

# ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซิสต์เอนโดไฟต์ต่อการควบคุมโรคไหม้ในข้าว<sup>/1</sup>

## Efficacy of actinomycetes endophytes to control rice blast<sup>/1</sup>

ผู้ทำสัมมนา

นายเกียรติศักดิ์ มลเพียรอาจ<sup>/2</sup>

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์สุพัตรา คำเรียง<sup>/3</sup>

### บทคัดย่อ

โรคไหม้ของข้าว (Rice blast disease) เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc. เป็นโรคที่มีความสำคัญก่อให้เกิดความเสียหายและมีการระบาดของโรคอย่างกว้างขวางในประเทศไทย การเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้นี้สามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นข้าวทั้งในระยะต้นกล้าจนถึงระยะออกรวงโดยเฉพาะในระยะ ออกรวงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อยลง น้ำหนักและขนาดของเมล็ดลดลง จึงต้องมีการควบคุมโรคด้วยวิธีการต่างๆ ปัจจุบันได้มีการนำราเอนโดไฟต์มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าว พบว่า ในระดับห้องปฏิบัติการสามารถคัดเลือกเชื้อได้ 2 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ ORR107 และ ORR719 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคสูงสุด และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวในระดับโรงเรือน พบว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ได้ดี สามารถลดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคลงได้ร้อยละ 68.90 และ 74.60 ตามลำดับ จากนั้นนำมาตรวจสอบความสามารถในการเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อต้นกล้าข้าว พบว่า เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อต้นกล้าของข้าวได้ และมีเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อที่นานขึ้น แสดงให้เห็นว่า เชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลทเหมาะสมสำหรับที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวระดับแปลงในเชิงอนุรักษ์ต่อไปในอนาคต

**คำสำคัญ :** เชื้อแอคติโนมัยซิสต์เอนโดไฟต์; โรคไหม้ในข้าว; *Pyricularia grisea* Sacc.

<sup>/1</sup>เอกสารประกอบรายวิชา 1201 480 สัมมนาพืชไร่

<sup>/2</sup>นักศึกษาชั้นปีที่ 4 ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

<sup>/3</sup>อาจารย์ประจำภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

## บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารหลักและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย อีกทั้งข้าวยังเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ (ปิลันธนา และศราวิชญ์, 2558) ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม เกษตรกรไทยปลูกข้าวเป็นอาชีพหลักและมีปริมาณการส่งออกข้าวถึง 7.5 ล้านตันต่อปี แต่ปริมาณการส่งออกลดลงและผลผลิตเสียหายโดยมีสาเหตุหลายประการ และหนึ่งในสาเหตุที่สำคัญ คือโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ โรคไหม้ของข้าวมีการระบาดทั่วทุกภาคของประเทศไทยโดยมีรา *Magnaporthe oryzae* เป็นเชื้อสาเหตุ เกษตรกรพยายามควบคุมโรคโดยวิธีการต่างๆ แต่วิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ การฉีดพ่นและกำจัดเชื้อสาเหตุด้วยสารเคมี มีรายงานการนำเข้าสารเคมีเพื่อกำจัดโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะรา กว่า 10,000 ตัน รวมมูลค่าถึง 3,839 ล้านบาทต่อปี โดยอัตราการใช้สารเคมีเพิ่มมากขึ้นในแต่ละปี สารเคมีเหล่านี้ส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรและผู้บริโภค นอกจากนี้ยังตกค้างในสิ่งแวดล้อม จากปัญหาดังกล่าวหลายๆ หน่วยงานจึงได้แสวงหาทางเลือกใหม่เพื่อลดการใช้สารเคมีและแก้ปัญหาอันตรายที่เกิดจากการใช้สารเคมีทั้งทางตรงและทางอ้อม ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (พืช สัตว์ และจุลินทรีย์) เป็นหนึ่งในทางเลือกที่น่าสนใจ โดยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้มีความปลอดภัยต่อผู้ใช้และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายและพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีรายงานการนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในหลายด้านด้วยกัน การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษารากที่อาศัยอยู่ในดินโดยราที่แยกได้ส่วนใหญ่ คือ *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. *Fusarium* sp. *Trichoderma* sp. และ *Rhizopus* sp. นอกจากนี้สารที่แยกได้จากราเหล่านี้ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ดังนั้นนักวิจัยจึงมองหาแหล่งใหม่ของเชื้อที่ยังมีการศึกษาน้อยอยู่หรือไม่พบการนำมาใช้ประโยชน์หรือไม่พบการศึกษามาก่อน เพื่อเพิ่มโอกาสในการเจอสารออกฤทธิ์ใหม่ๆ ที่แยกได้จากรา ปัจจุบันได้มีการศึกษารากลุ่มหนึ่งซึ่งมีความสัมพันธ์และอาศัยภายในเนื้อเยื่อของพืช เรียกว่าราเอนโดไฟต์ พบว่าสัดส่วนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์มีจำนวนสูงถึง 51 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารออกฤทธิ์ที่แยกจากราในดินมีเพียง 31 เปอร์เซ็นต์ มีการนำราเอนโดไฟต์มาใช้ประโยชน์โดยเฉพาะนำมาควบคุมราโรคพืช (พทุทธิกร และอุมี, 2561)

ดังนั้นในการทำสัมมนาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่ออภิปรายประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ต่อการควบคุมโรคไหม้ในข้าว

## สาเหตุโรคไหม้ในข้าว

โรคไหม้ของข้าว (Rice blast disease) เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc. เป็นโรคที่มีความสำคัญก่อให้เกิดความเสียหายและมีการระบาดของโรคอย่างกว้างขวางในประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกข้าวภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเกษตรกรนิยมปลูกข้าวพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค เช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105, กข 6 เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ให้ราคาดีและเป็นที่ต้องการของตลาด (พูนศักดิ์ และคณะ, 2554) การเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้สามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นข้าวทั้งในระยะต้นกล้าจนถึงระยะออกรวง โดยเฉพาะในระยะ ออกรวงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อยลง น้ำหนักและขนาดของเมล็ดลดลง (พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) เชื้อรานี้เป็นเชื้อราที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม มีความแปรปรวนของเชื้อมากกว่าเชื้อราชนิดอื่น มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วอายุ (Ou, 1980) Giatgong และ Frederiksen, (1969) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความแปรปรวนทางพันธุกรรม พบว่าเกิดจากการกลายพันธุ์และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศทำให้เกิดเชื้อสายพันธุ์ใหม่ๆ ทำให้เชื้อรามีการปรับตัวได้อย่างรวดเร็วในการเข้าทำลายข้าว (Mekwatanakarn *et al.*, 2000) ได้ทำการศึกษาประชากรเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทย พบว่า เชื้อโรคไหม้ในประเทศไทยมีความ แปรปรวนมากกว่าแหล่งปลูกข้าวอื่นๆ ของโลกและเชื้อมีความแตกต่างกันไปตามแหล่งเพาะปลูกข้าว ระยะการเจริญเติบโตของข้าว ฤดูปลูกและพันธุ์ข้าวที่เชื้อเข้าทำลาย

## การประยุกต์ใช้เชื้อราแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

ราเอนโดไฟต์มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพหรือทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจที่หลากหลาย ดังนี้

### 1. สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติพบได้ทั้งในผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพร เช่น เตยกวบ งานวิจัยหลายงานที่ค้น พบสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างจากราเอนโดไฟต์ซึ่งเป็น ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น ต้นแปะกวย (inkgo biloba) มีราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. ให้สารพวกฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งกระบวนการเกิดไลปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุ ของการเกิดโรคและความชรา (Liu, *et al.*, 2007) Isopestacin เป็นสารในกลุ่ม isobenzofuranone ได้จากราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspore* คัดแยกได้จากพืช *Terminalia morobensis* ที่พบในประเทศ Papua New Guinea (Strobel *et al.*, 2002) มีฤทธิ์ในการ ต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีโครงสร้าง ใกล้เคียงกับสารฟลาโวนอยด์ สามารถดักจับ ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและไฮดรอกซิลเรดิคัลได้ มีงานวิจัยคัดแยกราเอนโดไฟต์จากใบบัวบก (*Centella asiatica*) เพื่อวิเคราะห์หาไฟโตเคมีคอล (phytochemicals) และทดสอบฤทธิ์ทาง

เอนไซม์ โดยใช้ วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และนำมาทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ HP-TLC ไฟโตเคมีคอลที่ได้เป็นสารในกลุ่มฟีนอล ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ แทนนิน และไกลโคไซด์ จากงานวิจัยพบว่า ราเอนโดไฟต์ที่ได้จากใบบัวบก *Centella asiatica* เมื่อนำ มาจำแนกโดยวิธี 18S rRNA sequencing ได้ราเอนโดไฟต์ สายพันธุ์ *Penicillium sp. nirjan22* (HK068965) และพบ ว่าราเอนโดไฟต์ชนิดนี้ให้สารประกอบฟีนอล 2.76 กรัม และให้ฟลาโวนอยด์ 0.275 กรัม อีกทั้งราชนิดนี้ยังสามารถ ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ได้ด้วย ซึ่งเมื่อนำผล ที่ได้ในเบื้องต้นนี้ ไปทดสอบประสิทธิภาพอีกครั้งใน หลอดทดลอง (in vitro) และในสิ่งมีชีวิต (in vivo) จะสามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคในมนุษย์และใช้ในทาง อุตสาหกรรมได้ (Devi, Prabakaran & Wahab, 2012) ซึ่งจะพบว่าปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากใบบัวบกไปใช้ใน ผลิตภัณฑ์ช่วยสมานแผล ลบรอยแผลเป็นและจุดต่างดำ โดยใช้คุณสมบัติของความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและ ต้านการอักเสบ ซึ่งหากราเอนโดไฟต์ที่พบนี้สามารถสร้าง สารที่มีคุณสมบัตินี้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นก็จะสามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อื่นได้อีกมากมาย

## 2. สารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial)

เชื่อว่าราเอนโดไฟต์มีกลไกในการต้านจุลชีพ ก่อโรคเพื่อเป็นการปกป้องตัวมันเองและพืชเจ้าบ้านไม่ให้ถูกคุกคาม โดยราจะสร้างสารเมแทบอไลต์ซึ่งเป็นพิษ ต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านั้น และ สารเมแทบอไลต์ ที่ได้จากราเอนโดไฟต์มีโครงสร้างหลากหลาย ได้แก่ แอลคาลอยด์ เพปไทด์ สเตียรอยด์เทอร์ปีนอยด์ ฟีนอล ควิโนน และ ฟลาโวนอยด์ (Yu, *et al.*, 2010) สาร (-) Mycorrhizin A, cytochalasin E, cytochalasin K และ racidin (ภาพ 4) คัดแยกจากราเอนโดไฟต์ 3 ชนิด ได้แก่ รา *Plectophomella sp.*, *Physalospora sp.* และ *Crataegus monogyna* (Hussan, *et al.*, 2014) จากงานวิจัยพบว่า เมื่อนำสารสกัดหยาบและสารที่คัดแยกได้จากราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบ ฤทธิ์ในการต้านจุลชีพโดยวิธี agar well diffusion และ นำสารสกัดหยาบนั้นมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี (column chromatography) และพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างเคมีโดยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (nuclear magnetic resonance spectra) ของสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ได้จากรา เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สาร (-) Mycorrhizin A ที่แยกได้จากรา *Plectophomella sp.* มีฤทธิ์ในการต้านราและแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ cytochalasin E และ K แยกได้จากรา *Physalospora sp.* มีฤทธิ์ต้านราและแบคทีเรีย *Chlorella fusca*, *Ustilago violacea*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* ส่วนราเอนโดไฟต์ *Crataegus monogyna* ให้สาร racidin มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อรา *Eurotium repens* และ *Mycotypha microspora* ได้เป็นอย่างดี

### 3. สารต้านมะเร็ง (anticancer) และต้านเนื้องอก (antitumor)

paclitaxel (Taxol) และอนุพันธ์เป็นสารที่ผลิต จากราเอนโดไฟต์และใช้ในการต้านมะเร็ง paclitaxel เป็นสารในกลุ่ม diterpenoid ที่พบในพืชตระกูลยิว (Taxus) ในครั้งแรกได้นำมาใช้ในการรักษามะเร็งปากมดลูกและมะเร็งเต้านม แต่ปัจจุบันถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิด จากเนื้อเยื่อแบ่งตัวผิดปกติได้ดี เชื้อราที่เจริญอยู่ในต้นยิว สามารถผลิตสาร paclitaxel ได้และเป็นสารชนิดเดียวกัน กับพืชเจ้าบ้านที่ราอาศัยอยู่ โดยคาดว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างขึ้นโดยสมุนไพรมักถูกสร้างโดยเชื้อราที่อาศัยอยู่ในพืชสมุนไพรมันด้วย ตัวอย่างเช่น ราเอนโดไฟต์ *Paecilomyces* sp. ที่แยกจากพืชสมุนไพรมะยม *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* และ *Torreya grandis* ในประเทศจีนสามารถผลิตสาร paclitaxel (Taxol) ซึ่งออกฤทธิ์ต้านเนื้องอกและต้านมะเร็งได้ (Huang, et al., 2001) ราเอนโดไฟต์ *Taxomyces andreanae* ซึ่งคัดแยกมาจากเปลือกของต้น northwest Pacific yew (*Taxus brevifolia*) (Taxaceae) ให้สาร paclitaxel มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (Stierle, Strobel & Stierle, 1993) paclitaxel จะไปจับกับ  $\beta$ -subunit ของ tubulin ใน microtubule เพิ่มการ polymerization ของ tubulin ให้กลายเป็น stable tubulin มากขึ้น และยับยั้งขบวนการ depolymerization ในกระบวนการแบ่งเซลล์ (cell division) นอกจากนี้ยังมีราเอนโดไฟต์ชนิดอื่นที่สามารถสร้าง paclitaxel ได้เช่นกัน ได้แก่ *Taxodium distichum* (Li, et al., 1996), *Wollemia nobilis* (Strobel, et al., 1997), *Phyllosticta spinarum* (Kumaran, Muthumary & Hur, 2008), *Bartalinia robillardoides* (Gangadevi & Muthumary, 2008), *Pestalotiopsis terminaliae* (Gangadevi & Muthumary, 2009), *Botryodiplodia theobromae* (Pandi, Manikandan & Muthumary, 2010)

สำหรับในประเทศไทย มีราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรมากมายชนิด ได้แก่ กระดังงา ดอกแดง เสน บุนนาค ทองแมว กุหลาบขาว ไชยหิน กระเบาใหญ่ กระเช้าผี คัดแยกมาได้ 23 ชนิด ตรวจสอบสารสกัดหยาบ พบว่าราหลายชนิดให้ผลน่าสนใจโดยคาดว่าจะสามารถพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ จึงนำไปเพาะเลี้ยง แยกสารบริสุทธิ์พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีในงานวิจัย พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากรา Lrub20 จากกระดังงาดอกแดงและรา *Phomopsis* sp. Usia5 จากสนซึ่งเป็น neurotoxin เช่น pyrone derivatives, dothideopyrones, questin, asteric acid, methyl asterate, sulochrin, eugenitin, 6-hydroxymethyleugenitin, cis-, trans-muconic acid, dothideopyrone D, และอนุพันธ์อะซีเตทของ Dothideopyrone มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและแสดงความ เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม มะเร็งช่องปาก และมะเร็งปอด (Chomcheon, et al., 2009)

ราเอนโดไฟต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถคัดแยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชทั้งในส่วนราก ใบ ลำต้น และกิ่งก้าน โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคใดๆ ในพืชที่ราอาศัยอยู่ราเอนโดไฟต์จัดเป็นแหล่งทางชีวภาพจากธรรมชาติที่ ให้สารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่สำคัญและมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ มากมาย รวมถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ การต้านจุลินทรีย์ การต้านมะเร็ง ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากรานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ ได้ทั้งทางการแพทย์และทางอุตสาหกรรม

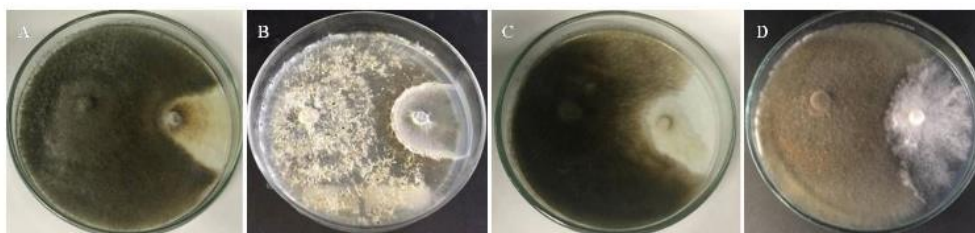
พฤทธิกร และอุมมี (2561) พบว่าราเอนโดไฟต์ *Chaetomium globosum*, *Penicillium chryso-genum* และ *Cladosporium cladosporioides* มีสมบัติด้านการเจริญของราก่อโรคพืชหลายสายพันธุ์ (*Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* *Nigrospora oryzae*, *Phoma sorghina* และ *Alternaria alternata*) Park และคณะ (2003) ศึกษาราเอนโดไฟต์ในการควบคุม *Magnaporthe* sp. สาเหตุโรคไหม้และ *Corticium sasaki* สาเหตุโรคกาบใบไหม้ของข้าว

### ราเอนโดไฟต์

แยกราเอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 40 ไอโซเลท จากจำนวนตัวอย่างใบ 300 ชิ้นตัวอย่าง จัดจำแนกและคัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่แยกได้ทั้งหมดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร PDA ได้ราทั้งหมด 17 กลุ่ม จากนั้นนำตัวแทนของราในแต่ละกลุ่ม จำนวน 17 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) และบันทึกการเจริญของราแต่ละสายพันธุ์ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบนอาหาร PDA ทุกวัน จนกว่าจะเจริญเต็มจานอาหารเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราโรคพืชโดยวิธี dual culture plate

### คัดเลือกราเอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *M.oryzae* โดยวิธี dual culture plate

การทดสอบประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ จำนวน 17 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของ *M.oryzae* จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยวิธี dual culture plate พบว่าราเอนโดไฟต์ จำนวน 4 ไอโซเลท (LW\_FS055, LW\_L027, LP\_LS026 และ LW\_L002) มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *M.oryzae* 33 ได้ดีที่สุด โดยให้ค่า PIRG ในช่วง 86.04 ถึง 93.02 เปอร์เซ็นต์ โดยกิจกรรมการยับยั้ง (antagonistic activities) ของราเอนโดไฟต์ต่อราโรคไหม้ของข้าวเป็นแบบการแข่งขันครอบครองพื้นที่ (competition) โดยเส้นใยของเชื้อทั้งสองชนิดเจริญชนกัน (ภาพที่ 1)



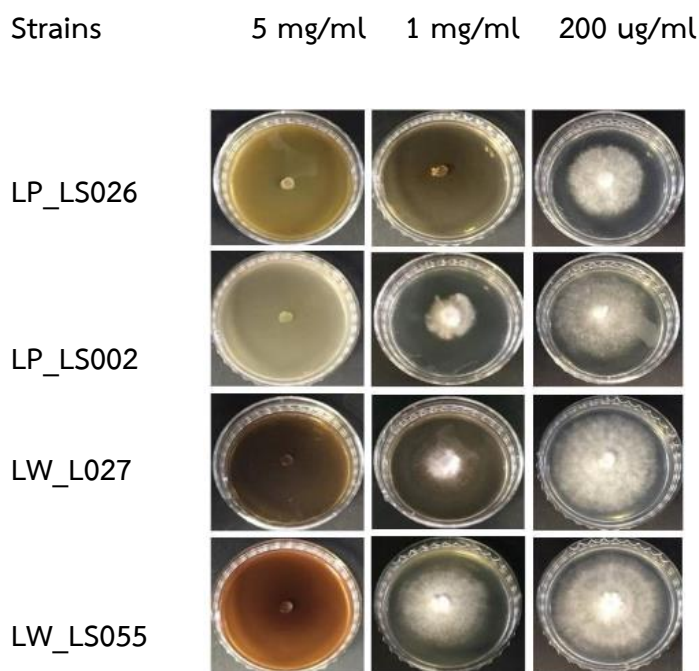
ที่มา: พฤษฏินกร และอุมมี (2561)

**ภาพที่ 1** ประสิทธิภาพของเอนโดไฟต์ในการยับยั้ง *M.oryzae* 33 โดยวิธี dual culture (A:ราเอนโดไฟต์ ไอโซเลท LW\_FS055 ให้ค่า PIRG 93.02 เปอร์เซ็นต์, B: ราเอนโดไฟต์ไอโซเลท LM\_L027 ให้ค่า PIEG 88.37 เปอร์เซ็นต์, C: ราเอนโดไฟต์ ไอโซเลท LP\_LS026 ให้ค่า PIRG 86.04 เปอร์เซ็นต์

**ฤทธิ์ของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ในการยับยั้ง *M. oryzae* โดยวิธี agar dilution plate**

นำราเอนโดไฟต์ที่มีศักยภาพสูงสุดจำนวน 4 ไอโซเลท (LW\_FS055, LW\_L027, LP\_LS026 และ LW\_L002) ที่ยับยั้ง *M.oryzae* 33 มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB และสกัดสารด้วยเอทิลอะซิเตท ได้สารสกัด (BE) จำนวน 4 สาร นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *M.oryzae* 33 ด้วยวิธี agar dilution plate ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 5, 1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็นชุดควบคุมเชิงลบ และสารเคมี 2 ชนิด คือ คาร์เบนดาซิมและโพรพิโคนาโซล เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ผลการทดสอบพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดหยาบทั้ง 4 สาร สามารถยับยั้ง *M.oryzae* 33 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ( $P>0.05$ ) และมีเพียงสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ไอโซเลท LP\_LS026 ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *M.oryzae* 33 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ ไอโซเลท LP\_LS002, LW\_L027 และ LW\_FS055 ให้ค่าการยับยั้งเท่ากับ 84.64, 48.16 และ 37.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการทดสอบค่าทางสถิติ (P-value) ของสารสกัดทั้ง 4 สาร เทียบกับชุดควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจาก LP\_LS026 ให้ค่าการยับยั้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม ( $P>0.05$ ) ขณะที่สารสกัดที่เหลือให้ค่าการยับยั้งลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.05$ ) และผลการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดทั้ง 4 สาร พบว่าราไอโซเลท LP\_LS026 ให้ค่าการยับยั้งสูงที่สุด (64 เปอร์เซ็นต์) โดยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ของสารสกัดจากราไอโซเลทนี้ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ( $P>0.05$ ) ขณะที่สารสกัดที่เหลือให้ค่าการยับยั้งต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ กับ *M.oryzae* 33 (ภาพที่ 2) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม ( $P<0.05$ ) จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าสารสกัดที่

ระดับความเข้มข้น 5, 1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของราไอโซเลท LP\_LS026 ให้ผลการยับยั้ง เทียบเท่ากับสารเคมีทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน



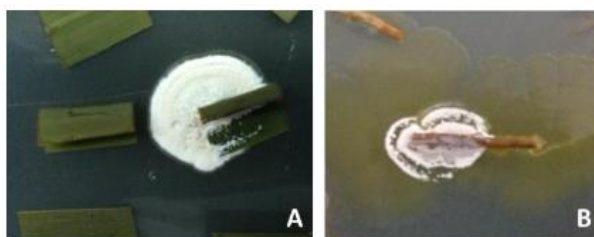
ที่มา: พญทธิกร และอุมมี (2561)

ภาพที่ 2 ประภาพของสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่ระดับความเข้มข้น 5.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ในการยับยั้ง *M.oryzae* 33 ด้วยวิธี agar dilution plate

ณปภพ และเกวลิน (2560) จากการแยกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากข้าว (*Oryza sativa* L.) บนอาหาร inhibitory mold agar 2 (IMA-2) สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 174 ไอโซเลท แบ่งกลุ่มไอโซเลทตามระยะเวลาในการเริ่มสร้าง aerial mycelium และการเจริญเต็มจานอาหาร และคัดเลือกไอโซเลทที่มีการเริ่มสร้าง aerial mycelium ภายใน 1 วันและเจริญเต็มจานอาหาร ภายใน 3 วัน จำนวน 10 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว ด้วยวิธีการ dual culture

จากการแยกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากชิ้นส่วนของข้าว จำนวน 4 สายพันธุ์ พบ โคโลนีเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์เจริญบนผิวหน้าชิ้นส่วนพืช (ภาพที่ 3) สามารถแยกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ได้ทั้งหมด 174 ไอโซเลท โดยนับจำนวนไอโซเลทจากโคโลนีที่เจริญบนชิ้นส่วนพืช ซึ่งส่วนใหญ่แยกได้จากส่วนใบ จำนวน 139 ไอโซเลทและส่วนราก จำนวน 35 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบจำนวนไอโซเลทของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวแต่ละสายพันธุ์ พบว่า

สามารถแยกเชื้อจากข้าวสายพันธุ์ กข1ได้มากที่สุด จำนวน 75 ไอโซเลท รองลงมาคือ กข7 จำนวน 42 ไอโซเลท สุพรรณบุรี1 จำนวน 34 ไอโซเลท และปทุมธานี1 จำนวน 23 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) สำหรับการแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสต์เอนโดไฟต์จากข้าวแต่ละสายพันธุ์นั้น จำนวนและชนิดของเชื้อที่แยกได้ มักแปรตามปัจจัยต่าง ๆ ด้านพืชอาศัย เช่น ชนิดพืช และพื้นที่เพาะปลูก เป็นต้น (Sardi *et al.*, 1992) รวมไปถึงส่วนต่างๆ ของพืชที่เชื้อแอคติโนมัยซิสต์เอนโดไฟต์อาศัยอยู่ในที่แตกต่างกัน เช่น ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ด (Qin *et al.*, 2011)



ที่มา: ฌปภพ และเกวลิน (2560)

**ภาพที่ 3** Endophytic actinomycetes เติบโตจาก ใบ (A) และ ราก (B) ของข้าวพันธุ์ RD1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LMA-2 หลังจาก 30 วัน ของระยะการพักตัว ที่ 30 °C

**ตารางที่ 1.** จำนวนความถี่การแยกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซิสต์ที่แยกได้จากข้าว 4 สายพันธุ์

| พันธุ์ข้าว | แยกจำนวนของเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซิสต์ |            |     |            |
|------------|--------------------------------------|------------|-----|------------|
|            | ออกจาก                               | แยกรหัส    | ราก | แยกรหัส    |
| RD1        | 61                                   | ORR101-161 | 14  | ORR162-175 |
| RD7        | 26                                   | ORR701-726 | 16  | ORR727-742 |
| PT1        | 19                                   | ORP101-119 | 4   | ORP120-123 |
| SP1        | 33                                   | ORS101-133 | 1   | ORS134     |

ที่มา: ฌปภพ และเกวลิน (2560)

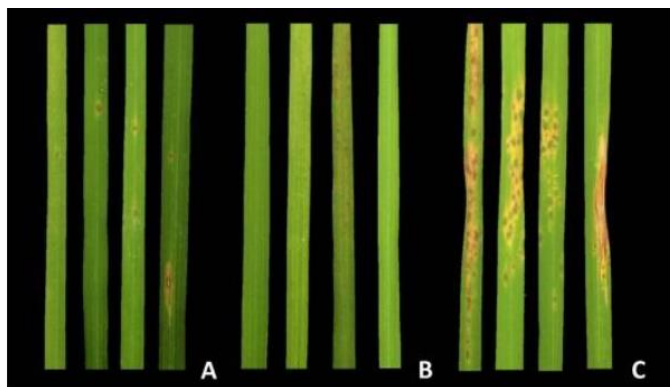
### ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ของต้นกล้าข้าว

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ของต้นกล้าข้าว โดยวิธีแช่เมล็ดข้าวในสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนมัยซิสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท ORR107 และ ORR719 ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค เมื่อต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน และประเมินโรคหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน พบว่า ต้นกล้าข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซิสต์เอนโดไฟต์ทั้งสองไอโซเลท มีระดับความรุนแรงในการเกิดโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติ เฉลี่ยเท่ากับ 1.47 และ 1.20 ตามลำดับ แต่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว ที่มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงเท่ากับ 4.73 (ภาพที่ 4) คิดเป็นร้อยละการลดลงของระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ยเท่ากับ 68.90 และ 74.60 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ

แอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถผลิตสารทุติยภูมิจำพวกสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungal) (Araujo et al., 2000) รวมทั้งเชื้อสามารถเข้าอยู่อาศัย (colonization) ในพืชอาศัย แล้วชักนำให้พืชอาศัยเกิดความต้านทานต่อโรคใหม่เพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ศิริมาศ และเกวลิน (2557) ที่สามารถชักนำให้ต้นกล้าสตรอว์เบอร์รีเกิดการต้านทานโรคทางใบในสตรอว์เบอร์รีภายหลังปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรร และพืชวงศ์กุหลาบลงบนต้นกล้า และรายงานของชัยพร (2556) ที่สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าของผลลำไยได้ในระดับห้องปฏิบัติการ หลังจากพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ลงบนผลลำไย

### การเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อต้นกล้าข้าว

จากการทดสอบการเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าว โดยเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท ORR107 และ ORR719 จากวิธีแยกเชื้อกลับจากใบลำต้น ราก และเปลือกเมล็ดของข้าวที่ได้รับการปลูกเชื้อ พบว่า เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าวได้ นอกจากนี้ การเจริญออกของเชื้อจากบริเวณรอยตัดของชิ้นพืชส่วนใบ ลำต้น ราก และเปลือกเมล็ดข้าว หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ไอโซเลท ORR107 มีแนวโน้มการแยกเชื้อกลับเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อ ที่ 1, 3, 5, 7 และ 14 วัน เท่ากับ 40.00, 63.33, 76.67, 80.00 และ 90.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับ ไอโซเลท ORR719 (ตารางที่ 4) สำหรับการเพิ่มปริมาณของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย สามารถแบ่งตัวที่รวดเร็ว ส่งผลให้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์เพิ่มปริมาณในต้นพืชได้มากขึ้นเรื่อย ๆ นอกจากนี้เชื้อทั้งสองไอโซเลทเป็นเชื้อที่แยกได้จากต้นกล้าข้าว จึงทำให้เชื้อทั้งสองไอโซเลทสามารถเข้าอาศัยในพืชอาศัยเดิมได้ สอดคล้องกับรายงานของ Shimizu et al. (2000) ที่แยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากพืชแล้วสามารถปลูกเชื้อกลับเข้าอาศัยในพืชอาศัยเดิมได้ และสอดคล้องกับรายงานของ Meguro et al. (2004) ที่สามารถเชื้อกลับหลังจากการปลูกเชื้อ *Streptomyces padanus*AOK-30 บนพืช mountain laurel ได้ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น แปรตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อ



ที่มา: ฦปภพ และเกวลิน (2560)

**ภาพที่ 4** อาการของโรคไหม้บนใบข้าวกล้าอายุ 21 วัน บำบัดโดยการแช่เมล็ดด้วยสารแขวนลอยสปอร์ (เข้มข้น 10<sup>9</sup> cfu/มล.) ของเอนโดฟิติกแอคติโนมัยซีตสโไซเอต ORR107 (A) และ ORR179 (B) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการบำบัด (C) หลังการเพาะเลี้ยงด้วยสารแขวนลอย *Pyricularia grisea* spore (รวม 10<sup>5</sup> cfu/ml) ในต้นกล้าอายุ 14 วัน

**ตารางที่ 2** ตัวเลขและเปอร์เซ็นต์การฟื้นตัวของเอนโดฟิติกแอคติโนมัยซีต 2 ที่เลือกแยกได้จากส่วนของต้นกล้าข้าวที่เพาะเชื้อหลังจากย้ายกล้า 1,3,5,7 และ 14 วัน

| ไอโซเลท | หลังปลูก<br>(วัน) | ส่วนของเนื้อเยื่อ |     |      |           |
|---------|-------------------|-------------------|-----|------|-----------|
|         |                   | ทั้ง              | ราก | กลีบ | %         |
| ORR107  | 1                 | 1                 | 2   | 9    | 12(40.00) |
|         | 3                 | 4                 | 5   | 10   | 19(63.33) |
|         | 5                 | 7                 | 8   | 8    | 23(76.67) |
|         | 7                 | 5                 | 10  | 9    | 24(80.00) |
|         | 14                | 9                 | 9   | 9    | 27(90.99) |
| ORR179  | 1                 | 2                 | 4   | 10   | 16(53.33) |
|         | 3                 | 6                 | 9   | 10   | 25(83.33) |
|         | 5                 | 6                 | 9   | 10   | 29(96.67) |
|         | 7                 | 8                 | 6   | 10   | 24(80.00) |
|         | 14                | 7                 | 8   | 9    | 24(80.00) |

ที่มา: ฦปภพ และเกวลิน (2560)

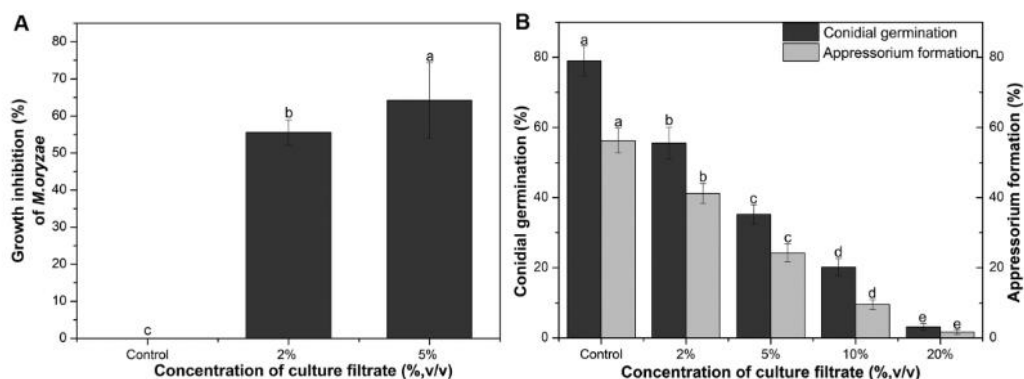
Ting Xu et al. (2019) ได้ศึกษาเชื้อราเอ็นโดไฟต์ของข้าว *Streptomyces hygroscopicus* OsiSh-2 ที่มีฤทธิ์เป็นปฏิชีวนะต่อโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* การรักษาพื้นผิวใบของต้นกล้าข้าว อัตราการเกิดโรคลดลงทั้งในโรงเรือนและสภาพแปลง 23.5 เปอร์เซ็นต์และ 28.3 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น osh-2 สามารถทำให้เกิดการสะสมโคตินและโคตินความเข้มข้นต่ำในผนังเซลล์ การวิเคราะห์ปริมาณคอร์ติซอลในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* นอกจากนี้ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์จะถูกกระตุ้นการปล่อยอิเล็กโทรไลต์ การสะสมออกซิเจนที่ใช้งานและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกในเซลล์ขนาดใหญ่ การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมที่พบในเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยตรงผลของ osh-2 ต่อเชื้อโรคระบาดข้าวอาจจะเนื่องจากการทำลายความสมบูรณ์ของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายการทำงานของไมโทคอนเดรียของเชื้อโรค

#### ฤทธิ์ต้านเชื้อราของการกรองของเชื้อ OsiSh-2 ต่อ *M.oryzae*

การศึกษาก่อนหน้านี้ของเราระบุว่า OsiSh-2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญนัยว่า OsiSh-2 สามารถหลั่งสารประกอบที่มีฤทธิ์สูง (Xu และคณะ, 2559). ดังนั้น จึงใช้ OsiSh-2 CFC ซึ่งเป็นแหล่งของสารต้านเชื้อราต่างๆ เพื่อตรวจสอบผลการยับยั้งของเชื้อ *M.oryzae* ในการศึกษา

ประเมินผลการยับยั้งของ OsiSh-2 CFC ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยของ *M.oryzae* โดยการวัดชีวมวลของ *M.oryzae* ที่สัมผัสกับ OsiSh-2 CFC ในขนาดต่างๆ OsiSh-2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้มากกว่า 50% และการยับยั้งนี้แสดงผลกระทบที่ขึ้นกับขนาดยา (รูปที่ 1A) ผลลัพธ์เหล่านี้ตรงกับรายงานก่อนหน้าของ Manhas (Manhas and Kaur, 2016) และ Li (Li et al., 2011) แสดงให้เห็นว่าผลกระทบที่เป็นปฏิชีวนะของ CFC จากแบคทีเรียแอคติโน 2 ตัว ได้แก่ *S. hydrogenans* DH16 และ *S. globisporus* JK-1 การเจริญเติบโตของเส้นใยของ *Alternaria brassicicola* และ *M.oryzae* ก็ขึ้นอยู่กับขนาดยาด้วย

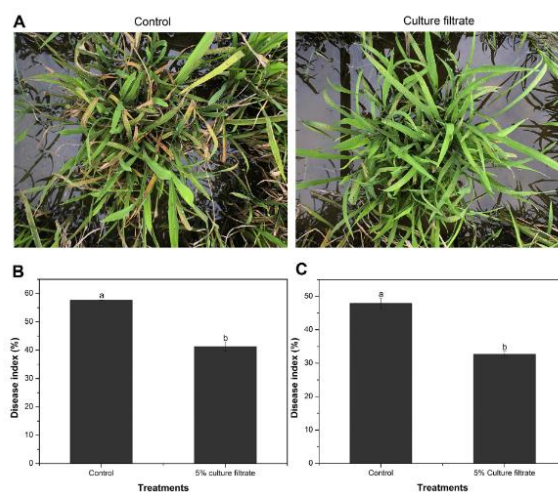
เนื่องจากการประเมินการงอกของสปอร์และการสร้างสปอร์เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการก่อโรคของเชื้อ *M.oryzae* (Wilson and Talbot, 2009) จึงได้ทำการศึกษาย่อยทั้งสองนี้ ในกลุ่มควบคุมนั้น 80% ของสปอร์จะงอกเพื่อสร้างเส้นใยหลังจาก 6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม อัตราการงอกลดลงอย่างมากเป็น 3.13% เมื่อสปอร์ได้รับการรักษาด้วย CFC ที่ความเข้มข้น 20% และไม่มีการงอกของสปอร์เมื่อทำการรักษาด้วย CFC ที่ความเข้มข้น 50% (ไม่แสดงข้อมูล) นอกจากนี้ CFC ของ OsiSh-2 ยังนำไปสู่การยับยั้งการก่อตัวของเชื้อก่อโรคหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งเกิดขึ้นในลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณรังสีในทำนองเดียวกัน ในขณะที่การควบคุมปริมาณมากจะก่อตัวขึ้นในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1B)



ที่มา: Ting Xu et al. (2019)

**ภาพที่ 5** ผลของการเพาะเลี้ยง OsiSh-2 ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยรา (A), การงอกของ conidial และการก่อตัวของเนื้อเยื่อ (B) ของ *Magnaporthe oryzae* การยับยั้งการเจริญของเส้นใยรากกำหนดหลังจาก 3 วันของการฟักตัวที่ความเข้มข้นต่างกันของตัวกรองการเพาะเลี้ยง OsiSh-2 ในตัวกลางที่เป็นของเหลว การงอกของ conidial และการก่อตัวของเนื้อเยื่อถูกกำหนดหลังจากการฟักตัวของ *M. oryzae* spore suspension ( $10^5$  /มล.) และความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ culture filtrate OsiSh-2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมงตามลำดับ กราฟแท่งแสดงถึง SEs ของการทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรที่ต่างกันบ่งชี้ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

การศึกษาก่อนหน้านี้ของเราแสดงให้เห็นว่าการฉีดพ่นสปอร์ของ OsiSh-2 สามารถจำกัดการระบาดของโรคในการทดสอบภาคสนามได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมทางชีวภาพของ OsiSh-2 CFC ต่อการระบาดของโรคได้รับการประเมินทั้งในสภาพเรือนกระจกและในไร่ มีผลชัดเจนในต้นกล้าข้าวโดยการบำบัดทางใบ ภายใต้สภาพพื้นที่ (ภาพที่ 6A) ต้นกล้าข้าวที่มีดัชนีโรคอยู่ที่ 41.3% เมื่อฉีดพ่นด้วย OsiSh-2 CFC 5% ในขณะที่ข้าวที่ไม่ผ่านการบำบัดได้รับความเสียหายอย่างรุนแรง โดยมีดัชนีโรคอยู่ที่ 57.6% (ภาพที่ 6B) ประสิทธิภาพเดียวกันก็สังเกตเห็นได้ในเรือนกระจกและสังเกตอาการของโรคที่มองเห็นได้ชัดเจนในพืชควบคุมด้วยดัชนีโรค 47.9% ในขณะที่พบดัชนีโรค 36.6% ในพืชที่ได้รับการรักษาด้วย OsiSh-2 CFC 5% (ภาพที่ 6C)



ที่มา: Ting Xu et al. (2019)

**ภาพที่ 6** ประสิทธิภาพของการบำบัดทางใบโดย 5% (v/v) culture filtrate OsiSh-2 เพื่อควบคุมการไหม้ของข้าวในทุ่งนาและโรงเรือนกระจก ภาพถ่ายตัวอย่าง (A) และดัชนีการเกิดโรค (B) ของข้าว 27 วันที่ได้รับการบำบัดด้วย culture filtrate ของ OsiSh-2 ในสภาพทุ่งนา ดัชนีการเกิดโรคของข้าว 45 วันที่ได้รับการบำบัดโดย culture filtrate ของ OsiSh-2 ในสภาวะเรือนกระจก (C)  $\text{ดัชนีโรค} = \frac{\sum[(\text{จำนวนใบที่เป็นโรคทุกระดับ} \times \text{ระดับโรคที่เกี่ยวข้อง})]}{(\text{จำนวนใบทั้งหมด} \times \text{ระดับโรคสูงสุด})} \times 100\%$  กราฟแท่งแสดงถึง SEs ของการทำซ้ำสามครั้ง ตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

OsiSh-2 ที่ เป็นปฏิสัมพันธ์ต่อการเติบโตและการพัฒนาของ *M.oryzae* จากผลการศึกษาครั้งนี้ได้มี การสร้างแบบจำลองการต้านเชื้อราแบบแผนผังของ OsiSh-2 ซึ่งรวมถึงการทำให้ผนังเซลล์เสื่อม ทำลายเยื่อหุ้มพลาสมา และทำให้การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ภายในเซลล์หยุดชะงัก การเหล่านี้ ระบบตอบสนองต่อความเครียดจากเชื้อราปรากฏขึ้นอย่างมากและไม่สามารถรักษาการเติบโตได้เมื่อ เร็วๆ นี้ จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ได้รับความสนใจอย่างมากในฐานะแหล่งทรัพยากรที่มีคุณค่าสำหรับการ ควบคุมโรคข้าวในทางชีวภาพ ในกลุ่ม an-tagonists นี้ *Streptomyces hygroscopicus* OsiSh-2 เป็นหนึ่งในไม่กี่คนที่แอคติโนแบคทีเรียชนิดเอนโดไฟต์ กิจกรรมการควบคุมทางชีวภาพที่มี ประสิทธิภาพของการกรองเพาะเลี้ยง OsiSh-2 ต่อการระบาดของโรคในข้าว การมีฤทธิ์ต้านเชื้อราใน วงกว้างที่ต่อต้านเชื้อไฟโตก่อโรคต่างๆ สารต้านเชื้อราที่เสถียรในตัวกรองการเพาะเลี้ยง OsiSh-2 และ การผสมผสานของโหมดการทำงานที่แตกต่างกันโดย OsiSh- 2 บอกเป็นนัยว่า OsiSh-2 อาจเอาชนะ ความแปรปรวนในการควบคุมทางชีวภาพของโรคได้ จึงมีผลดีในการเกษตรอย่างมาก

## สรุป

จากการทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์จากข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้จำนวน 174 ไอโซเลท เมื่อคัดเลือก 10 ไอโซเลท ที่มีการสร้าง aerial mycelium และเจริญฟูเต็มจานอาหารได้ภายในระยะเวลาอันสั้น มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia grisea* สาเหตุโรคไหม้ของข้าว ในระดับห้องปฏิบัติการสามารถคัดเลือกเชื้อได้ 2 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ ORR107 และ ORR719 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคสูงสุด และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวในระดับโรงเรือน พบว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ได้ดี สามารถลดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคลงได้ร้อยละ 68.90 และ 74.60 ตามลำดับ จากนั้นนำมาตรวจสอบความสามารถในการเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อต้นกล้าข้าว พบว่า เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อต้นกล้าของข้าวได้ และมีเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาหลังการปลูกเชื้อที่นานขึ้น แสดงให้เห็นว่า เชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท เหมาะสมสำหรับที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวระดับแปลง ในเชิงอนุรักษ์ต่อไปในอนาคต ซึ่งการใช้ประโยชน์จากเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์นอกจากมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ในข้าวได้แล้วยังเป็นทางเลือกใหม่เพื่อลดการใช้สารเคมีและแก้ปัญหาอันตรายที่เกิดจากการใช้สารเคมีทั้งทางตรงและทางอ้อมได้

## เอกสารอ้างอิง

- ชัยพร ชัดสงคราม และ เกวลิน คุณาศักดากุล. 2556. ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ จากพืชวงศ์ลำไยในการควบคุมโรคผลเน่าของลำไย. วารสารเกษตร. 29(3): 239-248
- ณปภพ แก้วกันทา และเกวลิน คุณาศักดากุล. 2560. ศักยภาพการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกจากข้าว ในการควบคุมโรคไหม้ของต้นกล้าข้าว. วารสารเกษตร 33(2): 203 - 213.
- ปิลันธนา ฐานพงษ์วรกุล และ ศราวิชญ์ สายมงคล. 2558. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ No.16 ในการ ควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าวพันธุ์ กข6. วารสารเกษตร 31(3): 301-310.
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, วราพงษ์ ชมาฤกษ์, จิรพงศ์ ไกรรินทร์, อุไรวรรณ คชสฤต, อนุชาติ คชสฤต, บุญรัตน์ จงดี, สมใจ สาลีโท, วีระศักดิ์ หอมสมบัติ, อัคราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และพนินา ยาใจ. 2554. ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้กับการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้. 249-267. ใน: ประชุมวิชาการข้าวและธัญพืช เมืองหนาว ประจำปี 2554. ณ โรงแรมอมารี แอร์พอร์ต ดอนเมือง, กรุงเทพฯ.
- พฤทธิกร ศุภพล และอุมมี แหวงบู. 2561. ประสิทธิภาพของราเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าว. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปีที่ 26 ฉบับที่2 มีนาคม - เมษายน 2561.
- ศิริมาศ ชัยชม และ เกวลิน คุณาศักดากุล. 2557. การใช้เชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ชักนำให้เกิดความต้านทานโรคทางใบของสตรอว์เบอร์รี่ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารเกษตร. 30(2):141-150.
- Araujo, J.M. de, A.C. da Silva and J.L. Azevedo. 2000. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). Brazilian Archives of Biology and Technology. 43: 447- 451.
- Chomcheon P, Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Ngamrojanavanich N, Kengtong S, Mahidol C, Ruchirawat S and Kittakoop P. 2009. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. Phytochemistry 70:407-413.
- Gangadevi V. and J. Muthumary. 2008. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. MYCOLOGIA BALCANICA 5:1-4.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Gangadevi, V. and Muthumary, J. 2009. Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae* and endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 52:9-15.
- Huang, W., Chung, U.I., Kronenberg, H.M., and de Crombrughe, B. 2001. The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:160– 165.
- Li, W., Tully, T., Kalderon, D. 1996. Effects of a conditional *Drosophila* PKA mutant on olfactory learning and memory. *Learn. Mem.* 2(6):320-333.
- Liu, X., Jia, J., Atkinson, S., Camara, M., Gao, K., Li, H., Cao, J. 2010. Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action. *World J. Microbiol. Biotechnol* 26:1465–1471.
- Mekwatanakarn, P., Kositratana, W., Levy, M., and Zeigler, R.S. 2000. Pathotype and avirulence gene diversity of *Pyricularia grisea* in Thailand as determined by rice lines near-isogenic for major resistance genes. *Plant Dis* 84:60-70.
- Nameirakpam Nirjanta Devi, J. John Prabakaran and Femina Wahab. 2012. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1280-1284.
- Ou S. H. 1985. *Rice Diseases*, 2<sup>nd</sup> ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.
- Pandi M, Manikandan R, Muthumary J. 2010. Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia thebromae* Pat., an endophytic fungus, against 7,12 dimethyl benz(a)-anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague Dawley rats. *Biomed Pharmacother* 64(1):48-53.
- Park, J.H., Park, H.J., Choi, J.G., Lee, S.W., Jang, K.S., Choi, Y.H., Cho, K.Y. and Kim, J.C., 2003. Screening for antifungal endophytic fungi against six pathogenic fungi. *Mycobiology*. 31:179-182.

### เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Qin, S., K. Xing, J. H. Jiang. L. H. Xu and W. J. Li. 2011. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89(3):457-473.
- Strobel, G.A., Stierle, D. and Hess, W.M. 1993. *Taxomyces andreanae* a proposed new tax on for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew. *Mycotaxon* 47:71-78.
- Sardi, P., M. Saracchi, S. Quaroni, B. Petrolini, G. E. Borgonovi and S. Merli. 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-steriled roots. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(8): 2691-2693.
- Strobel, G.A., Stierle, D. and Hess, W.M. 1993. *Pestalotiopsis microspora*, an Endophyte of the Wollemi Pine, *Wollemia nobilis*. *Aust. J. Bot.* 45:1073-1082.
- Strobel, G.A., Ford, E., Worapong J., Paper, J.K., Arif, A.M., Grant, D.M., Fung, P.C.W. and Chan, K. 2002. Ispoesacin, and isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, processing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* 60:179-183.
- Ting Xua, , Lidan Caoa, Jiarui Zenga, Christopher M.M. Francob, Yuanzhu Yangc, Xiaochun Huc, Ying Liua, Xiang Wang, Yan Gaoa, Zhigang Bua, Liming Shid, Guoying Zhoue, Qian Zhouf, Xuanming Liua, Yonghua Zhua.2019. The antifungal action mode of the rice endophyte *Streptomyces hygrosopicus* OsiSh-2 as a potential biocontrol agent against the rice blast pathogen. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 160: 58-69.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L. Zheng, C., Guo, L., Li, W. and Qin, L. 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research* 165(6):437-449.