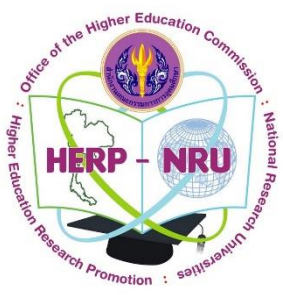


รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘

การคัดเลือกเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์จากดินในจังหวัดจันทบุรีและตราดเพื่อการยับยั้งโรคเชื้อราที่เกิดจาก *Pestalotiopsis* sp. ในมังคุดและเงาะ

Screening of Actinomycetes from soli in Chanta Buri and Trat for inhibition of fungal diseases caused by *Pestalotiopsis* sp. in Mangosteen and Rambutan

ผศ.ดร. มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร
มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน ๒๕๖๑

รหัสโครงการ 2558A10862013
เลขที่สัญญา 20/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘

การคัดเลือกเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์จากดินในจังหวัดจันทบุรีและตราดเพื่อการยับยั้งโรคเชื้อราที่เกิดจาก *Pestalotiopsis* sp. ในมังคุดและเงาะ

ผศ. ดร. มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดยสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัย
ในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

(Exeutive Summary)

ข้าพเจ้า ผศ. ดร. มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณโครงการวิจัยภายใต้ โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา สกอ. (HERP) โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การคัดเลือกเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์จากดินในจังหวัดจันทบุรี และตราด เพื่อการยับยั้งโรคเชื้อราที่เกิดจาก *Pestalotiopsis* sp. ในมังคุดและเงาะ

(ภาษาอังกฤษ) Screening of Actinomycetes from soli in Chanta Buri and Trat for inhibition of fungal diseases caused by *Pestalotiopsis* sp. in Mangosteen and Rambutan

รหัสโครงการ 2558A10862013 สัญญาเลขที่ 20/2558 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 200,000 บาท ระยะเวลาดำเนินการตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง วันที่ 30 กันยายน 2561

บทคัดย่อ

มังคุดและเงาะเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกในปี พ.ศ. 2558 รวมกันสูงหลายพันล้านบาท โดยแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญอยู่ในจังหวัดทางภาคตะวันออกและภาคใต้ของไทย ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตของมังคุดและเงาะลดลงและส่งผลกระทบโดยตรงต่อรายได้ของเกษตรกร คือ ปัญหาด้านโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. โดยเชื้อราชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในต้นมังคุด การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือการฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดเชื้อรา โดยเกษตรกรส่วนใหญ่มักใช้ฉีดพ่นเป็นประจำ ซึ่งไม่เพียงแต่จะทำให้สิ้นเปลืองทั้งกำลังแรงงานและค่าใช้จ่ายที่เพิ่มมากขึ้นแล้ว สารเคมีที่ตกค้างยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ตลอดจนสุขภาพของผู้บริโภค รวมถึงข้อกำหนดกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) ด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติมายับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช จัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Actinomycetes จากดินในสวนมังคุดที่มีคุณสมบัติในการ

ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ผลการทดลองด้วยวิธี Dual Culture Technique พบว่าเชื้อ Actinomycetes จำนวน 18 ไอโซเลท ได้แก่ Act-75, 76, 81, 85, 90, 106, 116, 118, 119, 120, 129, 131, 133, 134, 135, 139, 143 และ Act-150 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ และเมื่อทำการสุ่มเลือกเชื้อ 3 ไอโซเลท จากทั้งหมด 18 ไอโซเลท เพื่อนำมาทำการหาลำดับเบสของ DNA ของ 16s rRNA สำหรับการระบุชนิดของเชื้อ Actinomycetes พบว่าเชื้อรหัส Act-116, Act-118 และ Act-120 คือเชื้อ *Streptomyces parvus*, *Streptomyces silaceus* และ *Streptomyces purpurascens* ตามลำดับซึ่งผลจากการวิจัยครั้งนี้อาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้จริงในสวนผลไม้ได้ อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการทดลองเพิ่มเติม โดยผู้วิจัยมีแผนจะนำเชื้อทั้ง 18 ไอโซเลทนี้ ไปใช้เพื่อเป็นส่วนประกอบของปุ๋ยชีวภาพเม็ดและทำการศึกษาทดลองในโรงเรือนจริงต่อไป

Output / Outcome

1. บทความวิจัยระดับชาติ 1 เรื่อง (ร่างบทความวิจัยได้แนบท้ายไว้ในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์)
2. การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ 1 ครั้ง
3. การพัฒนาบัณฑิตในระดับปริญญาตรี คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
4. สร้างความร่วมมือระหว่างสถาบันการศึกษา ในงานวิจัยนี้ได้ทำงานร่วมกับบุคลากรของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และวิทยาเขตจันทบุรี มหาวิทยาลัยบูรพา
5. ที่สำคัญได้เชื้อกลุ่ม Actinomycetes 18 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการวิจัยต่อยอดเพื่อหาสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘ รหัสโครงการ 2558A10862013 สัญญาเลขที่ ๒๐/๒๕๕๘

บทคัดย่อ

มังคุดและเงาะเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกในปี พ.ศ. 2558 รวมกันสูงหลายพันล้านบาท โดยแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญอยู่ในจังหวัดทางภาคตะวันออกและภาคใต้ของไทย ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตของมังคุดและเงาะลดลงและส่งผลกระทบโดยตรงต่อรายได้ของเกษตรกร คือ ปัญหาด้านโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. โดยเชื้อราชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในต้นมังคุด การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือการฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดเชื้อรา โดยเกษตรกรส่วนใหญ่มักใช้ฉีดพ่นเป็นประจำ ซึ่งไม่เพียงแต่จะทำให้สิ้นเปลืองทั้งกำลังแรงงานและค่าใช้จ่ายที่เพิ่มมากขึ้นแล้ว สารเคมีที่ตกค้างยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ตลอดจนสุขภาพของผู้บริโภค รวมถึงข้อกำหนดกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) ด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติมายับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช จัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Actinomycetes จากดินในสวนมังคุดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ผลการทดลองด้วยวิธี Dual Culture Technique พบว่าเชื้อ Actinomycetes จำนวน 18 ไอโซเลท ได้แก่ Act-75, 76, 81, 85, 90, 106, 116, 118, 119, 120, 129, 131, 133, 134, 135, 139, 143 และ Act-150 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ และเมื่อทำการสุ่มเลือกเชื้อ 3 ไอโซเลท จากทั้งหมด 18 ไอโซเลท เพื่อนำมาทำการหาลำดับเบสของ DNA ของ 16s rRNA สำหรับการระบุชนิดของเชื้อ Actinomycetes พบว่าเชื้อรหัส Act-116, Act-118 และ Act-120 คือเชื้อ *Streptomyces parvus*, *Streptomyces silaceus* และ *Streptomyces purpurascens* ตามลำดับซึ่งผลจากการวิจัยครั้งนี้อาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้จริงในสวนผลไม้ได้ อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการทดลองเพิ่มเติม โดยผู้วิจัยมีแผนจะนำเชื้อทั้ง 18 ไอโซเลทนี้ ไปใช้เพื่อเป็นส่วนประกอบของปุ๋ยชีวภาพเม็ดและทำการศึกษาทดลองในโรงเรือนจริงต่อไป

คำสำคัญ : มังคุด, ชีววิธี, Actinomycetes, *Pestalotiopsis* sp.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
3. วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย	9
3.2 วิธีการวิจัย	10
4. ผลการวิจัย	
4.1 การเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่เกษตร	12
4.2 การแยกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จากตัวอย่างดิน	13
4.3 การแยกเชื้อราก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. จากมังคุดและเงาะ	14
4.4 การทดสอบเชื้อ Actinomycetes ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.	15

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5. สรุปและอภิปรายผล	19
เอกสารอ้างอิง	21
รายงานสรุปการเงิน	24
ภาคผนวก	25
การนำเสนอผลงาน	26
(ร่าง) บทความวิจัยในวารสารระดับชาติ	27
ประวัติผู้วิจัย	40

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2-1 ชื่อเรียกของเชื้อรากลุ่ม *Pestalotiopsis* sp. ในสถานะ Anamorphs และ Teleomorphs 8

4-1 แสดงจำนวนของเชื้อกลุ่ม Actinomycetes ที่แยกได้จากสวนผลไม้ใน จังหวัดจันทบุรีและตราด 14

4-2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ Actinomycetes ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. 17

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะสัณฐานที่หลากหลายของโคนิเดียของเชื้อ *Pestalotiopsis* sp.	6
2-2	วัฏจักรการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Pestalotiopsis* sp.	7
4-1	พื้นที่เก็บตัวอย่างดินในสวนเงาะและมังคุด จังหวัดจันทบุรี	12
4-2	ผลการคัดเลือกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จากดินในสวนมังคุด	13
4-3	เชื้อกลุ่ม Actinomycetes ที่ได้จากการคัดเลือกจากดินในสวนมังคุดและเงาะ ในจังหวัดจันทบุรี เชื้อไอโซเลทที่ Act-051, 061, 071, 081 และ 091	13
4-4	การทำ tissue transplanting ของมังคุด เพื่อแยกเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.	15
4-5	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.	15
4-6	ผลทดสอบที่เชื้อกลุ่ม Actinomycetes ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ รา *Pestalotiopsis* sp.	16
4-7	ผลทดสอบที่เชื้อกลุ่ม Actinomycetes สามารถยับยั้งการเจริญของ รา *Pestalotiopsis* sp. เชื้อ Act-75, 76, 81, 85 และ 90	16
4-8	ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces parvus*, *S. silaceus* และ *S. purpurascens*	18
4-9	ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ของ 16s rRNA ของเชื้อ Actinomycetes รหัส Act-116, Act-118 และ Act-120	18

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มังคุดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยมังคุดได้รับการขนานนามว่า “Queen of Fruits” ในปัจจุบันประเทศไทยส่งออกมังคุดเป็นอันดับ 1 ของโลก ในปี พ.ศ. 2556 มีการส่งออกสูงถึง 215,865 ตัน ทั้งในรูปของผลสดและแช่แข็ง ซึ่งนำรายได้เข้าประเทศได้มากถึง 4,296 ล้านบาท (ศูนย์ข้อมูลผลไม้ สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) และการบริโภคภายในประเทศมีมากถึง 56,026 ตัน แหล่งเพาะปลูกที่สำคัญของมังคุดอยู่ในจังหวัดทางภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย โดยจังหวัดที่เพาะปลูกมังคุดมากที่สุดคือ จันทบุรี รองลงมาคือ นครศรีธรรมราช ชุมพร ตราด ระยอง ซึ่งจังหวัดจันทบุรีมีพื้นที่เพาะปลูกมังคุดประมาณ 121,450 ไร่ (ศูนย์ข้อมูลผลไม้ สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)

เงาะเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยอีกชนิด โดยในปี พ.ศ. 2556 มีผลผลิตรวมสูงถึง 315,843 ตัน ซึ่งถูกบริโภคภายในประเทศสูงถึง 301,794 ตัน ที่เหลืออีก 14,049 ตันถูกส่งออก โดยมีมูลค่าการส่งออกทั้งในรูปของผลสดและผลิตภัณฑ์แปรรูปสูงถึง 625.7 ล้านบาท แหล่งเพาะปลูกที่สำคัญของเงาะอยู่ในจังหวัดทางภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย โดย 5 จังหวัดที่มีการเพาะปลูกเงาะมากที่สุดคือ จันทบุรี ตราด นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี และนราธิวาส ซึ่งจังหวัดจันทบุรีเป็นจังหวัดที่มีพื้นที่เพาะในการปลูกเงาะมากที่สุด (ศูนย์ข้อมูลผลไม้ สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)

โรคศัตรูพืชของมังคุดและเงาะมีมากมาย เช่น ศัตรูพืชจากหนอนและแมลง โรคจุดสนิมที่เกิดจากสาหร่าย และโรคที่มีความสำคัญอย่างมากอีกโรคหนึ่ง คือ การติดเชื้อราชนิด *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตมังคุดอย่างมาก เนื่องจากเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. เป็นเชื้อราที่ก่อโรคใบไหม้ในต้นมังคุดทำให้เกิดการแคระแกรนของต้น มีการเจริญเติบโตที่ไม่เต็มที่ สร้างผลผลิตได้ต่ำ และนอกจากนี้เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ยังเป็นเชื้อที่สำคัญในการก่อโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในผลไม้หลายชนิดด้วย เช่นมังคุด เงาะและทุเรียน ในปัจจุบันเกษตรกรไทยนิยมใช้สารเคมีจำพวก Carbendazim และ Benomyl ในการป้องกัน ดูแลและรักษาการติดเชื้อราดังกล่าว (นิศากร สุวรรณและคณะ 2556) รวมไปถึงการรมผลมังคุดด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) เพื่อยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. หลังการเก็บเกี่ยว

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า การใช้สารเคมีในการกำจัดเชื้อก่อโรคในผลไม้ก่อให้เกิดผลเสียหลายๆ อย่างตามมา เช่น การเกิดสารเคมีตกค้างในผลไม้ที่สูงกว่าเกณฑ์ที่ประเทศคู่ค้ากำหนดไว้ ซึ่งมีผลต่อการส่งออกไปยังประเทศต่างๆ โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และกลุ่มประเทศในยุโรป (สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร, 2553) อีกประการหนึ่งที่สำคัญ คือ ส่งผลให้เชื้อราในธรรมชาติดื้อต่อยา

โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ซึ่งจัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ที่พบได้ในธรมมชาติโดยทั่วไป ยาฆ่าเชื้อราที่ใช้ในการเกษตรส่งผลให้เชื้อ *Aspergillus fumigatus* เกิดการปรับตัวและกลายพันธุ์ทำให้เกิดการดื้อต่อยาที่ใช้รักษาในมนุษย์ (Snelders, van der Lee et al. 2008, Snelders, Huis In 't Veld et al. 2009, Snelders, Karawajczyk et al. 2010, Snelders, Camps et al. 2012)

แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้คือ การควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ความหมายคือการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติและมีความสามารถในการผลิตสาร secondary metabolite เช่น เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ มาใช้ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช เชื้อแอคติโนมัยซีทส์เป็นเชื้อที่มีความสำคัญอย่างมากทางการแพทย์ เภสัชกรรม การเกษตร และภาคอุตสาหกรรม เพราะสามารถสร้างสารซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ ในการวิจัยนี้จะใช้วิธีการควบคุมทางชีวภาพ โดยคัดเลือกหาเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้จากดินในสวนมังคุดและเงาะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา Pestalotiopsis sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยว

ผลสำเร็จจากงานวิจัยนี้ จะทำให้เกิดการลดการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา ส่งผลให้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนการผลิต เพิ่มผลผลิตของต้นมังคุดและเงาะเนื่องจากต้นสามารถเจริญเติบโตได้ดี ลดการตกค้างของสารเคมีในผลมังคุดและเงาะทำให้ไม่ประสบปัญหาการกีดกันจากการส่งออก จากเหตุผลดังกล่าวจะนำไปสู่การนำรายได้เข้าประเทศได้มากขึ้น นอกจากนี้ผลทางอ้อมคือน่าจะลดอัตราการกลายพันธุ์ของเชื้อราที่ก่อโรคในมนุษย์ที่ถูกเหนี่ยวนำจากการใช้ยากำจัดเชื้อราทางการเกษตรได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์จากดินในพื้นที่เพาะปลูกที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้และโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวในมังคุดและเงาะ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- เก็บตัวอย่างดินจังหวัดละไม่ต่ำกว่า 50 ตัวอย่าง จากสวนมังคุดและเงาะในจังหวัดจันทบุรีและตราด มาทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์อย่างน้อยจำนวน 100 ไอโซเลต
- เก็บตัวอย่างต้นมังคุดและเงาะที่เกิดโรคจากเชื้อรา และทำการแยกเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ในผลไม้
- คัดเลือกหาเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ด้วยวิธี Dual Culture Technique
- สุ่มเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ไปทำการหาลำดับเบส ไม่น้อยกว่า 3 ไอโซเลท

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่อาศัยอยู่ในดินสามารถผลิตสาร secondary metabolite เช่น สารปฏิชีวนะ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคของโรคใบไหม้และโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวในมังคุดและเงาะ

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ประการแรก ได้เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ได้

ประการที่สอง พัฒนาบัณฑิตในระดับปริญญาตรี คณะสหเวชศาสตร์ และระดับปริญญาโท คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประการที่สาม เพิ่มผลงานวิจัยให้แก่มหาวิทยาลัยบูรพา โดยการนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หรือตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ (TCI กลุ่ม 1) หรือนานาชาติ

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีและยากำจัดศัตรูพืชเพื่อใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ ทั้งนี้เพื่อการเพิ่มผลผลิตในภาคการเกษตร ตลอดจนการคงสภาพสินค้าทางการเกษตรในภาคการส่งออก แต่เนื่องจากสารเคมีเหล่านั้นส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นการปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมทางดิน น้ำ และการตกค้างในผลผลิต ทำให้เกิดอันตรายแก่เกษตรกร ชาวบ้านบริเวณใกล้เคียงและผู้บริโภค นอกจากนี้ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ได้

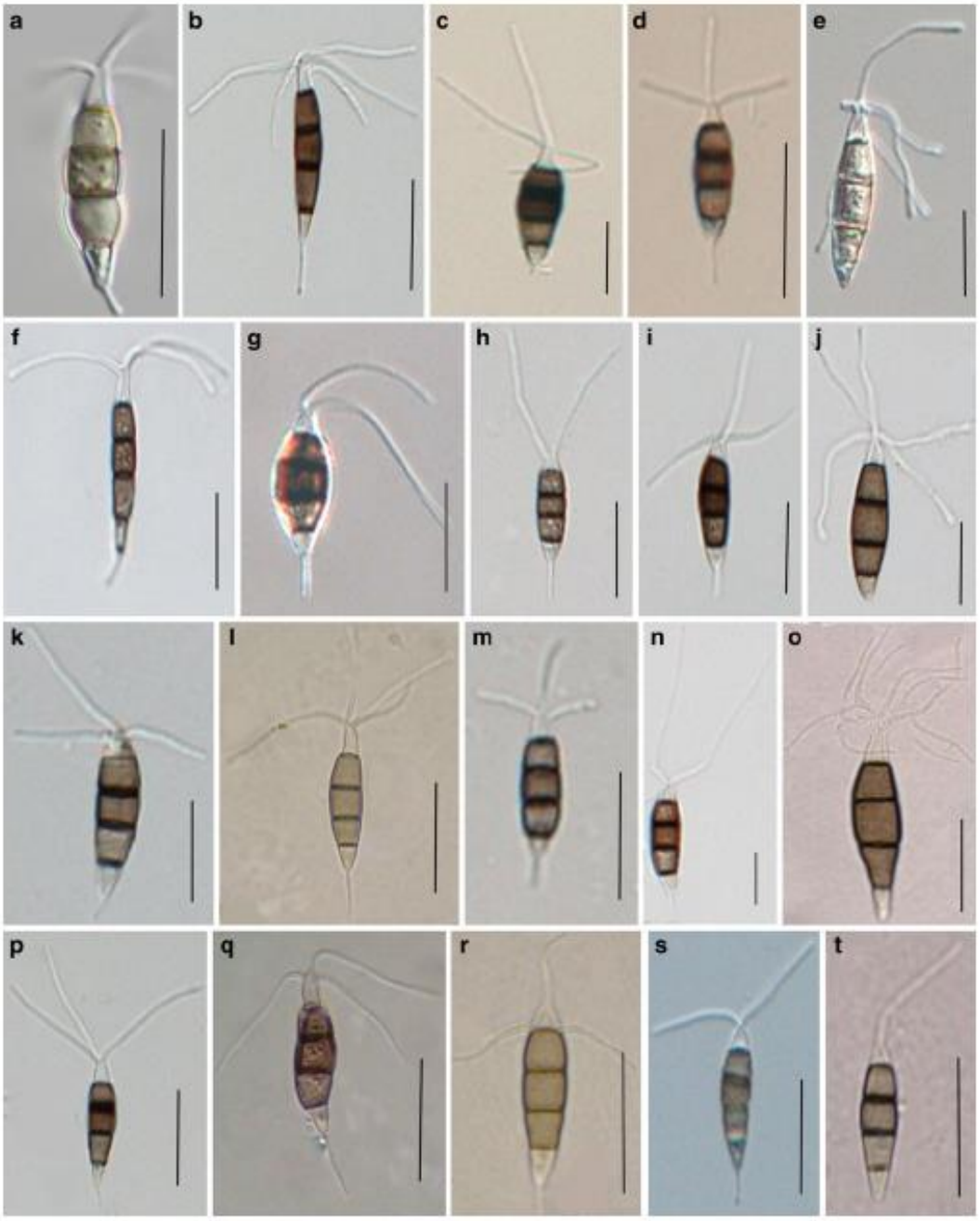
เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีสท์จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก บางชนิดติดสี acid fast ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อรา มีความแตกต่างจากเชื้อรา คือ เป็นสิ่งมีชีวิตชนิด prokaryotic cell ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ไม่มีไมโตคอนเดรีย เชื้อแอคติโนมัยซีสท์สามารถถูกยับยั้งการเติบโตได้โดยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเติบโตของเชื้อรา (Cross and Goodfellow, 1973) ในปี ค.ศ. 1997 Stackebrandt และคณะได้เสนอการจัดหมวดหมู่ของเชื้อแบคทีเรียแบบใหม่ โดยอาศัยความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16s rRNA โดยเชื้อแอคติโนมัยซีสท์จัดอยู่ใน Class Actinobacteria วงศ์ Actinomyceteales

เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ (Actinomycetes) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีการนำไปใช้ในการควบคุมโรคพืช เนื่องจากเป็นเชื้อสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ซึ่งในปัจจุบันมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ผลิตมาจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ (Goodfellow et al., 1988) รายงานการวิจัยหลายรายงานชี้ให้เห็นว่าเชื้อกลุ่มกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์สามารถถูกนำมาใช้ทางการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ได้ เช่น Samac et al. (2003) รายงานว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. ที่อาศัยอยู่กับรากพืชในกลุ่ม alfalfa สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่ป้องกันการเกิดโรคใบจุดได้อย่างดี และสามารถนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคที่ระบบรากและเมล็ดในพืชชนิดอื่นได้ เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ จีนัส *Streptomyces* และ *Micromonospora* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะพวก beta-lactams, polyethers, nonpolyenic, macrolides, และ azalomycin B เพื่อใช้ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา (Gesheva 2002) นอกจากยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ศัตรูพืชได้แล้ว เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์สามารถผลิตเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายสารต่างๆ เช่น ลิกนิน ไคติน เซลลูโลส เป็นต้น ได้ นอกจากนี้เชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ บางชนิดสามารถย่อยสลายยากำจัดศัตรูพืชได้ เช่นย่อยสลาย diuron (Castillo et al., 2006) และ alachlor ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรง (Sette et al., 2005) และย่อยสลายยาฆ่าแมลง gamma-hexachloro cyclohexane (Benimeli et al., 2008)

Pestalotiopsis sp. เป็นเชื้อที่อยู่ใน class Deuteromycetes, subclass Coelomycetes, order Melanconiales, family Melancomiaceae สามารถสร้าง fruiting body เรียกว่า acervulus

ใต้ผิวพืชชั้น epidermis หรือ cuticle ของพืชที่เป็นโรค เมื่อแก่จะดันผิวพืชให้แตกออก ภายใน acervulus ประกอบด้วย conidium เกิดบนก้าน conidiospore สั้น ๆ conidium ที่เจริญเต็มที่แล้วมักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน มีสีต่าง ๆ เช่น สีขาว ครีม ส้ม ดำ ขึ้นกับการสร้าง pigment ของ conidium (อังสุมา สมบัติชัย, 2530) มีลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เส้นใยมีสีขาวนวลถึงสีน้ำตาลอ่อน เส้นใยหยาบ ฟูเล็กน้อยพบกลุ่มสปอร์สีดำมันเยิ้มกระจายทั่วโคโลนี ลักษณะก้านชูสปอร์สั้น ไม่แตกแขนง สีอ่อน ผนังหนา ขนาด 21-28 x 8-10 ไมโครเมตร บริเวณกลางเซลล์จะมีสีเข้มสุดส่วนหัวและส่วนท้ายของ conidia จะมีสีอ่อน พบระยางค์ 2-3 เส้นที่ส่วนท้ายของเซลล์ (Holliday, 1980) ดังแสดงในรูปที่ 2-1

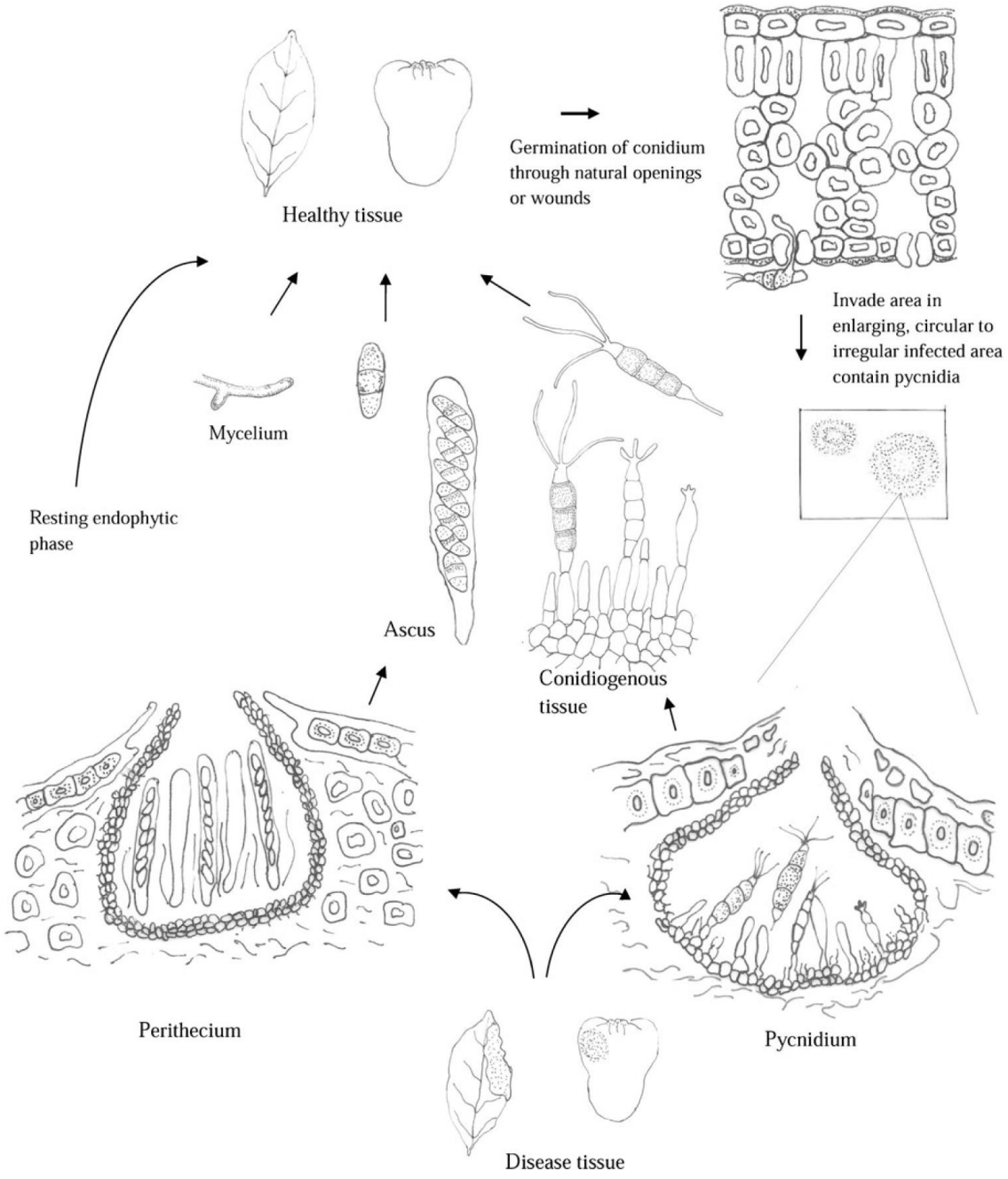
Pestalotiopsis sp. เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคพืชทั่วไปในเขตร้อน โดยเฉพาะโรคใบไหม้และโรคหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตร (เนตรนภิส เขียวขำ และสมศิริ แสงโชติ. 2551) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทั้งในภาคการเกษตรและการส่งออกของประเทศไทยอย่างมาก โดยเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สามารถก่อโรคได้ทั้งในต้นพืชและผลไม้หลังจากการเก็บเกี่ยว เชื้อรานี้สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายส่วนไม่ว่าจะเป็น ใบ ดอก ผล โดยพบอุบัติการณ์อย่างมากในต้นมังคุด ฝรั่ง ลองกองและเงาะ นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อราชนิดนี้ระบาดในประเทศอาร์เจนตินา ออสเตรเลีย แคนาดา เอธิโอเปีย อิสราเอล เคนยา นิวซีแลนด์ ปากีสถานและอเมริกา กล่าวคือสามารถพบได้ทั่วโลก (Holliday, 1980) ต้นมังคุดที่ถูกราชนิดนี้เข้าทำลาย จะทำให้เกิดโรคใบไหม้ ซึ่งมีอาการ ดังนี้ ใบจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แล้วกลายเป็นสีน้ำตาลไหม้เกือบดำ กิ่งจะเล็กขาดน้ำและแห้งตายในที่สุด ลำต้นแคระแกรน มีการเจริญเติบโตที่ต่ำ สร้างผลผลิตได้น้อย นอกจากนี้ยังสร้างความเสียหายแก่ผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวซึ่งทำให้ผลมังคุดมีลักษณะแข็ง บริเวณที่เป็นโรคจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงอ่อน (Alvarez และ Nishijima, 1987)



รูปที่ 2-1 ลักษณะสัณฐานที่หลากหลายของโคนิเดียของเชื้อ *Pestalotiopsis* sp.

a, light concolorous **b**, dark concolorous **c**, versicolorous **d**, small conidia **e**, large conidia **f,** relatively long conidia **g**, relatively broad conidia **h**, two apical appendages **I**, three apical appendages **j**, five apical appendages **k**, apical appendages without knobbed apical appendages **l**, apical appendages with knobbed apical appendages **m**, relatively short apical appendages **n**, relatively large apical appendages **o**, branched apical appendages **p**, attached to the top of the apical appendages **q**, attached to the middle of the apical appendages **r**, some attached to the bottom of the apical cell **s**, presence of apical appendages **t**, absence of apical appendages. Scale bars: a–b=20 μm

ที่มา : Maharachchikumbura, S., และคณะ 2011



รูปที่ 2-2 วัฏจักรการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Pestalotiopsis* sp.

ที่มา : Maharachchikumbura, S., และคณะ 2011

ตารางที่ 2-1 ชื่อเรียกของเชื้อรากลุ่ม *Pestalotiopsis* sp. ในสถานะ Anamorphs และ Teleomorphs

Asexual form	Sexual form
Pestalotiopsis baarnensis Steyaert	*Pestalosphaeria accidenta*
Pestalotiopsis sp.	*Pestalosphaeria alpiniae* P.K. Chi & S.Q. Chen
Pestalotiopsis sp.	*Pestalosphaeria austroamericana* Nag Raj & DiCosmo
Pestalotiopsis guepinii var *macrotricha* (Kleb.) B. Sutton	*Pestalosphaeria concentrica* M.E. Barr
Pestalotiopsis sp.	*Pestalosphaeria elaeidis* (C. Booth & J.S. Robertson) Aa
Pestalotiopsis eugeniae (Thüm.) S. Kaneko	*Pestalosphaeria eugeniae* P.K. Chi & S.M. Lin
Pestalotiopsis neglecta	*Pestalosphaeria gubae* Tak. Kobay., Ishihara & Yas. Ono
Pestalotiopsis microspora	*Pestalosphaeria hansenii*
Pestalotiopsis podocarpi (Dennis) X.A. Sun & Q.X. Ge	*Pestalosphaeria jinggangensis*
Pestalotiopsis sp.	*Pestalosphaeria leucospermi* Samuels, E. Müll. & Petrini
Pestalotiopsis maculiformans (Guba & Zeller) Steyaert	*Pestalosphaeria maculiformans* Marinc., M.J. Wingf. & Crous
Pestalotiopsis besseyi (Guba) Nag Raj	*Pestalosphaeria varia* Nag Raj

ที่มา : Maharachchikumbura, S., และคณะ 2011

ในปัจจุบันแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้คือ การควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ความหมายคือการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติและมีความสามารถในการผลิตสาร secondary metabolite เช่น เชื้อแอคติโนมัยซีทส์มาใช้ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช ในการวิจัยนี้จะใช้วิธีการควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol) โดยคัดเลือกหาเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้จากดินในสวนมังคุดและเงาะ ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้ทั้งสองชนิด

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเชื้อ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

3.1.1 เชื้อราและแบคทีเรีย

- เชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ที่แยกได้จากต้นมังคุดและเงาะในพื้นที่สวนผลไม้ของจังหวัดจันทบุรีและตราด
- เชื้อกลุ่ม Actinomycetes ซึ่งแยกได้จากดินในพื้นที่สวนผลไม้ของจังหวัดจันทบุรีและตราด

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (Himedia Laboratories PVt. Ltd.)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Starch casein agar (SCA) ที่มียา cycloheximide และ nalidixic acid
- อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2

3.1.4 อุปกรณ์

- Plate เพาะเชื้อpetri dish (membrane solution)
- Filter กรองสารขนาดรูกรอง 0.22 µm (corning Incorated)
- Microcentrifuge tube 1.5 ml (Kirgen)
- หลอดพลาสติกขนาด 15 และ 50 ml (corning)
- Autopipett และ tip ขนาดต่างๆ
- Slide และcover slip
- กระบอกฉีดยา
- ขวดใส่สารขนาดต่างๆ (schott duran)
- ขวดรูปชมพู่ขนาดต่างๆ (schott duran)
- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (schott duran)
- กระบอกตวง (witeg®)
- หลอดทดลองขนาดต่างๆ
- ตะขอเขี่ยเชื้อ (hook)
- Cotton swap sterile
- แผ่นอลูมิเนียม (aluminium foil)
- ถุงมือยาง

- Autoclave tape
- ปากกาlabel
- กรรไกร
- Scotch tape
- กระดาษชำระ
- ถุงพลาสติกขนาดใหญ่

3.1.5 เครื่องมือ

- ตู้บ่มเชื้อ incubator (CONTHERM scientific Ltd.)
- เครื่องวัดความขุ่น densitometer (Grant-bio)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงcentrifuge (Labnet)
- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
- เครื่องชั่งสาร
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ autoclave (Hirayama)
- ตู้อบความร้อน oven (Binder)
- เครื่อง vortex mixer (vortex-2 GENE®)
- ตู้แช่เย็น -20 และ 4 ºC
- ตะเกียงบุนเสน

3.1.6 สารเคมี

- 0.85% Normal saline solution (NSS)
- สีย้อม lactophenol cotton blue (LPCB)
- 70% Ethanol
- Glycerol
- น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินถูกเก็บจากสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี 35 ตัวอย่าง และตราด 70 ตัวอย่าง รวม 105 ตัวอย่าง โดยในหนึ่งแปลงเกษตรจะถูกแบ่งเก็บจากบริเวณหัวแปลงกลางแปลง และท้ายแปลงตัวอย่างดินถูกเก็บไว้ในหลอดพลาสติกขนาด 15 ml พร้อมทั้งทำการบันทึกข้อมูลของบริเวณที่เก็บตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่อยู่ในหลอดพลาสติกขนาด 15 ml ถูกเก็บไว้ในในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป

3.2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงในอาหาร starch casein broth (SCB) และเจือจางตัวอย่างดินให้เป็น 10^{-4} ถึง 10^{-6} จากนั้นดูดตัวอย่างดินปริมาตร 100 µl เพื่อทำการ spread plate ลงบนอาหาร starch casein agar (SCA) ที่มียา cycloheximide และ nalidixic acid ผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อได้เชื้อแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ได้แล้ว ทำการเก็บ stock เชื้อโดยใช้อาหาร ISP-2

3.2.3 การแยกเชื้อ *Pestalotiopsis* sp.

การแยกเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ทำโดยใช้วิธี tissue transplanting โดยตัดชิ้นส่วนของตัวอย่างที่มีรอยโรคจากมังคุดและเงาะ ขนาด 5x5 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อภายนอกด้วย 25% Clorox (1.25% Sodium hypochloride) ในจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 5 นาที แล้วรินน้ำยาออก ล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นซับด้วยทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและนำไปวางในอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิด PDA (Potato Dextrose Agar) ที่ผสมยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย penicillin-streptomycin เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม จากนั้นทำการบ่มเชื้อราให้เจริญที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3-7 วัน ตรวจสอบด้วยการย้อมสีและดูลักษณะโครงสร้างของเส้นใยและโคนิเดีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.4 การทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติมัยซีทส์ในการยับยั้งเชื้อ *Pestalotiopsis* sp.

การทดสอบความสามารถของเชื้อแอคติมัยซีทส์ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคในมังคุดและเงาะ ด้วยเทคนิค dual culture

ทำการลากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในแนวตั้งฉากบนอาหารชนิด PDA (Potato Dextrose Agar) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อแอคติมัยซีทส์เจริญและหลั่งสารต้านเชื้อราสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่แยกได้จากรอยโรคของต้นมังคุดและเงาะวางลงบนจานเพาะเลี้ยงให้ห่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่ระยะ 3 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่เกษตรกรรม

ได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจำนวน 105 ตัวอย่าง จากสวนผลไม้ซึ่งมีการเพาะปลูกเงาะและมังคุด ในจังหวัดจันทบุรีและตราด

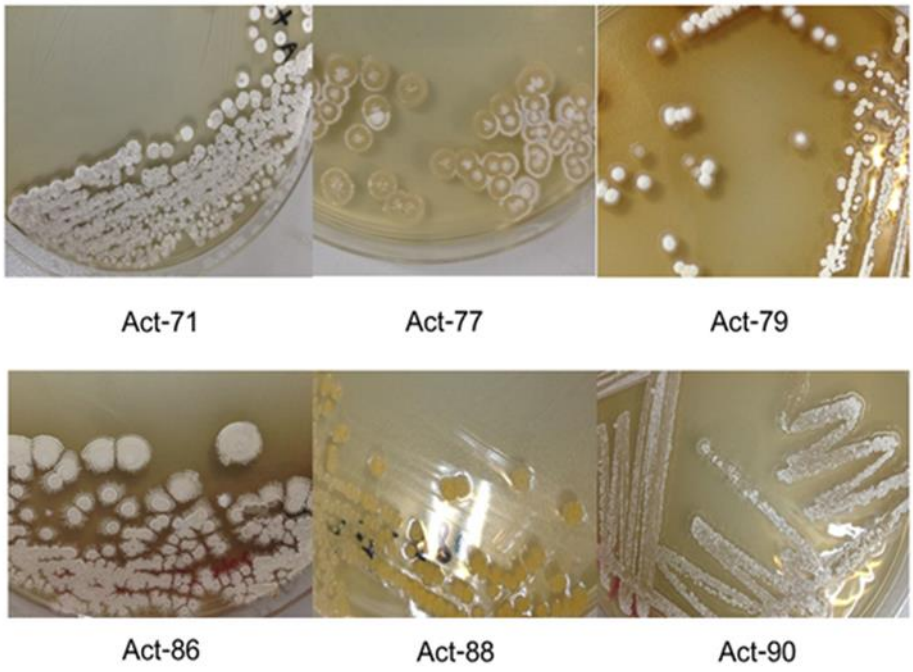
รูปที่ 4-1 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินในสวนเงาะและมังคุดในจังหวัดจันทบุรี

รูปบน : พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างดินและตัวอย่างโรคจากต้นเงาะ
รูปล่าง : พื้นที่ในการเก็บตัวอย่างดินและตัวอย่างโรคจากต้นเงาะ

4.2 แยกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จากตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดิน 105 ตัวอย่าง ถูกนำมาชั่งให้มีปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในอาหาร starch casein broth (SCB) และเจือจางตัวอย่างดินให้เป็น 10^{-4} ถึง 10^{-6} จากนั้นดูดตัวอย่างดินปริมาตร 100 µl เพื่อทำการ spread plate ลงบนอาหาร starch casein agar (SCA) ที่มียา cycloheximide, nalidixic acid และ fluconazole ผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อแยกเชื้อ Actinomycetes ได้แล้ว (ส่วนใหญ่แล้วโคโลนีจะปรากฏภายใน 7 วัน) ทำการเก็บ stock เชื้อโดยใช้อาหาร ISP-2

รูปที่ 4-2 ผลการคัดเลือกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จากดินในสวนมังคุด



รูปที่ 4-3 เชื้อกลุ่ม Actinomycetes ที่ได้จากการคัดเลือกจากดินในสวนมังคุดและเงาะ

เมื่อโคโลนีของเชื้อกลุ่ม Actinomycetes ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้เลือกโคโลนีที่มีลักษณะขรุขระ ขอบไม่เรียบ โคโลนีแห้ง คล้ายลักษณะของเชื้อราแต่ไม่มีการสร้างเส้นใย ดังแสดงในรูปที่ 4-2 มาเขี่ยในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (cross streak) เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยว (single colony) จากนั้นให้ทำการเก็บเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ดังแสดงในรูปที่ 4-3) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ 20% glycerol เก็บไว้ที่อุณหภูมิและตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ผลจากการแยกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จากดินในสวนผลไม้ซึ่งมีการเพาะปลูกมังคุด ในจังหวัดจันทบุรี พบว่าสามารถแยกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes ได้ 354 ไอโซเลท แต่ทางผู้วิจัยได้นำเชื้อมาทำการทดลองการต้านเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. เพียงแค่ 200 ไอโซเลทเท่านั้น รายละเอียดแสดงไว้ในตารางที่ 4-1

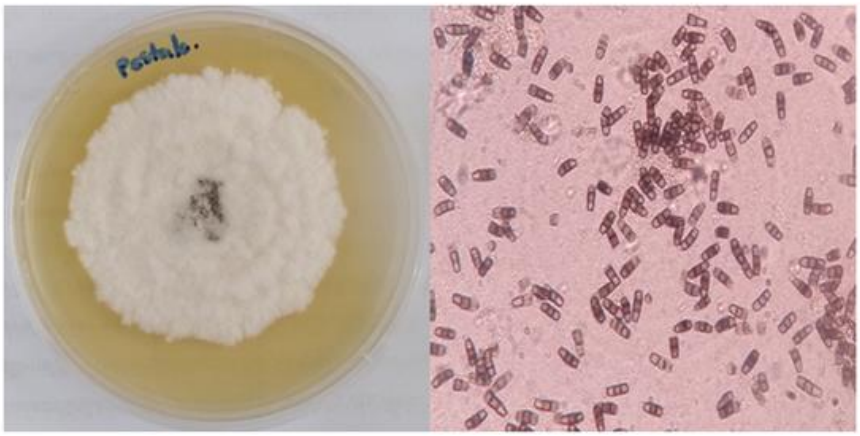
ตารางที่ 4-1 แสดงจำนวนของเชื้อกลุ่ม Actinomycetes ที่แยกได้จากสวนผลไม้ในจังหวัดจันทบุรีและตราด

จังหวัด	บริเวณที่ปลูกผลไม้	จำนวน Actinomycetes ที่แยกได้ (n = 354)	จำนวนที่นำมาทดสอบการต้านเชื้อรา (n = 200)
จันทบุรี	มังคุด	96	50
	เงาะ	48	50
ตราด	มังคุด	150	50
	เงาะ	60	50

4.3 การแยกเชื้อราก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. จากมังคุดและเงาะ

<u>วิธีทำ</u> ทำการแยกเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. โดยใช้วิธี tissue transplanting โดยตัดชิ้นส่วนของตัวอย่าง ขนาด 5x5 มิลลิเมตร นำไปฆ่าเชื้อภายนอกด้วย 25% Clorox ในจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 5 นาที แล้วรินน้ำยาออก ล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นซับด้วยกระดาษชำระที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและนำไปวางในอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิด PDA (Potato Dextrose Agar) ที่ผสมยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย penicillin-streptomycin เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม จากนั้นทำการบ่มเชื้อราให้เจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน ตรวจสอบด้วยการย้อมสีและดูลักษณะโครงสร้างของเส้นใยและโคนิเดีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

รูปที่ 4-4 การทำ tissue transplanting ของมังคุด เพื่อแยกเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.



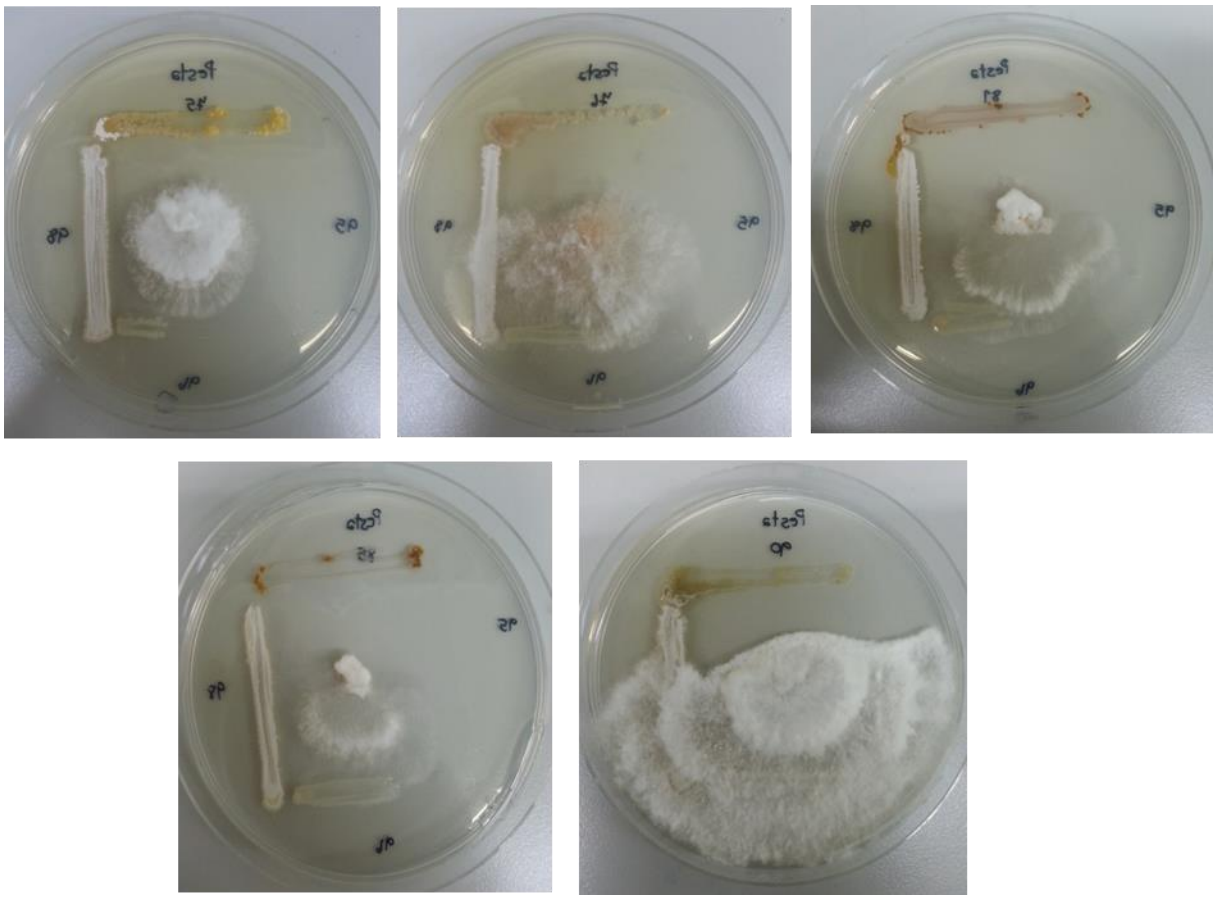
รูปที่ 4-5 ลักษณะโคโลนีและแมคโครโคนิเดียของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

4.4 การทดสอบเชื้อ Actinomycetes ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

การคัดเลือกเชื้อ Actinomycetes สายพันธุ์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ด้วยเทคนิค dual culture ทำโดยเขี่ยเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในแนวตั้งฉากบนอาหารชนิด PDA (Potato Dextrose Agar) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อแอคติมัยซีทส์เจริญและหลั่งสารต้านเชื้อราสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่แยกได้จากรอยโรคของต้นมังคุดวางลงตรงกลางจานเพาะเลี้ยงให้ห่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่ระยะ 3 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และทำการอ่านผล ผลการทดลองในภาพที่ 4-6 คือผลลบต่อการทดสอบ และภาพที่ 4-7 คือผลบวกต่อการทดสอบ โดยเชื้อ Act-75, 76, 81, 85, 90, 106, 116, 118, 119, 120, 129, 131, 133, 134, 135, 139,

143 และ 150 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ได้ โดยลักษณะของโคโลนีของเชื้อ Actinomycetes ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4-2

รูปที่ 4-6 ผลทดสอบที่เชื้อกลุ่ม Actinomycetes ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Pestalotiopsis* sp.



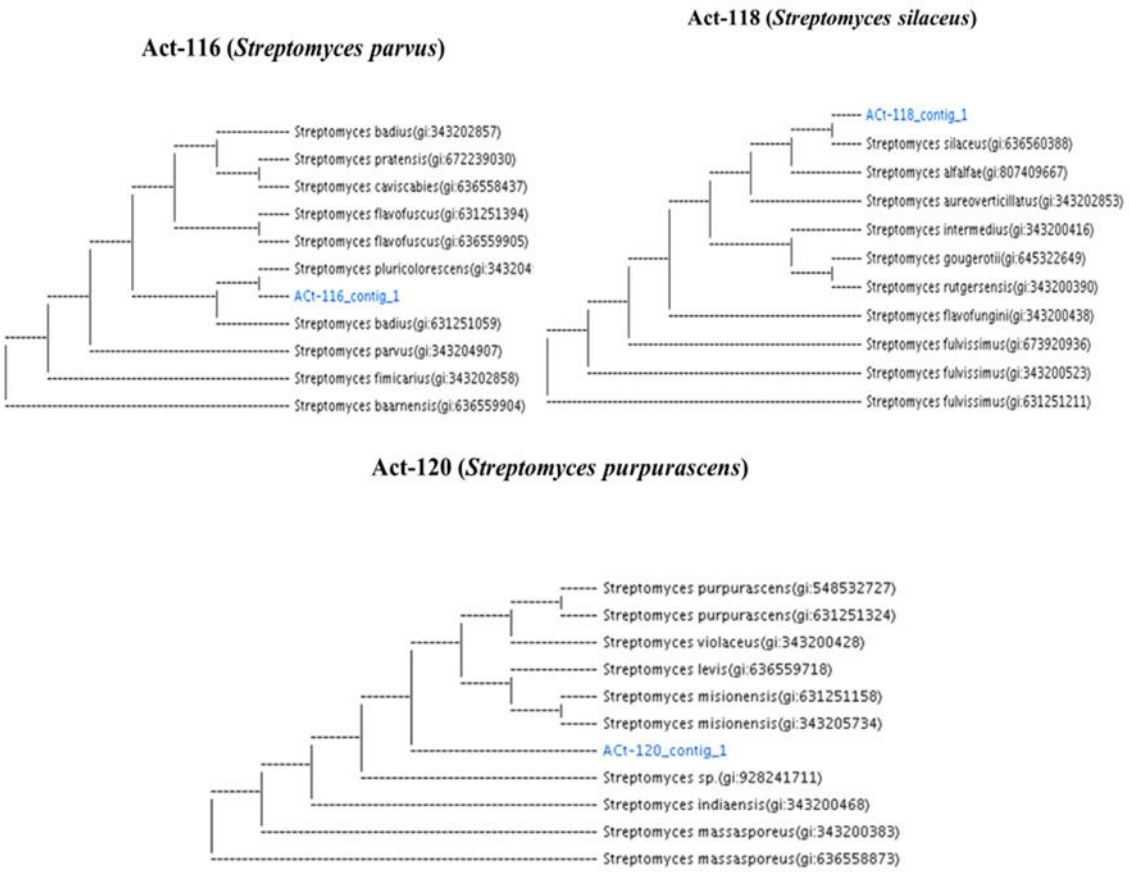
รูปที่ 4-7 ผลทดสอบที่เชื้อกลุ่ม Actinomycetes สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Pestalotiopsis* sp. เชื้อ Act-75, 76, 81, 85 และ 90

ตารางที่ 4-2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ Actinomycetes ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
Act-75	สีเหลือง ผิวโคโลนีด้าน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-76	สีครีม - สีเหลืองอ่อน ผิวโคโลนีด้าน
Act-81	สีส้ม - แดง ผิวโคโลนีด้าน
Act-85	สีน้ำตาลเข้ม ผิวโคโลนีด้าน
Act-90	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-106	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-116	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-118	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-119	สีครีม เมื่อเลี้ยงนานขึ้น พบผงสีขาวรอบๆโคโลนี
Act-120	สีม่วง ผิวโคโลนีด้าน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-129	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-131	สีครีม-ขาว ขอบโคโลนีด้าน ตรงกลางมันวาว
Act-133	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน เมื่อเลี้ยงนานขึ้นตรงกลางโคโลนีจะเป็นขยุ้ม
Act-134	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-135	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-139	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน ขอบโคโลนีสีขาว
Act-143	สีครีม-ขาว ผิวโคโลนีด้าน เมื่อเลี้ยงนานขึ้นตรงกลางโคโลนีจะเป็นขยุ้ม
Act-150	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน มีการสร้างเส้นใยภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อทำการสุ่มเลือกเชื้อ 3 ไอโซเลท จากทั้งหมด 18 ไอโซเลท และนำมาทำการหาลำดับเบสของ DNA ของ 16s rRNA เพื่อทำการระบุชนิดของเชื้อ Actinomycetes พบว่าเชื้อรหัส Act-116, Act-118 และ Act-120 คือเชื้อ *Streptomyces parvus*, *Streptomyces silaceus* และ *Streptomyces purpurascens* ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4-7 ถึง 4-9

รูปที่ 4-8 ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces parvus*, *S. silaceus* และ *S. purpurascens*



รูปที่ 4-9 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ของ 16s rRNA ของเชื้อ Actinomycetes รหัส Act-116, Act-118 และ Act-120

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

การเกษตรในทุกภาคส่วนของประเทศไทย ไม่เว้นแม้แต่จังหวัดจันทบุรี ได้มีการส่งออกสินค้าทางการเกษตรเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ทุเรียน มังคุด เงาะ สละ ฯลฯ ในการทำการเกษตรต่างๆ เหล่านี้ได้มีการใช้ตัวช่วยเพื่อเพิ่มผลผลิตให้มีมากขึ้นและเพื่อป้องกันความเสียหายของพืชผล โดยเกษตรกรส่วนใหญ่มักจะเลือกใช้สารเคมี อาทิ สารกำจัดวัชพืช สารกำจัดแมลง และสารกำจัดเชื้อรา (กรมวิชาการเกษตร, 2557) ซึ่งสารเคมีต่างๆ เหล่านี้ส่งผลต่อระบบนิเวศน์ การเปลี่ยนแปลงของสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารกำจัดเชื้อราเพื่อป้องกันพืชเศรษฐกิจจากโรคเชื้อราเป็นจำนวนมาก และเป็นเวลานานหลายปี ยังผลให้เชื้อราหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมหรือดินในพื้นที่การเกษตรต่างๆ อาจเกิดการปรับตัวดื้อต่อยาที่ใช้ในทางเกษตรกรรม ทั้งที่เป็นเชื้อราที่ก่อโรคในพืชเช่น *Erysiphe spp., Sphaerotheca sp., Phyllactinia spp., Phyllachora sp.* และ *Glomerella spp.* (Klaassen, C. H., et al., 2010) และเชื้อราฉวยโอกาสที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมและสามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ เช่น *A. fumigatus*

จากเหตุผลข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงได้พยายามทำการวิจัยเพื่อใช้การควบคุมทางชีวภาพ (biological control) มาใช้แทนการใช้สารเคมีหรือเพื่อลดการใช้สารเคมี การควบคุมทางชีวภาพนี้ความหมายคือการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติและมีความสามารถในการผลิตสาร secondary metabolite เช่น เชื้อแอคติโนมัยซีทส์ มาใช้ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช เชื้อแอคติโนมัยซีทส์เป็นเชื้อที่มีความสำคัญอย่างมากทางการแพทย์ เภสัชกรรม การเกษตรและภาคอุตสาหกรรม เพราะสามารถสร้างสารซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ ในการวิจัยนี้จะใช้วิธีการควบคุมทางชีวภาพ โดยคัดเลือกหาเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกได้จากดินในสวนมังคุดและมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้และโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยว

ผลการศึกษาวิธีการควบคุมทางชีวภาพ โดยคัดเลือกเชื้อ Actinomycetes จากดินในสวนมังคุดและเงาะในจังหวัดจันทบุรีและตราด ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ด้วยวิธี Dual Culture Technique พบว่าเชื้อ Actinomycetes จำนวน 18 ไอโซเลท ได้แก่ Act-75, 76, 81, 85, 90, 106, 116, 118, 119, 120, 129, 131, 133, 134, 135, 139, 143 และ Act-150 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ และเมื่อทำการสุ่มเลือกเชื้อ 3 ไอโซเลท จากทั้งหมด 18 ไอโซเลท เพื่อนำมาทำการหาลำดับเบสของ DNA ของ 16s rRNA สำหรับการระบุชนิดของเชื้อ Actinomycetes พบว่าเชื้อรหัส Act-116, Act-118 และ Act-120 คือเชื้อ Streptomyces parvus, Streptomyces silaceus และ Streptomyces purpurascens ตามลำดับ เชื้อทั้งสามชนิดที่ได้ไม่ปรากฏหลักฐานทางวิทยาศาตร์ว่าเป็นเชื้อก่อโรคในคน สัตว์และในพืช ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้อย่างสูงในการนำเชื้อทั้งสามไอโซเลทนี้มาทำการพัฒนาเพื่อใช้ยับยั้งโรคติดเชื้อราจาก *Pestalotiopsis* sp.

การศึกษาเกี่ยวกับวิธีการควบคุมทางชีวภาพโดยเชื้อ Actinomycetes นั้นมีการศึกษาคุณสมบัติกันอย่างหลากหลาย เช่น anti-bacterial activity โดยพบว่าเชื้อ Actinomycetes ที่แยกได้จากดินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Gram positive bacteria โดยเฉพาะ *Staphylococcus aureus* (Kumar et al, 2010) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ganesan et al. และ Valan Arasu et al. ที่กล่าวว่าเชื้อ Actinomycetes ที่แยกได้จากดิน สามารถยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคในมนุษย์ได้ แต่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Gram negative bacteria และเชื้อในกลุ่มยีสต์ได้เพียงเล็กน้อยซึ่งอาจจะมีผลมากจากลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกต่างกัน ในงานวิจัยของ Lemriss et al. กล่าวว่า เชื้อ Actinomycetes ที่แยกได้จากดิน สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ถึง 40 % โดยในงานวิจัยดังกล่าวได้บ่งชี้ว่านอกจากคุณสมบัติ anti-bacterial activity ยังพบว่า เชื้อ Actinomycetes ยังมีคุณสมบัติ antifungal activity ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรค die-back disease ในพืช (Keast and Tonkin, 1983) (Kamara and Gangwar, 2015) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shimizu et al. และ Meguro et al. ซึ่งได้กล่าวว่าเชื้อ Actinomycetes สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora cinnamomi*, *Colletotrichum orbiculare* และ *Pestalotiopsis sydowiana* ได้ และสาร secondary metabolite จากเชื้อ Actinomycetes ที่ถูกสกัดด้วย acetone มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา รวมถึงสามารถยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium oryzae*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* (Kamara and Gangwar, 2015) โดยเชื้อ Actinomycetes อาจจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการดูดซึมอาหาร และสาร secondary metabolites ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในพืช รายงานการวิจัยก่อนหน้า พบว่าเชื้อ Actinomycetes มากกว่าร้อยละ 49 สามารถผลิตสาร metabolites ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา ส่วนจะยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคชนิดใดนั้น ขึ้นกับสกุลและชนิดของเชื้อ (Lemriss et al, 2003)

ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ Actinomycetes มีประโยชน์หลากหลาย มีแนวโน้มว่าสามารถนำมาใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพต่อเชื้อราพืชได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้และผลเน่าในมังคุดและเงาะได้

ผลสำเร็จจากงานวิจัยนี้ จะทำให้เกิดการลดการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา ส่งผลให้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนการผลิต เพิ่มผลผลิตของต้นมังคุดเนื่องจากต้นสามารถเจริญเติบโตได้ดี ลดการตกค้างของสารเคมีในผลมังคุดทำให้ไม่ประสบปัญหาการกีดกันจากการส่งออก จากเหตุผลดังกล่าวจะนำไปสู่การนำรายได้เข้าประเทศได้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. ศูนย์ข้อมูลผลไม้ สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, ๒๕๕๗. แหล่งสืบค้น : http://www.oae.go.th/fruits/index.php/mangosteen-data. ๑๐ มิถุนายน ๒๕๕๗
2. กรมส่งเสริมการเกษตร, ๒๕๔๑. โรคขอบใบแห้งในมังคุด (ออนไลน์). แหล่งสืบค้น : http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=41/. ๑ มิถุนายน ๒๕๕๗
3. กรมส่งเสริมการเกษตร, ๒๕๔๑. โรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว (ออนไลน์). แหล่งสืบค้น : http://www.doa.go.th/pprdo/download/text2.pdf. ๙ มิถุนายน ๒๕๕๗
4. ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, ๒๕๕๖. โรคที่เกิดจากเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. (ออนไลน์). แหล่งสืบค้น : www.phtnet.org/newsletter/?mod=download&id=34. ๙ มิถุนายน ๒๕๕๗
5. กฤติกาและอิงกฤช. 2556. การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทส์ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของข้าว. สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 65 : 1-71
6. นิศากร สุวรรณและคณะ 2556. การประเมินประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราและเชื้อแอกติโนมัยซีทในการควบคุมเชื้อรา *Nalanthamala psidii* สาเหตุโรคเหี่ยวของฝรั่ง. สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 392-393 ; 391-403
7. เนตรนภิส เขียวขำ และ สมศิริ แสงโชติ. 2551. รายงานวิจัยการเกิดโรคและสาเหตุการเข้าทำลายในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวที่ก่อให้เกิดโรคผลเน่า
8. สุทธินันต์ คำนา และ สายสมร ลำยอง. 2553. ความหลากหลายทางชีวภาพและเมแทโบไลต์ทุติยภูมิของแอกติโนไมซีสต์จากดินรอบรากพืชสมุนไพรบางชนิดBiodiversity and secondary metabolites of actinomycetes from rhizosphere soils of some medicinal plants. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
9. อังศุมา ชยสมบัติ. 2530. โรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะม่วงที่เกิดจาเชื้อรา Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Sacc. และการควบคุม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทร ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
10. Alvarez, A. M., and Nishijima, W. T. 1987. Postharvest diseases of papaya. Plant Disease. 71: 681-686.
11. Arai, T. 1975. Culture madia for Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan.
12. Castillo A. E., J. Rojas, R. Monteros Solito, I. Nardelli y G. Guasch. 2003. Métodos paradeterminar Carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metilcarbamato). Agrotecnia (Argentina) 10: 15-20.

13. Cross, T. and M. Gooodfellow, 1973. Taxonomy and classification of actinomycetes. Soc. Applied Bacteriol. Symp. Ser., 2: 11-112.
14. Gesheva V. 2002. *Rhizosphere microflora* of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. Europe. J. Soil Biol. 38:85-88.
15. Goodfellow, M., S. T. Williams and M. Mordarski. 1988. Actinomycetes in biotechnology. Academic Press Limited, London.
16. Holliday. P. 1980. Fungus Disease of Tropical Crops. Cambridge University Press, Cambridge.
17. Isaac, S. and D. Jennings. 1995. Microbial Culture. Bios Sci. Publ. Limited, London.
18. Kamara, V. and Gangwar, M. Antifungal Activity of Actinomycetes from Rhizospheric Soil of Medicinal plants against phytopathogenic fungi. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci (2015) 4(3):182-187.
19. Klaassen C. H., de Valk H. A., Curfs-Breuker I. M., Meis J. F., Novel mixed-format real-time PCR assay to detect mutations conferring resistance to triazoles in Aspergillus fumigatus and prevalence of multi-triazole resistance among clinical isolates in the Netherlands. J Antimicrob Chemother, 2010. 65(5): p. 901-5.
20. Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L. D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., and Hyde, K. D. Pestalotiopsis—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. Fungal Diversity (2011) 50:167–187.
21. Rao, V. G. 1994. A new fruit spot of *Annona squamosa* from India. Plant Dis. Reptr.48: 399–401.
22. Samac *et al*., 2003. Effects of antibiotic-producing Streptomyces on nodulation and leaf spot in alfalfa. Applied soil Ecology 22 (2003). 55 ; 55-66
23. Schwyn B, Neilands JB. 1996. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Journal of Analytical Biochemistry 49 : 47-56
24. Shih, H.D., Lui, Y.C., Hsu, F.L., Mulabagal, V., Dodda, R. and Huang, J.W. 2003. Fungichromin:a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhiazoctonia solani*.Journal of Agricultural Food Chemistry 51: 95-99
25. Shirling, E.D. and Gottlieb, D. 1996. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology. 16 ; 313-340
26. Stackbrandt, E., F.A.Rainey, and N.L.Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov.Int.J.Syst.Bacteriol. 47:479-491.

27. Snelders, E., S. M. Camps, A. Karawajczyk, G. Schaftenaar, G. H. Kema, H. A. van der Lee, C. H. Klaassen, W. J. Melchers and P. E. Verweij (2012). "Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in Aspergillus fumigatus." PLoS One 7(3): e31801.
28. Snelders, E., R. A. Huis In 't Veld, A. J. Rijs, G. H. Kema, W. J. Melchers and P. E. Verweij (2009). "Possible environmental origin of resistance of Aspergillus fumigatus to medical triazoles." Appl Environ Microbiol 75(12): 4053-4057.
29. Snelders, E., A. Karawajczyk, G. Schaftenaar, P. E. Verweij and W. J. Melchers (2010). "Azole resistance profile of amino acid changes in Aspergillus fumigatus CYP51A based on protein homology modeling." Antimicrob Agents Chemother 54(6): 2425-2430.
30. Snelders, E., H. A. van der Lee, J. Kuijpers, A. J. Rijs, J. Varga, R. A. Samson, E. Mellado, A. R. Donders, W. J. Melchers and P. E. Verweij (2008). "Emergence of azole resistance in Aspergillus fumigatus and spread of a single resistance mechanism." PLoS Med 5(11): e219.

รายงานสรุปการเงิน ประจำปีงบประมาณ 2558

รหัสโครงการ 2558A10862013

โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ชื่อมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การคัดเลือกเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทส์จากดินในจังหวัดจันทบุรีและตราด เพื่อการยับยั้งโรคเชื้อราที่เกิดจาก *Pestalotiopsis* sp. ในมังคุดและเงาะ

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ. ดร. มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ.2557 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2561

ระยะเวลาดำเนินการ 4 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2557 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2561

<u>รายจ่าย</u>

หมวด	งบประมาณ รวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย งวดปัจจุบัน	คงเหลือ
1. ค่าตอบแทน	0	20,000	0
2. ค่าจ้าง	40,000	0	0
3. ค่าวัสดุ	110,000	0	0
4. ค่าใช้สอย	20,000	0	0
5. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	10,000	0	0
6. รวม	200,000		

<u>จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 .....100,000..... บาท เมื่อ.....30 มี.ค. 2558.....

งวดที่ 2 .....80,000..... บาท เมื่อ..... 30 พ.ค. 2558.....

งวดที่ 3 .....20,000..... บาท เมื่อ..... 30 ก.ย. 2561.....

รวม .....200,000..... **บาท**

....

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน **ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ**

วันที่..... **วันที่**.....

ภาคผนวก

การคัดเลือกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จากดินในจังหวัดจันทบุรีและตราดเพื่อยับยั้งโรคเชื้อราที่เกิดจาก *Pestalotiopsis* sp. ในมังคุดและเงาะ

มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร[1], มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม[2], พรทิพย์ พลาดิศัยเลิศ[3] และ วิทวัส แจ้งเอี่ยม[4]

[1]คณะสหเวชศาสตร์, [2]คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์, [3]หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์, [4]คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

มังคุดและเงาะเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย หนึ่งในปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้รายได้จากผลไม้ทั้งสองชนิดนี้ลดลง คือการติดเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. เพราะเชื้อนี้ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตมังคุดและเงาะอย่างมาก โดย *Pestalotiopsis* sp. เป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบไหม้ในมังคุด นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวในผลไม้หลายชนิด ในปัจจุบันเกษตรกรไทยนิยมใช้สารเคมีในการป้องกัน ดูแลและรักษาการติดเชื้อราดังกล่าว เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าการใช้สารเคมีในการกำจัดเชื้อก่อโรคในผลไม้ก่อให้เกิดผลเสียหลายๆ อย่างตามมา เช่น เป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม และอาจถูกประเทศคู่ค้ากีดกัน แนวทางการแก้ปัญหาหนึ่งที่มีความน่าสนใจคือ การใช้การควบคุมทางชีวภาพโดยนำจุลินทรีย์ที่พบในธรรมชาติมายับยั้งเชื้อราก่อโรค

ในการวิจัยนี้จะใช้วิธีการควบคุมทางชีวภาพ โดยคัดเลือกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จากดินในสวนมังคุดและเงาะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ผลการทดลองด้วย Dual culture technique พบว่าเชื้อกลุ่ม Actinomycetes จำนวน 5 isolates ได้แก่ Act-BUU 75, 76, 81, 85 และ 90 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ ซึ่งผลจากการวิจัยครั้งนี้อาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในสวนผลไม้ และอาจทำให้ลดการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา ส่งผลให้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนการผลิต ลดการตกค้างของสารเคมี ทำให้ไม่ประสบปัญหาการกีดกันจากการส่งออก อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการทดลองเพิ่มเติม โดยผู้วิจัยมีแผนจะนำเชื้อทั้ง 5 isolates นี้ ไปใช้เพื่อเป็นส่วนประกอบของปุ๋ยชีวภาพและทำการศึกษาทดลองในโรงเรือนจริงต่อไป

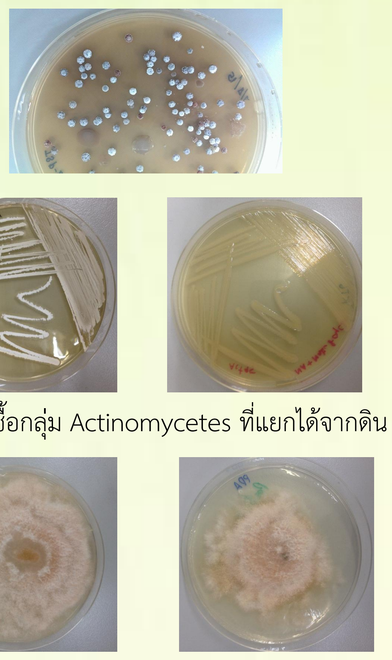
วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ของเชื้อกลุ่ม Actinomycetes ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่ทำให้เกิดโรคในมังคุดและเงาะ

ระเบียบวิธีวิจัย

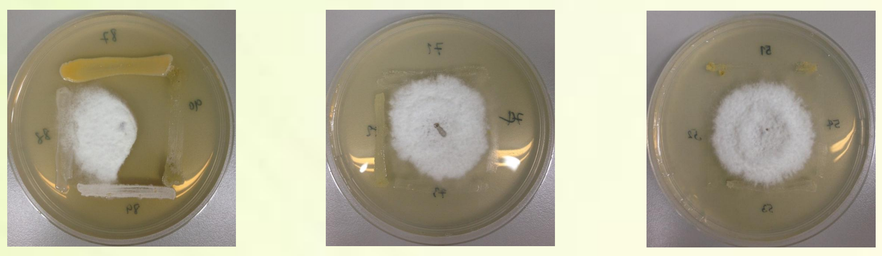
- เก็บตัวอย่างดินจำนวน 50 ตัวอย่าง จากสวนมังคุดในจังหวัดจันทบุรีและตราด มาทำการคัดแยกเชื้อกลุ่ม Actinomycetes อย่างน้อยจำนวน 100 isolates
- เก็บตัวอย่างต้นมังคุดที่เกิดโรคจากเชื้อรา และทำการแยกเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. จำนวน 5 isolates
- คัดเลือกหาเชื้อกลุ่ม Actinomycetes ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ด้วยวิธี Dual Culture Technique โดยนำเชื้อ Actinomycetes มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเขี่ยเส้นใยของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีเชื้อกลุ่ม Actinomycetes อยู่ นำไปบ่มที่ 25°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงทำการสังเกตการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อกลุ่ม Actinomycetes และ เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp.

ตัวอย่างพื้นที่ในสวนมังคุดที่ทำการเก็บดินตัวอย่าง



ตัวอย่างเชื้อกลุ่ม Actinomycetes ที่แยกได้จากดิน

ตัวอย่างเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่แยกได้จากรอยโรค



ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อกลุ่ม Actinomycetes บน PDA ด้วยวิธี Dual culture technique

ผลการทดลอง

เชื้อ Actinomycetes จำนวน 5 isolates จากทั้งหมด 100 isolates ได้แก่ Act-BUU 75, 76, 81, 85 และ 90 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้

Act-BUU 75 Act-BUU 76 Act-BUU 81

Act-BUU 85 Act-BUU 90

ภาพแสดงลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อกลุ่ม Actinomycetes บน PDA ด้วยวิธี Dual culture technique

สรุปและอภิปราย

เชื้อกลุ่ม Actinomycetes ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. พบได้ 5 isolates จากการแยกเชื้อจากดินในสวนมังคุดและเงาะ ได้แก่ Act-BUU 75, 76, 81, 85 และ 90 โดยเชื้อแบคทีเรียจะสร้างสาร secondary metabolite ขึ้นมายับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ดังนั้นเชื้อ Actinomycetes ทั้ง 5 isolates จึงมีศักยภาพที่จะนำไปศึกษาและพัฒนาเพื่อนำมาใช้ควบคุมโรคในสวนผลไม้ เช่น มังคุดและเงาะ ตลอดจนการนำไปสูการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมีต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา สกอ. (HERP) ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘ และมหาวิทยาลัยบูรพา

การคัดเลือกเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีสท์จากดินเพื่อการยับยั้งโรคเชื้อราที่เกิดจาก *Pestalotiopsis* sp.

Screening of Actinomycetes from Soil for Inhibition of Fungal Disease Caused by *Pestalotiopsis* sp.

อภิญญา บุญเขียน[1], พรทิพย์ พลาดิศัยเลิศ[2], มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม[3], นางสาววัชรมาศ ม่วงแก้ว[4] และ มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร[1,2*]

Apinya Bunkhean[1], Pornthip Paladisailerd[2], Maneerat Koohapitagtam[3], Watcharamat Muangkaew[4] and Marut Tangwattanachuleeporn[1,2*]

1, คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2, หลักสูตรวิศวกรรมชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา,

3, คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา,

4, ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ: *Pestalotiopsis* sp. เป็นเชื้อก่อโรคที่ทำลายพืชหลายชนิดให้เกิดความเสียหาย แพร่กระจายอยู่ทุกมุมโลก และเป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิดตลอดจนเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะ นำไปสู่การใช้สารเคมีในการกำจัด ท้ายที่สุดจึงได้รับผลเสียระยะยาวทั้งผู้ใช้ สิ่งแวดล้อม และสภาพดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ลดลง งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช และทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชนิดนี้ ผลการแยกแอคติโนมัยซีสต์จากดินด้วยวิธีสเปรดเพลทเทคนิค จากแอคติโนมัยซีสต์จำนวน 160 ไอโซเลท พบว่า 18 ไอโซเลท แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ดังนี้ Act-75, 76, 81, 85, 90,106,116,118, 119,120,129,131, 133,134,135,139,143 และ Act-150 เมื่อทดสอบด้วยวิธี Dual culture ภายหลังทำการสุ่มเชื้อแอคติโนจำนวน 3 ไอโซเลท คือ Act-116, Act-118 และ Act-120 เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่าคือเชื้อ *Streptomyces parvus*, *Streptomyces silaceus* และ *Streptomyces purpurascens* ตามลำดับ ทุกไอโซเลทที่ทำการหาลำดับ

เบสเป็นเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยซีสต์ และไม่พบว่าเป็นเชื้อก่อโรคในมนุยษ์และพืช ซึ่งจากผลการศึกษาเหล่านี้อาจจะเป็นทางเลือกใหม่ ในการลดการทำลายพืชโดยเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และทำให้การเพาะปลูกเข้าสู่กระบวนการเกษตรสีเขียวปลอดสารเคมี ซึ่งนอกจากจะใช้งานง่าย ได้ผลผลิตดี ยังมีความปลอดภัยในห่วงโซ่อาหารอีกด้วย

คำสำคัญ : *Pestalotiopsis* sp., แอคติโนมัยซีสต์, ต้านการเจริญของเชื้อรา

Abstract: *Pestalotiopsis* sp. is phytopathogenic causing various diseases in plants damage and disseminate everywhere in the world and it is the cause of symptomless infection of plant tissues. leads to the use of chemicals to eliminate pathogens . results to decreased exuberance of soil. This study was aimed to isolate actinomycetes with antifungal properties from land crops and the results show that among these isolate are Act-75, 76, 81, 85, 90,106,116,118, 119,120,129,131, 133,134,135,139,143 and Act-150 exhibited significant antifungal activity to *Pestalotiopsis* sp. with dual culture technique. 16s rRNA gene sequence analysis strongly suggested that 3 of these isolate belonged to the genus *Streptomyces* such as *Streptomyces parvus*, *Streptomyces silaceus* and *Streptomyces purpurascens* respectively. The isolates are not belonged in human phathogents and these findings demonstrate can be used to treat fungal infections and increasing green agricultural process and chemical free, easy to us, increase crops product and safe.

บทนำ

เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. เป็นที่ทราบกันอย่างดีในวงการทางจุลชีววิทยาว่ามีความหลากหลายอย่างมากและสร้างผลกระทบแก่พืชเป็นวงกว้างนับตั้งแต่ส่วนที่อยู่ใกล้กับพื้นดินอย่างส่วนของลำต้น ส่วนเหนือดิน เช่น ใบ ดอก และ ผล รวมถึงบางชนิดที่พบว่ามีการก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ ส่วนแหล่งที่อยู่อาศัยของเชื้อราชนิดนี้พบได้ทั้งใน ดิน น้ำเสีย กระดาษ สิ่งทอ ขนสัตว์ รวมไปถึงสภาพแวดล้อมสุดขั้วหนาวเย็น หรือมีความเค็ม การก่อโรคที่เป็นปัญหาสำคัญที่มีสาเหตุมาจากชนิดนี้อาทิ โรคขี้กลากในพืช (Canker lesions) อาการยอดตายของพืช (Shoot dieback) โรคใบจุด (Leaf spots) อาการใบไหม้ (Needle blight) โรคปลายใบแห้งหรือเน่าดำ (Tip blight) ใบไหม้สีเทา (Grey blight) โรคแผลเรื้อน (Scabby canker) อาการใบซีดรุนแรง (Severe chlorosis) โรคผลเน่า (Fruit rots) และยังมีโรคที่เกิดขึ้นหลังการเก็บเกี่ยวอีกจำนวนมาก อย่างเช่น โรคเน่าของผลองุ่นหลังการเก็บเกี่ยว (Ruvishika, Jayawardena, Zhang, Liu, Maharachchikumbura, Zhou, Huang, Nilthong, Wang, Li, Yan, & Hyde, 2015). นอกจากนี้เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. โดยส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ อยู่ในวงศ์ Amphisphaeriaceae และชนิดของเชื้อก่อโรคพืชชนิดนี้จะเป็นไปตามพืชอาศัย (Maharachchikumbura, Hyde, Groenewald, & Crous, 2014; Reddy, Murali, Suryanarayanan, Rajulu, & Thirunavukkarasu, 2016) *Pestalotiopsis* sp.จะไม่มีพืชอาศัยที่จำเพาะ แต่นอกจากการเป็นเชื้อก่อโรคในพืชแล้ว บางกลุ่มยังเป็นเชื้อรา endophyte และกลายเป็นเชื้อราฉวยโอกาสเมื่อพืชอ่อนแอ โดยทั่วไปจะพบว่าโคนิเดียจะมีรูปแบบ 6 เซลล์ หรือ 4 เซลล์ สีน้ำตาลเข้ม และส่วนปลายของโคนิเดียทั้งสองด้านจะไม่มีสี และการมีจำนวนของ Apical appendages ที่แตกต่างกัน หรืออาจพบว่า Apical appendages มีลักษณะเป็นกิ่งก้าน ในการแพร่กระจายมีปัจจัยหลายประการที่ส่งเสริม อาทิ การรอดชีวิตของสปอร์แม้ว่าจะอยู่ในสภาวะเลวร้ายนำไปสู่การติดเชื้อปฐมภูมิ เกิดการแพร่กระจายเข้าสู่ขั้นการติดเชื้อทุติยภูมิ ทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้นจากการแพร่กระจายของเชื้อ ที่อาจเกิดจากเศษซากพืช การมีเชื้อปนเปื้อนอยู่ในเมล็ดพันธุ์สำหรับการเพาะปลูก การใช้สารอาหารเร่งการเจริญของพืช ซึ่งในบางครั้งสามารถเร่งการงอกของสปอร์ หรือมีการปนเปื้อนในดินอยู่ก่อน การใช้เครื่องมือร่วมกันระหว่างพืชที่มีการติดเชื้อและไม่มีการติดเชื้อ การพัดพาสปอร์ด้วยน้ำหรือลม (Maharachchikumbura, Guo, Chukeatirote, Bahkali, & Kevin, (2011) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเป็นเรื่องที่มีความท้าทายต่อเกษตรกรอย่างมากในการป้องกันและกำจัด และอาจทำให้มีต้นทุนค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น**ภาพที่ 1**

แอคติโนมัยซีสต์ได้รับความสนใจจากนักวิจัยจำนวนมากในการพัฒนาให้เป็น Biocontrol เพื่อนำมาควบคุมการเกิดโรคของงานทางด้านการเกษตร เนื่องมาจากความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีผลกระทบค่อนข้างต่ำหรืออาจไม่เกิดผลเสียใดๆ นอกจากความสามารถในการควบคุมโรคแล้วยังช่วยส่งเสริมการเจริญให้แก่พืชอีกด้วย (Shi, Nwet, Ge, Zhao, Liu, Cui, & Zhang, 2018) แบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมในงานการวิจัยหลายแขนง เนื่องมาจากความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อความสามารถในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (Kumar, Yuvaraj, Paulraj, Ignacimuthu, & Al-Dhabi, 2018) ซึ่งโดยส่วนใหญ่แอคติโนมัยซีสต์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และยีสต์ตลอดจนความสามารถในการเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย มีการสร้างเส้นใยสั้นๆบนผิวหน้าอาหาร มีการสร้างสปอร์เรียงต่อกันเป็นสาย และมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน ทั้งสีของโคโลนี้ ตลอดจนการสร้างพิกเมนต์ที่มีความต่างของสี เช่น แดง เหลือง น้ำตาล เป็นต้น (Nath, Verma, Singh, Singh Chauahan, Suman , & Kumar, 2017) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสต์จากดินบริเวณรากของพืชที่มีประสิทธิสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และอาจนำไปสู่การเป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญในการพัฒนาทางเลือกใหม่ของการเกษตรกรรม**ภาพที่ 2-3**

วิธีการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสต์จากดิน

ทำการคัดเลือกพื้นที่การเกษตรที่เป็นสวนผลไม้จาก 4 จังหวัดในภาคตะวันออกดังนี้คือ จังหวัดระยอง จังหวัดจันทบุรี จังหวัดชลบุรี และจังหวัดตราด โดยเก็บตัวอย่างดินใส่หลอดสเตอไรด์ขนาด 50 มิลลิลิตร จังหวัดละ 80 ตัวอย่าง จากนั้นชั่งดินปริมาณ 1 กรัม ละลายด้วยสารละลาย NaCl 0.85% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางจนถึง 10^{-5} ดูดสารละลายของแต่ละค่าการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ผสมยาปฏิชีวนะ cycloheximide และ nalidixic acid เพื่อยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียบางกลุ่ม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกแอคติโนมัยซีสต์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา อาทิ สี ลักษณะของโคโลนี เพื่อการคัดเลือกในเบื้องต้น จากนั้นเลี้ยงให้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร NA ทำการรักษาเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียส (Komar, Kant, Mishra, & Pachouri, 2010)

วิธีการแยกเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ด้วยวิธี tissues transplanting method

เก็บตัวอย่างใบและส่วนของกิ่งจากต้นมังคุด เงาะ และทุเรียน ที่มีอาการของโรคใบไหม้ จากนั้นใช้มีดหรือกรรไกรที่ปราศจากเชื้อตัดชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคขนาด 3x5 เซนติเมตร ทำการฆ่าเชื้อพื้นผิวของชิ้นส่วนพืชด้วยการนำชิ้นส่วนแช่ทั้งหมดแช่ลงในสารสารละลายคลอร๊อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2 – 4 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง นำชิ้นส่วนพืชที่มีรอยโรคทั้งหมดวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บ่มเชื้อไว้นาน 2-3 วัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเขี่ยปลายเส้นใยเลี้ยงในจานอาหาร PDA ใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะของโคโลนี ทำสไลด์เพื่อศึกษารูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นเชื้อ *Pestalotiopsis* sp.
(พีระวรรณ พัฒนาวิภาส, บูรณี พั่ววงษ์แพทย์, ทัศนาพร ทัศดร และศิวิไล ลาภบรรจง, 2551)

ทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อรา

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ดำเนินการทดสอบด้วยวิธี Dual culture เริ่มจากการขีดเชื้อแอคติโนมัยซีสต์แต่ละชนิดบนผิวหน้าอาหาร PDA ทั้ง 4 ด้านของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำจานอาหารเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้คอกบอยเลอร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์ 6 มิลลิเมตร ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราที่กำลังเจริญ วางลง ณ จุดกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน จึงทำการเช็คผลการทดสอบโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ (Krucharoenphaisan, Rodbagpong, Saengpaen, & Sinma, 2016)

ผลการทดลอง

ผลการทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ด้วยวิธี Dual culture บนอาหาร PDA ผลการศึกษาพบว่าแอคติโนมัยซีสต์จำนวน 18 ไอโซเลท จากทั้งหมด 160 ไอโซเลท คือ Act-75, 76, 81, 85, 90,106,116,118, 119,120,129,131, 133,134,135,139,143 และ Act-150 แสดงความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อรา ซึ่งสังเกตได้จากเส้นใยของเชื้อราไม่สามารถเจริญสัมผัส หรือเจริญทับรอยเจริญของแอคติโนมัยซีสต์ได้ (Positive) เมื่อ ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยวิธี Dual culture เปรียบเทียบกับชุดควบคุมภายใต้สภาวะการทดสอบเดียวกัน **ภาพที่ 4** และพบว่ามีการแพร่กระจายของสารที่เชื้อแอคติโน

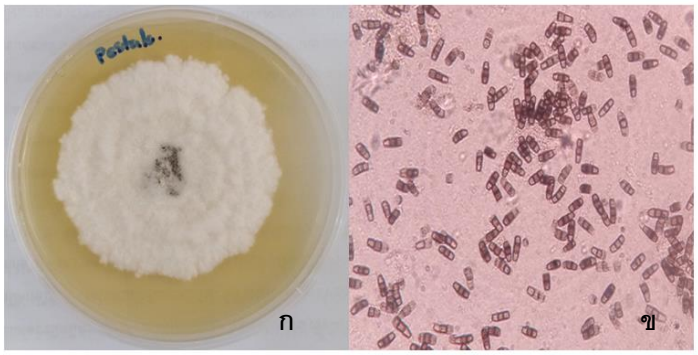
มัยซีสต์สร้างขึ้น เป็นผลให้สีของอาหารเปลี่ยนไปจากเดิม อาทิ Act-116 สีของอาหารเป็นสีเหลืองอ่อน Act-118 สีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และ Act-120 ทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีแดง และผลการบันทึกลักษณะของโคโลนีแอคติโนมัยซีสต์ได้ดัง**ตารางที่ 1** เชื้อจากการสังเกตพบว่าในบริเวณที่สารที่เชื้อแอคติโนมัยซีสต์แพร่ไปถึงจะทำให้การเจริญของเส้นใยราไม่สมบูรณ์หรือไม่สามารถเจริญได้ในบริเวณดังกล่าว จากนั้นได้ทำการคัดเลือกแอคติโนมัยซีสต์จำนวน 3 ไอโซเลท คือ Act-116, Act-118 และ Act-120 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและมีความแตกต่างกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงสีของพิกเมนต์ที่ต่างกัน เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนส์ 16S rRNA พบว่าคือเชื้อ *Streptomyces parvus*, *Streptomyces silaceus* และ *Streptomyces purpurascens* ตามลำดับ

อภิปรายผล

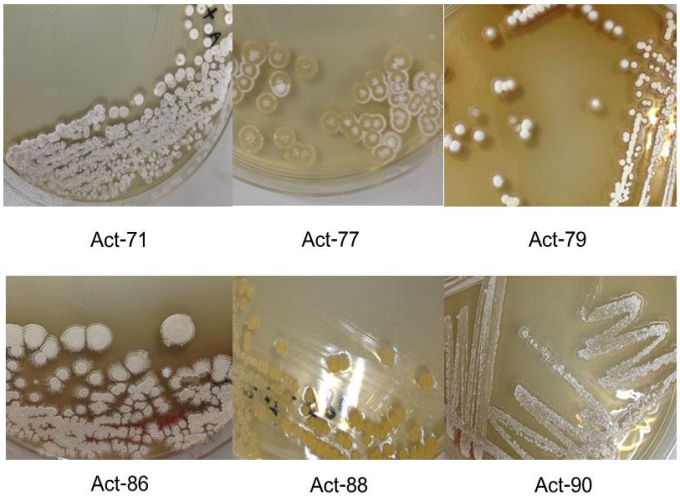
จากปัญหาการใช้งานสารเคมีในการกำจัดศัตรูพืช ทั้งวัชพืช แมลง และจุลชีพทำให้เกิดการตกค้างและการแพร่กระจายของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม และเพื่อลดสาเหตุที่นำไปสู่การใช้สารเคมี ตลอดจนช่วยลดอัตราการใช้สารเคมี และสร้างความยั่งยืนในด้านเกษตรกรรม โดยเฉพาะสารต้านจุลชีพที่นอกจากจะทำให้เกิดการตกค้างในผลผลิตแล้ว ยังมีความเสี่ยงต่องานทางด้านสาธารณสุขอย่างการดื้อยาของเชื้อในสิ่งแวดล้อม ทำให้มีการวิจัยเพื่อนำผลิตภัณฑ์ที่เป็นธรรมชาติมาช่วยควบคุมโรคพืชเพิ่มขึ้นจำนวนมาก (Shi, Nwet, Ge , Zhao , Liu1 , Cui, & Zhang , 2018) ในขณะเดียวกันพบว่ามีจุลินทรีย์ที่มีความน่าสนใจอย่างยิ่งในการนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืชนั่นคือจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีสต์ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้มีการผลิตสารทุติยภูมิที่ออกฤทธิ์ทำลาย หรือยับยั้งการเจริญของเชื้อรา หรือแบคทีเรียก่อโรคพืชหลายชนิด โดยเฉพาะการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และหากสามารถควบคุมการเจริญได้แล้ว ก็จะเป็นการตัดวงจรในการแพร่กระจายหรือการสร้างสปอร์หรอการงอกของสปอร์ของเชื้อราก่อโรคได้ ตลอดจนการสร้างสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช และเพิ่มปริมาณผลผลิตของพืชผล (Aldesuquy HS., Mansour FA., & Abo-Hamed SA. 1998) หรือการนำผลิตภัณฑ์ที่แบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีสต์สร้างอย่างเช่น flavomycin, Actinomycin , Rhodomycins A and B, Chitinase และ Siderophores หรือ Streptomycin (Benedict, 1953) ที่ผลิตขึ้นโดย *Streptomyces purpurasce* และ *Streptomyces cavourensis* (Bundale, Besde, Pillai, Gangwani, Nashikkar, Kadam, & Upadhyay, 2018; Holkar, Begde, Nashikkar, Kadam, & Upadhyay, 2013) ที่สามารถสร้าง Chitinase, Siderophores, lytic enzymes

อย่างเช่น β-1,3 glucanase, chitinase, 2-furancarboxaldehyde, lipase และ protease ที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ (Kamil, Saeed, Tarabily, & AbuQamar, 2018) เป็นต้น ซึ่งความสามารถของแบคทีเรียเหล่านี้สร้างความสนใจ และเกิดงานวิจัยเรื่องนี้ขึ้น เพื่อการพัฒนาระบบการควบคุมโรคพืชที่เป็นมิตรต่อมนุษย์ สิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อม และเพื่อตอบสนองต่อความต้องการในการพัฒนาดังที่กล่าวไว้ข้างต้นเป็นแรงบันผลักดันให้งานวิจัยนี้สำเร็จดังวัตถุประสงค์ นอกจากนี้ผลการวิจัยนี้ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่พบว่าแอคติโนมัยซีสต์บางชนิดมีความสามารถในการเป็นเชื้อควบคุมการเจริญของ *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆที่รายงานว่า *Streptomyces parvus* มีกิจกรรมของเซลล์ที่สามารถผลิตสารต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช และสามารถผลิตสารต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบอีกหลายชนิด นอกจากนี้ยังสามารถต้านการแพร่ขยายของมะเร็งหลายชนิด และมีถิ่นที่อยู่อาศัยที่หลากหลายแม้ในสิ่งแวดล้อมทางทะเล แสดงให้เห็นว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสต์มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมหลายรูปแบบ (Elnaby, Elala, Raouf, Abd-elwahab and Hamed (2016); Naine, Devi, Mohanasrinivasan, and Vaishnavi, 2015) ในขณะที่การทดลองการความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ที่แยกได้จากราก ลำต้น และใบ ของต้นกุหลาบพันปี พบว่ามีแอคติโนมัยซีสต์ที่อยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* เป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* ที่ก่อโรคในต้นกุหลาบพันปี และยังมีผลต่อเชื้อราก่อโรค ยีสต์และแบคทีเรียอื่นๆอีกมากกว่า 12 ชนิด นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นถึงการส่งเสริมการเจริญของต้นกุหลาบพันปีอีกด้วย (Shimizu, Nakagawa, Sato, Furumai, Igarashi, Onaka, Yoshida and Kunoh, 2000)

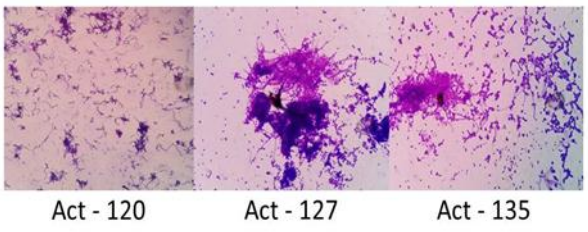
สรุปผลการทดสอบได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ที่แยกจากดินในพืชที่การเกษตรซึ่งทุกชนิดจัดอยู่ในอาณาจักรของแบคทีเรีย วงศ์ Streptomycetaceae อยู่ในสกุล Streptomyces และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด และได้ทำการทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากพืชที่ติดเชื้อ พบว่าแบคทีเรียแอคติโนมัยซีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อรา เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* ได้ และอาจนำไปสู่การต่อยอดในงานวิจัยอื่นๆต่อไปในภายภาคหน้า



ภาพที่ 1 ลักษณะของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. บนอาหาร PDA ที่ 14 วัน(ก) และลักษณะของโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า(ข)



ภาพที่ 2 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์ไอโซเลท Act-71, Act-77, Act-79, Act-86, Act-88 และ Act-90 บนอาหาร NA



ภาพที่ 3 ลักษณะของแอคติโนมัยซีสต์ Act-120, Act-127 และ Act-135 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 1 ลักษณะของโคโลนีแอคติมัยซีสต์ที่มีการสร้างสารต้านการเจริญของเชื้อรา

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
Act-75	สีเหลือง ผิวโคโลนีด้าน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-76	สีครีม - สีเหลืองอ่อน ผิวโคโลนีด้าน
Act-81	สีส้ม - แดง ผิวโคโลนีด้าน
Act-85	สีน้ำตาลเข้ม ผิวโคโลนีด้าน
Act-90	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-106	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-116	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-118	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-119	สีครีม เมื่อเลี้ยงนานขึ้น พบผงสีขาวรอบๆโคโลนี
Act-120	สีม่วง ผิวโคโลนีด้าน สร้างเส้นใยสีขาว
Act-129	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-131	สีครีม-ขาว ขอบโคโลนีด้าน ตรงกลางมันวาว
Act-133	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน เมื่อเลี้ยงนานขึ้นตรงกลางโคโลนีจะเป็นขยุ้ม
Act-134	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-135	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน
Act-139	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน ขอบโคโลนีสีขาว
Act-143	สีครีม-ขาว ผิวโคโลนีด้าน เมื่อเลี้ยงนานขึ้นตรงกลางโคโลนีจะเป็นขยุ้ม
Act-150	สีครีม ผิวโคโลนีด้าน มีการสร้างเส้นใยภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาพที่ 4 การทดสอบกิจกรรมการต้านการเจริญของแอคติโนมัยซีสต์ที่มีต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ด้วยวิธี Dual culture

เอกสารอ้างอิง

Ruvishika, S., Jayawardena, Zhang, W., Liu, M., Maharachchikumbura, S. S. N., Zhou, Y., Huang, J., Nilthong, S., Wang, Z. Y., Li, X. H., Yan, J. Y., & Hyde, K. D. (2015). Identification and characterization of Pestalotiopsis like fungi related to grapevine diseases in China. *The British Mycological Society*, 119, 348-361.

Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P.W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology,* 79, 121–186.

Reddy, M. S., Murali, T.S., Suryanarayanan, T.S., Rajulu, M. B. G., & Thirunavukkarasu, N. (2016). Pestalotiopsis species occur as generalist endophytes in trees of Western Ghats Forests of outhern India. *Fungal Ecology*, 24, 70-75.

Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, LD., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Kevin, D. H. (2011). Pestalotiopsis—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50, 167-187.

Komar, N., Kant-Singh, R., Mishra, S.K., & Pachouri, U.C. (2010). Isolation and screening of soil *Actinomycetes* as source of antibiotics active against bacteria. *Internatonal Journal of Microbiology Reaearch*, 2(2), 12-16.

Krucharoenphaisan, K., Rodbagpong, K., Saengpaen, P., & Sinma, K. (2016). Exploration on soil *Actinomycetes* against *Phytophthora* sp. causing root rot of Cassava and plant growth promotig activities. *Journal of Plant Sciences*, 11, 38-44.

Shi, L., Nwet, T. T., Ge, BB., Zhao, W., Liu, BH., Cui, H., Zhang, K. C. (2018). Antifungal and plant growth-promoting activities of Streptomyces roseoflavus strain NKZ-259. *Biological Control*, 125, 57-64.

Kumar, P. S., Yuvaraj, P., Paulraj, M. G., Ignacimuthu, S., & Al-Dhabi, N. A. (2018). Bio-prospecting of soil Streptomyces and its bioassay-guided isolation of microbial derived auxin with antifungal properties. *Journal de Mycologie Medicale*, in press,

Nath-Yadav, A., Verma, P., Singh, B., Singh-Chauahan, V., Suman, A., & Kumar-Saxena, A. (2017). Plant growth promoting baceria : biodiversity and multifunctional attributes or sustainable agriculture. *Advances Biotechnology and Microbiology*, 5(5), 1-16.

Aldesuquy, HS., Mansour, FA., & Abo-Hamed, SA. (1998). Effect of the culture filtrates of Streptomyces on growth and productivity of wheat plants. *FoliaMicrobiologica*, 3, 465-470.

Benedict, R. G. (1953). Antibiotics produced by Actinomycetes. *Botanical Review*, 19(5), 229-320.

Naine, S. J., Devi, C. S., Mohanasrinivasan, V., & Vaishnavi, B. (2015). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of marine *Streptomyces parvus* VITJS11 crude extract. *Brazilian Archives of Biology and Technology,* 58(2), 198-207.

Abd-Elnaby, H., Abo-Elala, G., Abdel-Raouf U., Abd-elwahab, A., & Hamed, M. (2016). Antibacterial and anticancer activity of marine *Streptomyces parvus*: optimization and application. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 180-191.

Shimizu, M., Nakagawa, Y., Sato, Y., Furumai, T., Igarashi, Y., Onaka, H., Yoshida, R., & Kunoh, H. (2000). Studies on endophytic Actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. Isolated from Rhododendron and Its antifungal activity. *Journal of General Plant Pathology*, 66, (4), 360–366.

Bundale, S., Besde, D., Pillai, D., Gangwani, K., Nashikkar, N., Kadam, T., & Upadhyay, A. (2018). Novel aromatic polyketides from soil *Streptomyces* spp. purification, Characterization and bioactivity studies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(67), 1-16.

Holkar, S., Begde, D., Nashikkar, N., Kadam, T., & Upadhyay, A. (2013). Rhodomycin analogues from *Streptomyces purpurascens*: Isolation, characterization and biological activities. *Springer Plus*, 2(9), 1-13.

Kamil, F. H., Saeed, E. E., El-Tarabily, K. A., & Abu-Qamar, S. F. (2018). Biological control of mango dieback disease caused by *Lasiodiplodia theobromae* using Streptomycete and Non-streptomycete actinobacteria in the United Arab Emirates. *Frontiers in microbiology*, 9(829), 1-19.

พีระวรรณ พัฒนาวิภาส, บูรณี พั่ววงษ์แพทย์, ทัศนาพร ทัศดร และศิวิไล ลาภบรรจง. 2551. การควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่โดยชีววิธี. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิ ชาการเกษตร, 438-450.