

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสสตรอว์เบอร์รี

วรารณ ภูักดีพันธ์^{1*}, ศิริรัตน์ บัญญัติ¹ ปริญา บัญญัติ¹ และเกวณีน คุณาศักดากุล²

¹ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

² ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ (endophytic actinomycetes; EA) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนส และการประเมินความสามารถในการเข้าอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อสตรอว์เบอร์รี จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากผลสตรอว์เบอร์รีในแปลงปลูกของเกษตรกร อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ ได้เชื้อราสาเหตุบริสุทธิ์จำนวน 29 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค คัดเลือกไอโซเลทรุนแรงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษา จากการคัดเลือกเชื้อ EA จำนวน 79 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Co024 ด้วยเทคนิค Dual culture แบบ 4:1 พบว่าเชื้อ EA ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 13 ไอโซเลท นำไอโซเลทที่คัดเลือกได้มาทดสอบประสิทธิภาพ ด้วยเทคนิค Dual culture แบบ 1:1 พบว่าไอโซเลท AND04, AND01, และ CINv1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคสูงมากที่สุด เท่ากับ 88.89, 83.89, และ 83.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงนำเชื้อ EA ทั้ง 3 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการเข้าอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อใบ ก้านใบ และรากของสตรอว์เบอร์รี โดยวิธีแยกเชื้อกลับ พบว่าทุกไอโซเลทสามารถเข้าอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อใบ ก้านใบ และรากของสตรอว์เบอร์รีได้

*วรารณ ภูักดีพันธ์: (fon.waraporn@gmail.com)

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์, การเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อพืช, โรคแอนแทรคโนสสตรอว์เบอร์รี

Selection of Endophytic Actinomycetes Against Strawberry Anthracnose Disease

Waraporn Pupakdeepon^{1*} Sirirat Banyat¹ Parinya Banyat¹ and Kaewalin Kunasakdakul²

¹ Faculty of Agriculture, Uttaradit Rajabhat University

² Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

Abstract

The objectives of this study are to assess the efficacy of endophytic actinomycetes (EA) in inhibiting the mycelial growth of *Colletotrichum* sp., and strawberry tissue colonization assessment. 29 isolates of anthracnose pathogen isolated from infected strawberry fruit in Samoeng district, Chiang Mai. Isolates of pure fungi were obtained to conduct a pathogenicity test. The most severe isolate was selected for further use in this study. The selection of 79 EA isolates to inhibit the mycelium growth of *Colletotrichum* sp. isolate Co024 with a 4:1 dual culture technique, showed 13 isolates of EA with a greater than 50 percent inhibition rate. The selected isolates were tested for efficacy by the 1:1 dual culture technique. Results show that isolate AND04, AND01, and CINv1 had the highest percentage of inhibiting mycelial growth equal to 88.89, 83.89, and 83.34, respectively. Testing for the colonization ability, the screened EA isolates were reisolated in each part of the strawberry's tissue. Results in all 3 isolates were successfully colonized in the tissue of the strawberry leaf, petiole, and root.

* Waraporn Pupakdeepon: (fon.waraporn@gmail.com)

Keywords: Actinomycetes endophyte, Colonization, Strawberry anthracnose disease

SCIENCE AND TECHNOLOGY
UTTARADIT RAJABHAT UNIVERSITY

1. บทนำ

สตรอว์เบอร์รีจัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญทางภาคเหนือของประเทศไทย เป็นที่นิยมและมีแนวโน้มความต้องการของตลาดเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสตรอว์เบอร์รีที่มีรูปทรง สีสันสวยงาม รสชาติหวานอมเปรี้ยว และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว สำหรับการปลูกสตรอว์เบอร์รีของประเทศไทยมีความสำคัญเชื่อมโยงกับเศรษฐกิจการท่องเที่ยวสูง โดยเฉพาะในพื้นที่ของจังหวัดที่มีภูมิอากาศหนาวเย็นและเป็นแหล่งท่องเที่ยว เช่น เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ เลย กาญจนบุรี ขอนแก่น อุบลราชธานี และสกลนคร เป็นต้น^[1] ปัจจุบันเกษตรกรผู้ปลูกสตรอว์เบอร์รีประสบปัญหาโรคสำคัญโดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนส ซึ่งเกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Colletotrichum* spp. เป็นสาเหตุหลักของโรคผลเน่า^[2] สามารถก่อให้เกิดโรคได้กับทุกส่วนของต้นสตรอว์เบอร์รี โดยโรคจะระบาดรุนแรงและสร้างความเสียหายให้กับผลผลิต เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกษตรกรมีการใช้สารเคมีควบคุมโรคเกินความจำเป็น ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยแนวทางการป้องกันกำจัดโรคในปัจจุบันนิยมใช้วิธีการควบคุมโรคโดยชีววิธี (Biological control) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งในรูปแบบเชื้อสดและรูปแบบผลิตภัณฑ์เพื่อลดจำนวนหรือควบคุมประชากรของเชื้อสาเหตุโรค และการหยุดยั้งกิจกรรมหรือกระบวนการเข้าทำลายพืชของเชื้อสาเหตุโรค^[3]

แอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ (endophytic actinomycete; EA) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชโดยไม่ทำให้พืชอาศัยเกิดโรค ในขณะเดียวกันทำให้พืชอาศัยมีสุขภาพดี ช่วยกระตุ้นความต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชอาศัย^[4, 5] โดยเกวลิน และชัยพร^[6] แยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์จากเปลือกผลลำไยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย โดยทดสอบบนอาหาร ISP-2 พบว่าไอโซเลต DIM15 สามารถยับยั้งเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. ในระดับสูงมาก ซึ่งสอดคล้องกับ ปิลันธนา และมณีการ์^[7] โดยศึกษาการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ควบคุมโรคไฟทอปธอราใบไหม้ในต้นกล้วยที่ปลูกขึ้นหนูที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora capsici* พบว่าไอโซเลต NCT8 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *P. capsici* Cap2 ได้สูงสุด 80.67 เปอร์เซ็นต์ และทำให้เส้นใยของเชื้อราที่มีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม และสอดคล้องกับ Nguyen และคณะ^[8] และ Chen และคณะ^[9] ที่รายงานถึงเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *P. capsici* สาเหตุโรค ไฟทอปธอราใบไหม้ และสอดคล้องกับ Khuchaoenphaisan et al.^[10] รายงานการคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ จำนวน 26 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรค แอนแทรคโนสในพริก ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรควบคุมเชื้อ *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสสตรอว์เบอร์รี และทดสอบความสามารถเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ ไอโซเลตที่คัดเลือกได้ในการเข้าอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อใบ ก้านใบ และรากของสตรอว์เบอร์รี เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษา เชิงลึกถึงกลไกในการควบคุมโรค และการส่งเสริมการเจริญเติบโต และใช้สำหรับส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ต่อไป

2. วิธีการดำเนินการ

2.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบริสุทธิ และการทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

นำผลสตรอว์เบอร์รีที่แสดงอาการผลเน่าจากแปลงเกษตรกร อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ มาแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting โดยตัดเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อของเนื้อเยื่อที่เป็นโรคและปกติ แช่ในสารละลาย NaOCl ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที ล้างในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ครึ่งละ 2 นาที วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) แยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี hyphal tip isolation บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนผลสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 คัดเลือกไอโซเลตที่ก่อโรครุนแรง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope ดัดแปลงวิธีการจาก ศิริมาศ และเกวลิน^[11]

2.3 เชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ที่ใช้ในการทดลอง

นำเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาชีววิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่คือ โอโซเลท CINv1^[12] มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 ใช้ทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อที่แยกได้จากพืชสมุนไพร โดยแยกเชื้อบริสุทธิ์แอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ จากพืชสมุนไพร 8 ชนิด ได้แก่ ฟาทะลายโจร กะเพรา ข่า คาวตอง ชะพลู ดีปลี หล้าหวาน และโรสแมรี่ เก็บตัวอย่างในจังหวัดเชียงใหม่ มาแยกเชื้อตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Shimizu *et al.*^[13] แยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 ศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เปรียบเทียบกับเอกสารวิชาการเพื่อจำแนกชนิดเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ในระดับสัณฐานวิทยา^[14, 15]

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพและคัดเลือกแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสตรอว์เบอร์รีในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. Co024 ด้วยวิธี dual culture แบบ 4:1 ตามวิธีการของ ปลัณธนา และมณีการ์^[7] โดยคัดเลือกโอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ นำไปทดสอบด้วยวิธี dual culture แบบ 1:1 วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแทนแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์เป็นชุดควบคุม บันทึกผลการทดลองโดยการวัดขนาดรัศมีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม และชุดทดสอบ คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Percent Inhibition of Radial Growth: PIRG) จากสูตร

$$PIRG = (R1-R2/R1) \times 100$$

เมื่อ R1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

จากนั้นคัดเลือกโอโซเลทที่มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2.5 ศึกษาความสามารถในการเข้าอาศัยในเนื้อเยื่อสตรอว์เบอร์รีโดยวิธีแยกเชื้อกลับ

ศึกษาการเข้าอาศัยอยู่ของแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 2.4 เปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม) ทำการทดลองในเนื้อเยื่อใบ ก้านใบ และราก ของต้นกล้าสตรอว์เบอร์รี อายุ 30 วัน ในอาหารสังเคราะห์ Murashige and Skoog Basal Medium (MS-medium) สภาพปลอดเชื้อ จากนั้นหยดด้วยสารละลายเซลล์แขวนลอยของเชื้อแต่ละโอโซเลท (ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 cfu/ml. ปริมาตร 10 μ l. /ต้น) บริเวณโคนต้น ดูแลรักษาในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นแยกเชื้อกลับโดยสุมใบ ก้านใบ และราก มาฆ่าเชื้อที่ผิว และวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการนับจำนวนชิ้นส่วนสตรอว์เบอร์รีที่ปรากฏโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธี ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้น ตามวิธีการของ Meguro *et al.*^[16] สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยของเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ดังนี้

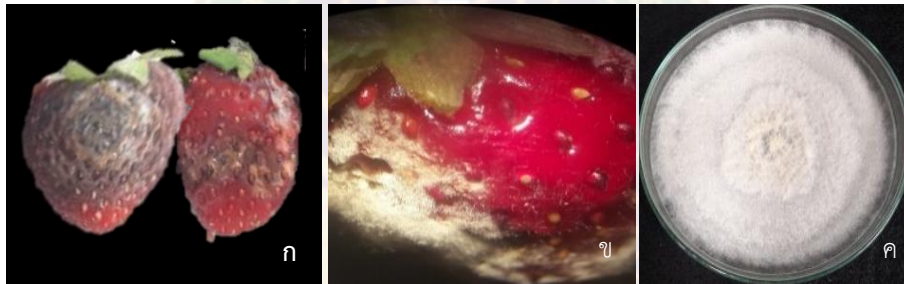
$$\text{เปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยของเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนพืชที่พบเชื้อเจริญ}}{\text{จำนวนชิ้นพืชทั้งหมด}} \times 100$$

3. ผลและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสบริสุทธิ์ และการทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

ผลสตรอว์เบอร์รีที่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนส พบว่าผลสดจะปรากฏอาการจุดไหม้ สีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ผลมีลักษณะเป็นวงแผลซ้อนกัน ต่อมาแผลเริ่มมีอาการยุบตัวหรือบวมลงในเนื้อเยื่อผลเล็กน้อย และมีการสร้างกลุ่มของสปอร์เชื้อรา

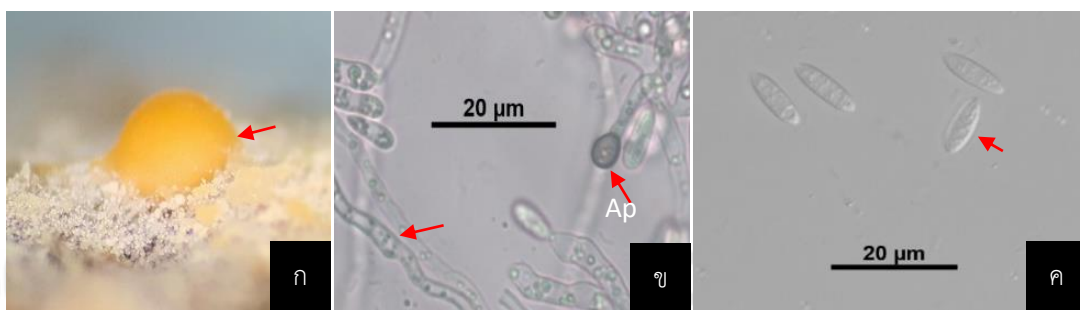
ลักษณะเยิ้ม สีเหลือง-ส้ม ปรากฏตรงกลางแผล (ภาพที่ 1 ก-ข) จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคสามารถแยกเชื้อราบริสุทธิ์ได้จำนวน 29 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการเกิดโรค และคัดเลือกไอโซเลทที่เกิดโรครุนแรงที่สุด คือไอโซเลท Co024 ทำให้ผลสโตรว์เบอร์รี่เกิดโรครุนแรงหลังวางเชื้อทดสอบ 3 วัน โดยลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลท Co024 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว ค่อนข้างฟู ลักษณะของเส้นใยเป็นวงซ้อนเป็นชั้น ๆ พบการสร้าง conidial mass เป็นจุดสีส้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา (ภาพที่ 1 ค) โดยสอดคล้องกับ Kumvinit and Akarapisan.^[2] แยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากผลสโตรว์เบอร์รี่ที่แสดงอาการแผลซ้ำ ฉ่ำน้ำ แผลยุบตัวเป็นวง ซ้อนกันเป็นชั้น ๆ สร้างกลุ่มสปอร์เชื้อราสีส้ม โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีส้มและสีเทา เมื่อจำแนกชนิดพบว่าเป็นเชื้อ *Colletotrichum acutatum* CK21



ภาพที่ 1. ผลสโตรว์เบอร์รี่ที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส (ก) กลุ่มสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp.

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope (ข) โคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. Co024 อายุ 14 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ค)

นำเชื้อราไอโซเลท Co024 ที่แสดงอาการของโรคเร็วและรุนแรงที่สุดมาเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 14 วัน นำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope พบว่าเส้นใยของเชื้อรามีผนังกัน สีขาว ใส ไม่มีสี สร้าง appressorium ค่อนข้างกลมสีเข้ม เส้นใยมีการสร้างสปอร์ หรือ conidia บนส่วนของ conidiogenous cell สปอร์หรือ conidia มีขนาดเล็ก ขอบปลายแหลมทั้งสองด้าน หรือเฉพาะด้านใดด้านหนึ่ง โดยค่าเฉลี่ยขนาดของ Conidia เท่ากับ 3.681×11.988 ไมโครเมตร (ค่าเฉลี่ยจาก 100 conidia) (ภาพที่ 2) สอดคล้องกับรายงานของ Damm *et al.*^[17] ลักษณะของเชื้อรา *C. acutatum* สายพันธุ์ CBS112759 มีลักษณะเส้นใย ใส ไม่มีสี ผนังเรียบ และมีผนังกัน และ conidia มีลักษณะใส ไม่มีสี ขนาดเฉลี่ยกว้างxยาว เท่ากับ $3.9 \pm 0.3 \times 12.6 \pm 1.8$ ไมโครเมตร ต่างจากสายพันธุ์ CBS112759 CBS112979 และ CBS 979.69 ที่ conidia มีลักษณะใส ไม่มีสี ลักษณะทรงกระบอก ปลายด้านใดด้านหนึ่งแหลม มีขนาดค่าเฉลี่ย เท่ากับ $3.4 \pm 0.5 \times 10.3 \pm 1.9$ ไมโครเมตร และพบว่าสายพันธุ์ CBS112979 มีขนาด conidia เล็กที่สุด



ภาพที่ 2. ลักษณะ conidiomata ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope (ก) ลักษณะเส้นใย

และ appressorium (Ap) (ข) และลักษณะ conidia (ค) ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp.

ไอโซเลท Co024

3.2 เชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ที่ใช้ในการทดลอง

นำเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้แก่ ไอโซเลท CINv1 มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 ตรวจสอบลักษณะโคโลนีพบว่าโคโลนีของเชื้อค่อนข้างกลม สีขาว มีการสร้างรงควัตถุบนอาหาร IMA-2 เป็นสีน้ำตาลแดง การจัดเรียงตัวของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นลักษณะเส้นสายต่อกันเป็นโซ่

เชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร 8 ชนิด ทำให้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ จำนวน 78 ไอโซเลท ผลการแยกเชื้อแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. เชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ จำนวน 78 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร และสายพันธุ์เปรียบเทียบ ไอโซเลท CINv1 ที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับ ที่	พืชอาศัย	ชื่อวิทยาศาสตร์	ไอโซเลท	จำนวน ไอโซเลท
	อบเชยเทศ	<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl.	CINv1	
1	ฟ้าทะลายโจร	<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f.) Wall.ex Nees.	AND01, AND02, AND03, AND04, AND06, AND07, AND08, AND010, AND011, AND012, AND015, AND017	12
2	กระเพรา	<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	OCI03, OCI05, OCI06, OCI011, OCI012, OCI014, OCI015, OCI019	8
3	ข่า	<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.	ALP07, ALP08, ALP09, ALP015, ALP020, ALP021	6
4	ควาตอง	<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	HOU04, HOU08, HOU011, HOU012, HOU013, HOU017, HOU018, HOU019, HOU020	9
5	ชะพลู	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	PIPs01, PIPs05, PIPs08, PIPs010, PIPs012, PIPs017, PIPs019, PIPs020	8
6	ดีปลี	<i>Piper retrofractum</i> Vahl.	PIPr03, PIPr05, PIPr06, PIPr011, PIPr014, PIPr022, PIPr023, PIPr025	8
7	หญ้าหวาน	<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni.	STE01, STE02, STE04, STE05, STE06, STE07, STE08, STE09, STE012, STE014, STE016, STE017, STE026	13
8	โรสแมรี่	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	ROS01, ROS02, ROS03, ROS08, ROS09, ROS011, ROS013, ROS015, ROS016, ROS021, ROS023, ROS024, ROS25, ROS29	14
รวม				78

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพและคัดเลือกแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสตรอร์เบอร์รี่ในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ทั้ง 79 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Co024 สาเหตุโรคแอนแทรกโนสตรอร์เบอร์รี่ ด้วยวิธี dual culture แบบ 4:1 บนอาหาร IMA-2 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 13 ไอโซเลท จากนั้นนำทั้ง 13 ไอโซเลท มาทดสอบด้วยวิธี dual culture แบบ 1:1 บนอาหาร IMA-2 จากผลการทดลองพบว่าแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* sp.

ไอโซเลท Co024 ได้ดีที่สุด คือไอโซเลท AND04 มีเปอร์เซ็นต์ การยับยั้งเท่ากับ 88.89 รองลงมา ได้แก่ AND01 และ CINv1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 83.89 และ 83.34 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) ตารางที่ 2. และภาพที่ 3ก สอดคล้องกับ ศิริมาศ และเกวลิน^[11] รายงานเชื้อปฏิปักษ์กลุ่มแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรและพืชวงศ์กุหลาบ จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ERY2, MET4, POL4, DUC2, PRU2 และ ROS7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สูงมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะ ไอโซเลท MET4 ที่สามารถยับยั้งได้สูงมากถึง 92.50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ทั้งสามไอโซเลท พบว่าแยกได้จากฟ้าทะลายโจร และอบเชย ซึ่งพืชทั้งสองเป็นพืชสมุนไพรที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคที่หลากหลาย โดยวัชรินทร์ และคณะ^[18] รายงานฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยฟ้าทะลายโจรและอบเชยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญ และยังสอดคล้องกับรายงานของ ปิรันธนา และคณะ^[19] รายงานถึงน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยประกอบด้วยสารสำคัญคือ ซินนามาลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) ยูจีนอล (eugenol) สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhimurium* และเชื้อรา *Candida albicans*, *Aspergillus* spp. และสอดคล้องกับ สุธามาส และศศิธร^[20] รายงานสารสกัดจากอบเชยในการยับยั้งเชื้อรา *Phyllosticta citricarpa* สาเหตุโรคใบจุดส้มโออีกด้วย

ตารางที่ 2. ผลของแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Co024 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2

Colletotrichum sp. ไอโซเลท Co024					
No.	Isolate	%PIRG *	No.	Isolate	%PIRG *
1	CINv1	83.34±2.886b	8	HOU018	57.78±1.922e
2	ALP07	64.44±1.928d	9	ROS05	67.78±1.922d
3	ALP015	60.00±0.000e	10	ROS06	57.78±1.922e
4	AND01	83.89±2.546b	11	OCI02	72.22±1.922c
5	AND02	74.44±1.928c	12	OCI014	52.22±1.922f
6	AND04	88.89±1.922a	13	PIPr03	51.11±1.922f
7	HOU011	52.22±1.922f			
%CV. 2.996					
LSD _{0.05} 3.418					

* ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ค่าที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันใน column ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Least significant difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.4 การศึกษาความสามารถในการเข้าอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อสตรอว์เบอร์รี

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ AND04, AND01 และ CINv1 มาทดสอบการเข้าอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อใบ ก้านใบ และรากต้นกล้าสตรอว์เบอร์รีในสภาพปลอดเชื้อ จากการแยกเชื้อกลับ พบว่าแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ทุกไอโซเลท สามารถเข้าอาศัยอยู่ในต้นกล้าของสตรอว์เบอร์รีได้ โดยไอโซเลท CINv1 สามารถแยกเชื้อกลับได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกส่วน รองลงมาคือ AND01 (100, 100 และ 96.67 เปอร์เซ็นต์) และ AND04 (96.67, 100 และ 96.67 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์จากชิ้นเนื้อเยื่อพืช (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3ข) ซึ่ง

สอดคล้องกับรายงานของ Goudjal *et al.*^[21] เชื้อ *Streptomyces* sp. TL7 ที่แยกจากทรัฟเฟิลทะเลทราย (sand truffles) เมื่อทดสอบการเข้าอยู่อาศัยในต้นกล้ามะเขือเทศ พบว่าสามารถแยกเชื้อกลับจากรากที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวของต้นกล้ามะเขือเทศได้ รวมถึงรายงานของ Meguro *et al.*^[22] ศึกษาเชื้อ *Streptomyces* sp. MBR-52 ที่แยกจากกุหลาบพันปี (rhododendron) พบว่าสามารถส่งเสริมการสร้างรากในแตงกวา และส่งเสริมการเจริญเติบโตในกุหลาบพันปีที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อได้ เมื่อนำมาแยกเชื้อกลับเพื่อทดสอบการเข้าอยู่อาศัย พบว่าสามารถแยกเชื้อกลับได้จากทั้งในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และโรงเรือนทดลอง

ตารางที่ 3. เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับจากส่วนใบ ก้านใบ และรากของสตรอว์เบอร์รี่ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังบ่มเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	จำนวนไอโซเลตเชื้อ EA ที่แยกได้จากส่วนของพืช ¹			เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับ ²		
	ใบ	ก้านใบ	ราก	ใบ	ก้านใบ	ราก
Control	0	0	0	0	0	0
CINv1	30	30	30	100	100	100
AND01	30	30	29	100	100	96.67
AND04	29	30	29	96.67	100	96.67

¹ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้น

² ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ



ภาพที่ 3 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลต Co024 (ก) และลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ข)

4. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองในครั้งนี้เมื่อทำการเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรจำนวน 8 ชนิด ในจังหวัดเชียงใหม่ นำมาแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์จนได้เชื้อบริสุทธิ์จำนวน 78 ไอโซเลต นำมาทดสอบร่วมกับเชื้อไอโซเลต CINv1 ที่มีรายงานประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคหลายชนิด และมีความสามารถในการเข้าอาศัยอยู่ (Colonization) ได้ในเนื้อเยื่อพืชได้ดี จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอว์เบอร์รี่ได้ทั้งหมด 29 ไอโซเลต และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการเกิดโรคสามารถทำให้เกิดโรครุนแรงที่สุดคือ ไอโซเลต Co024 เมื่อนำเชื้อ

แอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ทั้งหมดไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค โดยวิธี dual culture แบบ 4:1 พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์จำนวน 13 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบ โดยวิธี dual culture แบบ 1:1 พบว่า เชื้อไอโซเลท AND04 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้สูงที่สุด เท่ากับ 88.89 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ไอโซเลท AND01 และ CINV1 ที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 83.89 และ 83.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถแยกเชื้อกลับได้สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ทุกไอโซเลท โดยเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ทั้งสามไอโซเลทนี้สามารถนำไปศึกษาเชิงลึกถึงกลไกสำคัญในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช การเข้าอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช และการส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช และสามารถส่งเสริมให้เกษตรกรในจังหวัดอุดรธาตินำไปใช้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ โดยคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.เกวลิน คุณาศักดากุล ในการให้ความอนุเคราะห์เชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ ได้แก่ ไอโซเลท CINV1 เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ตลอดจนแนวทางในการวิจัย และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาชีววิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธาติน ที่สนับสนุนสถานที่ วัสดุ-อุปกรณ์ และงบประมาณ ขอขอบพระคุณเกษตรกรทุกท่านในจังหวัดเชียงใหม่ที่อนุญาตให้เข้าเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรและสตรอว์เบอร์รี่สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] ครองใจ โสมรักษ์ ญัฐพงษ์ วงษ์มา และอังคณา เทียนกล้า. การเจริญเติบโต และผลผลิตของสตรอว์เบอร์รี่ที่ปลูกในจังหวัดสกลนคร. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ปีที่ 19 ฉบับที่ 2. 77-85, 2560.
- [2] A. Kumvinit and A. Akarapisan. Identification of *Colletotrichum acutatum* and Screening of Antagonistic Bacteria Isolated from Strawberry in Chiang Mai, Thailand. International Journal of Agricultural Technology. 12 (4). pp. 693-706, 2016.
- [3] สุพจน์ กาเซ็ม. ชีวิตวิธีการควบคุมโรคพืชกับการผลิตพืชอาหารปลอดภัย. ข่าวสารเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ปีที่ 60 ฉบับที่ 1. 13-21, 2558.
- [4] D.N. Nair and S. Padmavathy, Impact of endophytic microorganisms on plants, environment, and humans. Scientific World Journal. 11 p, 2014.
- [5] M. Shimizu S. Yazawa and Y. Ushijima, A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose. Journal of General Plant Pathology. no. 75 pp. 27-36, 2009.
- [6] เกวลิน คุณาศักดากุล และชัยพร ชัดสงคราม. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย. วารสารเกษตร ปีที่ 28 ฉบับที่ 3. 285-294, 2555.
- [7] ปิลันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล และมณีนารถ ตรีภักตราครบุรี. การคัดเลือกแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์เบื้องต้นเพื่อควบคุมโรคไฟทอปธอราใบไหม้ในต้นกล้วยน้ำว้า. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 51 ฉบับที่ 1. 359-364, 2563.
- [8] X.H. Nguyen K.W. Naing Y.S. Lee Y.H. Kim J.H. Moon and K.Y. Kim, Antagonism of antifungal metabolites from *Streptomyces griseus* H7602 against *Phytophthora capsici*. J. Basic Microbiol. no. 55, pp. 45-53, 2015.
- [9] Y.Y. Chen P.C. Chen and T.T. Tsay, The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici*. Biological Control. no 98, pp. 34-42, 2016.

- [10] K. Khucharoenphaisan, K. Sinma, and C. Lorrunguang. Efficiency of Actinomycetes Against Phytopathogenic Fungus of Chilli Anthracnose. Journal of Applied Sciences. no. 13 (3) pp. 472-478, 2013.
- [11] ศิริมาศ ชัยชม และเกวลิน คุณาศักดากุล. การใช้เชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ชักนำให้เกิดความต้านทานโรคทางใบของสตรอว์เบอร์รี่ด้วยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารเกษตร ปีที่ 30 ฉบับที่ 2. 141-150, 2557.
- [12] เกวลิน คุณาศักดากุล และฉัตรสุดา เพื่อกใจแผ้ว. การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สารทุติยภูมิจากเชื้อแอคติโนมัยซิสเพื่อควบคุมโรคทางใบของพืชตระกูลกระหล่ำและมะเขือเทศบนพื้นที่สูง. รายงานฉบับสมบูรณ์ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) 71 หน้า, 2554.
- [13] M. Shimizu Y. Nakagawa Y. T. Furumai Y. Igarashi H. Onaka R. Yoshida and H. Konoh, Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolated from Rhododendron and its antifungal activity. Journal of General Plant Pathology. no. 66 pp. 360-366, 2000.
- [14] S. Miyadoh M. Hamada K. Hotta T. Kudo A. Seino G. Vobis and A. Yokpya, Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan. p. 233, 1997.
- [15] P. Chatsuda, Selection of endophytic actinomycetes and evaluation of their antifungal compounds for controlling Alternaria leaf spot of Cabbage. Thesis. p. 168, 2017.
- [16] A. Meguro S. Hasegawa M. Shimizu and T. Nishimura, Induction of disease resistance in tissue cultured seedlings of mountain laurel after treatment with *Streptomyces padanus* AOK-30. Actinomycetologica. no. 18 (2), pp. 48-53, 2004.
- [17] U. Damm P.F. Cannon J.H.C. Woudenberg P.W. Crous, The *Colletotrichum acutatum* species complex. Studies in Mycology. no. 73, pp. 37-113, 2012.
- [18] วชิรินทร์ รังสิภานุรัตน์ พิชรี กัมมารเจษฎากุล และอิสยา จันทรวิธานุชิต.ฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทย 10 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* ATCC 25922. วารสาร มฉก.วิชาการ ปีที่ 19 ฉบับที่ 38. 35-48, 2559.
- [19] ปิณฑนา เลิศสถิตธนกร กรองกาญจน์ มนตรี จารุวรรณ บรรจง เบญจวรรณ ส้ารวล และศิริณา โคตรจันทร์. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันจากเปลือกอบเชยเทศ. วารสารไทยเกษตรศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ ปีที่ 7 ฉบับที่ 1. 39-43, 2555.
- [20] สุธามาศ ณ น่าน และศศิธร วรปติรังสี. ผลของสารสกัดสมุนไพรบางชนิดในการป้องกันกำจัดโรคจุดดำของส้มโอ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 2553.
- [21] Y. Goudjal Z. Miyada A. Meklat and S. Nasserline, Plant-growth-promoting potential of endosymbiotic actinobacteria isolated from sand truffles (*Terfezia leonis* Tul.) of the Algerian Sahara. Ann Microbiol. no. 66 (1), p. 10, 2015.
- [22] A. Meguro Y. Ohmura S. Hasegawa M. Shimizu T. Nishimura and H. Kunoh, An Endophytic Actinomycete, *Streptomyces* sp. MBR-52, That Accelerates Emergence and Elongation of Plant Adventitious Roots. Actinomycetologica. no. 20 (1), pp. 1-9, 2006.