ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora infestans* และส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ

Efficacy of endophytic actinomyces for inhibit *Phytophthora infestans* and plant growth promotion of tomato

วิศิษฐ์ เจริญอึ๊ง [1]
เกวลิน คุณาศักดากุล [2]
Email: kaewalin.k3@gmail.com
[1] นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Email: art64jau@gmail.com
[2] สาขาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ (EA) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora infestans* และประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศจากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เก็บรวบรวมจากแปลงปลูกของเกษตรกรภายใต้มูลนิธิโครงการหลวง สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้จำนวน 10 ไอโซเลทนำมาทดสอบความสารถมารถในการเกิดโรคและคัดเลือกไอโซเลทที่มีความรุนแรงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษา จากการคัดกรองเชื้อ EA จำนวน 40 ไอโซเลท ในการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อรา *P. infestans* โดยใช้เทคนิค dual culture เพื่อประเมินผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. infestans* เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในแนวรัศมี (PIRG) พบว่า เชื้อ EA จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ CINc1 CINv1 CINv2 CINv3 CEN26 GAR1 PRE5 COF1 MET4 และ DUC2 สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 80% จึงนำเชื้อ EA ทั้ง 10 ไอโซเลทนี้ มาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพปลอดเชื้อโดยการใช้สปอร์ แขวนลอยของเชื้อ EA หยดลงตรงบริเวณโคนต้นมะเขือเทศ พบว่า ไอโซเลท CEN26 แสดงเปอร์เซ็นต์การส่งเสริมการเจริญเติบโตสูงสุดทั้งในด้านความสูง จำนวนใบ ขนาดลำต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของมะเขือเทศ และสามารถแยกเชื้อกลับจากเนื้อเยื่อใบ ลำต้น และรากของมะเขือเทศ ได้ 100%

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ Phytophthora infestans การส่งเสริมการเจริญเติบโต

Abstract

This study aims to study efficiency of Endophytic Actinomyces (EA) for inhibition mycelium grow of *Phytophthora infestans* and study efficiency of growth promotion in

tomato. Isolation of plant pathogen from leaf showed late blight were surveyed in the tomato-growing areas located under the Royal Project Foundation. Ten isolates of *P. infestans* were pure cultured and select the isolates that can cause the most severe disease for further studies. The experiment for selection of EA to control *P. infestans* running by dual culture technique, 40 isolates of EA were used to evaluate their inhibitory effects on growth of *P. infestans*. 10 isolates of EA; CINc1, CINv1, CINv2, CINv3, CEN26, GAR1, PRE5, COF1 MET4 and DUC2, were selected through their significant data of the PIRG that over than 80 %. The experiment for selection of EA to plant growth promotion in cultivation in aseptic conditions by drop the spore suspension of EA on tomato. CEN26 show the highest percentage of the height, number of leaf, trunk size, fresh weight and dry weight of tomato and can be 100% re-isolated EA from leaves, stem and roots of tomato.

Key word: Endophytic Actinomyces, *Phytophthora infestans*, Growth promotion

บทนำ

มะเขือเทศเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีพื้นที่การเพาะปลูกประมาณ 39,555 ไร่ โดยจังหวัดเชียงใหม่มีพื้นที่เพาะปลูกมะเขือเทศมากที่สุดในประเทศ ซึ่งในการเพาะปลูกมะเขือเทศประสบปัญหาทางด้านโรคและแมลงศัตรูพืชส่งผลกระทบให้ผลผลิตเกิดความเสียหาย โรคที่มีความสำคัญต่อการผลิตมะเขือเทศโรคหนึ่งคือ โรคใบไหม้ (late blight) สาเหตุเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. infestans* สามารถทำให้เกิดโรคได้ทุกส่วนของมะเขือเทศไม่ว่าจะเป็น กิ่ง ก้าน ใบ ลำต้น และผล ซึ่งเชื้อสาเหตุจะอาศัยอยู่ในเศษซากพืชที่เป็นโรคและต้นพืชที่หลงเหลือในแปลงหลังจากการเก็บเก็บ สามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโต โดยเฉพาะในสภาพอากาศเย็นและมีความชื้นสูง โรคจะระบาดอย่างรวดเร็วสร้างความเสียหายต่อการผลิตเป็นจำนวนมาก เกษตรกรมักใช้วิธีการควบคุมโรคด้วยการพ่นด้วยสารเคมีฆ่าเชื้อราที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ถึงแม้ว่าการใช้สารเคมีจะควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างรวดเร็ว หากเกษตรกรใช้ไม่ถูกต้องเหมาะสม เช่น ใช้มากเกินความจำเป็น อาจทำให้สารพิษปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมได้ โดยเฉพาะผลผลิต แหล่งน้ำและดินบนพื้นที่สูง รวมทั้งก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของเกษตรกรด้วย หรืออาจก่อให้เกิดการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อราของเชื้อสาเหตุโรคและทำให้การควบคุมโรคนั้นไม่ได้ผลซึ่งจะยิ่งส่งผลให้เกษตรกรมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคเพิ่มสูงขึ้น

ในปัจจุบันการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีมีความต้องการเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากตลอดระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมาเกษตรกรมีการปรับเปลี่ยนการผลิตพืชเข้าสู่มาตรฐานเกษตรปลอดภัย มีการศึกษาการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมโรคพืชในพืชชนิดหลายชนิดรวมถึง เช่น เชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ (อรอุมา และเบญจวรรณ, 2017) เชื้อรา *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคถอดฝักดาบของเข้า (ชวลิต และเกวลิน, 2018) เชื้อรา *Colletorichum gloeosporiodes* สาเหตุโรคแอนแทรค

โนสของพริก (ปิลันธนา และคณะ, 2021) เป็นต้น ซึ่งเชื้อ EA ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม Streptomyces, Actinoplanete และ Nocardioform เป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ได้หลายชนิด อีกทั้งมีคุณสมบัติในการในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและสามารถเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อพืชเพื่อส่งเสริมให้พืชมีความแข็งแรง และไม่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคอีกด้วย ทั้งนี้จึงได้มีการศึกษาการนำเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ นำมาควบคุมเชื้อรา *P. infestans* สาเหตุโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ และศึกษาในการส่งเสริมการเจริญเติบโต เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาพัฒนาต่อยอดในการผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในการป้องกันกำจัดโรคพืชต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อรา *P. infestans* สาเหตุโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ EA ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *P. infestans*
3. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ EA ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อของมะเขือมะเขือเทศ

ขอบเขตของการวิจัย

1. แยกและจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ จากแปลงปลูกบนพื้นที่สูง
2. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ EA ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. infestans* ในระดับห้องปฏิบัติการ
3. ทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชในระดับห้องปฏิบัติการ
4. ระยะเวลาในการทำวิจัยระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2562 ถึง 30 มีนาคม 2563

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ระเบียบวิธีการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ (Scientific research) เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. infestans* สาเหตุโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ และประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อพืชในระดับห้องปฏิบัติการ

2. ขั้นตอนการวิจัย

1. การสำรวจและการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ของพืชมะเขือเทศ

สำรวจและรวบรวมข้อมูลการแพร่ระบาดของโรคใบไหม้ของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *P. infestans* ในพื้นที่เพาะปลูกบนพื้นที่สูง 4 พื้นที่ ได้แก่ ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แพะ ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงทุ่งเรา และสถานีวิจัยเกษตรหลวงอินทนนท์ บันทึกข้อมูล

ลักษณะอาการและเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคเพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ดำเนินการโดยนำตัวอย่างใบที่แสดงอาการของโรคใบไหม้ มาแยกเชื้อโดยวิธีใช้เหยื่อล่อตามวิธีของ Tumwine *et al* (2000) จากนั้นทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี hyphal tip isolation เลี้ยงบนอาหาร Corn Meal Agar (CMA) ภายใต้ความมืด ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะเส้นใย สปอร์ เพื่อจำแนกชนิดราสาเหตุโรคใบไหม้ของพืชวงศ์มะเขือเปรียบเทียบกับเอกสารทางวิชาการ

2. การทดสอบความสามารถในการก่อโรค

นำเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร CA มาทดสอบความสามารถในการก่อโรคทางใบ ด้วยวิธี detached leaf ตามวิธีของ Pettitt *et al* (2011) โดยเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรคความเข้มข้น 10^6 spore/ml หยดลงบนใบมะเขือเทศปริมาณ 20 µl ในกล่องพลาสติกใสที่ให้ความชื้น บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการเกิดโรคที่ปรากฏ บันทึกลักษณะอาการ และประเมินความรุนแรงของโรค

3. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ

นำ EA ที่ได้จากงานวิจัยที่ผ่านมาของ เกวลิน และฉัตรสุดา (2551), เกวลิน และประไพพิศ (2552) และ ศิริมาศ และเกวลิน (2557) ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช จำนวน 40 ไอโซเลท นำมาคัดกรองทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร IMA-2 บ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นวัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญจากสูตร (Percent Inhibition of Radial Growth: PIRG)

$$PIRG = (R1-R2x100)/R1$$

เมื่อ R1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

4. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อของมะเขือเทศ

นำมะเขือเทศในสภาพปลอดเชื้ออายุ 30 วัน นำมาย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS โดยคัดเลือกต้นที่มีลักษณะแข็งแรงและตัดให้มีขนาด 2 cm เพื่อเตรียมนำไปใช้ในการทดสอบ จากนั้นหยดสปอร์แขวนลอยเชื้อ EA แต่ละไอโซเลทที่ความเข้มข้น 10^6 spore/ml. ลงบนบริเวณโคนต้นปริมาณ 100 µl/ต้น โดยชุดควบคุมใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ประเมินผลการทดลองโดยบันทึกค่าเฉลี่ยของความสูง จำจวนใบ รัศมีของลำต้น ความยากราก จำนวนราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างราก ลำต้น และใบ ในแต่ละกรรมวิธี นำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย NaOCl ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ

กลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง เลี้ยงบนอาหาร IMA-2 เพื่อตรวจสอบการเข้าอาศัยด้วยวิธีการแยกเชื้อกลับ (re-isolation) โดยใช้สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยอยู่ของเชื้อ EA ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยอยู่ = จำนวนชิ้นส่วนพืชที่พบเชื้อเจริญ X 100 / จำนวนชิ้นพืชทั้งหมด

ผลการวิจัย

1. การสำรวจและการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ของพืชมะเขือเทศ

จากการสำรวจโรคในพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกมะเขือเทศ 3 พื้นที่ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แพะ และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงทุ่งเรา การเพาะปลูกมะเขือเทศในพื้นที่ดังกล่าว จะปลูกลงถุงบรรจุขุยมะพร้าวหยาบ ภายใต้โรงเรือนที่มีตาข่ายกันแมลง ให้สารละลายธาตุอาหารแบบน้ำหยด ผลการสำรวจไม่พบการแพร่ระบาดของโรคใบไหม้ของมะเขือเทศทั้ง 3 พื้นที่ อย่างไรก็ตามเมื่อสำรวจโรคใบไหม้ในพื้นที่สถานีวิจัยเกษตรหลวงอินทนนท์ มีการเพาะปลูกมะเขือเทศในแปลงปลูกกลางแจ้ง ไม่มีโรงเรือน ให้น้ำแบบน้ำหยด จากการสำรวจ พบอาการใบไหม้ทั้งในระยะต้นกล้าและระยะให้ผลผลิต พบอาการของโรคส่วนใหญ่มักเกิดอาการใบไหม้ของใบที่ตำแหน่งบริเวณกลาง-ล่างของลำต้น โดยสังเกตได้จากอาการแผลสีน้ำตาลดำ บนใบ ก้านใบ ลำต้น และผล หากอากาศชื้นแผลจะมีลักษณะฉ่ำน้ำเริ่มที่ปลายใบและขยายไปทั่วใบ เมื่อนำตัวอย่างพืชที่แสดงเกิดโรคไปแยกเชื้อด้วยวิธี baiting methods พบว่าสามารถแยกเชื้อสาเหตุโรคได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ลักษณะการเจริญของโคโลนีสีขาว เส้นใยอ่อนนุ่มเป็นปุย เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเชื้อราสร้าง sporangiophore มีลักษณะใสไม่มีสี ไม่มีผนังกั้น แตกติ่งก้านสาขา และมีการสร้าง sporangium บน sporangiophore ลักษณะ sporangium ใส ผิวเรียบบนหัวของ sporangium มี papilla มีเซลล์เดียว ขนาด 19-27 x 31-45 µm ซึ่งเป็นไปตามการลักษณะการจำแนกจัดเป็นชนิด *P. infestans* (Jaimasit and Prakob, 2011)

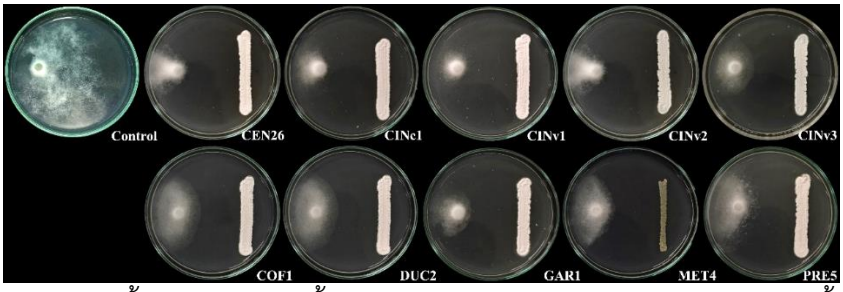
2. การทดสอบความสามารถในการก่อโรค

เชื้อรา *P. infestans* สามารถเข้าทำลายส่วนของใบได้ โดยแสดงอาการจุดฉ่ำน้ำขนาดเล็ก ไม่มีขอบแผล และพบกลุ่มของสปอร์และเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ขึ้นในเนื้อเยื่อใบ สามารถวัดระดับความรุนแรงของโรคได้ 5 ระดับ โดยใช้เกณฑ์การประเมินความรุนแรงของโรคจากเปอร์เซ็นต์ความเสียหายของพื้นที่ใบทั้งหมด ได้แก่ ระดับ 0 ใบที่ไม่เกิดโรค, ระดับที่ 1 ใบที่แสดงอาการโรคใบไหม้ 1-25%, ระดับที่ 2 ใบที่แสดงอาการโรคใบไหม้ 26-50%, ระดับที่ 3 ใบที่แสดงอาการโรคใบไหม้ 51-75% และระดับที่ 4 ใบที่แสดงอาการโรคใบไหม้ 76-100 % จากนั้นคัดเลือกเชื้อรา *P. infestans* ที่ทำให้เกิดโรครุนแรงที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใบไหม้ ของมะเขือเทศ

จากการทดสอบสามารถคัดกรองเชื้อ EA จำนวน 10 ไอโซเลท จาก 40 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้สูง ได้แก่ CEN26, CINc1, CINv1, CINv2, CINv3, COF1, DUC2, GAR1, MET4 และ PRE5 (ภาพที่ 1) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาตุโรค เท่ากับ

88.89, 84.81, 89.63, 88.89, 84.44, 84.44, 88.89, 87.41, 89.26 และ 85.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากนั้นนำเชื้อ EA ที่คัดกรองทั้ง 10 ไอโซเลทไปใช้ในการทดลองต่อไป

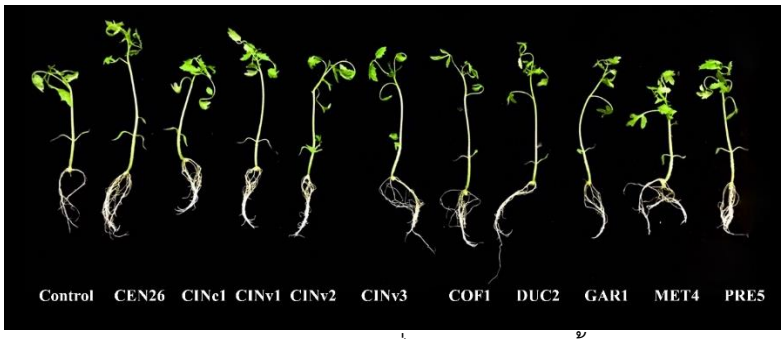


ภาพที่ 1 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *Phytophthora infestans* ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร IMA-2

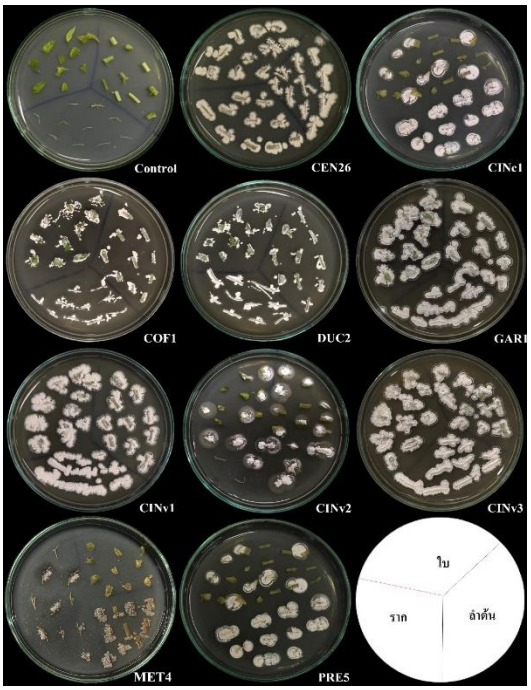
4. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อของมะเขือเทศราชินี

จากการทดสอบพบว่า เชื้อแต่ละไอโซเลทสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้ทุกไอโซเลท แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อไอโซเลท CEN26 สามารถส่งเสริม ความสูง (7.5 เซนติเมตร.) จำนวนใบ (6.9 ใบ) ความยาวราก (3.75 เซนติเมตร) จำนวนราก (6.9 เส้น) น้ำหนักสด (0.63 กรัม) และน้ำแห้ง (0.051 กรัม) ได้ดีที่สุด ขณะที่ไอโซเลท MET4 ส่งเสริมขนาดลำต้น (0.05 เซนติเมตร.) มากที่สุด (ภาพที่ 2 ตารางที่ 1)

เมื่อนำเชื้อ EA จำนวน 10 ไอโซเลท นำไปทดสอบการเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อพืชของต้นกล้ามะเขือเทศราชินีในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เชื้อ EA สามารถเข้าอยู่อาศัยในต้นกล้าได้ ซึ่งสามารถแยกเชื้อแต่ละไอโซเลทกลับได้ โดยตรวจพบโคโลนีของเชื้อ EA ที่เจริญออกจากชิ้นส่วนของพืช บนผิวหน้าอาหาร ซึ่งไอโซเลท CEN26 CINv1 CINv3 COF1 DUC2 และGAR1 เป็นไอโซเลทที่สามารถเจริญออกมาจากชิ้นส่วนของต้นได้ทุกส่วน โดยให้เปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ CINc1 CINv2 PRE5และ MET4 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การแยกเชื้อกลับเท่ากับ 88 77 61 และ 55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยส่วนใหญ่สามารถแยกเชื้อกลับได้จากส่วนราก ของกล้ามะเขือเทศในทุกไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ ไม่พบการเจริญของเชื้อ EA ออกจากชิ้นพืชเลย (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศราชินีที่ได้รับการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ ไอโซเลทต่าง ๆ ในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 14 วัน



ภาพที่ 3 ลักษณะการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลทที่แยกเชื้อกลับหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จากเนื้อเยื่อส่วนใบ ลำต้น และรากของต้นกล้ามะเขือเทศ

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ ได้ทำการศึกษาเชื้อ EA ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. infestans* พบว่าเชื้อ EA ทั้ง 10 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราได้ดี โดยสามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราได้มากกว่า 80% เนื่องจากเชื้อ EA มีคุณสมบัติในการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา ซึ่งจากการรายงานของ Phuakjaiphaeo *et.al.* (2016) ได้ทำการศึกษาสาร 2,5-Bis (hydroxymethyl) furan monoacetate เป็นหนึ่งในสารที่ผลิตจากเชื้อ EA ไอโซ

เลท CEN26 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ได้ถึง 90% และจากการรายงานของ Trejo-Estrada *et.al.* (1998) ได้ทำการศึกษาสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ที่สร้างจากเชื้อ *Streptomyces violaceusniger* YCED-9 ที่ผลิตสารต้านจุลชีพสามชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา สารประกอบเหล่านี้ถูกทำให้บริสุทธิ์ ประกอบด้วยสาร AFA (Anti-Fusarium Activity.) สารฆ่าเชื้อราที่มีสารประกอบคล้าย polyene ที่คล้ายกับ guanidylfungin A และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเส้นใยของ *Pythium* sp. และ *Phytophthora* spp. ได้สูง

ในการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ EA ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการเข้าอยู่อาศัยในเนื้อเยื่อมะเขือเทศ แสดงให้เห็นว่า การใช้เชื้อ EA สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตอย่างเห็นได้ชัดทั้งขนาดของลำต้น ความยาวราก จำนวนราก และความสูงของต้นมะเขือเทศ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เนื่องจากเชื้อ EA มีความสามารถในการผลิตสารสงเสริมการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิดออกมาส่งผลให้พืชนั้นเจริญเติบโตดีกว่าพืชที่ไม่มีเชื้อ EA อาศัยอยู่ อีกทั้งจากการแยกเชื้อ EA กลับจากเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของมะเขือเทศแสดงให้เห็นว่าเชื้อ EA สามารถเข้าไปอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่อของมะเขือเทศได้และสามารถเคลื่อนย้ายผ่านทางท่อลำเลียง

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 14 วัน

กรรมวิธี	การเจริญเติบโตของมะเขือเทศ (14 วัน)[1/]						
	ความสูงต้น (cm)	ความยาวราก (cm)	จำนวนราก (ราก)	ขนาดลำต้น (cm)	จำนวนใบ (ใบ)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
ชุดควบคุม	5.6$^{F\ 2/}$	2.13^{J}	3.2^{I}	0.025^{C}	5.60^{H}	0.350^{G}	0.025^{I}
CEN26	**7.5^{A}**	**3.74^{A}**	**6.9^{A}**	0.030^{B}	**8.90^{A}**	**0.630^{A}**	**0.051^{A}**
CINc1	5.9^{E}	**3.76^{A}**	5.4^{F}	0.030^{B}	6.90^{D}	0.578^{C}	0.049^{B}
CINv1	7.0^{BC}	3.70^{B}	5.6^{E}	0.030^{B}	8.50^{B}	0.588^{B}	0.043^{C}
CINv2	6.5^{D}	2.54^{H}	5.4^{F}	0.030^{B}	6.50^{G}	0.573^{C}	0.039^{F}
CINv3	6.8^{C}	2.46^{I}	5.7^{D}	0.030^{B}	6.50^{G}	0.355^{G}	0.049^{B}
COF1	6.8^{D}	2.89^{G}	4.3^{H}	0.030^{B}	6.50^{F}	0.368^{F}	0.031^{G}
DUC2	6.9^{C}	3.00^{F}	5.2^{G}	0.030^{B}	6.50^{G}	0.514^{E}	0.041^{D}
GAR1	7.2^{B}	3.21^{E}	5.9^{C}	0.030^{B}	8.00^{C}	0.534^{D}	0.040^{E}
MET4	6.5^{D}	3.55^{C}	6.8^{B}	**0.05^{A}**	7.80^{D}	0.592^{B}	0.049^{B}
PRE5	6.8^{C}	3.49^{D}	5.6^{E}	0.030^{B}	8.60^{B}	0.367^{F}	0.030^{H}
%CV	2.16	0.43	0.71	7.70	1.21	0.74	0.61
LSD	0.24	0.02	0.06	0.02	0.15	0.54	0.041

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ

[2] ค่าที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันใน columm เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดย วิธี Least significant difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

น้ำหรืออาหารของพืชไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ผลการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตอาจเพิ่มขึ้นโดยความสามารถของเชื้อ EA .ในแต่ละไอโซเลท โดยอาจมีความสามารถในการสร้างไคติเนส (Taechowisan *et al*. 2004), IAA (Martinez-Noel *et al*. 2001) ได้แตกต่างกัน พืชมีกลไกการต้านทานของตัวเอง (Franceschi *et al*., 2005) ในการป้องกันโรคพืชหรือสิ่งต่าง ๆ ที่สามารถทำให้พืชเกิดความเสียหายได้ ซึ่งการที่พืชมีเชื้อ EA เข้าไปอยู่อาศัยภายในเนื้อเยื่ออาจทำให้พืชมีความในการป้องกันการเกิดโรคมากขึ้น เนื่องจากเชื้อ EA สามารถมีส่วนร่วมในการต่อต้านกับเชื้อสาเหตุของโรคพืชได้โดยการสร้างสารบางชนิดที่มีผลต่อการจำกัดการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรค (Vassilev *et al*. 2549; Jain and Jain. 2007) หรือกระตุ้นกลไกลทางธรรมชาติในการป้องกันตัวของพืช (Pre'vost et al. 2006; Lehr et al. 2008)

ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปศึกษาและพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์ที่สามารถควบคุมโรคพืชและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในอนาคต เพื่อลดการใช้สารเคมีและยกระดับผลผลิตทางการเกษตรที่ปลอดภัยไม่มีสารพิษจากสารกำจัดศัตรูพืชตกค้าง

เอกสารอ้างอิง

เกวลิน คุณาศักดากุล และ ฉัตรสุดา เผือกใจแผ้ว. (2551). การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคผัก. รายงานฉบับสมบูรณ์. สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน). 44 หน้า

เกวลิน คุณาศักดากุล และ ประไพพิศ สุวิทย์ชยานนท์. (2552). การพัฒนาผลิตภัณฑ์คลุกเมล็ดจากเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์เพื่อควบคุมโรคในระยะกล้าของพริกกะเหรี่ยง กะหล่ำปลี และมะเขือเทศ. รายงานฉบับสมบูรณ์. สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน). 58 หน้า

ชวลิต ตนะทิพย์ และ เกวลิน คุณาศักดากุล. (2018). ชีวภัณฑ์แอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์แบบกระดาษเพื่อควบคุมโรคถอดฝักดาบของข้าวไรซ์เบอร์รีในระยะกล้า. วารสารเกษตร 34(1), 67-75.

ปิลันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล, วชิรญาณ์ ดวงตัะ, มณิการ์ ตรึกตราครบุรี และ สมบัติ ศรีชูวงศ์. (2021). ศักยภาพการเป็นปฏิปักษ์ของ Streptomyces spp. และ Bacillus subtilis ต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. วารสารแก่นเกษตร. 49(3), 656-667.

ศิริมาศ ชัยชม และ เกวลิน คุณาศักดากุล. (2014). การใช้เชื้อแอกติโนไมซีสเอนโดไฟต์ชักนำให้เกิดความต้านทานโรคทางใบของสตรอว์เบอร์รีด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารเกษตร. 30(2), 141-150.

อรอุมา เรืองวงษ์ และ เบญจวรรณ ใจจันทรา. (2017). การ ใช้แอคติโนมัยซีทจากดินเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ. วารสารเกษตร. 33(1), 49-59.

Franceschi, V.R., Krokene, P., Christiansen, E., & Krekling, T. (2005). Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. New phytologist. 167(2), 353–376

Jaimasit, P., & Prakob, W. (2011). Characterization of *Phytophthora infestans* population in potato crops from Chiang mai and Tak provinces. Journal of Agricultural Technology. 7(2), 431-439.

Jain, P.K. & Jain, P.C. (2007). Isolation characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS 1322. Indian Journal of Experimental Biology. 45, 203–206

Lehr, N.A., Schrey, S.D., Hampp, R., & Tarkka, M.T. (2008). Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. New Phytologist. 177(4), 965-976.

Martinez-Noel, G.M.A., Madrid, E.A., Bottini, R., & Lamattina, L. (2001). Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-Phytophthora infestans interaction and inhibits the pathogen growth in vitro. Plant Physiol Biochem. 39, 815–823.

Pettitt, T. R., Wainwright, M. F., Wakeham, A. J., & White, J. G. (2011). A simple detached leaf assay provides rapid and inexpensive determination of pathogenicity of *Pythium* isolates to 'all year round'(AYR) chrysanthemum roots. Plant Pathology, 60(5), 946-956.

Phuakjaiphaeo, C., Chang, C. I., Ruangwong, O., & Kunasakdakul, K. (2016). Isolation and identification of an antifungal compound from endophytic *Streptomyces* sp. CEN 26 active against *Alternaria brassicicola*. Letters in applied microbiology. 63(1), 38-44.

Pre´vost, K., Couture, G., Shipley, B., Brzezinski, R., & Beaulieu, C. (2006). Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities. Biocontrol. 51, 533–546.

Taechowisan, T., Peberdy, J.F. & Lumyong, S. (2004). PCR cloning and heterologous expression of chitinase gene of endophytic Streptomyces aureofaciens CMUAc130. The Journal of general and applied microbiology. 50, 177–182.

Trejo-Estrada, S. R., Paszczynski, A., & Crawford, D. L. (1998). Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 21(1-2), 81-90.

Tumwine, J., Frinking, H. D., & Jeger, M. J. (2000). Isolation techniques and cultural media for Phytophthora infestans from tomatoes. Mycologist. 14(3), 137-139.

Vassilev, N., Vassileva, M., & Nikolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. Applied microbiology and biotechnology. 71(2), 137–144.