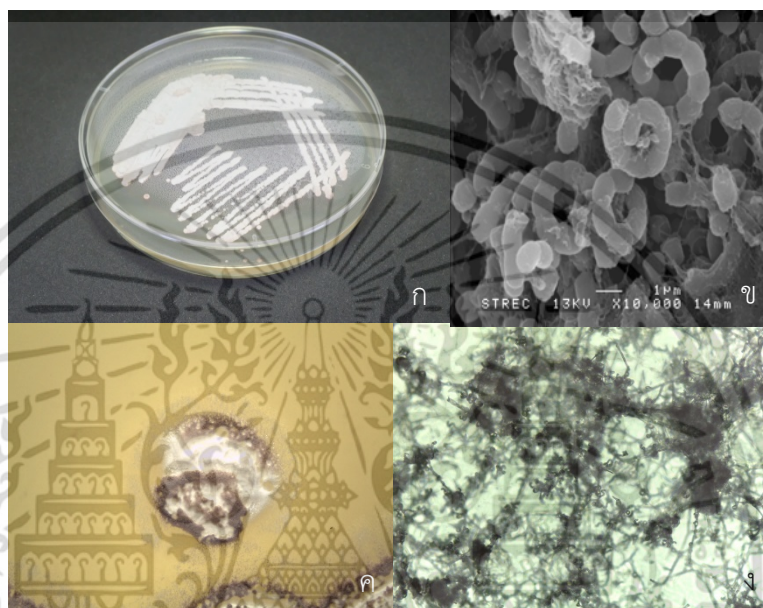
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต 51B-9-1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต PP2R-9-A1 ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยอาหารมีสีเหลืองอ่อนยึดเกาะแน่นกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยอากาศมีลักษณะเป็นผงแป้งสีขาวปกคลุมด้านบนและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มเมื่อถึงระยะสร้างสปอร์ สร้างรงควัตถุละลายน้ำสีเทาอ่อนบนอาหาร ISP2 เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่าและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าสปอร์ต่อซดกันเป็นเกลียว (รูปที่ 4.20)

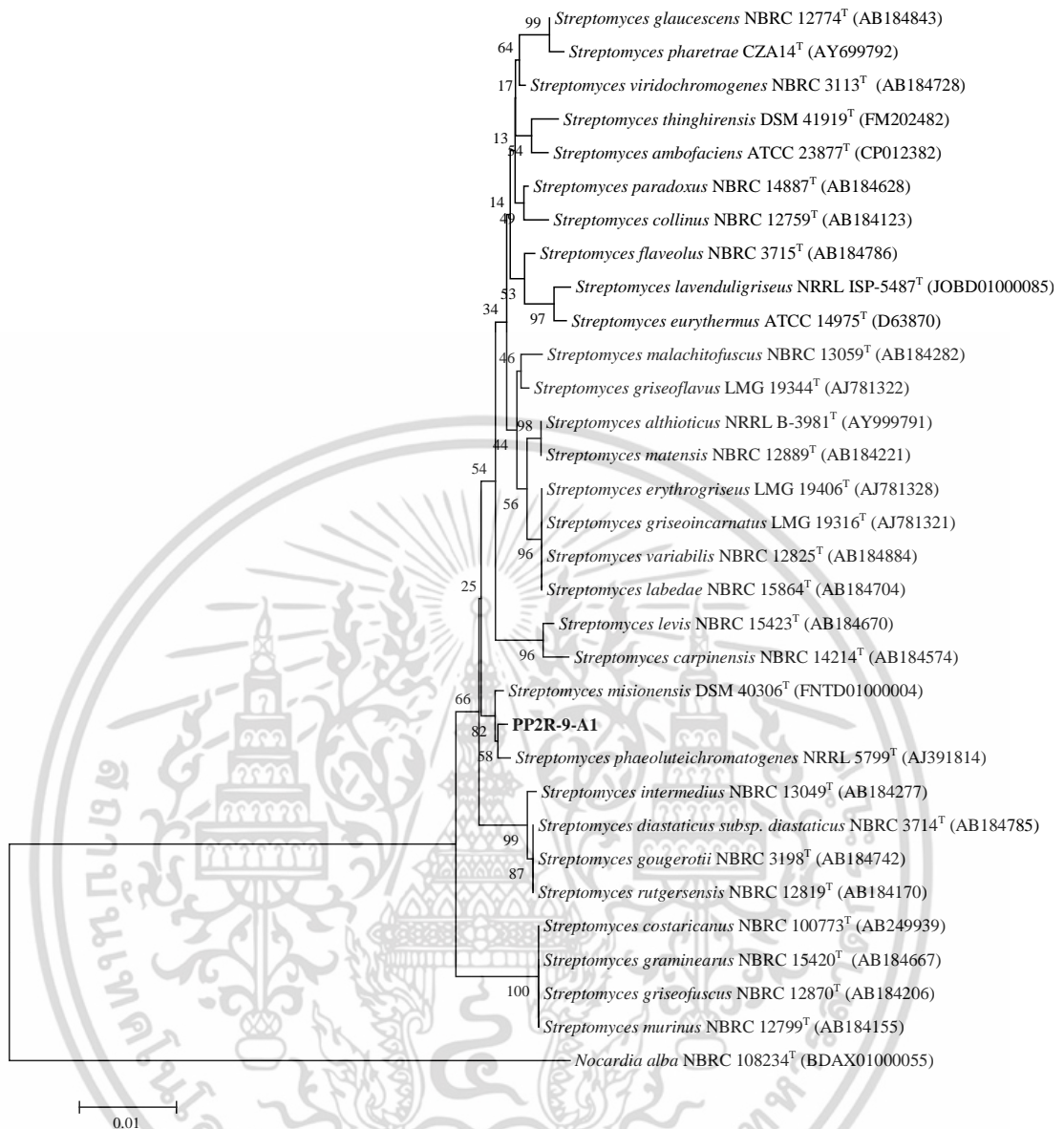


รูปที่ 4.20 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต PP2R-9-A1

- (ก และ ค) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า
- (ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยสีท ไอโซเลต PP2R-9-A1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces phaeoluteichromatogenes* มากที่สุด ด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.57 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 58 (รูปที่ 4.21)

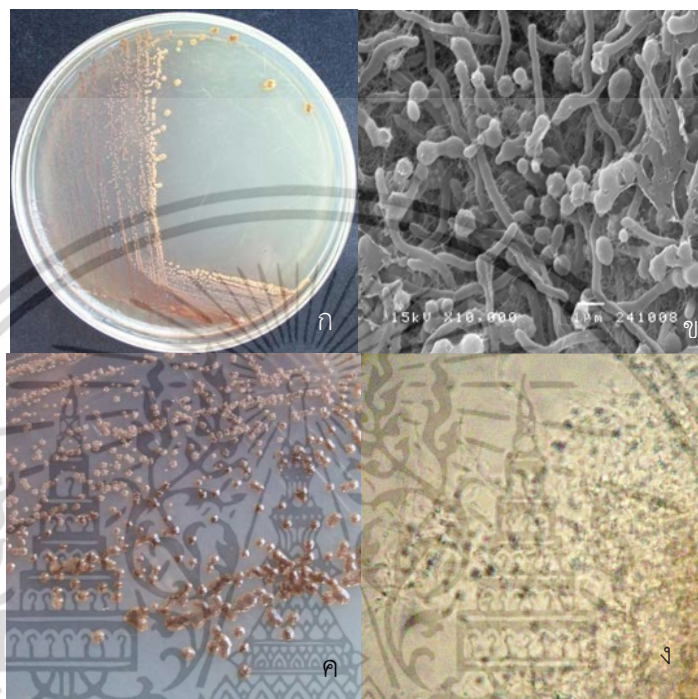
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต PP2R-9-A1 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต SL3-70 ลักษณะโคโลนีมีสีส้มเมื่อถึงระยะการสร้างสปอร์จะกลายเป็นสีน้ำตาลเข้ม ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะขรุขระ ไม่สร้างเส้นใยอากาศในทุกอาหารทดสอบ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่าและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเชื้อไอโซเลตนี้สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหารโดยตรง (รูปที่ 4.22)



รูปที่ 4.22 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต SL3-70

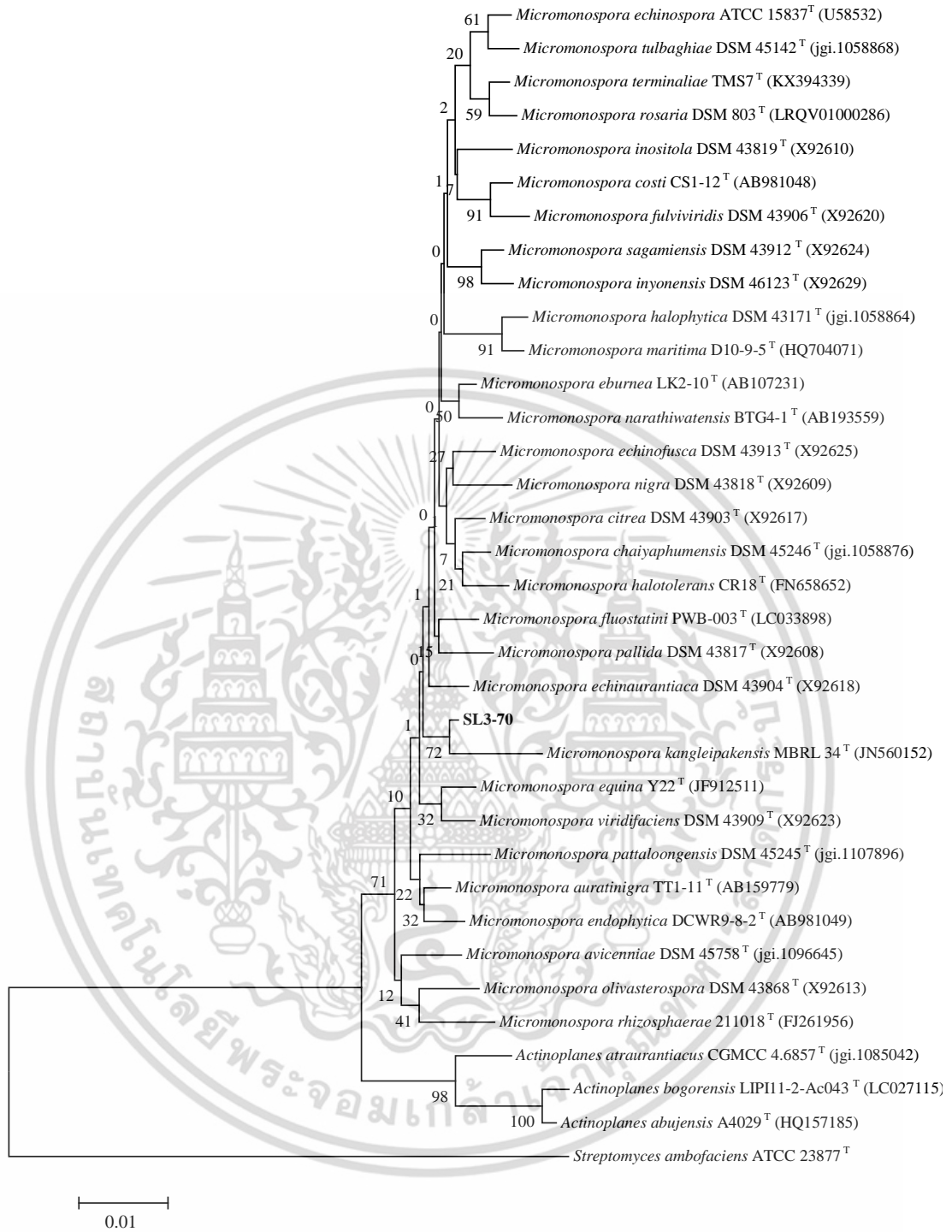
(ก และ ค) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยสีท ไอโซเลต SL3-70 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora kangleipakensis* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 98.94 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 72 (รูปที่ 4.23)

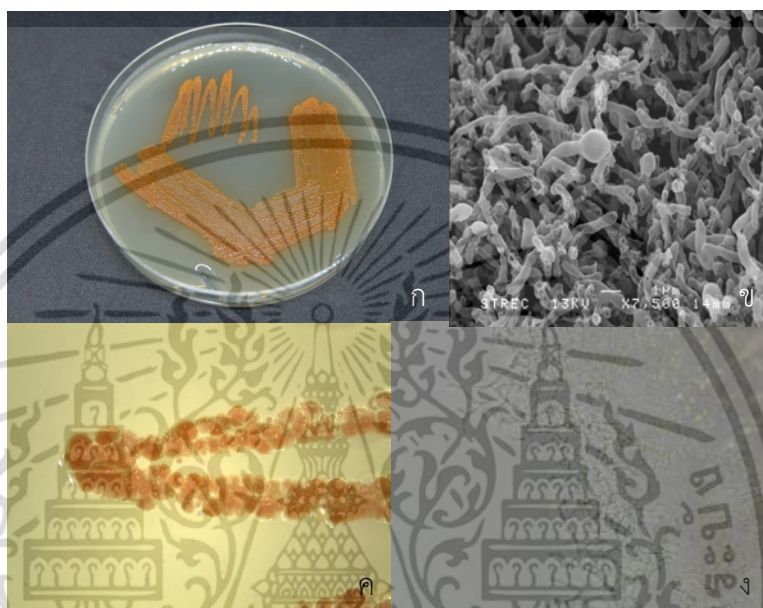
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต SL3-70 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต U47BR-9-6 ลักษณะโคโลนีมีสีส้ม ไม่สร้างเส้นใยอากาศในทุกอาหารทดสอบ เจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร ISP2 และสร้างรงควัตถุละลายน้ำได้สีส้มอ่อน เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่าและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทสร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหารโดยตรง (รูปที่ 4.24)



รูปที่ 4.24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต U47BR-9-6

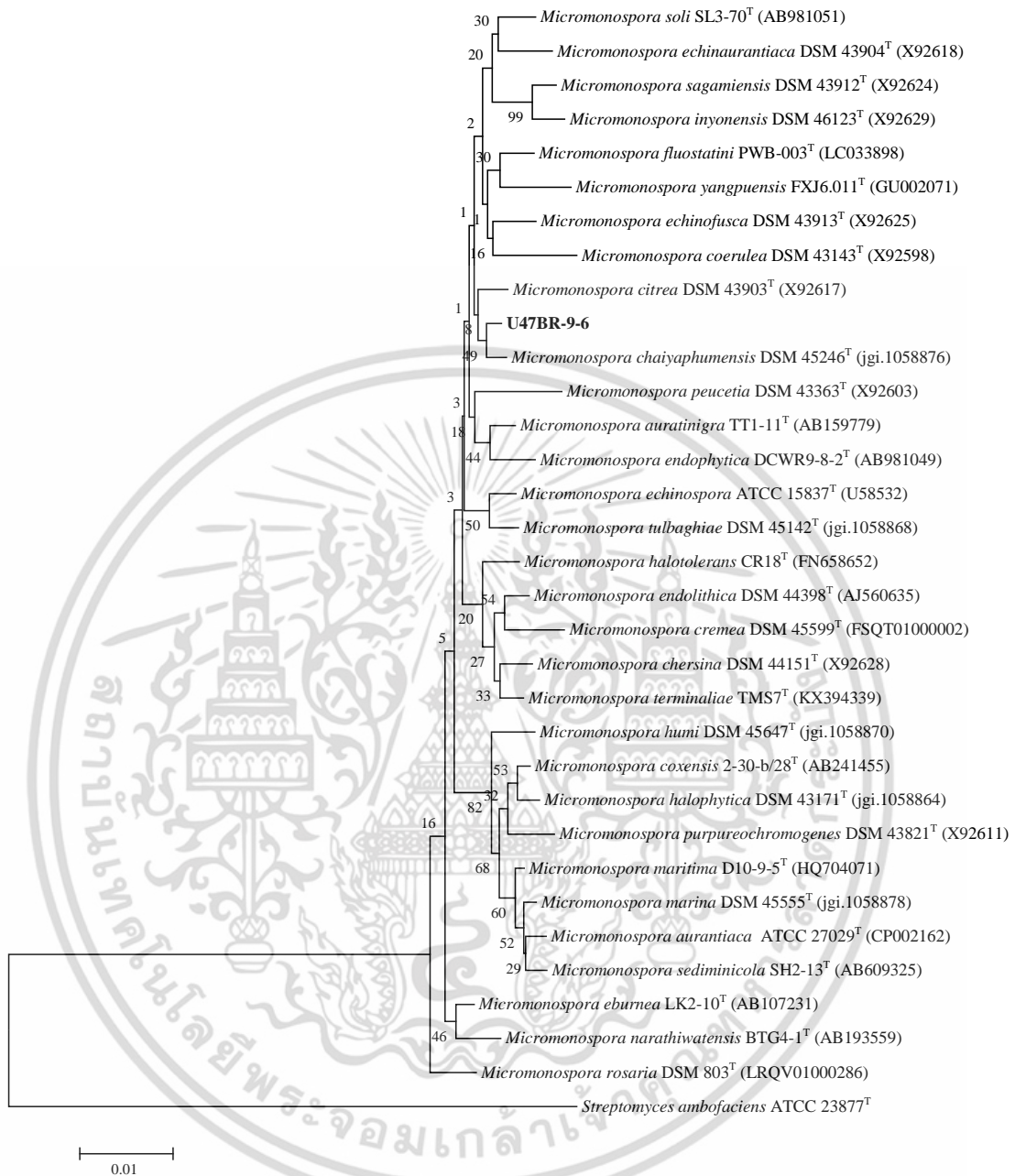
(ก และ ค) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต U47BR-9-6 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora chaiyaphumensis* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.58 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 49 (รูปที่ 4.25)

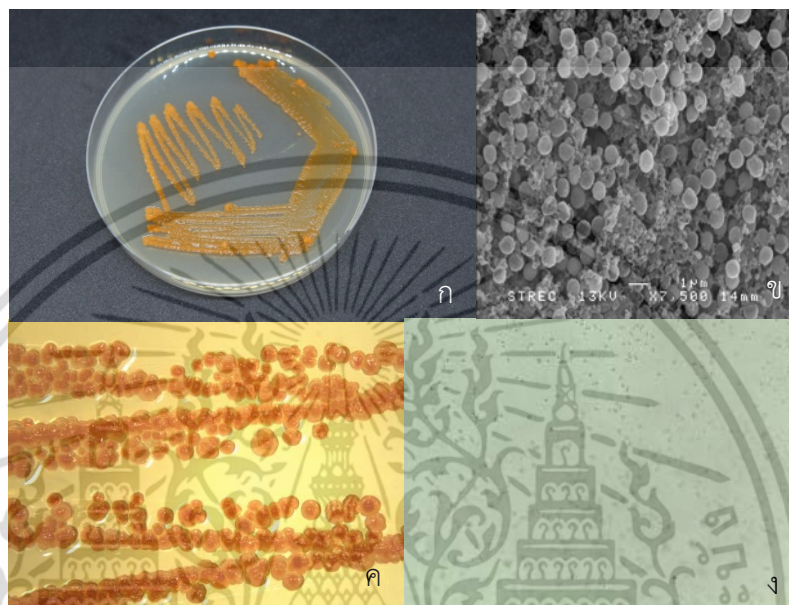
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.25 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต U47BR-9-6 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต UHR-9-5 ลักษณะโคโลนีมีสีส้มยึดเกาะแน่นกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่สร้างเส้นใยอากาศในทุกอาหารทดสอบ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่าและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบการสร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอาหารโดยตรง (รูปที่ 4.26)



รูปที่ 4.26 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต UHR-9-5

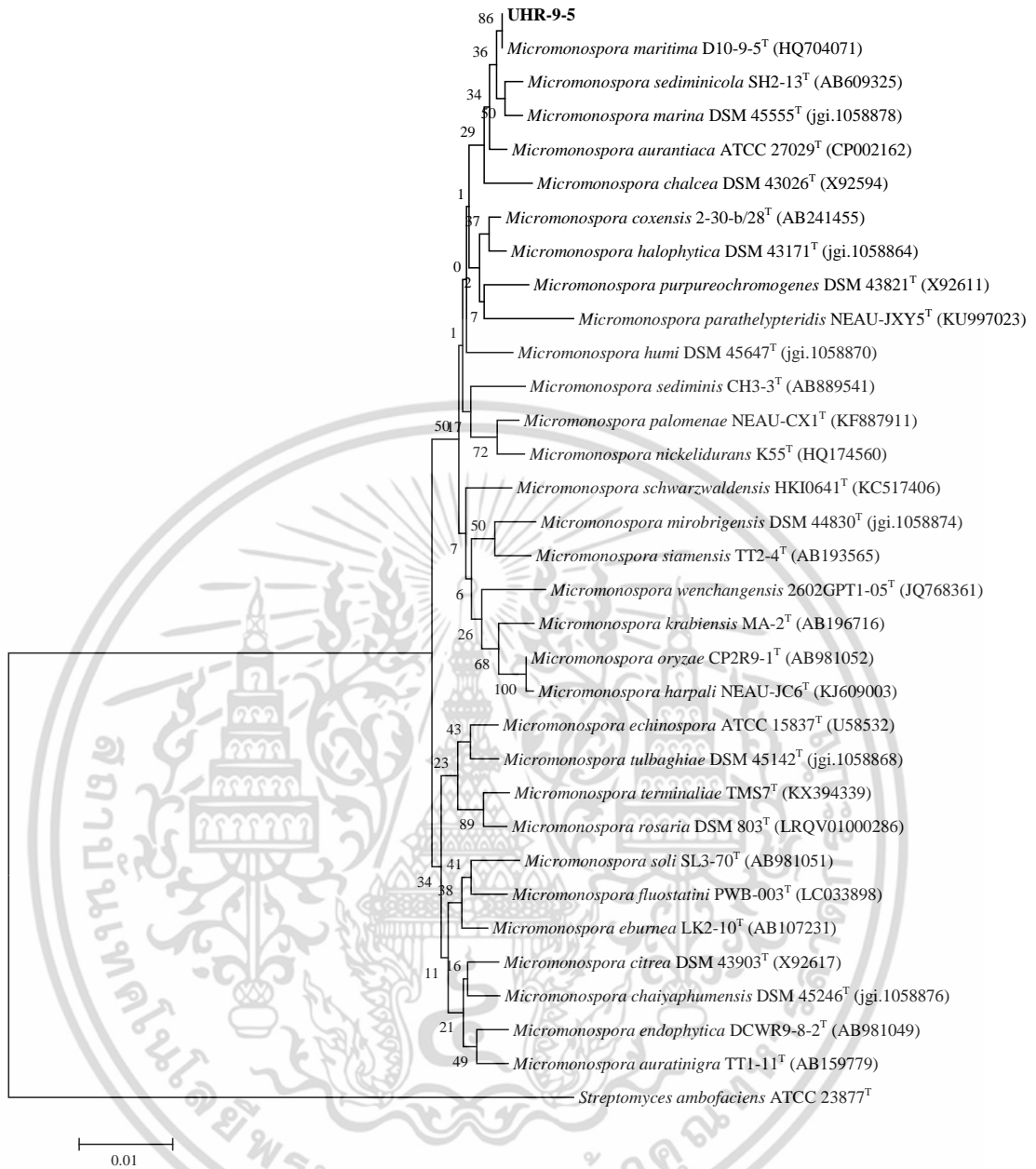
(ก และ ค) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน

(ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า

(ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลต UHR-9-5 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora maritima* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.93 ที่ระดับความเชื่อมั่นของbootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 86 (รูปที่ 4.27)

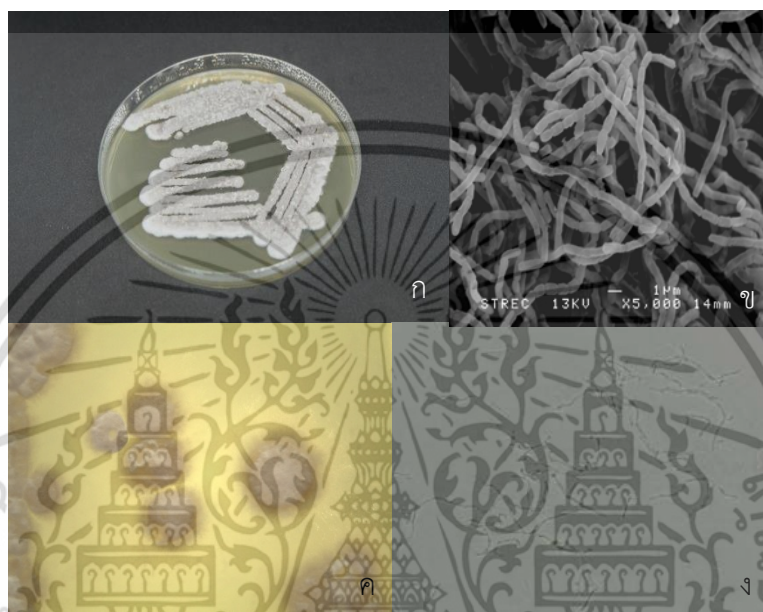
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต UHR-9-5 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต UT1R-9-4 ลักษณะโคโลนีมีสีเทาอ่อน เส้นใยอาหารมีสีเหลืองยึดเกาะแน่นกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นใยอากาศมีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาว เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล (long working distance) กำลังขยาย 400 เท่าและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเชื้อไอโซเลตนี้สร้างสปอร์รูปร่างแท่งสั้นต่อกันเป็นสายยาว (รูปที่ 4.28)

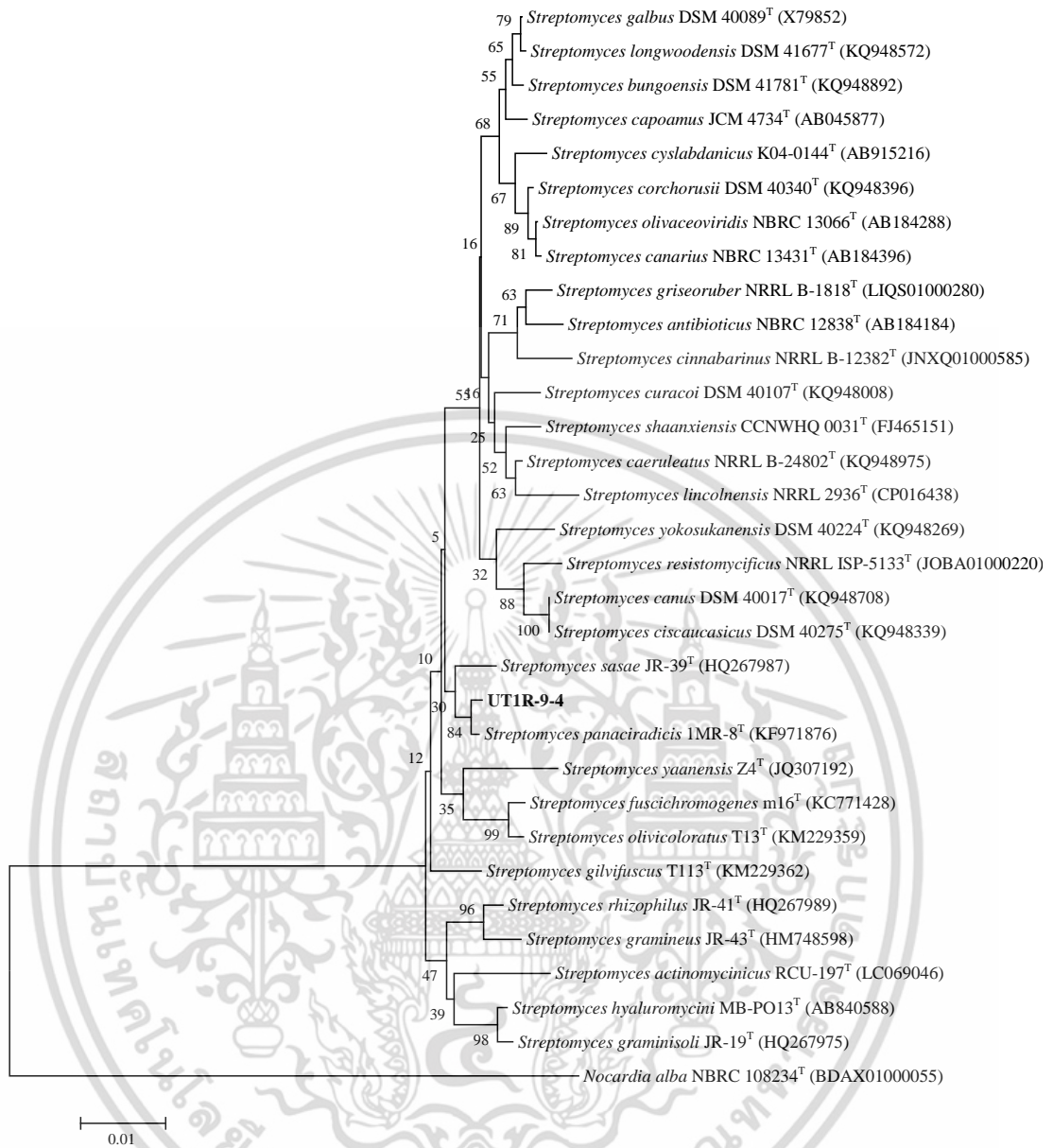


รูปที่ 4.28 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลต UT1R-9-4

- (ก และ ค) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 14 วัน
- (ข) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) กำลังขยาย 3,500 เท่า
- (ง) ลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงด้วยเลนส์ส่องระยะไกล กำลังขยาย 400 เท่า

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA gene ของเชื้อแอกติโนมัยซีท ไอโซเลต UT1R-9-4 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces panaciradicis* มากที่สุดด้วยค่าร้อยละความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (%similarity) เท่ากับ 99.79 ที่ระดับความเชื่อมั่นของbootstrap values บน phylogenetic tree ร้อยละ 84 (รูปที่ 4.29)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.29 ตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต UT1R-9-4 บน phylogenetic tree (neighbor-joining method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากวิเคราะห์ลำดับเบสบนยีน 16S rRNA ของเชื้อแอกติโนมัยสีททั้ง 15 ไอโซเลตพบว่า จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis* และ *Micromonospora* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ วันวิสาข์ (2546) ที่รายงานว่าสามารถแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟท์ จากตัวอย่างต่างๆเช่น ใบ ลำต้น และรากของต้นข้าว ในจังหวัดเชียงใหม่ แล้วนำมาศึกษาลักษณะทาง สัณฐานวิทยา พบว่าส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Coombs และคณะ (2004) ที่รายงานว่าสามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสีทเอนโดไฟท์ในรากของต้น ข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลีนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โรคพืช และ จัดจำแนกได้เป็นแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces*, *Micromonospora* และ *Nocardiodies*

4.3 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar cross streak สำหรับเชื้อแบคทีเรียและ dual culture สำหรับทดสอบเชื้อรา จำนวน 15 ไอโซเลต พบว่ามีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ AT1L-8, AT1S-8 และ SLB1-1 (ตารางที่ 4.2) โดยทั้งสามไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้เหมือนกัน จากการทดลองนี้พบว่าเชื้อทุกไอโซเลตไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้เลย

ตารางที่ 4.2 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar cross streak

ไอโซเลต	ขนาดความกว้างระหว่างขอบของเชื้อจุลินทรีย์กับขอบโคโลนีของแอกติโนมัยสีท (mm.)					
	MRSA	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E.coli</i>
51B-4-3	-	-	-	-	-	-
51B-9-1	-	-	-	-	-	-
51B-9-11	-	-	-	-	-	-
AT1L-8	-	18	21	-	-	-
AT1S-8	-	40	40	-	-	-
SLB1-1	-	40	40	-	-	-
CP2R-9-1	-	-	-	-	-	-
DCWR-9-1	-	-	-	-	-	-
DCWR-9-2-8	-	-	-	-	-	-
PCWR-4-6	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)...ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี agar cross streak

ไอโซเลต	ขนาดความกว้างระหว่างขอบของเชื้อจุลินทรีย์กับขอบโคโลนีของแอกติโนมัยสิท (mm.)					
	MRSA	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E.coli</i>
PP2R-9-A1	-	-	-	-	-	-
SL3-70	-	-	-	-	-	-
U47BR-9-6	-	-	-	-	-	-
UHR-9-5	-	-	-	-	-	-
UT1R-9-4	-	-	-	-	-	-

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นพบว่า ไอโซเลต AT1L-8, AT1S-8 และ SLB1-1 มีความสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด โดยทั้ง 3 ไอโซเลต จัดอยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* สอดคล้องกับรายงาน Usama R. A. และคณะ (2014) พบว่าเชื้อสกุล *Streptomyces* สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้หลากหลาย เช่น Actinorhodin, Prodiginine, Desferrioxamine E (Moody, 2014), Istamycin (Slattery *et al.*, 2001) Enniatin B1 (Ola *et al.*, 2013) และ Undecylprodigiosin (Zhu *et al.*, 2014) ซึ่งสามารถแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกับทั้ง 3 ไอโซเลต

4.4 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าว (*P. grisea*) จากเชื้อแอกติโนมัยสิทโดยใช้วิธี dual culture

การศึกษากาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคใบไหม้ของแอกติโนมัยสิททั้ง 15 ไอโซเลต จะพบว่ามีเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลต ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. grisea* ได้ คือ ไอโซเลต AT1L-8, AT1S-8 และ SLB1-1 (รูปที่ 4.30) โดยพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าวของเชื้อแอกติโนมัยสิททั้ง 3 ไอโซเลตมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งในช่วง 79.60 – 81.20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3) ซึ่งเชื้อแอกติโนมัยสิททั้ง 3 ไอโซเลตสร้างฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ได้ใกล้เคียงกับรายงานของ นรารธรรม (2554) ที่ทำการคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยสิทจากดินนาข้าว ใน 16 จังหวัดของประเทศไทย พบว่าส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* จากนั้นนำไอโซเลตที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคข้าว บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยใช้วิธี dual culture พบว่าไอโซเลต RF-12 มีความสามารถในการยับยั้งราก่อโรคข้าวได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ ไอโซเลต RF 16-12 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces albiflaviniger* NRRL B-1356^T (99.86 เปอร์เซ็นต์)

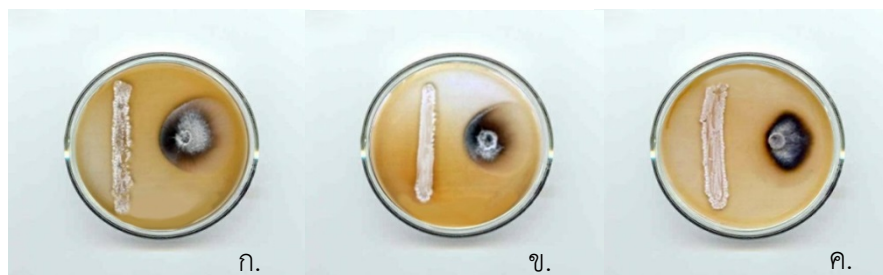
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองนี้พบว่าเชื้อ AT1S-8 AT1L-8 และ SLB1-1 มีความสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด จึงนำทั้ง 3 ไอโซเลตนี้ไปทำการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้

ตาราง 4.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าว (*P. grisea*) ของ แอคติโนมัยสีทโดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน

ไอโซเลต	% การยับยั้งการเจริญ ของเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าว
51B-4-3	-
51B-9-1	-
51B-9-11	-
AT1L-8	80.80 ± 3.35
AT1S-8	79.60 ± 3.29
SLB1-1	81.20 ± 4.15
CP2R-9-1	-
DCWR-9-1	-
DCWR-9-2-8	-
PCWR-4-6	-
PP2R-9-A1	-
SL3-70	-
U47BR-9-6	-
UHR-9-5	-
UT1R-9-4	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.30 ผลการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยใช้แอคติโนมัยสีทด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

ก. เชื้อไอโซเลต AT1L-8

ข. เชื้อไอโซเลต AT1S-8

ค. เชื้อไอโซเลต SLB1-1

4.5 การศึกษาชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้

จากการศึกษาชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดคือ potato dextrose broth (PDB), yeast extract malt extract broth (YM), glycerol molasses peptone broth (GMP) ที่มีผลต่อการผลิตสารต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท 3 ไอโซเลตจากการทดลองข้างต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลต สามารถผลิตสารต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร GMP และมีเพียงไอโซเลต AT1S-8 ที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ได้ดีที่สุดทั้งในอาหาร GMP และ YM โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราก่อโรคเท่ากับ 97.29 และ 95.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.4) สอดคล้องกับ Zarandi และคณะ (2009) ที่ทำการศึกษาวิธีควบคุมโรคใบไหม้ข้าวโดยนำเชื้อ *Streptomyces sindeneusis* มาเพาะเลี้ยงในอาหารชนิด Casein glycerol (CG) จากนั้นผสมกับสปอร์ของเชื้อรา *M. oryzae* แล้วพ่นลงไปในข้าวพบว่าอัตราการเกิดโรคมีค่าเท่ากับ 0.5% ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุมที่พ่นเฉพาะเชื้อราก่อโรคที่แสดงอัตราการเกิดโรค 8% ซึ่งอาหารชนิด Casein glycerol (CG) มี glycerol เป็นส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหารชนิด GMP ที่ใช้ในการทดลองนี้ นอกจากนั้นอาหาร GMP ยังมีส่วนประกอบของกากน้ำตาลซึ่งสามารถกระตุ้นให้เชื้อแอคติโนมัยสีทผลิตสารต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ได้ดีขึ้น จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของผงน้ำหมักจากเชื้อแอคติโนมัยสีทโดยใช้อาหารชนิด GMP ต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.4 ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ (*P. grisea*)

ความเข้มข้น (%v/v)	%การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรคราใบไหม้											
	Isolate AT1L-8			Isolate AT1S-8			Isolate SLB1-1			Isolate SLB1-1		
	GMP	YM	PDB	GMP	YM	PDB	GMP	YM	PDB	GMP	YM	PDB
1	57.99±4.55 ^d	70.14±10.77 ^d	45.27±2.73 ^d	45.13±4.13 ^d	84.00±1.06 ^d	28.81±8.68 ^d	43.75±3.35 ^d	28.00±5.23 ^d	58.58±6.65 ^d			
5	84.17±1.75 ^d	81.78±7.30 ^d	56.93±8.14 ^d	81.22±7.44 ^d	90.38±3.42 ^c	47.65±3.14 ^d	55.99±3.34 ^d	43.14±10.90 ^d	64.45±2.17 ^d			
10	86.57±2.73 ^d	88.77±4.08 ^d	71.27±1.76 ^d	87.31±1.79 ^d	90.41±1.22 ^c	67.44±2.19 ^d	84.45±4.31 ^d	54.96±12.55 ^d	67.56±1.84 ^d			
15	87.54±3.65 ^d	89.81±2.35 ^d	67.70±7.91 ^d	86.90±4.80 ^d	93.54±1.82 ^b	71.27±1.45 ^d	90.49±2.86 ^c	63.35±3.64 ^d	70.77±2.04 ^d			
20	95.64±0.51^a	90.63±2.96 ^c	74.01±11.89 ^d	97.29±0.48^a	95.38±1.44^a	78.78±3.15 ^d	94.51±1.32^a	73.00±6.28 ^d	73.73±2.28 ^d			

*หมายเหตุ: ข้อมูลที่มีอักษรไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

4.6 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำหมักจากเชื้อแอสกีโตไมยสีทแบบผง (Powder of cell-free culture filtrate) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าว

จากการนำน้ำหมักจากเชื้อแอสกีโตไมยสีทที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GMP มาระเหิดแห้งให้อยู่ในรูปแบบผง แล้วนำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค โดยทดสอบด้วยการผสมลงในอาหาร PDA แล้ววางชิ้นส่วนของของเชื้อราก่อโรคใบไหม้ (*P. grisea*) และวัดความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค (ตารางที่ 4.5) พบว่าความเข้มข้นของน้ำหมักจากเชื้อแอสกีโตไมยสีทแบบผงทั้งที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 % w/v ของไอโซเลต AT1S-8 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคใบไหม้ได้สูงที่สุดและไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ จึงเลือกใช้น้ำหมักจากไอโซเลต AT1S-8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด GMP ความเข้มข้น 0.4 %w/v ในการพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์ขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราก่อโรค (*P. grisea*) ด้วยน้ำหมักจากเชื้อแอสกีโตไมยสีทในอาหาร GMP รูปแบบผงความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ของผงน้ำหมัก (%w/v)	% การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรคใบไหม้		
	Isolate AT1L-8	Isolate AT1S-8	Isolate SLB1-1
0.1	68.72±2.10 ^c	90.52±1.17 ^{cd}	78.98±0.18 ^c
0.2	73.69±0.57 ^c	92.94±0.43 ^{bc}	81.59±0.46 ^c
0.3	81.08±2.42 ^c	94.38±0.90 ^b	83.35±0.38 ^c
0.4	88.75±2.21 ^c	97.94±0.37^a	85.49±0.79 ^c
0.5	92.21±1.17 ^{bcd}	99.33±0.03^a	92.47±0.26 ^{bc}

*หมายเหตุ: ข้อมูลที่มีอักษรไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

4.7 การผลิตผลิตภัณฑ์ควบคุมเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าวจากสารออกฤทธิ์ของเชื้อแอสกีโตไมยสีทที่คัดเลือก

การผลิตผลิตภัณฑ์ควบคุมเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าวทำโดยนำผงน้ำหมักจากเชื้อแอสกีโตไมยสีทความเข้มข้นที่ได้จากหัวข้อ 4.6 ผสมกับสารลดแรงตึงผิว 4 ชนิด คือ Tergitol (15-S-5), Tergitol (15-S-7), Triton (X-100) และ Np 9 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทำให้ขึ้นตำรับผลิตภัณฑ์ได้ 11 ตำรับ ตามตารางที่ 4.6 จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าว และการยับยั้งการเจริญของต้นข้าวในโรงเรือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ตำรับผลิตภัณฑ์ควบคุมเชื้อราก่อโรคใบไหม้ในข้าว

ตำรับ	ส่วนผสม			
	ผงน้ำหมัก จากเชื้อแอสคิตินมัยสีท(g)	สารลดแรงตึงผิว		น้ำกลั่น (ml)
		ชนิด	ปริมาณ (g)	
1	0.4	Tergitol (15-S-5)	0.1	q.s. 100
2	0.4		1.2	q.s. 100
3	0.4	Tergitol (15-S-7)	0.1	q.s. 100
4	0.4		1.2	q.s. 100
5	0.4	triton (X-100)	3	q.s. 100
6	0.4		5	q.s. 100
7	0.4		6	q.s. 100
8	0.4	Np 9	1	q.s. 100
9	0.4		2	q.s. 100
10	0.4		5	q.s. 100
11	0.4		6	q.s. 100

ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Browning (1991) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมเชื้อรา มอด หนอน ปลวก พยาธิ และแมลงต่างๆ โดยใช้สาร alkyloxypolyethyleneoxyethanols หรือที่เรียกว่า Tergitol 15-S series (เช่น 15-S-3, 15-S-5, 15-S-7, 15-S-9, 15-S-12, และ 15-S-15) โดยความเข้มข้นของ Tergitol จะแตกต่างกันตามวัตถุประสงค์ของการทำงาน ยกตัวอย่างเช่น ใช้ Tergitol 15-S-9 ปริมาตร 8 ออนซ์ ผสมน้ำหรือน้ำมันพืช 5 แกลลอนต่อพื้นที่หนึ่งเอเคอร์ (0.12 %v/v) ในการกำจัดนอนเจาะสมอฝ้าย และคลุกเมล็ดถั่วลิสงเพื่อกำจัดเชื้อรา ก่อนนำไปปลูก นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Staats (2001) ที่ทำการศึกษาวิธีการดูแลรักษาพืชเพื่อป้องกันการทำลายจากศัตรูพืชโดยใช้ตำรับผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ตำรับที่มีสาร Aluminum sulfate 5%, Ganax V22 0.5%, Carbopol 940 2%, 1-3, Butylene Glycol 5%, Gantrez ES 225 3%, Triethanolamine (Catalyst) 1% Triton X-100 หรือ NP 9 6% และน้ำ เป็นส่วนประกอบในการป้องกันโรค Red Bud Canker ที่เกิดจากเชื้อราซึ่งผสมสาร Triton X-100 หรือ NP 9 เช่นเดียวกับในการทดลองนี้ซึ่งทำให้การขึ้นตำรับผลิตภัณฑ์ต่างๆ มีโอกาสที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคใบไหม้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 การประเมินผลการควบคุมโรคใบไหม้ข้าวด้วยตำรับผลิตภัณฑ์น้ำหมักจากแอคติโนมัยสีทในโรงเรือน

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 11 ตำรับ มาทำการประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมและยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ข้าว พบว่าตำรับผลิตภัณฑ์ที่ผสม Triton (X-100) และ Np9 มีประสิทธิภาพในการป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ต่ำกว่าตำรับผลิตภัณฑ์ที่ผสม Tergitol (15-S-5) และ Tergitol (15-S-7) (รูปที่ 4.31-รูปที่ 4.34) จากผลการทดลองที่ได้พบว่าผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 3 คือ ผงน้ำหมักจากเชื้อแอคติโนมัยสีทความเข้มข้น 0.4 %w/v ผสมกับ Tergitol (15-S-7) ความเข้มข้น 0.1 %w/v มีประสิทธิภาพในการป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ในข้าวได้ดีที่สุด โดยมีอัตราการเกิดโรคในข้าวโม่งที่ 72 เท่ากับ 22.22 และ 15.56 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Browning (1991) ที่ค้นพบว่าการใช้ Tergitol 15-S series สามารถนำไปใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้ และเมื่อนำมาผสมกับผงน้ำหมักจากเชื้อแอคติโนมัยสีท ทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรคใบไหม้ได้ดีกว่าการใช้ Tergitol 15-S series เพียงอย่างเดียว ฉะนั้นจึงเลือกผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 3 และตั้งชื่อเป็น *Anti-P. grisea* Product I มาทำการทดสอบขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.7 แสดงอัตราการเกิดโรคใหม่ซ้ำในการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้ของน้ำหมักจากเชื้อแอคติโนมัยซีท ดำรับที่พัฒนาขึ้น

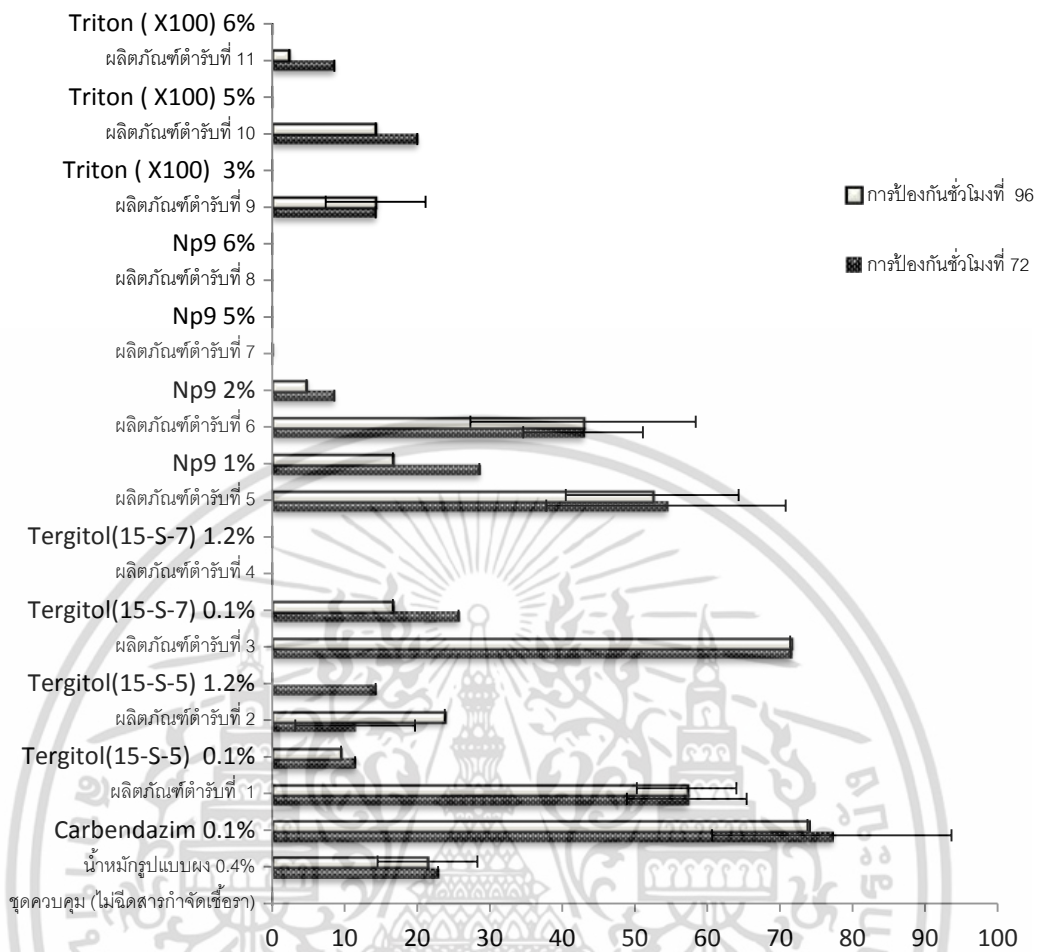
ทรีทเมนต์	อัตราการเกิดโรค					
	การป้องกันโรค			การยับยั้งโรค		
	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	ชั่วโมงที่ 96	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	ชั่วโมงที่ 96
ชุดควบคุม (ไม่พ่นสารกำจัดเชื้อรา)	77.78 ± 6.42 ^f	93.33 ± 5.56 ^f	77.78 ± 13.61 ^f	77.78 ± 13.61 ^f	95.56 ± 6.09 ^f	95.56 ± 6.09 ^f
น้ำหมักรูปแบบผง 0.4%	60.00 ± 6.09 ^e	73.33 ± 9.94 ^d	51.11 ± 16.85 ^{def}	51.11 ± 16.85 ^{def}	82.22 ± 6.09 ^f	82.22 ± 6.09 ^f
Carbendazim 0.1%	17.78 ± 0.00^a	24.44 ± 0.00^a	11.11 ± 0.00^a	11.11 ± 0.00^a	15.56 ± 6.71^a	15.56 ± 6.71^a
ผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 1	33.33 ± 6.42 ^{bc}	40.00 ± 6.42 ^b	40.00 ± 23.04 ^{cd}	40.00 ± 23.04 ^{cd}	66.67 ± 22.22 ^{de}	66.67 ± 22.22 ^{de}
Tergitol (15-S-5) 0.1%	68.89 ± 4.97 ^{ef}	84.44 ± 6.09 ^{ef}	66.67 ± 0.00 ^{ef}	66.67 ± 0.00 ^{ef}	88.89 ± 0.00 ^f	88.89 ± 0.00 ^f
ผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 2	68.89 ± 6.42 ^{ef}	71.11 ± 6.42 ^d	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f
Tergitol (15-S-5) 1.2%	66.67 ± 0.00 ^{ef}	88.89 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f
ผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 3	22.22 ± 7.86^{ab}	26.67 ± 6.09^a	15.56 ± 6.09^{ab}	15.56 ± 6.09^{ab}	20.00 ± 4.97^{ab}	20.00 ± 4.97^{ab}
Tergitol (15-S-7) 0.1%	57.78 ± 4.97 ^f	77.78 ± 0.00 ^{de}	55.56 ± 0.00 ^{def}	55.56 ± 0.00 ^{def}	68.89 ± 4.97 ^{def}	68.89 ± 4.97 ^{def}
ผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 4	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f
Tergitol (15-S-5) 1.2%	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f	100.00 ± 0.00 ^f
ผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 5	35.56 ± 7.86 ^{bc}	44.44 ± 11.11 ^{bc}	20.00 ± 9.30 ^{ab}	20.00 ± 9.30 ^{ab}	31.11 ± 14.49 ^{bc}	31.11 ± 14.49 ^{bc}
Np9 1%	55.56 ± 0.00 ^{de}	77.78 ± 0.00 ^{de}	51.11 ± 9.94 ^{def}	51.11 ± 9.94 ^{def}	66.67 ± 0.00 ^{de}	66.67 ± 0.00 ^{de}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)... แสดงอัตราการเกิดโรคไปเพิ่มซ้ำในการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคไปเพิ่มซ้ำของน้ำหมักจากเชื้อแอคติโนมัยซีท ดัชนีที่พัฒนาขึ้น

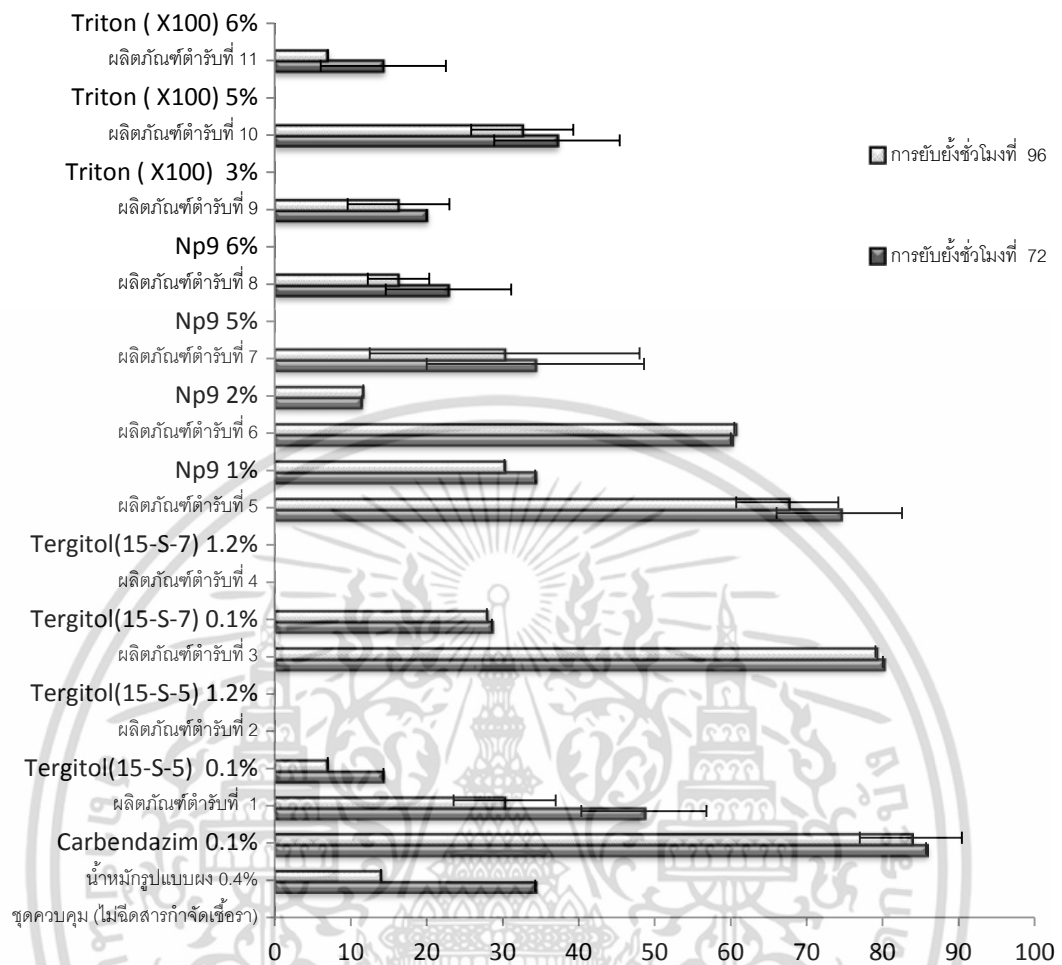
พรีทเมนต์	อัตราการเกิดโรค					
	การป้องกันโรค			การยับยั้งโรค		
	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	
ผลิตภัณฑ์ตัวรับที่ 6	44.44 ± 6.42 ^{cd}	53.33 ± 12.83 ^c	31.11 ± 4.97 ^{bc}	37.78 ± 6.09 ^c		
Np9 2%	71.11 ± 6.09 ^{ef}	88.89 ± 0.00 ^f	68.89 ± 4.97 ^f	84.44 ± 6.09 ^f		
ผลิตภัณฑ์ตัวรับที่ 7	84.44±6.42 ^f	93.33±5.56 ^f	51.11±28.97 ^{def}	66.67±23.57 ^{de}		
Np9 5%	91.11±4.97 ^f	100.00±0.00 ^f	95.56±6.09 ^{ef}	100.00±0.00 ^f		
ผลิตภัณฑ์ตัวรับที่ 8	93.33±6.09 ^f	95.56±6.09 ^f	60.00±23.04 ^f	80.00±22.77 ^{ef}		
Np9 6%	100.00±0.00 ^f	100.00±0.00 ^f	77.78±13.61 ^{ef}	100.00±0.00 ^f		
ผลิตภัณฑ์ตัวรับที่ 9	66.67±7.86 ^f	80.00±9.30 ^{def}	62.22±9.94 ^f	80.00±9.30 ^{ef}		
Triton (X100) 3%	82.22±6.09 ^f	100.00±0.00 ^f	100.00±0.00 ^f	100.00±0.00 ^f		
ผลิตภัณฑ์ตัวรับที่ 10	62.22±6.09 ^{ef}	80.00±4.97 ^{def}	48.89±23.04 ^{de}	64.44±21.37 ^d		
Triton (X100) 5%	77.78±0.00 ^f	100.00±0.00 ^f	100.00±0.00 ^{ef}	100.00±0.00 ^f		
ผลิตภัณฑ์ตัวรับที่ 11	71.11±6.09 ^{ef}	91.11±4.97 ^f	66.67±11.11 ^f	88.89±7.86 ^f		
Triton (X100) 6%	77.78±0.00 ^f	100.00±0.00 ^f	100.00±0.00 ^f	100.00±0.00 ^f		

หมายเหตุ: ข้อมูลที่มีอักษรไม่เหมือนกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.31 ประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ข้าวในระดับโรงเรียนของผลัดภณท์ตำรับต่างๆ เปรียบเทียบกับสารเคมียับยั้งเชื้อราทางการค้า (Carbendazim) หลังผ่านไป 72 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.32 ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบไหม้ข้าวในระดับโรงเรียนของผลิตภัณฑ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับสารเคมียับยั้งเชื้อราทางการค้า (Carbendazim) หลังผ่านไป 72 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



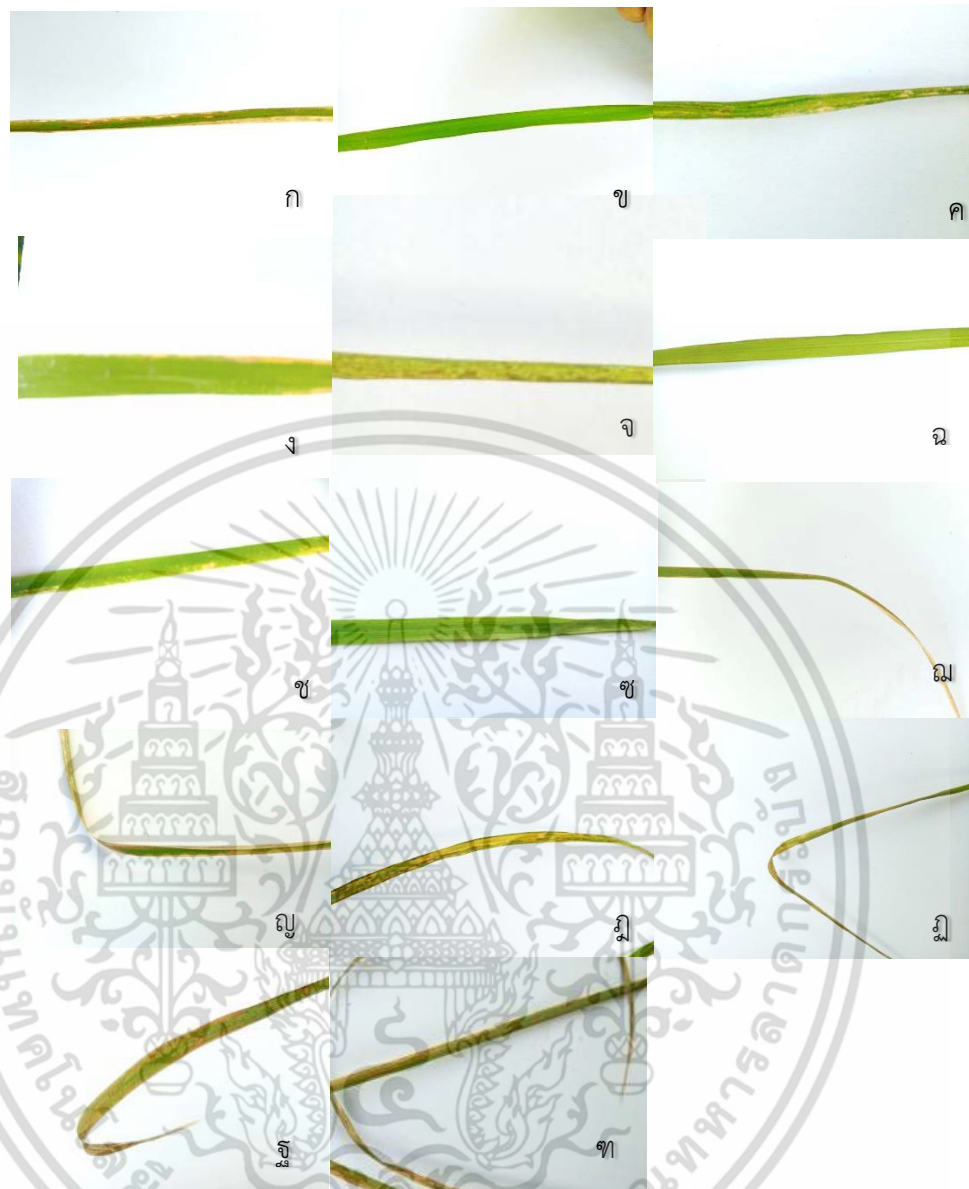
รูปที่ 4.33 ประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ของผลิตภัณฑ์จากน้ำหมักเชื้อแอคติโนมัยสีท ไอโซเลต AT1S-8 ตำรับต่างๆ หลังผ่านการปลูกเชื้อไป 72 ชั่วโมง

- ก. ใบข้าวชุดควบคุม (ฉีดพ่นด้วยเชื้อก่อโรคใบไหม้)
- ข. ใบข้าวฉีดพ่นด้วย Carbendazim เข้มข้น 0.1%
- ค. ใบข้าวฉีดพ่นด้วย น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4%
- ง. ใบข้าวฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 1 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Tergitol (15-S-5) ความเข้มข้น 0.1%)
- จ. ใบข้าวฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 2 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Tergitol (15-S-5) ความเข้มข้น 1.2%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ฉ. ใบข้าวฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 3 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Tergitol (15-S-7) ความเข้มข้น 0.1%)
- ช. ใบข้าวฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 4 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Tergitol (15-S-7) ความเข้มข้น 1.2%)
- ซ. ใบข้าวฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 5 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Np9 ความเข้มข้น 1%)
- ฌ. ใบข้าวฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 6 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Np9 ความเข้มข้น 2%)
- ญ. ใบข้าวฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 7 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Np9 ความเข้มข้น 5%)
- ฎ. ใบข้าวฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 8 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Np9 ความเข้มข้น 6%)
- ฏ. ใบข้าวฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 9 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม triton (X-100) ความเข้มข้น 3%)
- ฐ. ใบข้าวฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 10 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม triton (X-100) ความเข้มข้น 5%)
- ฑ. ใบข้าวฉีดพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 11 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม triton (X-100) ความเข้มข้น 6%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.34 ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบไหม้ของผลิตภัณฑ์จากน้ำหมักจากเชื้อแอสคิโนมัยสีทไอโซเลต AT1S-8 ตำรับต่างๆ หลังผ่านการปลูกเชื้อไป 72 ชั่วโมง

- ก. ใบข้าวชุดควบคุม (ฉีดพ่นด้วยเชื้อก่อโรคใบไหม้)
- ข. ใบข้าวฉีดพ่นด้วย Carbendazim เข้มข้น 0.1%
- ค. ใบข้าวฉีดพ่นด้วย น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4%
- ง. ใบข้าวฉีดพ่นด้วย ผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 1 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Tergitol (15-S-5) ความเข้มข้น 0.1%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- จ. ใบข้าวฉีดยาด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 2 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Tergitol (15-S-5) ความเข้มข้น 1.2%)
- ฉ. ใบข้าวฉีดยาด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 3 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Tergitol (15-S-7) ความเข้มข้น 0.1%)
- ช. ใบข้าวฉีดยาด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 4 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Tergitol (15-S-7) ความเข้มข้น 1.2%)
- ซ. ใบข้าวฉีดยาด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 5 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Np9 ความเข้มข้น 1%)
- ฅ. ใบข้าวฉีดยาด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 6 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Np9 ความเข้มข้น 2%)
- ฉ. ใบข้าวฉีดยาด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 7 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Np9 ความเข้มข้น 5%)
- ค. ใบข้าวฉีดยาด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 8 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม Np9 ความเข้มข้น 6%)
- ฌ. ใบข้าวฉีดยาด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 9 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม triton (X-100) ความเข้มข้น 3%)
- ง. ใบข้าวฉีดยาด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 10 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม triton (X-100) ความเข้มข้น 5%)
- จ. ใบข้าวฉีดยาด้วยผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 11 (น้ำหมักจากเชื้อ AT1S-8 เข้มข้น 0.4% ผสม triton (X-100) ความเข้มข้น 6%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.9 การประเมินผลการควบคุมโรคใบไหม้ข้าวด้วยผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ในแปลงนาระบบเปิด

จากการศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันและการยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ข้าวของผลิตภัณฑ์ที่คัดเลือกเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าคือ Carbendazim และมีตัวควบคุมคือต้นข้าวที่ฉีดด้วยเชื้อก่อโรค การศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดโรคใบไหม้ข้าวพบว่าเมื่อพ่นตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ความเข้มข้น 2 เท่า (0.5 %w/v/m²) แล้วสังเกตอัตราการเกิดโรคในแต่ละวันเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า พบว่าในช่วงต้นของการฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ คือวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 มีการป้องกันโรคได้ใกล้เคียงกัน โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้ในข้าว 84.96 และ 85.51 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.35) แต่เมื่อเวลาผ่านไปวันที่ 6 ถึงวันที่ 7 พบว่าตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ความเข้มข้น 2 เท่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้ในข้าวในช่วง 83.20 ถึง 84.92 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Carbendazim (0.1 %w/v/m²) สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ในช่วง 80.91 ถึง 82.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ข้าวพบว่าตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ความเข้มข้น 2 เท่า ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 มีการยับยั้งโรคได้ดีกว่า Carbendazim โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้ในช่วง 84.98 ถึง 89.83 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Carbendazim สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้เพียง 81.88 ถึง 83.79 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.36) ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I มีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวจึงสามารถยึดเกาะผิวใบข้าวได้ดีกว่า Carbendazim ที่อยู่ในรูปแบบผงละลายน้ำ สอดคล้องกับรายงานของ Xiangkun และคณะ (2015) ที่พัฒนาเชื้อแบคทีเรียสูตรผงแห้ง (Dry flowable formulations) โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ T429 เพื่อต่อต้านโรคใบไหม้ในข้าวที่เกิดจากเชื้อ *M. grisea* ด้วยวิธีการใช้ *B. subtilis* สายพันธุ์ T429 ที่ผสม wetting agent AEO-5, dispersant NNO, disintegrant (NH₄)₂SO₄, และ adhesive CMC-Na ที่เป็นสารช่วยยึดเกาะ จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยสเปร์ยทราย แล้วทำการทดสอบในแปลงนาพบว่าตำรับที่มีความเข้มข้น 50 และ 75 กรัม ต่อ 667 ตารางเมตร มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้ในข้าว 77.6 และ 78.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

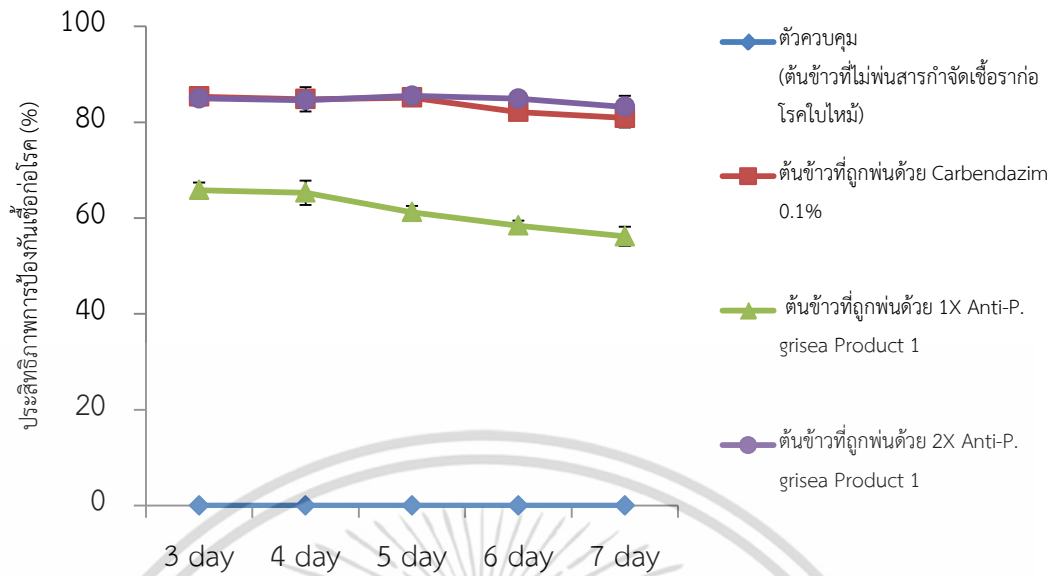
ตารางที่ 4.8 แสดงอัตราการเกิดโรคใบไหม้ข้าวในการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ของตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ในแปลงนาระบบเปิด

เวลา (วัน)	อัตราการเกิดโรค			
	ตัวควบคุม (ต้นข้าวที่ไม่พ่น สารกำจัดเชื้อรา ก่อโรคใบไหม้)	ต้นข้าวที่ถูกพ่น ด้วย Carbendazim 0.1%	ต้นข้าวที่ถูกพ่น ด้วย 1X Anti- <i>P.</i> <i>grisea</i> Product I	ต้นข้าวที่ถูกพ่น ด้วย 2X Anti- <i>P.</i> <i>grisea</i> Product I
3	37.93±2.14 ^d	5.56±1.60 ^a	12.96±1.27 ^{bc}	5.70±1.51 ^a
4	38.00±5.80 ^d	5.78±1.54 ^a	13.19±2.00 ^{bc}	5.85±2.13 ^a
5	40.89±2.14 ^d	6.07±1.34 ^a	15.85±2.00 ^c	5.93±1.51 ^a
6	42.74±3.20 ^d	7.63±1.04 ^{ab}	17.78±2.13 ^c	6.44±1.02 ^a
7	41.93±2.16 ^d	8.00±2.01 ^{ab}	18.37±1.63 ^c	7.04±1.90 ^a

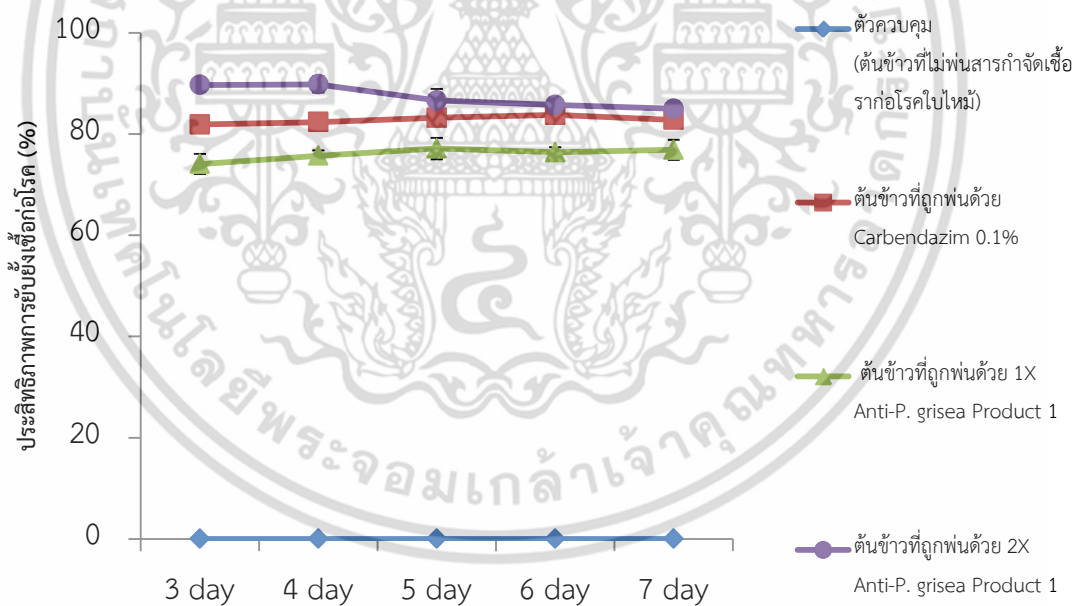
ตารางที่ 4.9 แสดงอัตราการเกิดโรคใบไหม้ข้าวในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบไหม้ของตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ในแปลงนาระบบเปิด

เวลา (วัน)	อัตราการเกิดโรค			
	ตัวควบคุม (ต้นข้าวที่ไม่พ่น สารกำจัดเชื้อรา ก่อโรคใบไหม้)	ต้นข้าวที่ถูกพ่น ด้วย Carbendazim 0.1%	ต้นข้าวที่ถูกพ่น ด้วย 1X Anti- <i>P.</i> <i>grisea</i> Product I	ต้นข้าวที่ถูกพ่น ด้วย 2X Anti- <i>P.</i> <i>grisea</i> Product I
3	32.30±1.34 ^d	5.85±1.04 ^{abc}	8.37±2.01 ^{bc}	3.33±1.26 ^a
4	35.70±2.16 ^d	6.30±2.54 ^{abc}	8.67±1.04 ^{bc}	3.63±1.60 ^{ab}
5	36.59±2.01 ^d	6.15±2.52 ^{abc}	8.37±2.13 ^{bc}	4.89±2.24 ^{abc}
6	37.93±1.63 ^d	6.15±2.21 ^{abc}	8.96±1.02 ^c	5.41±1.34 ^{abc}
7	37.48±1.90 ^d	6.44±1.34 ^{abc}	8.67±2.00 ^c	5.63±1.51 ^{abc}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

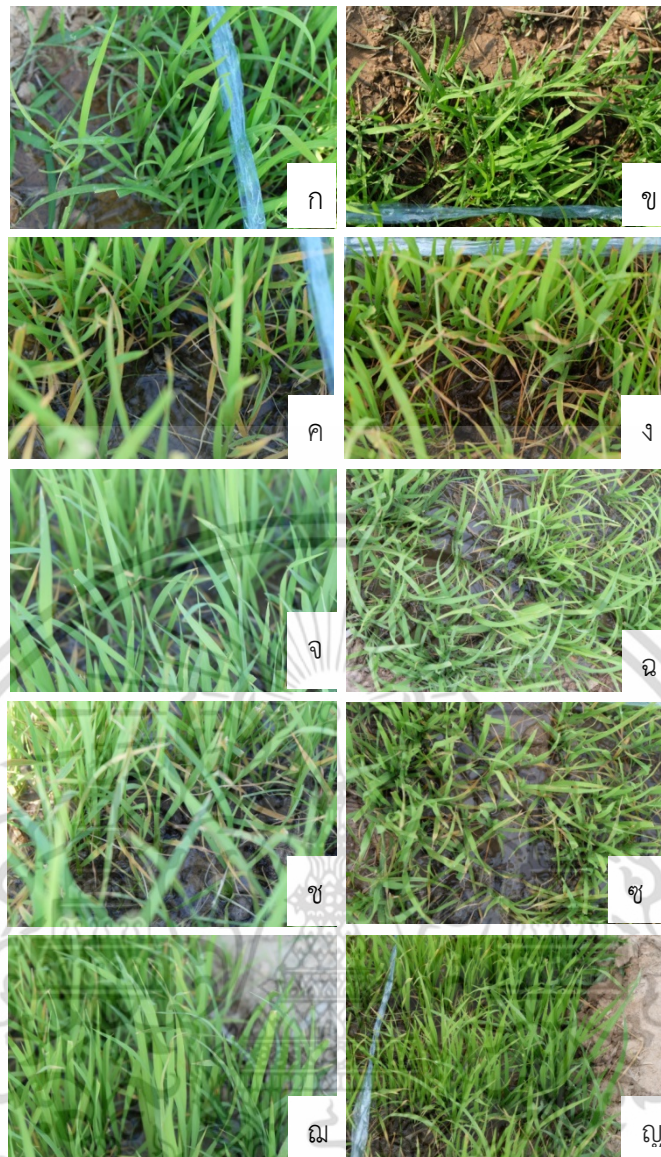


รูปที่ 4.35 ประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ข้าวในแปลงนาระบบเปิดของตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-P. grisea Product I เปรียบเทียบกับสารเคมียับยั้งเชื้อราทางการค้า (Carbendazim)



รูปที่ 4.36 ประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบไหม้ข้าวในแปลงนาระบบเปิดของตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-P. grisea Product I เปรียบเทียบกับสารเคมียับยั้งเชื้อราทางการค้า (Carbendazim)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

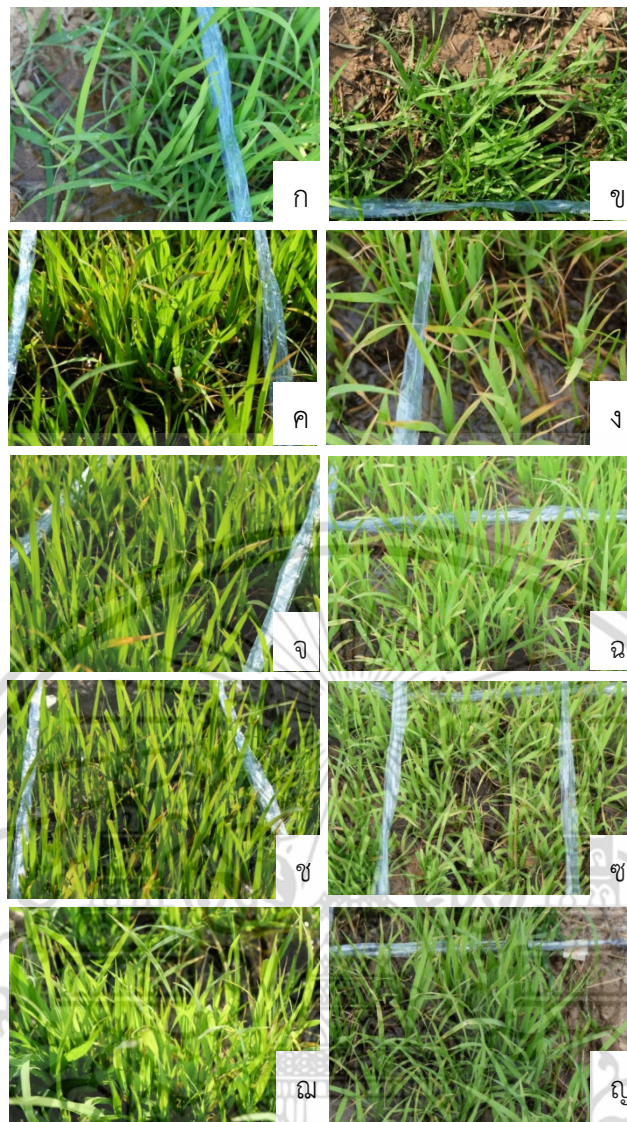


รูปที่ 4.37 ทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันโรคใบไหม้ตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea*

Product I ในแปลงนาระบบเปิดในวันที่ 3 และวันที่ 7

- ก. ต้นข้าวปกติ วันที่ 3
- ข. ต้นข้าวปกติ วันที่ 7
- ค. ตัวควบคุมเชิงลบ(ต้นข้าวที่ไม่พ่นสารกำจัดเชื้อราก่อโรคใบไหม้) วันที่ 3
- ง. ตัวควบคุมเชิงลบ(ต้นข้าวที่ไม่พ่นสารกำจัดเชื้อราก่อโรคใบไหม้) วันที่ 7
- จ. ตัวควบคุมเชิงบวก (Carbendazim 0.1%) วันที่ 3
- ฉ. ตัวควบคุมเชิงบวก (Carbendazim 0.1%) วันที่ 7
- ช. ต้นข้าวที่ถูกพ่นด้วย 1X Anti-*P. grisea* Product I วันที่ 3
- ซ. ต้นข้าวที่ถูกพ่นด้วย 1X Anti-*P. grisea* Product I วันที่ 7
- ฌ. ต้นข้าวที่ถูกพ่นด้วย 2X Anti-*P. grisea* Product I วันที่ 3
- ญ. ต้นข้าวที่ถูกพ่นด้วย 2X Anti-*P. grisea* Product I วันที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.38 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโรคใบไหม้ของตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ในแปลงนาระบบเปิดในวันที่ 3 และวันที่ 7

- ก. ต้นข้าวปกติ วันที่ 3
- ข. ต้นข้าวปกติ วันที่ 7
- ค. ตัวควบคุมเชิงลบ(ต้นข้าวที่ไม่พ่นสารกำจัดเชื้อราก่อโรคใบไหม้) วันที่ 3
- ง. ตัวควบคุมเชิงลบ(ต้นข้าวที่ไม่พ่นสารกำจัดเชื้อราก่อโรคใบไหม้) วันที่ 7
- จ. ตัวควบคุมเชิงบวก (Carbendazim 0.1%) วันที่ 3
- ฉ. ตัวควบคุมเชิงบวก (Carbendazim 0.1%) วันที่ 7
- ช. ต้นข้าวที่ถูกพ่นด้วย 1X Anti-*P. grisea* Product I วันที่ 3
- ซ. ต้นข้าวที่ถูกพ่นด้วย 1X Anti-*P. grisea* Product I วันที่ 7
- ฌ. ต้นข้าวที่ถูกพ่นด้วย 2X Anti-*P. grisea* Product I วันที่ 3
- ญ. ต้นข้าวที่ถูกพ่นด้วย 2X Anti-*P. grisea* Product I วันที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.10 การทดสอบความเป็นพิษของตำรับผลิตภัณฑ์ต่อสัตว์น้ำ และความเป็นพิษต่อเซลล์

4.10.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อปลาไนล์

จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ที่ทำให้ลูกปลาไนล์จำนวนครึ่งหนึ่งตายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (24-hr LC₅₀) โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm ที่อุณหภูมิ 25±2°C pH 7.2-7.5 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าอัตราการตายของลูกปลาไนล์ที่แต่ละความเข้มข้นมีค่าเท่ากับ 0, 6.67, 6.67, 26.67, 43.33 และ 86.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อนำอัตราการตายดังกล่าวคำนวณค่า ที่ 24 ชั่วโมง LC₅₀ มีค่า 75.50 ppm (mg/L) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Walker และคณะ (1964) ซึ่งทำการศึกษาความเป็นพิษของสาร antimycin A ต่อปลาและสัตว์น้ำจำนวน 24 ชนิด โดยสาร antimycin เป็นสารต้านเชื้อราที่สกัดมาจาก *Streptomyces* sp. (Dunshee และคณะ, 1949) ผลการทดลองพบว่า antimycin A ความเข้มข้น 0.8 ppb ทำให้ปลาที่ใช้ในการทดลองตายทั้งหมดในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I จึงเป็นพิษต่อสัตว์น้ำน้อยกว่าสาร antimycin A ในเชื้อ *Streptomyces* sp.

4.10.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ต่อเซลล์ไตของลิง (African Green Monkey Kidney cell: Vero cell) ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองด้วยวิธี MTT assay พบว่าผลิตภัณฑ์แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ที่ระดับความเข้มข้น <62.5 µg/ml สอดคล้องกับรายงานของ Aftab, Zechel and Sajid (2015) ที่นำเชื้อ *Streptomyces* sp. มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิงพบว่าแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 56 µg/ml

4.11 ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ในการกำจัดวัชพืชและการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว

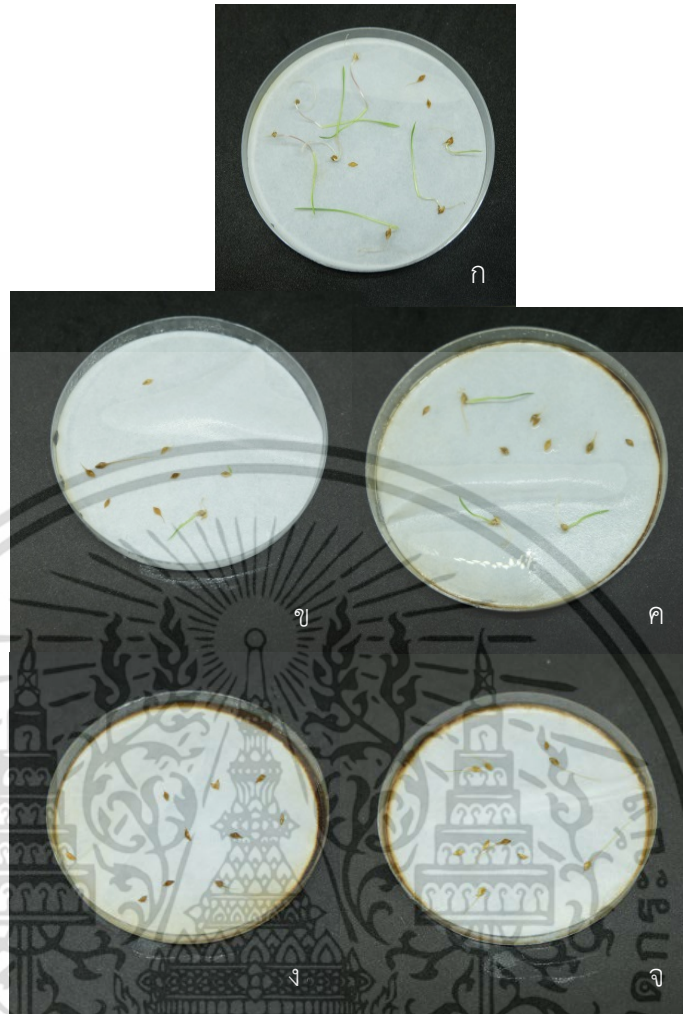
จากการทดสอบผลิตภัณฑ์ในการกำจัดวัชพืช ได้แก่ เมล็ดหญ้าข้าวนก และการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าวพบว่า ผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ที่ระดับความเข้มข้น 2 เท่า สามารถยับยั้งการเจริญของรากและลำต้นของหญ้าข้าวนกได้เป็นอย่างดี (รูปที่ 4.40) แต่ในทางกลับกันผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า ยังสามารถยับยั้งการเจริญของรากเมล็ดข้าว (รูปที่ 4.41) แต่ไม่ส่งผลต่อการพัฒนาเป็นต้นข้าว (ตารางที่ 4.10) ทั้งนี้แม้ว่าผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ยับยั้งการงอกของรากข้าว แต่หากนำไปใช้ควบคุมโรคใบไหม้ข้าวในระยะต้นกล้าจะไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของต้นข้าว สอดคล้องกับรายงานของ ปันดดา (2545) ได้รายงานว่ามีการค้นพบ

สาร bialaphos จากเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* และ *S. viridochromogenes* ซึ่งจัดเป็น สารสกัดจากจุลินทรีย์ตัวแรกที่ได้รับการพัฒนาเป็นสารกำจัดวัชพืชที่นำมาใช้ได้จริงและสามารถ จำหน่ายได้ นอกจากนี้ยังมีสาร hydantocin ที่ได้รับความสนใจอย่างมากจากกลุ่มนักวิจัยของบริษัท ยาและสารเคมีชั้นนำ เพื่อพัฒนาเป็นสารกำจัดวัชพืชชนิดใหม่ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่างไปจาก สารเดิมที่ใช้ในปัจจุบัน

ตารางที่ 4.10 ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ต่ออัตราการกำจัดวัชพืชและ การยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว

ทรีทเมนต์	เมล็ดหญ้าข้าวฉ่ำ			เมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105		
	%รอดชีวิต	ความยาวรากเฉลี่ย(mm)	ความยาวต้นเฉลี่ย(mm)	%รอดชีวิต	ความยาวรากเฉลี่ย(mm)	ความยาวต้นเฉลี่ย(mm)
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	73	17.31±0.39 ^d	36.81±2.20 ^d	100	26.73 ±0.67 ^e	26.77±0.40 ^d
สารลดแรงตึงผิว (Tergitol 15-S-7) เข้มข้น 0.1%w/v	20	4.50 ±0.50 ^b	11.00±3.61 ^b	100	20.00 ±0.00 ^d	11.07±0.50 ^b
ผงน้ำหมักจากเชื้อแอสคิตินอมัยสียา เข้มข้น 0.4%w/v	30	9.78 ±0.69 ^c	19.33±0.33 ^c	70	4.17±0.29 ^c	2.10 ±0.16 ^a
ผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I เข้มข้น 1 เท่า	20	0 ±0.00 ^a	2.33±0.29 ^a	70	2.67±0.36 ^b	9.13 ±1.40 ^b
ผลิตภัณฑ์ Anti- <i>P. grisea</i> Product I เข้มข้น 2 เท่า	0	0 ±0.00 ^a	0 ±0.00 ^a	40	0 ±0.00 ^a	3.17±0.29 ^a

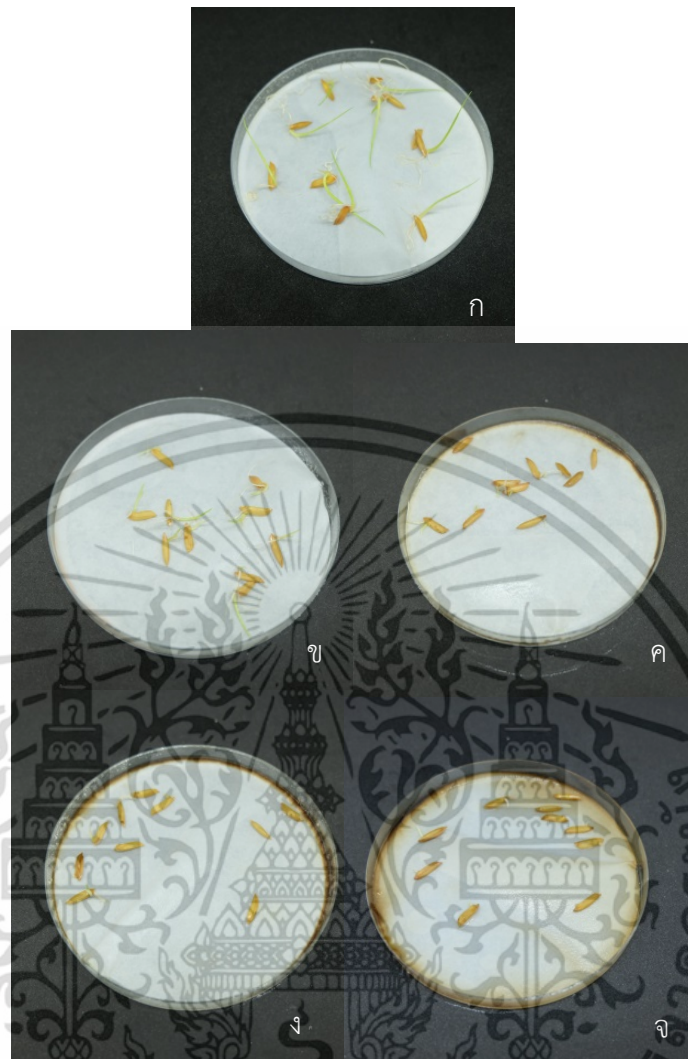
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.39 ประสิทธิภาพการกำจัดวัชพืชของผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I

- ก. ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)
- ข. สารลดแรงตึงผิว (Tergitol 15-S-7)เข้มข้น 0.1 %w/v
- ค. ผงน้ำหมักจากเชื้อแอคติโนมัยซีทเข้มข้น 0.4 %w/v
- ง. ผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I เข้มข้น 1 เท่า
- จ. ผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I เข้มข้น 2 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.40 ประสิทธิภาพการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าวของผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I

- ก. ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)
- ข. สารลดแรงตึงผิว (Tergitol 15-S-7)เข้มข้น 0.1 %w/v
- ค. ผงน้ำหมักจากเชื้อแอสคิตินมัยซีทเข้มข้น 0.4 %w/v
- ง. ผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I เข้มข้น 1 เท่า
- จ. ผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I เข้มข้น 2 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.12 ผลการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในสภาวะเร่ง

จากการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในสภาวะเร่งโดยการนำผลิตภัณฑ์ไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสลับกับแช่ผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็นจำนวน 5 รอบ แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยวิธีผสมผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ลงไปในอาหาร PDA แล้วนำอาหารนี้ไปเพาะเลี้ยงเชื้อราก่อโรคใบไหม้ (*P. grisea*) โดยผลิตภัณฑ์นี้ก่อนผ่านสภาวะเร่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 78.86 ± 2.64 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อผ่านสภาวะเร่งในรอบ 1-5 พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคลดลงเป็น 77.05 ± 3.32 , 71.54 ± 1.58 , 72.30 ± 1.76 , 65.89 ± 3.36 และ 62.80 ± 1.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเมื่อผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการผันแปรอุณหภูมิจะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคลดน้อยลง จึงสรุปได้ว่าความร้อนมีผลต่อความคงตัวของสารในผลิตภัณฑ์คล้ายคลึงกับผลิตภัณฑ์กำจัดเชื้อราทางการค้า (Cabendazim) จึงควรเก็บผลิตภัณฑ์ให้พ้นแสง เก็บไว้ในที่แห้งและเย็น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zarandi (2009) ที่ทดสอบความคงตัวของสารออกฤทธิ์ (active crude) ของเชื้อ *Streptomyces sindenensis* ซึ่งละลายในน้ำกลั่นแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($12-30$ °C) พบว่าสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา *M. oryzae* มีความคงตัวประมาณ 6 เดือน และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคลดลงเป็น 0 เมื่ออุณหภูมิสูง 170 °C

ตารางที่ 4.11 ผลการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราก่อโรค (*P. grisea*) ของผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I

สภาวะเร่ง รอบที่	% การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคใบไหม้
0	78.86 ± 2.64^a
1	77.05 ± 3.32^a
2	71.54 ± 1.58^b
3	72.30 ± 1.76^b
4	65.89 ± 3.36^c
5	62.80 ± 1.52^c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



- รูปที่ 4.41 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคใบไหม้จากผลิตภัณฑ์ที่ผ่านสภาวะเร่ง
- ก. ชุดควบคุม
 - ข. ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคของผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่ผ่านสภาวะเร่ง
 - ค. ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านของสภาวะเร่ง 1 รอบ
 - ง. ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านของสภาวะเร่ง 2 รอบ
 - จ. ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านของสภาวะเร่ง 3 รอบ
 - ฉ. ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านของสภาวะเร่ง 4 รอบ
 - ช. ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านของสภาวะเร่ง 5 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการนำเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกโดยนายสุขเกษม คงสันต์ ซึ่งทำการแยกเชื้อจากลำต้น ใบข้าว และดินบริเวณรอบๆรากข้าว มาศึกษาอนุกรมวิธานและฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นของเชื้อแอกติโนมัยสีททั้ง 15 ไอโซเลตพบว่าจัดอยู่ในสกุล *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis* และ *Micromonospora* จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นพบว่า ไอโซเลต AT1L-8, AT1S-8 และ SLB1-1 มีความสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าว (*P.grisea*) ได้ดี จากการระบุชนิดเบื้องต้นด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rRNA gene พบว่า ทั้งไอโซเลต AT1L-8 และ AT1S-8 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces samsunensis* มากที่สุด (99.86% 16s rRNA gene sequence similarity) ไอโซเลต SLB1-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces sioyaensis* มากที่สุด (99.69% 16s rRNA gene sequence similarity) และมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าวอยู่ในช่วง 79.60 - 81.20 เปอร์เซ็นต์ จึงนำทั้ง 3 ไอโซเลตนี้ไปทำการศึกษานิตของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ พบว่าเชื้อแอกติโนมัยสีททั้ง 3 ไอโซเลตสามารถผลิตสารต้านเชื้อราก่อโรคใบไหม้ได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร GMP จึงเลือกอาหารชนิดนี้นำมาศึกษาความเข้มข้นของน้ำหมักจากเชื้อแอกติโนมัยสีทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคใบไหม้ข้าว โดยนำน้ำหมักมากระเห็ดแห้งด้วยเครื่องฟรีซดราย (freeze dryer) ให้อยู่ในรูปแบบผง (Powder of cell-free culture filtrate) พบว่าความเข้มข้นของน้ำหมักจากเชื้อแอกติโนมัยสีทแบบผงแห้งที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 % w/v ของไอโซเลต AT1S-8 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคใบไหม้ได้สูงที่สุดและไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จึงเลือกใช้ น้ำหมักจากไอโซเลต AT1S-8 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด GMP ความเข้มข้น 0.4 %w/v ในการพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์โดยผสมกับสารลดแรงตึงผิว 4 ชนิด คือ Tergitol (15-S-5), Tergitol (15-S-7), Triton (X-100) และ Np 9 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทำให้ขึ้นตำรับผลิตภัณฑ์ได้ 11 ตำรับ นำมาทำการประเมินประสิทธิภาพในการป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ข้าว จากผลการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 3 คือ ผงน้ำหมักจากเชื้อแอกติโนมัยสีทความเข้มข้น 0.4 %w/v ผสมกับ Tergitol (15-S-7) ความเข้มข้น 0.1 %w/v มีประสิทธิภาพในการป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ในข้าวได้ดีที่สุด จึงเลือกผลิตภัณฑ์ตำรับที่ 3 (Anti-*P. grisea* Product I) มาทำการทดสอบในแปลงนาระบบเปิดเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าคือ Carbendazim การศึกษาประสิทธิภาพการป้องกันการเกิดโรคใบไหม้ข้าวพบว่าเมื่อพ่นตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product ความเข้มข้น 2 เท่า ในช่วงต้นของการฉีดพ่นผลิตภัณฑ์ วันที่ 3 ถึงวันที่ 5 มีการป้องกันโรคได้ใกล้เคียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กัน แต่เมื่อเวลาผ่านไปวันที่ 6 ถึงวันที่ 7 พบว่าตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product ความเข้มข้น 2 เท่า มีการป้องกันโรคได้ดีกว่า Carbendazim ส่วนประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ข้าวพบว่าเมื่อพ่นตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product ความเข้มข้น 2 เท่า ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 4 มีการยับยั้งโรคได้ดีกว่า Carbendazim และเมื่อเวลาผ่านไปวันที่ 5 ถึงวันที่ 7 พบว่าตำรับผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product ความเข้มข้น 2 เท่า สามารถยับยั้งการเกิดโรคใบไหม้ได้ใกล้เคียงกับ Carbendazim จากนั้นนำตำรับผลิตภัณฑ์มาทดสอบความเป็นพิษโดยศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ต่อการมีชีวิตของลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) มีค่า LC₅₀ ที่เวลา 24 ชั่วโมง อยู่ที่ระดับ 75.50 ppm (mg/L) และการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ต่อเซลล์ไตของลิง พบว่าผลิตภัณฑ์แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น <62.5 µg/ml นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ที่ระดับความเข้มข้น 2 เท่า สามารถยับยั้งการเจริญของรากและลำต้นของหญ้าข้าวนกได้เป็นอย่างดี แม้ว่าจะยับยั้งการเจริญของเมล็ดข้าวด้วยแต่หากนำไปใช้ควบคุมโรคใบไหม้ข้าวในระยะต้นกล้าจะไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญของต้นข้าว และการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ Anti-*P. grisea* Product I ในสภาวะเร่งพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคใบไหม้จากผลิตภัณฑ์ที่ผ่านสภาวะเร่งจำนวน 5 รอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคลดน้อยลง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 งานวิจัยนี้ทำการทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพสูงสุดของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีทจึงใช้วิธีพรีซดรายเพื่อให้สารสกัดไม่โดนความร้อน ดังนั้น หากมีการศึกษาเพิ่มเติมในการใช้สเปรย์ดรายก็เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดต้นทุนการผลิต

5.2.2 การใช้สารลดแรงตึงผิวเป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ควบคุมโรค ดังนั้น การศึกษาสารลดแรงตึงผิวเพิ่มเติมเป็นการเพิ่มโอกาสให้มีทางเลือกในการใช้สารลดแรงตึงผิวมาประยุกต์ใช้ควบคุมโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ได้

5.2.3 ตำรับผลิตภัณฑ์ที่ได้ควรนำไปศึกษาเพิ่มเติมในการควบคุมโรคพืชชนิดอื่นๆ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์นี้มีคุณสมบัติหลากหลายมากยิ่งขึ้น

5.2.4 ตำรับผลิตภัณฑ์ที่ได้ควรนำไปศึกษาเพิ่มเติมในการลดความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ลง เช่น ลดความเข้มข้นของการใช้ผลิตภัณฑ์ในการควบคุมโรค

เอกสารอ้างอิง

- เกษม สร้อยทอง. (2532). การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะเทคโนโลยีการอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จิตติ ท่าไวย. (2557). แอคติโนแบคทีเรียเทคนิคการแยกและคัดเลือกเชื้อ. โรงพิมพ์บริษัทแดเน็กซ์ อินเทอร์เน็ตเปอร์เซชั่น, กรุงเทพฯ 160 หน้า.
- ธีระวัช สุวรรณนวล และจำรัส สุนโย. (2557).อิทธิพลของการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคไหม้ครองในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105.สัมมนาวิชาการกลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบน และภาคเหนือตอนล่าง ประจำปี 2557. หน้า 397-401.
- บัญญัติ สมยะ. (2527). การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับโรคใบไหม้ของข้าวไร่. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ บัณฑิต คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วันวิสาข์ แพงฟัก. (2546) การคัดเลือกแอคติโนมัยซิทเอนโดไฟท์ในข้าวเพื่อควบคุมโรคใบไหม้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วิโรจน์ ณ ระนอง และอัมพร สยามลาวา. (2533). ประมวลความรู้เรื่องข้าว. สถาบันวิจัยเพื่อการ พัฒนา ประเทศไทย.436 หน้า
- สมคิด ดิสถาพร. (2532). ชาวนาปราบโรคข้าว.กลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืชเมืองหนาว กองโรค พืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตรและสหกรณ์. 116 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2550). สถิติการเกษตรของประเทศไทยปี 2550. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, นนทบุรี 176 หน้า
- ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวขอนแก่น. (2560). ศัตรูข้าวและการป้องกันกำจัด (ออนไลน์). สืบค้นจาก : <http://kkn-rsc.ricethailand.go.th/rice/pest/> [2 มีนาคม 2560]
- ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวและหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว. (2553).หนูนข้าวหอมมะลิแดงต้านโรค (ออนไลน์) สืบค้นจาก : <http://dna.kps.ku.ac.th/index.php>. [2 มีนาคม 2560]
- อังคณา กันทาจันทร์ สุวัฒน์ เจียรระคงมัน วีระศักดิ์ หอมสมบัติ และกัลยา บุญสง่า (2555).ปฏิกริยาของพันธุ์ข้าวต่อโรคไหม้ และขอบใบแห้งที่จังหวัดสกลนคร. หน้า 228-242.
- Berdy,J. (2005). Bioactive microbial metabolites. Journal of Antibiotics.58:1-26.
- C. Michael Hogan. (2010). Bacteria. Encyclopedia of Earth. eds. Sidney Draggan and C.J.Cleveland, National Council for Science and the Environment, Washington DC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Chin, K.M. (1994). Collar rot, a new symptom of the rice blast disease. *MARDI Res.* 2:82-84.
- Coombs, J.T., Michelsen, P.P., and Franco, C.M.M. (2004). Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control* 29, 359-366.
- Coyne, M.S.(1999). *Soil micrology : An exploratory approach* Delmar. *Antimicrob Agents Chemother.* 16:710-1718.
- Dhananjeyan, V., Selvan N., and Dhanapal. (2010). "Isolation, Characterization, screening and antibiotic sensitivity of Actinomycetes from Locally (Near MCAS) collected soil samples." *Journal of Biological Sciences* 10, 6: 514-519
- El-Tarabily, K.A., Nassar, A.H., Hardy, G.E., and Sivasithamparam, K. (2009). Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *J Appl Microbiol* 106, 13-26.
- Ghai R, Rodriguez-Valera F, McMahon KD, *et al.* (2011). Lopez-Garcia P, ed. "Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river". *PLOS ONE.* 6 (8): e23785. doi:10.1371/journal.pone.0023785. PMC 3158796 Freely accessible. PMID 21915244.
- Gnanamanickam, S.S. (2009). *Biological Control of Rice Diseases, Progress in Biological Control* 8. Springer Science and Business Media.
- Hayakawa, M., Kenya I., and Hideo N. (1988). "Distribution of rare actinomycetes in Japanese soils." *Journal of Fermentation Technology* 66, 4: 367-373.
- Kato, H. (2001). *Rice blast disease. Pesticide outlook* (pp. 23–25). Europe: The Royal Society of Chemistry.
- Kurtböke, D. (2012). Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 1843-1852.
- Mei, C., and Flinn, B.S. (2010). The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement. *Recent Patents on Biotechnology* 4, 1872-2083.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Naikpatil, S. V., and Rathod J. L. (2011). "Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar." *Journal of Ecobiotechnology* 3,10: 48-53
- Ningthoujam, Debananda S.; Sanasam, Suchitra; Tamreihao, K; Nimaichand, Salam (November 2009). "Antagonistic activities of local actinomycete isolates against rice fungal pathogens". *African Journal of Microbiology Research*. 3 (11): 737-742.
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J.H., Xu, L.H., and Li, W.J. (2011). Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 89, 457-473
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., and Dowling, D.N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett* 278, 1-9.
- Servin JA, Herbold CW, Skophammer RG, Lake JA (January 2008). "Evidence excluding the root of the tree of life from the actinobacteria". *Mol. Biol. Evol.* 25 (1): 1-4. doi:10.1093/molbev/msm249. PMID 18003601.
- Smith, Bruce D. (1998) *The Emergence of Agriculture*. Scientific American Library, A Division of HPHLP, New York, ISBN 0-7167-6030-4.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., and Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod* 67, 257-268.
- Takagi, M., and Shin-Ya, K. (2012). Construction of a natural product library containing secondary metabolites produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)*.
- Vidhyasekaran P., Ponmalar T.R., Samiyappan R., Velazhahan R., Vimala R., Ramanathan A., Paranidharan V. and Muthukrishnan S. 1997. Host-Specific Toxin Production by *Rhizoctonia solani*, the Rice Sheath Blight Pathogen. *Phytopathology*. 87(12):1258-63.
- Williams, S.T., Sharpe M. E. and Holt J.G. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. United states.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P., and Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol Res* 165, 437-449.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Zhi, X.Y., Li, W. J. and Stackebrandt, E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of existing higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59,589-608.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Glycerol Molasses Peptone (GMP)

Glycerol	20	มิลลิลิตร
Molasses	10	มิลลิลิตร
Meat extract	5	กรัม
peptone	5	กรัม
CaCO ₃	4	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Yeast extract-Malt extract agar (ISP2)

Glucose	4.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Malt extract	10.0	กรัม
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Oatmeal agar (ISP3)

Oatmeal	20.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Inorganic salt-strach agar (ISP4)

Solution strach	10.0	กรัม
-----------------	------	------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

K ₂ HPO ₄ (anhydrous)	1.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	กรัม
CaCO ₃	2.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Glycerol-asparagine agar (ISP5)

L-asparagine (anhydrous)	1.0	กรัม
Glycerol	10.0	กรัม
K ₂ HPO ₄ (anhydrous)	1.0	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Peptone-Yeast extract iron agar (ISP6)

Peptone iron agar	36	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.0-7.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Tyrosine agar (ISP7)

Glycerol	15.0	กรัม
L-tyrosine	0.5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

L-asparagine	1.0	กรัม
K ₂ HPO ₄ (anhydrous)	0.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Trace salts solution	1.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.2-7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Trace salt solution

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

Carbon utilization agar (ISP9)

Carbon sources

Carbohydrate	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

Pridham and Gottlieb trace salts

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.64	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.11	กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.79	กรัม
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

Basal mineral salts agar

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64	กรัม
---	------	------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KH_2PO_4 (anhydrous)	2.38	กรัม
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5.65	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0	กรัม
Pridham and Gottlieb trace salts	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม

pH 6.8-7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หลังนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำ Carbon sources มาผสมกับ Basal mineral salts agar

Glucose asparagine agar

Glucose	10.0	กรัม
Asparagine	0.5	กรัม
K_2HPO_4 (anhydrous)	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 6.8-7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Czapek's sucrose agar (Difco)

Sucrose	30.0	กรัม
NaNO_3	2.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
MgSO_4	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
FeSO_4	0.01	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 7.3

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nutrient agar (Difco)

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

pH 6.8

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. ตำรับผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคใบไหม้ข้าว Anti-*P.grisea* Product I



น้ำหมักจากเชื้อแอคติโนมัยซีทีไอโซเลต AT1S-8 ในอาหาร GMP รูปแบบผง

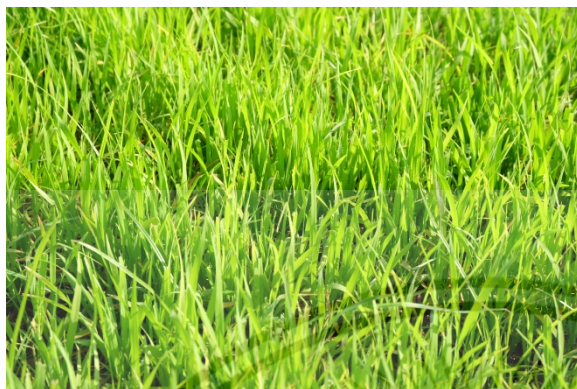


ผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคใบไหม้ข้าว Anti-*P.grisea* Product I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

1. โรคใบไหม้ข้าว



ต้นข้าวปกติ



ต้นข้าวที่ถูกพ่นเชื้อราก่อโรคใบไหม้ (*P. grisea*)



ลักษณะรอยโรคที่เกิดจากเชื้อราก่อโรคใบไหม้ (*P. grisea*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวนริศรา กำแก้ว
วัน เดือน ปีเกิด	20 กรกฎาคม 2534
ที่อยู่	112 หมู่ 8 ตำบลกล้วยกว้าง อ.ห้วยทับทัน จังหวัดศรีสะเกษ
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2557 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	พ.ศ. 2557 ตำแหน่งเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการจุลชีววิทยา บริษัท จอห์นสัน แอนด์ จอห์นสัน (ประเทศไทย) จำกัด
งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	Kumkaew,N., Charoensettasilp,S. and Thawai,C.(2016) “Characterization of endophytic <i>Streptomyces</i> sp. AT1S-8 and its application for blast disease control” Natural resources & bio-based innovative products : Proceeding of the 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (p.412-423). Chiang Mai : Chiang Mai University

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้