

การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium Rolfsii* ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24 ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนส

Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* root and stem rot disease of chili using chitinase-producing actinomycetes, *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล* และ ชนิตาภา นวะพิณ

ห้องปฏิบัติการไบโอรีเมดิเอชัน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190

*E-mail: scpranpa@gmail.com

บทคัดย่อ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินรอบรากพืชจากแปลงเกษตรกรในเขตจังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดศรีสะเกษ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment media for isolation of chitinase-producing actinomycetes (EMCA agar) สามารถคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ จำนวน 283 ไอโซเลท นำเชื้อที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนส สามารถคัดเลือกเชื้อที่สร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ดี จำนวน 68 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่า *Sclerotium rolfsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ cornmeal agar (CMA agar) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีมีจำนวน 13 ไอโซเลท คือ PACCH24, PACCH42, PACCH91, PACCH101, PACCH129, PACCH133, PACCH137, PACCH140, PACCH224, PACCH225, PACCH246, PACCH247 และ PACCH277 เชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากที่สุดห้าอันดับแรกคือ PACCH277, PACCH129, PACCH225, PACCH24 และ PACCH246 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเกิดจากการที่เชื้อแอคติโนมัยซีทสร้างเอนไซม์ไคติเนสมาทำลายหรือย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคในต้นพริกพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ คือ PACCH24 และ PACCH225 ซึ่งแตกต่างจากชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคในต้นพริกกับประสิทธิภาพการยับยั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีความสัมพันธ์กัน แหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกลูต้ามิโนแอคติโนมัยซีท PACCH24 คือ ยีสต์สกัด (0.8 กรัมต่อลิตร) และซูโครส (1.0 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนิดของ DAP และน้ำตาลภายในเซลล์ รวมทั้งการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล สามารถจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้คือ *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24 ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. hygroscopicus* PACCH24 เป็นเชื้อที่มีศักยภาพสูงเหมาะสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริก รวมทั้งการพัฒนาร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์รูปแบบต่างๆ เพื่อประโยชน์ในการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพริกต่อไป

คำสำคัญ : เชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างเอนไซม์ไคติเนส *Streptomyces hygroscopicus* การควบคุมทางชีวภาพ โรครากเน่าโคนเน่าของพริก พริก *Sclerotium rolfsii*

Abstract

Rhizosphere-associated soils from Ubon Ratchathani and Srisaket province were collected for isolation of actinomycetes using selective media. Two hundred and eighty three isolates were obtained by using enrichment media for isolation of chitinase-producing actinomycetes agar (EMCA agar). All isolates were screened for chitinolytic activity and sixty eight isolates gave significant clear zone on EMCA agar plates. The selected chitinase-producing isolates were assayed for *in vitro* antagonism towards *Sclerotium rolfsii* using cornmeal agar (CMA agar) assay procedure and the result showed that thirteen isolates have remarkable inhibiting the growth of the fungus. There

were PACCH24, PACCH42, PACCH91, PACCH101, PACCH129, PACCH133, PACCH137, PACCH 140, PACCH 224, PACCH 225, PACCH 246, PACCH 247 and PACCH 277, whereas the top five antagonistic actinomycetes were PACCH 277, PACCH129, PACCH225, PACCH24 and PACCH246, respectively. The results indicated that these actinomycetes produced chitinase which catalyzed chitin, resulting in inhibition of *S. rolfii* growth. Their abilities to prevent the disease development were tested for *in vivo* biocontrol assay on young chili seedling in climate room condition. Two out of thirteen candidate antagonists reduced the disease development at 90%. There were PACCH24 and PACCH225 which was different from *in vitro* assay result. It showed that the ability to inhibit the pathogen *in vitro* was not related to the disease reduction *in vivo*. Maximum biomass production of actinomycetes PACCH24 could be produced by using a combination of yeast extract (0.8 g/l) with sucrose (1.0 g/l) as nitrogen source and carbon source, respectively. Morphology characteristic, diaminopimelic acid, sugar analysis, and 16S rDNA sequencing analysis showed that it was *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24. The study indicated a novel chitinolytic actinomycete could be developed as a biological agent including a complement with organic fertilizers in order to control root and stem rot disease and promoting growth of chili.

Keywords: chitinase-producing actinomycetes, *Streptomyces hygroscopicus*, biocontrol, root and stem rot, chili, *Sclerotium rolfii*

1. บทนำ

พริก เป็นพืชชนิดหนึ่งที่อยู่ในตระกูล Solanaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Capsicum frutescens* L. ปัจจุบันปลูกในหลายประเทศทั่วโลก เช่น สหรัฐอเมริกา ประเทศในทวีปยุโรป อาฟริกา อินเดีย ออสเตรเลียและประเทศในแถบเอเชีย พริกเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพราะนอกจากจะใช้ประกอบอาหารหรือเป็นเครื่องเทศแล้ว ยังใช้เป็นยารักษาโรคบางชนิด และนำไปแปรรูปเป็นเครื่องปรุงแต่งรส เช่น พริกแห้ง พริกป่น น้ำพริกเผา น้ำพริกแกง และซอสพริก เป็นต้น จากรายงานของกรมส่งเสริมการเกษตรประจำปี 2544 [1] พบว่า การส่งออกพริกมีทั้งรูปผลสด ซอสพริกและพริกแห้ง มีปริมาณการส่งออก 12,283 ตัน มูลค่าส่งออก 114 ล้านบาท ประเทศนำเข้าหลัก ได้แก่ มาเลเซีย เนเธอร์แลนด์ สิงคโปร์ และไต้หวัน สำหรับซอสพริกมีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นปีละ 80-100 ล้านบาท การส่งออกพริกแห้งพบทุกปีแต่ปริมาณการส่งออกไม่แน่นอน มีมูลค่าอยู่ระหว่าง 51-144 ล้านบาท สำหรับพริกในแหล่งปลูกต่างๆ สามารถแบ่งตามขนาดเป็น 2 ประเภท คือ พริกใหญ่และพริกเล็ก แหล่งปลูกพริกใหญ่ที่สำคัญ เช่น เชียงใหม่ นครสวรรค์ ลำพูน อุตรดิตถ์ ชัยภูมิ นครราชสีมา เลย และราชบุรี เป็นต้น แหล่งปลูกพริกเล็กที่สำคัญ เช่น เชียงใหม่ นครสวรรค์ เพชรบูรณ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ นครราชสีมา มุกดาหาร อุบลราชธานี กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี เป็นต้น [2] จากปริมาณการส่งออกแสดงให้เห็นว่าความต้องการใช้พริกมีมาก

ขึ้น แต่ปริมาณและคุณภาพของพริกที่ผลิตได้ยังไม่สอดคล้องกับความต้องการของผู้ใช้ และผู้แปรรูป อย่างไรก็ตาม พริกมีปัญหากระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพต่ำ โดยเฉพาะการผลิตเพื่อให้ได้มาตรฐานสากล ปลอดภัยและปลอดภัยจากสารพิษ ดังนั้น ปัญหาสำคัญที่สมควรจะได้รับการแก้ปัญหาอย่างรีบด่วน คือการจัดการระบบการปลูกพริกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพผลผลิตให้ได้มาตรฐานคุณภาพตามที่ต้องการ ปัญหาสำคัญในการปลูกพริกคือ โรคและแมลงที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อปริมาณและคุณภาพของพริก

โรครากเน่าและโคนเน่าของพริก (root and stem rot disease) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfii* เป็นโรคหนึ่งที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตเป็นอย่างมาก ลักษณะอาการของโรคคือ โคนต้นมีแผลสีน้ำตาล มีเส้นใยเชื้อราสีขาวหรือมีเม็ดกลมคล้ายเม็ดผักกาดสีขาวหรือสีน้ำตาล ลำต้นแคระแกร็น ใบเหลืองเหี่ยวหลุดร่วง รากหลุดร่วง การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของพริก ทำได้หลายวิธี เช่น การคลุมเมล็ดด้วยสารเคมีฆ่าเชื้อรา การใช้สารเคมีฉีดพ่นในระยะต้นกล้าและการปรับสภาพแวดล้อมเพื่อลดความรุนแรงของโรค อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคมียกจำกัด คือ หากมีการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน จะทำให้เชื้อราสาเหตุโรคเกิดความต้านทานต่อสารเคมีชนิดนั้น ๆ เป็นผลให้การควบคุมโรคกระทำได้ยากขึ้น นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาสารเคมีตกค้างอีกด้วย ดังนั้น การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าโดยการใช้จุลินทรีย์ จึงเป็น

ทางเลือกหนึ่งที่ยอมรับในกลุ่มเกษตรกรและมีรายงานหลายฉบับสนับสนุนการใช้เชื้อราปฏิปักษ์และแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคดังกล่าว [3-8] จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นสารชีวภัณฑ์ที่สามารถลดจำนวนหรือลดความสามารถในการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรค โดยอาศัยกลไกใดกลไกหนึ่ง เช่น การสร้างสารยับยั้ง การแข่งขันการเจริญและการเป็นไฮเปอร์พาราไซต์ [9] ซึ่งการเป็นไฮเปอร์พาราไซต์จะขึ้นอยู่กับการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค [10] เอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินหรือไคตินเนส จึงเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคในดินเพราะเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งมีไคตินเป็นองค์ประกอบหลัก [11-12] แบคทีเรียที่สังเคราะห์เอนไซม์ไคตินเนสถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช ที่เกิดจาก *Fusarium* sp. และ *Pythium* sp. [13], *Gaeumannomyces graminis* [14] และ *Rhizoctonia solani* Kuhn [3, 15] แต่การนำเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สังเคราะห์เอนไซม์ไคตินเนสมาใช้ในการควบคุมโรคพืช ยังมีรายงานน้อยมาก เชื้อแอคติโนมัยซีท์เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างเส้นใย ได้รับการยอมรับว่าสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ สารยับยั้งและเอนไซม์หลายชนิดที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ อุตสาหกรรมและทางการเกษตร งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีท์ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส ศึกษาแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญ รวมทั้งประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *S. rostrisii* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) และในต้นพืช (*in vivo*)

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินรอบรากพืชในแปลงเกษตรกรในเขตจังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดใกล้เคียง โดยใช้พลั่วตักดิน ขุดลึกจากผิวดินลงไป 5-10 เซนติเมตร นำตัวอย่างดินใส่ในถุงพลาสติก รัดปากถุงให้แน่น เมื่อนำกลับมาห้องปฏิบัติการ เตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาเพื่อการคัดแยกหาเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนสต่อไป

2.2 การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส

แยกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนสจากตัวอย่างดินโดยวิธี serial dilution spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment media for

isolation of chitinase-producing actinomycetes (EMCA agar) [16] บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน คัดเลือกโคโลนีที่ใสบริเวณใส (clear zone) และลักษณะโคโลนีเฉพาะ เช่น ขนาดของโคโลนี สีของโคโลนี แยกจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์

2.3 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast malt extract (International Streptomyces Project; ISP-2) agar [17] บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตัดชิ้นวัน (ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร) จำนวน 5 ชิ้น ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP-2 broth บ่มด้วยเครื่องบ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วจึงเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMCA agar ปล่อยให้สารละลายแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน วัดรัศมีบริเวณใสที่เกิดขึ้น โดยกำหนดระดับความสามารถในการสร้างเอนไซม์ระดับ Significants (S) หมายถึง รัศมีบริเวณใสมากกว่า 5.0 มม. Moderate (M) หมายถึง รัศมีบริเวณใสเท่ากับ 2.5 ถึง 5.0 มม. และ Negligible (N) หมายถึง รัศมีบริเวณใสน้อยกว่า 2.5 มม.

2.4 การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่า

นำชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรครากเน่า 2% โซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง นำชิ้นส่วนที่ได้ไปซบในกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) + 0.5% สเตอโรโตมัยซิน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คัดแยกโคโลนีที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะโคโรนีเดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคตามวิธีของ Barnett และ Hunter [18] นำเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคที่คัดแยกได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการก่อโรคอีกครั้ง โดยการนำไปเพาะในดินที่ปลูกพืช สังเกตการเกิดโรคและทำการคัดแยกเชื้อซ้ำอีก เก็บสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคบน PDA + 1% นำสกัดจากต้นกล้าพืช เพื่อการศึกษาต่อไป

2.5 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเชื้อแอคติโนมัยซีท์ที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMCA agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ตัดชิ้นวัณที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีท์ (ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร) วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ cornmeal agar (CMA agar) (แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน) โดยวางตรงกลางของส่วนที่หนึ่ง บ่มจนเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเพาะชิ้นวัณ (ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร) ที่มีเชื้อราสาเหตุโรคอายุ 3 วัน วางลงตรงกลางของส่วนที่สองของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มจนเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องต่อเนื่องอีก 4 วันหรือจนกว่าเชื้อรากอโรจะเจริญเต็มจานอาหาร วัตรศมีการยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นระหว่างโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีท์และเชื้อราสาเหตุโรค

2.6 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ในการควบคุมการเกิดโรคโรครากเน่าโคนเน่าของพริกในต้นพืช

2.6.1 การเตรียมต้นกล้าพริก

นำผลพริกสุกมาล้างทำความสะอาด แล้วเช็ดผิวพริกด้วย แอลกอฮอล์ 70% ใช้ใบมีดกรีดเปลือกพริกออก แล้วนำเมล็ดมาเพาะลงบนดินปลอดเชื้อ เมื่อเมล็ดพริกเริ่มงอก จึงย้ายลงปลูกในกระถางปลูกขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร) จนกระทั่งพืชมีอายุ 30-45 วัน

2.6.2 การเตรียมเชื้อแอคติโนมัยซีท์

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นเตรียมซัสเฟินชั้นของสปอร์ด้วย 0.1% Tween 80 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับจำนวนสปอร์ด้วย haemocytometer

2.6.3 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค *S. rolfsii*

นำเมล็ดสเคอโรเตียมของเชื้อรา *S. rolfsii* ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4-5 วัน จนเกิดเส้นใยสีขาวเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ที่ตัดวัณขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.6.4 วิธีการทดสอบ

นำซัสเฟินชั้นของสปอร์เชื้อแอคติโนมัยซีท์ เพาะลงบนต้นกล้าพริกในอัตราส่วน 1:5 (มิลลิลิตรต่อกรัมของดิน) จำนวน 3 ครั้ง (6 วันต่อครั้ง) ครั้งละ 25 มิลลิลิตร โดยทำชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ หลังการเพาะซัสเฟินชั้นของสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท์ครั้งที่สามให้นำชิ้นวัณของ *S. rolfsii* วางบริเวณโคนต้นพริกให้ลึกจากผิวดินลงไปประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มต้นพืชที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนต้นกล้าพืชที่เกิด

โรคหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเป็นเวลา 20 วัน ทดลองควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนเชื้อแอคติโนมัยซีท์และเชื้อราสาเหตุโรค และการทดลองควบคุมที่มีการปลูกเชื้อแอคติโนมัยซีท์และใช้น้ำกลั่นแทนเชื้อราสาเหตุโรค

2.7 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อแอคติโนมัยซีท์

2.7.1 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar ที่ปรับเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด ถั่วเหลืองผง และกากถั่วเหลืองแห้งบดละเอียด ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำให้เป็นซัสเฟินชั้นของสปอร์โดยใช้ 0.1% Tween 80 ตรวจสอบจำนวนสปอร์ด้วย haemocytometer

2.7.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar ที่ปรับเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส ฟรุกโทส มอลต์สกัดและกากน้ำตาล ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำให้เป็นซัสเฟินชั้นของสปอร์โดยใช้ 0.1% Tween 80 ตรวจสอบจำนวนสปอร์ด้วย haemocytometer

2.7.3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 2.7.1 และปรับความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0 และ 15.0 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำให้เป็นซัสเฟินชั้นของสปอร์โดยใช้ 0.1% Tween 80 ตรวจสอบจำนวนสปอร์ด้วย haemocytometer

2.7.4. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 2.7.2 และปรับความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ 0.4, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, และ 10.0 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำให้เป็นซัสเฟินชั้นของสปอร์โดยใช้ 0.1% Tween 80 ตรวจสอบจำนวนสปอร์ด้วย haemocytometer

2.8 การตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีท์โดยวิธีทางเคมีและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

2.8.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในเซลล์

เพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 agar โดยวิธีซีดีให้เป็นช่องตารางบนผิวของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน ตรวจดูการสร้างเส้นใย และลักษณะของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ ได้แก่ ชนิดของ diaminopimelic acid โดยการไฮโดรไลซ์เซลล์และทำการแยกด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อตรวจสอบชนิดของสาร isomer of diaminopimelic acid และวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ ได้แก่ ไซโลส แมนนูโรส แรมโนส อะราบีโนส และกาแลคโตส [19]

2.8.2 การวิเคราะห์หาระดับเบสของ 16S rDNA

เพาะเลี้ยงเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์และหมუნเหวียงเพื่อแยกตัวเซลล์ นำเซลล์ที่ได้มาเติมสารละลาย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 8.0) จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอโดยทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลาย 10% SDS, Proteinase K ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตกตะกอนสารรบกวนอื่น ๆ ด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วย 70% เอทานอล เทส่วนใสทิ้งไป ทิ้งไว้จนตะกอนแห้งแล้วจึงละลายคืนด้วย TE buffer เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S rDNA จากตัวอย่างที่สกัดได้โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR (Polymerase Chain Reaction, PCR) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยเตรียมสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ primer pairs pA/pH', deoxynucleoside triphosphate, Tag DNA polymerase และ PCR buffer จากนั้นนำ amplified 16S rDNA product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง automated sequencing นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับ 16S rRNA gene sequence ในฐานข้อมูลของ EMBL database เพื่อจับคู่หาเชื้อที่มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการกันมากที่สุด

3. ผลการวิจัย

3.1 การคัดแยกเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส เมื่อนำตัวอย่างดินรอบรากพืช จำนวน 14 ตัวอย่าง มาทำการแยกเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนสโดยวิธี serial dilution spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMCA agar ได้เชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ รวมทั้งสิ้น 283 ไอโซเลท

3.2 การคัดเลือกเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส

เมื่อนำเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMCA agar ผลการทดลองพบว่า มีเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่สร้างบริเวณใสในระดับ Significants (S) จำนวน 45 ไอโซเลท เชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่สร้างบริเวณใสในระดับ Moderate (M) จำนวน 70 ไอโซเลท เชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่สร้างบริเวณใสในระดับ Negligible (N) จำนวน 147 ไอโซเลท และเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่ไม่เจริญ (NG) จำนวน 21 ไอโซเลท คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสในระดับ S จำนวน 45 ไอโซเลทและ ระดับ M จำนวน 5 ไอโซเลท (PACCH 137, PACCH 175, PACCH 198, PACCH 225, และ PACCH 246) รวมทั้งสิ้น 50 ไอโซเลท เพื่อการศึกษาต่อไป

3.3 การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริก

การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าจากพริกที่แสดงอาการของโรคจากแปลงพริกของบ้านแม่ต๋ำบ้านศรีโค อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี ผลการทดลองพบว่า สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้ 1 สายพันธุ์ เมื่อนำศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พิสูจน์การก่อโรค และจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรค ตามวิธีของ Barnett และ Hunter [18] พบว่าเชื้อราที่คัดแยกได้คือ *S. rolfisii* จึงใช้เชื้อดังกล่าวเพื่อการศึกษาต่อไป

3.4 การคัดเลือกเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การนำเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้ดี จำนวน 50 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่เกิดจาก *S. rolfisii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA agar ผลการทดลองพบว่า เชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่ยับยั้งการเจริญของ *S. rolfisii* ได้ดีมาก (รัศมีการยับยั้ง 20.0-25.0 มม.) จำนวน 1 ไอโซเลท เชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่ยับยั้งได้ดี (รัศมีการยับยั้ง 10.0-19.9 มม.) จำนวน 12 ไอโซเลท เชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่ยับยั้งได้พอใช้ (รัศมีการยับยั้ง 0.5-9.9 มม.) จำนวน 14 ไอโซเลท เชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่ไม่สามารถยับยั้งได้ จำนวน 23 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 1 คัดเลือกเชื้อแอสคิตินอิมยีสท์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. rolfisii* ได้ดีมากและดี จำนวน 13 ไอโซเลท คือ PACCH 24, PACCH 42, PACCH 91, PACCH 101, PACCH 129, PACCH 133, PACCH 137, PACCH 140, PACCH 224, PACCH 225, PACCH 246, PACCH 247 และ PACCH 277 เพื่อศึกษาการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าในต้นพริกต่อไป

3.5 การคัดเลือกเชื้อแอดติโนมัยซีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรครากเน่าโคนเน่าในต้นพริก

เมื่อนำซัสเฟินชั้นของสปอร์ของเชื้อแอดติโนมัยซีที่คัดเลือกไว้มาเพาะลงบนต้นกล้าพริก ผลการทดลองพบว่า ต้นพริกมีการเจริญเติบโตดี ไม่มีอาการของโรค ผลการทดลองควบคุมที่มีการปลูกเชื้อแอดติโนมัยซีและใช้น้ำกลั่นแทนเชื้อราสาเหตุโรค พบว่า ต้นพริกมีการเจริญเติบโตดี ไม่มีอาการของโรค แสดงว่าเชื้อแอดติโนมัยซีที่ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของต้นพริก ผลจากการทดลองควบคุมที่มีการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค พบว่า ต้นพริกแสดงอาการของโรค ผลจากการทดลองที่มีการปลูกเชื้อแอดติโนมัยซีและเชื้อราสาเหตุโรค พบว่า เชื้อแอดติโนมัยซีสามารถควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfisii* ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของต้นปกติได้สูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ คือ เชื้อแอดติโนมัยซี PACCH24 และ PACCH225 เชื้อแอดติโนมัยซีที่ให้เปอร์เซ็นต์ของต้นปกติเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ คือ เชื้อแอดติโนมัยซี PACCH140 เชื้อแอดติโนมัยซีที่ให้เปอร์เซ็นต์ของต้นปกติเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ คือ เชื้อแอดติโนมัยซี PACCH42, PACCH129, PACCH224 และ PACCH246 เชื้อแอดติโนมัยซีที่ให้เปอร์เซ็นต์ของต้นปกติเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ คือ เชื้อแอดติโนมัยซี PACCH101, PACCH137

และ PACCH277 เชื้อแอดติโนมัยซีที่ให้เปอร์เซ็นต์ของต้นปกติเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ คือ เชื้อแอดติโนมัยซี PACCH133 และ PACCH247 เชื้อแอดติโนมัยซีที่ให้เปอร์เซ็นต์ของต้นปกติเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ คือ เชื้อแอดติโนมัยซี PACCH91

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคในต้นพริก (*in vivo*) กับประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคนอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) พบว่าเชื้อแอดติโนมัยซีที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfisii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีห้าอันดับแรกคือ เชื้อแอดติโนมัยซี PACCH277, PACCH129, PACCH225, PACCH24 และ PACCH101 ตามลำดับ (PACCH 24 และ PACCH 101 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเท่ากัน) แต่พบว่าเชื้อแอดติโนมัยซีที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfisii* ในต้นพริกได้ดีที่สุดคือ เชื้อแอดติโนมัยซี PACCH 24 และ PACCH 225 ส่วนเชื้อแอดติโนมัยซีอื่น ๆ แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่แตกต่างกันมากนัก แต่การยับยั้งในต้นพริกมีความแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2 ดังนั้นในการศึกษาวิจัยจึงควรทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อและในต้นพริก เพื่อการคัดเลือกให้ได้เชื้อแอดติโนมัยซีที่เหมาะสม

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยไซต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA agar บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

ไอโซเลท	รัศมีการยับยั้ง (มม.)	ไอโซเลท	รัศมีการยับยั้ง (มม.)
PACCH 24	12.0	PACCH 175	9.5
PACCH 28	0.0	PACCH 185	0.0
PACCH 35	0.0	PACCH 186	2.0
PACCH 40	2.0	PACCH 197	0.0
PACCH 42	10.0	PACCH 198	9.0
PACCH 50	0.0	PACCH 210	0.0
PACCH 51	0.0	PACCH 214	0.0
PACCH 55	0.0	PACCH 216	0.0
PACCH 57	9.25	PACCH 219	2.5
PACCH 58	9.5	PACCH 220	0.0
PACCH 60	0.0	PACCH 224	10.5
PACCH 86	0.0	PACCH 225	13.0
PACCH 91	10.0	PACCH 226	9.0
PACCH101	12.0	PACCH 232	5.0
PACCH 104	9.5	PACCH 233	0.0
PACCH 119	5.5	PACCH 245	2.5
PACCH 128	5.0	PACCH 246	10.0
PACCH 129	15.0	PACCH 247	10.5
PACCH 132	0.0	PACCH 251	0.0
PACCH 133	10.0	PACCH 265	0.0
PACCH 137	11.0	PACCH 270	0.0
PACCH 138	0.0	PACCH 271	0.0
PACCH 140	11.5	PACCH 272	6.0
PACCH 173	0.0	PACCH 277	25.0
PACCH 174	0.0	PACCH 233	0.0

รวม 50 ไอโซเลท

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfisii* จากการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) และในต้นพืช (*in vivo*)

ไอโซเลท	รัศมีการยับยั้ง <i>S. rolfisii</i> เมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (มม.)	ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์ของต้นปกติ (%) เมื่อทดสอบในต้นพืช
PACCH 277	25.0	PACCH 24	90
PACCH 129	15.0	PACCH 225	90
PACCH 225	13.0	PACCH 140	80
PACCH 24	12.0	PACCH 42	70
PACCH 101	12.0	PACCH 129	70
PACCH 140	11.5	PACCH 224	70
PACCH 137	11.0	PACCH 246	70
PACCH 224	10.5	PACCH 101	50
PACCH 42	10.0	PACCH 137	50
PACCH 91	10.0	PACCH 277	50
PACCH 133	10.0	PACCH 133	40
PACCH 246	10.0	PACCH 247	40
PACCH 247	10.0	PACCH 91	30

3.6 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิต กล้าเชื้อแอสคิตินัมยีสี่

3.6.1 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เมื่อนำเชื้อแอสคิตินัมยีสี่ PACCH 24 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar ที่มีกลูโคส (0.4 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอนและได้ปรับเปลี่ยนชนิดของแหล่งไนโตรเจนคือ ยีสต์สกัด ถั่วเหลืองผง และกากถั่วเหลืองแห้งบดละเอียด (ระดับความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองพบว่า เชื้อแอสคิตินัมยีสี่ PACCH 24 สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดใ้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน (3.62×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือ กากถั่วเหลืองอบแห้ง (3.15×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) และถั่วเหลืองผง (1.31×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1

3.6.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เมื่อนำเชื้อแอสคิตินัมยีสี่ PACCH 24 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar ที่มียีสต์สกัด (0.8 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน และได้ปรับเปลี่ยนชนิดของแหล่ง

คาร์บอนคือ กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส มอลต์สกัด และกากน้ำตาล (ระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 0.4 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองพบว่า เชื้อแอสคิตินัมยีสี่ PACCH 24 สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดใ้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (6.02×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือ ฟรุคโตส (3.66×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) กลูโคส (3.62×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) กากน้ำตาล (3.24×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) และมอลต์สกัด (2.4×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1

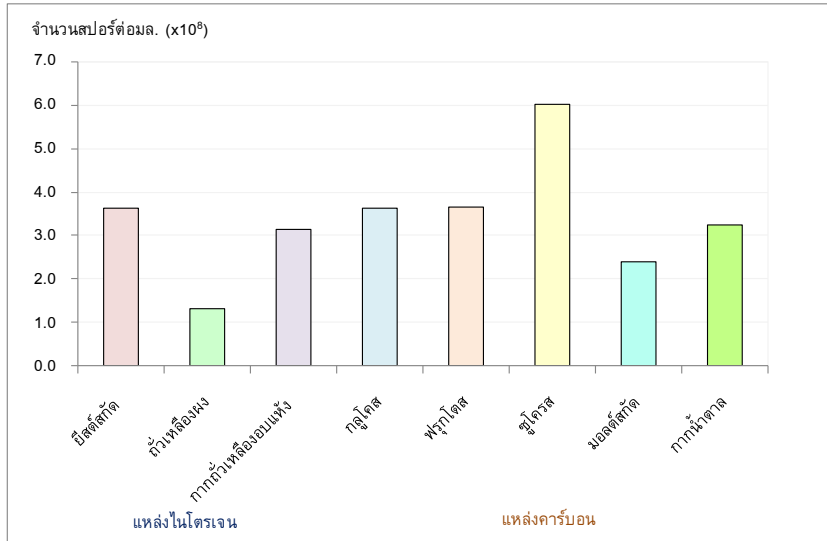
3.6.3 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อนำเชื้อแอสคิตินัมยีสี่ PACCH 24 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (ยีสต์สกัด) และปรับความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กันคือ 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10.0 และ 15.0 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (ซูโครส) เชื้อแอสคิตินัมยีสี่ PACCH 24 สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของยีสต์สกัดเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร (6.02×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ดังแสดงในภาพที่ 2

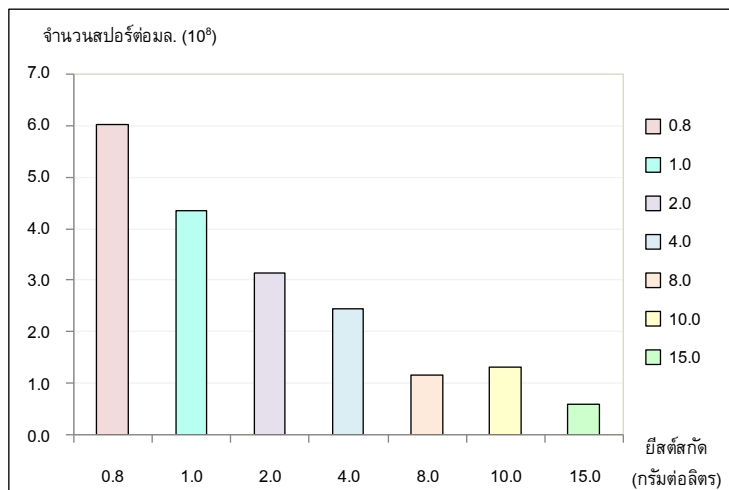
3.6.4 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

เมื่อนำเชื้อแอกติโนมัยสีท PACCH 24 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (ซูโครส) และปรับความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กันคือ 0.4, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, และ 10.0 กรัมต่อลิตร ผลการทดลอง

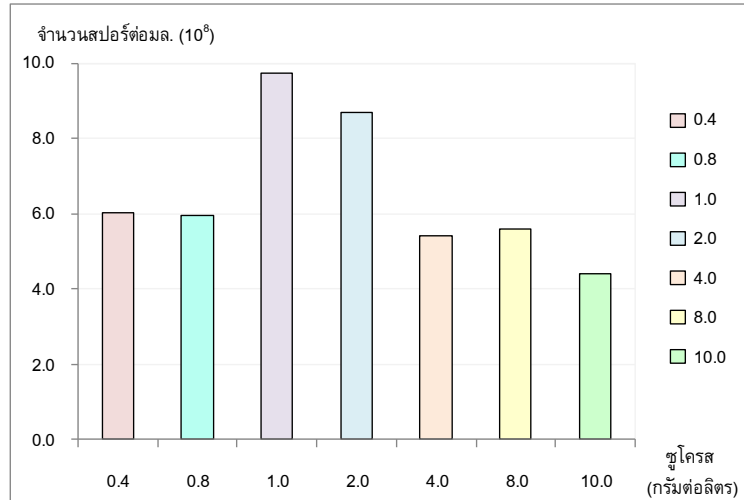
พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (ยีสต์สกัด 0.8 กรัมต่อลิตร) เชื้อแอกติโนมัยสีท PACCH 24 สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตร (9.73×10^8 สปอร์ต่อมิลลิเมตร) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar เพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีท PACCH 24



ภาพที่ 2 ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar เพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีท PACCH 24



ภาพที่ 3 ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสปอร์โครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ CYD agar เพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีท PACCH 24

3.7 การตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อแอกติโนมัยซีท โดยวิธีทางเคมีและเทคนิคทางชีวโมเลกุล

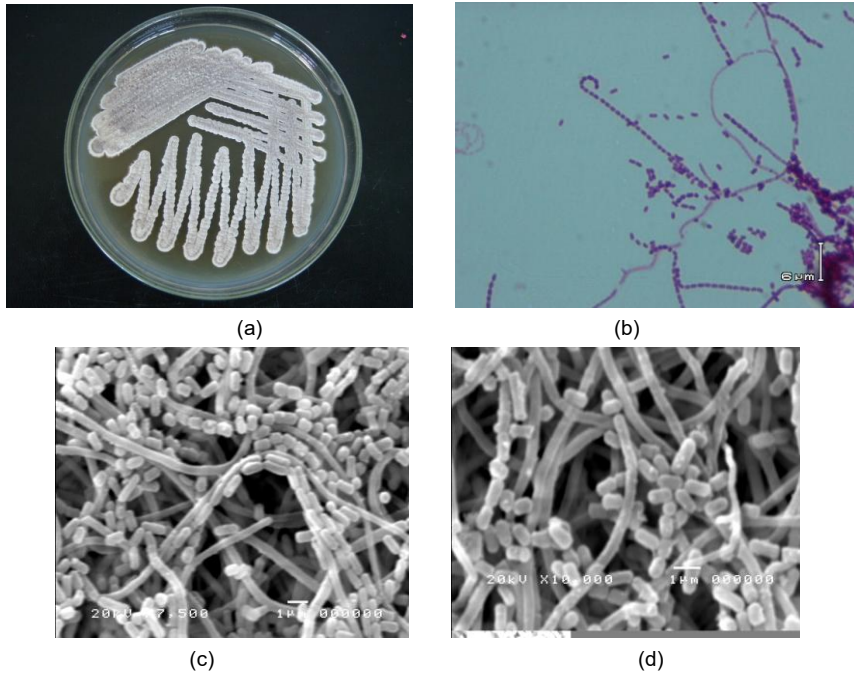
3.7.1 การศึกษาพื้นฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมี

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีท PACCH24 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 สัปดาห์ ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างเส้นใย และลักษณะของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ทำการวิเคราะห์ชนิดของ diaminopimelic acid และชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ ผลการทดลองพบว่า โคลินของเชื้อแอกติโนมัยซีท PACCH24 มีลักษณะเป็นขุย แบน ติดแน่นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างเส้นใยราบ (substrate mycelium) สีเทา สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลอ่อนที่ขั้วออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4a-4b) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเส้นใยมีโคนดีไอสปอร์เรียงเป็นสายยาว ส่วนปลายของสายจะโค้งงอเป็นลูปเล็กน้อย (open loops, primitive spirals, hooks) (ภาพที่ 4c-4d) ผนังเซลล์ของเชื้อแอกติโนมัยซีท PACCH24 ประกอบด้วย diaminopimelic acid ชนิด LL-DAP ไม่มีน้ำตาลเป็น

องค์ประกอบ จากการจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ในระดับจีนัสตามที่เสนอใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ninth edition [20] โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา ร่วมกับองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ จึงสามารถจัดจำแนกเชื้อแอกติโนมัยซีท PACCH 24 อยู่ในจีนัส *Streptomyces* sp.

3.7.2 การวิเคราะห์ระดับเบสของ 16 S rDNA

เมื่อนำเชื้อแอกติโนมัยซีท PACCH 24 มาจัดจำแนกระดับสปีชีส์ด้วยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA fragments โดยใช้ primer pairs pA/pH' และนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยใช้ primer 943 reverse แล้วนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่เหมือนกันที่สุดในฐานข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search ผลการสืบค้นข้อมูลพบว่าลำดับเบสของเชื้อแอกติโนมัยซีท PACCH 24 สอดคล้อง 96 % กับ ลำดับเบสของ *Streptomyces hygroscopicus* strain 3088 16S ribosomal RNA gene (Accession no. EF063461.1) ดังนั้นเชื้อแอกติโนมัยซีท PACCH 24 คือ *Streptomyces hygroscopicus* PACCH 24



ภาพที่ 4 (a) เชื้อแอกติโนมัยซีท PACCH24 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 agar (b) ลักษณะเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (c-d) ลักษณะเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

4. อธิบายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินรอบรากพืชจากแปลงเกษตรกรในเขตจังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 14 ตัวอย่าง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ EMCA agar ผลการทดลองพบว่า สามารถคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทได้ จำนวน 283 ไอโซเลท และสามารถคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่สร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ดี สามารถย่อยสลายไคติเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMCA agar เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จำนวน 45 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อแอกติโนมัยซีทมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfisii* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริกบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีท PACCH277 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfisii* ได้มากที่สุด รองลงมาคือ PACCH129, PACCH225, PACCH24 และ PACCH246 ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทเหล่านี้เป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitin-degrading actinomycetes) และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfisii* ได้โดยการสร้างเอนไซม์ไคติเนสมาทำลายหรือย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jung และคณะ [15] พบว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus*

illinoisensis KJA-424 ที่คัดแยกจากดินแถบชายฝั่งทะเลในประเทศเกาหลี เป็นทำแบคทีเรียที่มีกิจกรรมในการย่อยสลายไคติเนสสูง เมื่อนำแบคทีเรียนี้มาเพาะเลี้ยงร่วมกับ *R. solani* จะพบการบวมและเสีรูปร่างของเส้นใยเชื้อรา และมีการปลดปล่อยสาร *N*-acetyl-D-glucosamine ออกจากเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา Hoster และคณะ [21] คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไคติเนสพบว่าเชื้อ *Streptomyces griseus* MG3 จะสร้างเอนไซม์ไคติเนสเพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืช และพบว่าเอนไซม์ไคติเนสที่ได้จากยีน *chiIS* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเจริญเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดและมีกิจกรรมในช่วงพีเอชที่กว้าง

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนมัยซีทในการควบคุมการเกิดโรครากเน่าโคนเน่าในต้นพริก ซึ่งปลูกในกระถางที่มีเชื้อแอกติโนมัยซีทและเชื้อรา *S. rolfisii* ผลการทดลองพบว่า เชื้อแอกติโนมัยซีทที่ลดการเกิดโรคได้สูงสุดคือ PACCH 24 และ PACCH 225 ซึ่งแตกต่างจากชนิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfisii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีคือ PACCH277, PACCH129, PACCH225, PACCH24 และ PACCH101 ตามลำดับ จาก

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคในต้นพืช (*in vivo*) กับประสิทธิภาพการยับยั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) ไม่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Liu และคณะ [22] กล่าวว่า การลดอาการของโรคแผลจุดของมันฝรั่งโดยการใช้ *Streptomyces* spp. 6 สายพันธุ์ในระดับแปลงภาคสนาม ไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากรายงานของ Anees และคณะ [23] ซึ่งศึกษาการสังเคราะห์สารยับยั้งที่ละลายน้ำได้ สารระเหย และการเป็นพาราไซต์ของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการต้านทานในต้นพืชทั้งในดินปลอดเชื้อและดินในสภาวะธรรมชาติ คณะผู้วิจัยสรุปว่าความสามารถในการสร้างสารยับยั้งที่ละลายน้ำได้หรือการสร้างห้วง (coil) ล้อมรอบเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีความสัมพันธ์กับการลดการเกิดโรคในต้นพืช

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ต้องเติมแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อสามารถสร้างสปอร์ในปริมาณที่สูง ผลการทดลองพบว่าการเติมยีสต์สกัด (0.8 กรัมต่อลิตร) และชูโครส (1.0 กรัมต่อลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลทำให้แอกติโนมัยซีท PACCH24 มีการเจริญอย่างรวดเร็วและสร้างสปอร์สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์สกัดประกอบด้วยกรดอะมิโน เปปไทด์ วิตามินที่ละลายน้ำได้และ คาร์โบไฮเดรตหลายชนิด จึงเหมาะสำหรับเป็นซับสเตรทของจุลินทรีย์ [24-26] ถึงแม้ว่ายีสต์สกัดจะมีราคาค่อนข้างแพง แต่ความเข้มข้นที่ใช้ในปริมาณต่ำ (0.8 กรัมต่อลิตร) จึงเป็นเหตุผลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตกล้าเชื้อในระดับอุตสาหกรรมได้

5. สรุปผลการวิจัย

การลดอาการและความรุนแรงของโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfisii* เกี่ยวข้องกับการที่เชื้อแอกติโนมัยซีท *S. hygroscopicus* PACCH24 สร้างเอนไซม์ไคตินเนส มาย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคเป็นผลให้การเจริญของเส้นใยสิ้นสุดลง เชื้อแอกติโนมัยซีท *S. hygroscopicus* PACCH24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfisii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อและในต้นพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเป็นเชื้อที่มีศักยภาพสูงเหมาะสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริกต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2552 ขอขอบคุณ รศ.ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำอันเป็นประโยชน์ นางสาวยุภารัตน์ เครื่องงา ที่ให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือในการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่สำหรับงานวิจัย

7. บรรณานุกรม

- [1] กรมวิชาการเกษตร. 2552. การปลูกพริก. <http://www.doa.go.th/pldata/CHILLI/1stat/st02.html>. สืบค้นเมื่อ 10 ตุลาคม.
- [2] สำนักงานเกษตรกรเขาค้อ. 2552. การปลูกพริก <http://phetchabun.doae.go.th/kaokho/apapika.html>. สืบค้นเมื่อ 10 ตุลาคม.
- [3] Ordentlich, A., Y. Elad, and I. Chet. 1988. "The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfisii*". *Phytopatho.* 78: 84-88.
- [4] Gal, S. W. 1992. **Purification and characterization of chitinase isozymes and cloning of a gene for 58 kD from *Serratia marcescens* KCTC2172.** Doctor's thesis, Gyeongsang National University.
- [5] Tweddell, R. J., S. H. Jabaii-Hare, and P. M. Charest. 1994. "Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*". *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 489-495.
- [6] Mao, W., J. A. Lewis, R. D. Lumsden and K. P. Hebbar. 1998. "Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants". *Crop. Protect.* 17: 535-542.
- [7] Tshahouridou, P. C. and C. C. Thanassouloupoulos. 2002. "Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizoehere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfisii*". *Soil Biol. Biochem.* 34: 767-776.

- [8] Flores-Moctezuma, H. E., R. Montes-Belmont, A. Jiménez-Pérez, and R. Nava-Juárez. 2006. "Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments". **Crop. Protect.** 25: 195-201.
- [9] Park, D. 1960. "Antagonism-the background of soil fungi". In: Parkinson, D., J. S. Waid (Eds.), **The Ecology of Soil Fungi**. Liverpool University Press. Liverpool.
- [10] Chet, I., A. Ordentlich, R. Shapira, and A. ppenheim. 1990. "Mechanism of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria". **Plant and Soil**. 129: 85-92.
- [11] Bartnicki-Garcia, S. 1968. "Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi". **Ann. Rev. Microbiol.** 22: 87-108.
- [12] Chet, I. 1987. "*Trichoderma*-application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi". In: Chet, I. (Ed.). **Innovative Approaches to Plants Diseases Control**. Wiley/Interscience. New York.
- [13] Mitchell, R. and M. Alexander. 1961. "The mycolytic phenomenon and biological control of *Fusarium* in soil". **Nature (London)**. 190: 109-110.
- [14] Campbell, R. and J. M. Ephgrave. 1983. "Effect of bentonite clay on the growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and its interaction with antagonistic bacteria". **J. of Gen. Microbiol.** 129: 771-777.
- [15] Jung, W. J., K. N. An, Y. L. Jin, R. D. Park, K. T. Lim, K. Y. Kim, and T. H. Tim. 2003. "Biological control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using chitinase-producing *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424". **Soil Biol. and Biochem.** 35: 1261-1264.
- [16] Thongchai, T., F. P. John and L. Saisanom. 2003. "Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity". **World. J. of Microbiol. and Biotechnol.** 19: 381-385.
- [17] Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. "Methods for characterization of *Streptomyces* species". **Int. J. Syst. Bacteriol.** 16: 313-340.
- [18] Barnett, H.L., and B.B. Hunter. 1972. "*Illustrated Genera of Imperfect Fungi*". Burgess Publishing. New York. 241 pp.
- [19] Lechevalier, H. A., M. P. Lechevalier, and N. N. Gerber. 1971. "Chemical composition as criterion on the classification of actinomycetes". **Adv. in Appl. Microbiol.** 14: 47-72.
- [20] Hensyl, W. R. 2000. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ninth edition**. New York: Lippincott Williams and Willkins.
- [21] Hoster, F., J. E. Schmitz, and R. Daniel. 2005. "Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain". **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 66: 434-442.
- [22] Liu, D., N. A. Anderson, and L. L. Kinkel. 1996. "Selection and characterization of strains of *Streptomyces* suppressive to the tomato scab pathogen." **Can. J. Microbiol.** 42: 487-502.
- [23] Anees, M., A. Tronsmo, V. Edel-Hermann, L. G. Hjeljord, C. Heraud, and C. Steinberg. 2010. "Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*." **Fungal Biol.** 114: 691-701.
- [24] Smith, T. J., A. J. Hillier, and G. J. Lee. 1975. "The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract." **J. Dairy. Res.** 42: 123-138.
- [25] Pepler, H. L. 1982. "Yeast extracts." In: Rose, A. H. (ed.) **Fermented Food**. Academic Press. London.
- [26] Crueger, W., and A. Crueger. 1993. **Substratos para la fermentation industrial**. Acribia. Madrid.