การคัดเลือกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

Screening of Endophytic Actinomycetes That Against Fusarium wilt in Tomato

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล* เอมอร คำเพราะ และรัชฎาพร นวะพิฒ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190

บทคัดย่อ

การคัดแยกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทจากรากมะเขือเทศจำนวน 13 ตัวอย่าง ด้วยวิธี serial dilution spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ water yeast extract cellulose (WYEC) agar และอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment media for isolation of chitinase-producing actinomycetes (EMCA) สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลท เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหารเลี้ยงเชื้อ cornmeal agar (CMA) พบว่าไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างเท่ากับ 10.0 มิลลิเมตรขึ้นไป) มีจำนวน 2 ไอโซเลท คือไอโซเลท PEACW 2 และ PEACW 18 เมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tomato tissue extract medium (TTE medium) พบว่าไม่มีไอโซเลทใดสามารถยับยั้งได้ดีที่สุด แต่มีไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญในระดับดี (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างเท่ากับ 2.0-5.0 มิลลิเมตร) จำนวน 2 ไอโซเลท คือ PEACW 4 และ PEACW 18 เมื่อนำเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ในต้นพืช เป็นเวลา 28 วัน พบว่าไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ดีที่สุด โดยให้เปอร์เซนต์ของต้นที่ไม่เกิดโรคเท่ากับ 60 เปอร์เซนต์ มีจำนวน 2 ไอโซเลท คือไอโซเลท PEACW 4 และPEACW 18 ส่วน ไอโซเลท PEACW 1 PEACW 2 และ PEACW 8 ให้เปอร์เซ็นต์ของต้นที่ไม่เกิดโรคเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลทที่เหลือให้เปอร์เซ็นต์ของต้นที่ไม่เกิดโรคน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท PEACW 4 และ PEACW 18 เป็นเชื้อที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์เพื่อการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศต่อไป

คำสำคัญ : เอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท มะเขือเทศ โรคเหี่ยวเหลือง

Abstract

Eighteen endophytic actinomycetes isolates were obtained from thirteen surface-sterilised tomato roots by serial dilution spread plate technique using water yeast extract cellulose (WYEC) agar and enrichment media for isolation of chitinase-producing actinomycetes (EMCA) agar. All isolates were screened for *in vitro* antagonism towards *Fusarium oxysporum*, a causative agent of tomato wilt, using a cornmeal agar (CMA) and tomato tissue extract (TTE) agar. PEACW 2 and PEACW 18 showed significant inhibition (> 10.0 mm.) on CMA whereas on TTE medium, none of the isolates were a very strong antagonist, PEACW 4 and PEACW 18 showing moderate inhibition (2.0-5.0 mm.). *In vivo* biocontrol assays, during 28-days growth experiments, PEACW 4 and PEACW 18 were the most effective in reducing fusarium infection in tomato (60% reduction) while PEACW 1, PEACW 2, and PEACW 8 caused 50% reduction of fusarium infection. The remaining treatments also reduced the disease but were slightly less effective (< 50% reduction). The study indicated that endophytic actinomycete PEACW 4 and PEACW 18 may be used as a biological agent to control fusarium wilt in tomato.

Keywords: endophytic actinomycetes, tomato, fusarium wilt

1. บทนำ

มะเขือเทศจัดเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทั้งในแง่การบริโภคสด และการผลิตเพื่ออุตสาหกรรม ปริมาณการส่งออกมะเขือเทศผลสดและผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี มะเขือเทศที่ปลูกในปัจจุบัน แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือมะเขือเทศผลสด และมะเขือเทศอุตสาหกรรม เพื่อนำส่งให้โรงงานทำผลิตภัณฑ์มะเขือเทศแปรรูปต่างๆ เช่น มะเขือเทศเข้มข้น ซอสมะเขือเทศ และน้ำมะเขือเทศ มะเขือเทศเป็นพืชผักที่อยู่ในตระกูล Solanaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lycopersicon esculentum* สามารถเจริญเติบโตได้ในดินแทบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วนที่มีความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของดินในช่วง 6.0-6.8 และความชื้นของดินพอเหมาะ ต้องการแสงแดดเต็มที่ตลอดวัน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 21-24 องศาเซลเซียส พื้นที่ที่มีการส่งเสริมการปลูกเชิงธุรกิจ ได้แก่ จังหวัดในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พื้นที่ที่ปลูกมะเขือเทศอุตสาหกรรม ได้แก่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ตาก หนองคาย สกลนคร นครพนม บุรีรัมย์ อุดรธานี สุรินทร์ และกาฬสินธุ์ สำหรับพื้นที่ที่ปลูกมะเขือเทศผลสด ได้แก่จังหวัดนครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี เชียงใหม่ลำปาง ลพบุรี เชียงราย และนครราชสีมา (http://www.doae.go.th/plant/tomato.htm)

อย่างไรก็ตามปัญหาของการผลิตที่พบอยู่เสมอคือ ปัญหาโรคพืชที่ระบาดมาก และทำความเสียหายให้กับผลมะเขือเทศที่ปลูก ทำให้จำนวนผลผลิตลดน้อยลง มีราคาต่ำและคุณภาพไม่ดี ปัญหาโรคพืชของมะเขือเทศที่สำคัญและมีผลในเชิงเศรษฐกิจ คือ โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ (Fusarium wilt of tomato) เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่พบแพร่กระจายในดิน (soil-borne fungi) ทำความเสียหายให้ทุกพื้นที่การเพาะปลูกมะเขือเทศในประเทศไทย ต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคนี้จะแสดงอาการเหี่ยว เริ่มจากใบส่วนล่างของต้นเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเหี่ยวตายไปทั้งต้น ลักษณะสำคัญของเชื้อราสาเหตุโรคนี้คือ สามารถแทรกเข้าสู่ต้นพืช (endophytic fungi) โดยผ่านทางรากหรือลำต้น อาศัยอยู่ภายในต้นพืช ทำลายท่อน้ำท่ออาหาร จนกระทั่งพืชเหี่ยวตายทั้งต้น จึงเป็นปัญหาสำคัญในการใช้สารเคมีในการกำจัด การป้องกันโรคนี้อาจทำได้โดยการปรับปรุงดินก่อนปลูกด้วยปุ๋ยคอกและปูนขาว และการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืช เช่น พีซีเอ็นบี ไวตาแวกซ์ หรือพีซีเอ็นบี ซึ่งจะช่วยลดอัตราการเป็นโรคลงได้บ้าง แต่ถ้ามีการระบาดของโรคแล้วต้องงดปลูกมะเขือเทศในบริเวณนั้นเป็นเวลาอย่างน้อย 4 ปี การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคนี้ นอกจากจะยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรแล้ว ค่าใช้จ่ายยังสูง มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ และก่อปัญหาให้เชื้อดื้อต่อสารเคมีที่ใช้ ทำให้เกิดสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงมากขึ้น (Fuchs *et al.,* 1999) โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จึงเป็นปัญหาที่ต้องการการแก้ไขอย่างเร่งด่วน

การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศโดยชีววิธี จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและลดค่าใช้จ่ายได้มากกว่าในกรณีที่การแก้ไขปัญหาด้วยสารเคมีไม่สามารถควบคุมได้ (Lumsden and Papavizas, 1988) แนวทางหนึ่งที่เลือกใช้คือ เอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท (endophytic actinomycete) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ (antagonist actinomycetes) ที่สามารถเข้าไปเจริญในรากและต้นพืช และสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ โดยไม่ทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช มีรายงานว่าเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทบางชนิดกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชมีความสมบูรณ์ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้ (Kortemaa *et al.,* 1994) เอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์แรกถูกแยกจากพืชพวก non-leguminous plant คือ *Frankia* sp. (Benson and Silvester, 1993) เชื้อ *Streptosporangium* sp. ถูกแยกจากรากพืชหลายชนิดในประเทศอิตาลี (Sardi *et al.*,1992) และจากรากข้าวโพดในประเทศบราซิล (Araujo *et al*., 2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทช่วยป้องกันพืชจากโรคต่างๆ และบางสายพันธุ์ยังสร้างสารที่กระตุ้นการเจริญของต้นพืชอีกด้วย (Crawford *et al.,* 1993; Kim *et al.,* 2002; Bressan, 2003) จึงเป็นการเพิ่มปริมาณผลผลิตและช่วยลดผลกระทบที่เกิดจากโรคพืช เมื่อเปรียบเทียบเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทกับแอคติโนมัยสีทที่อยู่รอบรากพืช จะเห็นว่าเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทไม่จำเป็นต้องแข่งขันการเจริญกับแอคติโนมัยสีทหรือแบคทีเรียที่อยู่ในดิน นอกจากจะเจริญได้ดีในต้นพืชแล้ว ยังทำให้เนื้อเยื่อพืชมีความสมบูรณ์อีกด้วย ดังนั้น เอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท จึงเป็นเชื้อที่ได้รับความสนใจในแง่ของการนำไปพัฒนาเป็นสารควบคุมโรคพืชที่มีประสิทธิภาพต่อไป

การศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกหาเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อและการควบคุมการเกิดโรคภายในต้นมะเขือเทศ ซึ่งจะเป็นแนว

ทางหนึ่งในการพัฒนาเชื้อดังกล่าวในรูปของสารชีวภัณฑ์เพื่อการควบคุมการเกิดโรคภายในต้นพืชโดยตรง ซึ่งต่างจากการใช้สารเคมีฉีดพ่นหรือคลุกเมล็ดก่อนปลูก จึงเป็นวิธีที่ช่วยลดปัญหาสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อม ปัญหาสุขภาพของผู้บริโภคและนำไปสู่การเกษตรแบบยั่งยืน

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างต้นมะเขือเทศที่สมบูรณ์ซึ่งเจริญในแปลงเกษตรกร โดยขุดดินรอบ ๆ และถอดต้นพืชที่เจริญในดินดังกล่าว ระวังอย่าให้รากขาด นำต้นมะเขือเทศใส่ในถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง และนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2.2 การเตรียมตัวอย่างและการแยกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท

2.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างต้นมะเขือเทศมาล้างเศษดินออกให้หมดด้วยน้ำสะอาด จากนั้นแช่ในสารละลาย 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปล่อยให้แห้ง นำเฉพาะส่วนรากพืชมาบดให้ละเอียด เก็บในขวดปลอดเชื้อเพื่อเป็นตัวอย่างในการคัดแยกเชื้อต่อไป

2.2.2 การแยกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท

ทำการแยกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างที่เตรียมไว้โดยวิธี serial dilution spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ water yeast extract cellulose (WYEC) agar (Crawford *et al.,* 1993) และอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment media for isolation of chitinase-producing actinomycetes EMCA) (Thongchai *et al.,* 2003) บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 วัน คัดเลือกโคโลนีที่ให้บริเวณใส และมีลักษณะโคโลนีเฉพาะแตกต่างกันมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี cross streak plate technique เก็บสายพันธุ์บริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทบน casamino acids-yeast extract-glucose agar slant (YCED) (Crawford *et al.,* 1993) เพื่อการศึกษาต่อไป

2.3 การแยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

การแยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ; *F. oxysporum* โดยนำชิ้นส่วนของต้นมะเขือเทศที่เป็นโรควางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง white fluorescence เป็นเวลา 7 วัน คัดแยกโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยวิธี cross streak plate technique ทำการศึกษาลักษณะโคนีเดียของ ไอโซเลทที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคตามวิธีของ Barnett และ Hunter (1972) นำสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคที่คัดแยกได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการก่อโรคอีกครั้ง โดยการนำไปเพาะในดินที่ปลูกพืช สังเกตการเกิดโรคและทำการคัดแยกเชื้อซ้ำอีก เก็บสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคใน PDA slant เพื่อการศึกษาต่อไป

2.4 การคัดเลือกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum*

2.4.1 การคัดเลือกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการเพาะชิ้นวุ้น (0.5 ซม.^{2}) ของเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลทลงบนกึ่งกลางของครึ่งหนึ่งของอาหารเลี้ยงเชื้อ cornmeal agar (CMA agar) และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tomato tissue extract medium (TTE medium) บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน จากนั้นเพาะชิ้นวุ้น (0.5 ซม.^{2}) ที่มีเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* ลงบริเวณกึ่งกลางของครึ่งหนึ่งของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มต่อเนื่องอีกเป็นเวลา 4 วัน ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคโดยเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท วัดได้จากระยะห่างระหว่างโคโลนีของเชื้อทั้งสองชนิด

2.4.2 การคัดเลือกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ในต้นพืช

นำเมล็ดพืชมาทำความสะอาดพื้นผิวด้วย 10% clorox เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำเมล็ดวางลงบนจานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อที่มีกระดาษทิชชูปลอดเชื้อที่เปียกชุ่มด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้วคลุมด้วยกระดาษทิชชูอีกชั้น ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ด จากนั้นนำเมล็ดพืชที่เตรียมได้เพาะลงในกระถางที่บรรจุดินปลอดเชื้อ นำกระถางใส่ในถาดที่มีน้ำ แล้วบ่มในตู้มืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเมล็ดเริ่มงอก จึงย้ายไปไว้ที่ห้องเพาะเลี้ยงต้นกล้าจนต้นกล้ามีอายุสาม

สัปดาห์ แบ่งต้นกล้ามะเขือเทศที่เตรียมได้ออกเป็น 4 ชุด (ชุดละ 5 ต้น) ชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ให้นำรากของต้นกล้าแช่ในซัสเพนชั่นส์ของเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกไว้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการปลูกในกระถาง ส่วนชุดที่ 2 และชุดที่ 3 ให้นำรากของต้นกล้าแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการปลูกในกระถาง แล้วนำกระถางไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงต้นกล้า รดน้ำทุกๆ 2 วัน หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ให้เพาะสปอร์ซัสเพนชั่นของเชื้อราสาเหตุโรคลงในต้นกล้าชุดที่ 1 และชุดที่ 3 (ในอัตราส่วนดิน 25 กรัมต่อซัสเพนชั่นส์ของสปอร์ 1 มิลลิลิตร) ทำการตรวจผลการเจริญและการเกิดโรคของต้นพืชทุกๆ 7 วัน จนครบ 28 วัน

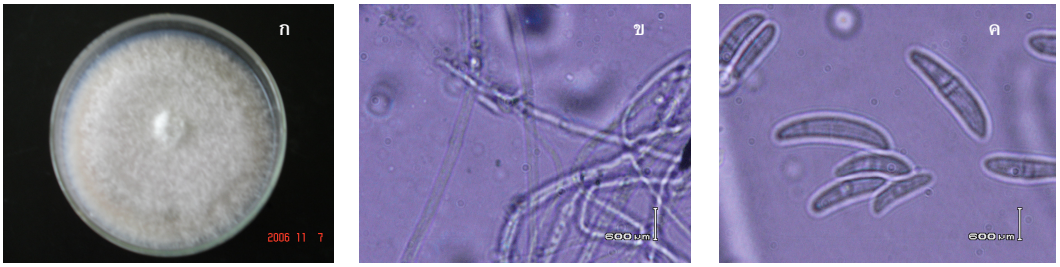
3. ผลการทดลอง

3.1 การแยกเชื้อเอนโดฟัยติคแอติโนมัยสีท

การคัดแยกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทจากรากมะเขือเทศจำนวน 13 ตัวอย่าง ด้วยวิธีฆ่าเชื้อที่ผิวตัวอย่างและเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WYEC agar และอาหารเลี้ยงเชื้อ EMCA agar สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลท โดยคัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ WYEC agar ได้ 4 ไอโซเลท ได้แก่ PEACW 12, PEACW 14, PEACW 16, PEACW 17 คัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ EMCA agar ได้ 14 ไอโซเลท ได้แก่ PEACW 1, PEACW 2, PEACW 3, PEACW 4, PEACW 5, PEACW 6, PEACW 7 PEACW 8, PEACW 9, PEACW 10, PEACW 11, PEACW 13, PEACW 15 และ PEACW 18

3.2 การแยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ

จากการเก็บตัวอย่างต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการเหี่ยวจากแปลงเกษตรกรรมในเขตจังหวัดอุบลราชธานี มาทำการคัดแยกเชื้อสาเหตุบนอาหาร PDA พบว่าเส้นใยเป็นสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสีชมพูอมม่วงอ่อนและเมื่ออายุมากจะเป็นสีม่วง (ภาพที่ 1ก) และเมื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยทำการ Scot tape technique พบว่าเส้นใยมีผนังกั้น (ภาพที่ 1ข) และมีการสร้างสปอร์แบบ macroconidia และ microconidia (ภาพที่ 1ค)



ภาพที่ 1 (ก) ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA medium เป็นเวลา 10 วัน (ข) ลักษณะเส้นใย และ (ค) ลักษณะสปอร์

3.3 ประสิทธิภาพการก่อโรคของ *Fusarium oxysporum*

จากการนำเชื้อ *F.oxysporum* ที่คัดแยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคเหี่ยวในต้นมะเขือเทศ โดยการตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *F.oxysporum* วางบนต้นมะเขือ-เทศที่ทำให้เกิดแผลบริเวณโคนต้น และเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม โดยไม่มีการเพาะเชื้อรา *F. oxysporum* ผลปรากฏว่าต้นมะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยวหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุ 3 วัน โดยมีการเหี่ยวทั้งลำต้นและตายในที่สุด แสดงว่าเชื้อสาเหตุโรคที่แยกได้เป็นเชื้อ *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวเหลืองในมะเขือเทศ

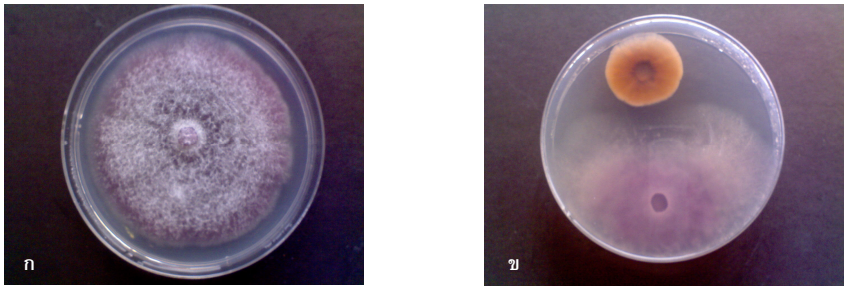
3.4 ประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. oxysporum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการนำเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้จำนวน 18 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA agar และ TTE medium พบว่าเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัย-สีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA agar ในระดับ Significant (S) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างเท่ากับ 10.0 มิลลิเมตรขึ้นไป) มีจำนวน 2 ไอโซเลท คือไอโซเลท PEACW 2 และ

PEACW 18 โดยมีรัศมีการยับยั้งเท่ากับ 12.0 และ 13.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญในระดับ Moderate (M) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างเท่ากับ 4.0-10.0 มิลลิเมตร) มีจำนวน 4 ไอโซเลท คือ PEACW 1, PEACW 4, PEACW 14, PEACW 16 สำหรับไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญในระดับ Negligible (N) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างน้อยกว่า 4.0 มิลลิเมตร) มีจำนวน 11 ไอโซเลท คือ PEACW 3, PEACW 5, PEACW 6, PEACW 7, PEACW 8, PEACW 9, PEACW 10, PEACW 11, PEACW 12, PEACW 13, PEACW 15 ไอโซเลทที่ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว มีจำนวน 1 ไอโซเลท คือ PEACW 17 (ดังแสดงในตารางที่ 1 ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดฟัยติดแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

ระดับความสามารถในการยับยั้ง	รหัสเชื้อ	จำนวน
Significant (S) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างเท่ากับ 10.0 มิลลิเมตรขึ้นไป)	PEACW2, PEACW18	2 ไอโซเลท
Moderate (M) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างเท่ากับ 4.0-10.0 มิลลิเมตร)	PEACW1, PEACW4, PEACW14, PEACW16	4 ไอโซเลท
Negligible (N) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างน้อยกว่า 4.0 มิลลิเมตร)	PEACW3, PEACW5, PEACW6, PEACW7, PEACW8, PEACW9, PEACW10, PEACW11, PEACW12, PEACW13, PEACW15	11 ไอโซเลท
Not Growth (NG) (เชื้อไม่เจริญ)	PEACW17	1 ไอโซเลท
	รวม	18 ไอโซเลท



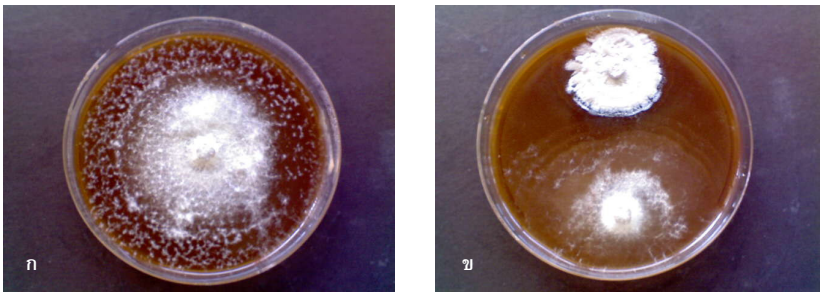
ภาพที่ 2 (ก) การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ *F. oxysporum* และ (ข) การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยเชื้อเอนโดฟัยติดแอคติโนมัยสีท PEACW 18 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA agar เป็นเวลา 10 วัน

เมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TTE medium พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อเอนโดฟัยติดแอคติโนมัยสีท มีการเจริญช้ากว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA agar จึงต้องทำการเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาที่นานกว่าคือ 25 วัน จากการทดลองพบว่าไม่มีไอโซเลทใดมีประสิทธิภาพในระดับ Significant (S) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างเท่ากับ 5.0 มิลลิเมตรขึ้นไป) ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญในระดับ Moderate (M) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างเท่ากับ 2.0-5.0 มิลลิเมตร) มีจำนวน 2 ไอโซเลท คือ PEACW4 และ PEACW18 สำหรับไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญในระดับ Negligible (N) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างน้อยกว่า 2.0 มิลลิเมตร) มีจำนวน 14 ไอโซเลท คือ PEACW1, PEACW2, PEACW3, PEACW6, PEACW7, PEACW8,

PEACW9, PEACW10, PEACW11, PEACW12, PEACW13, PEACW14, PEACW15, PEACW16 ไอโซเลทที่ไม่เจริญ มีจำนวน 2 ไอโซเลท คือ PEACW5 และ PEACW17 (ดังแสดงในตารางที่ 2 ภาพที่ 3)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TTE medium เป็นเวลา 25 วัน

ระดับความสามารถในการยับยั้ง	รหัสเชื้อ	จำนวน
Significant (S) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างเท่ากับ 5.0 มิลลิเมตรขึ้นไป)	-	0 ไอโซเลท
Moderate (M) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างเท่ากับ 2.0-5.0 มิลลิเมตร)	PEACW4, PEACW18	2 ไอโซเลท
Negligible (N) (รัศมีของบริเวณยับยั้งมีความกว้างน้อยกว่า 2.0 มิลลิเมตร)	PEACW1, PEACW2, PEACW3, PEACW6, PEACW7, PEACW8, PEACW9, PEACW10, PEACW11, PEACW12, PEACW13, PEACW14, PEACW15, PEACW16	14 ไอโซเลท
Not Growth (NG) (เชื้อไม่เจริญ)	PEACW5, PEACW17	2 ไอโซเลท
รวม		18 ไอโซเลท



ภาพที่ 3 (ก) การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ *F. oxysporum* และ (ข) การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* โรคโดยเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท PEACW4 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TTE agar เป็นเวลา 25 วัน

3.5 ประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. oxysporum* ในพืช

เมื่อนำเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีททั้ง 16 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในต้นพืช พบว่าเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ในต้นพืชได้ดีที่สุด โดยให้เปอร์เซนต์ของต้นที่ไม่เกิดโรคเท่ากับ 60 เปอร์เซนต์ มีจำนวน 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท PEACW 4 และไอโซเลท PEACW 18 เชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่ให้เปอร์เซนต์ของต้นที่ไม่เกิดโรคเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์ มีจำนวน 3 ไอโซเลท คือไอโซเลท PEACW 1, PEACW 2 และ PEACW 8 เชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่ให้เปอร์เซนต์ของต้นที่ไม่เกิดโรคเท่ากับ 40 เปอร์ เซนต์ มีจำนวน 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท PEACW 12 เชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่ให้เปอร์เซนต์ของต้นที่ไม่เกิดโรคเท่ากับ 30 เปอร์เซนต์ มีจำนวน 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท PEACW 13 เชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่ให้เปอร์เซนต์ของต้นที่ไม่เกิดโรคเท่ากับ 10 เปอร์เซนต์ มีจำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท PEACW 7, PEACW14 และ PEACW 16 และมีจำนวน 6 ไอโซเลทที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในต้นพืชได้ (ดังตารางที่ 3 ภาพที่ 4-5) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีททั้ง 16 ไอโซเลท ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของต้นพืช

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* เมื่อปลูกเชื้อในต้นมะเขือเทศ

รหัสเชื้อ	ต้นพืชที่ไม่เกิดโรค (%)	ต้นพืชที่เกิดโรค (%)	ต้นพืชที่ตาย (%)
PEACW 1	50	50	0
PEACW 2	50	50	0
PEACW 3	0	100	0
PEACW 4	60	40	0
PEACW 6	0	100	10
PEACW 7	10	90	0
PEACW 8	50	50	0
PEACW 9	0	100	0
PEACW 10	0	100	0
PEACW 11	0	100	0
PEACW 12	40	60	0
PEACW 13	30	70	0
PEACW 14	10	90	0
PEACW 15	0	100	0
PEACW 16	10	90	0
PEACW 18	60	40	0

ภาพที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ในต้นมะเขือเทศในระดับห้องปฏิบัติการ

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างรากของต้นมะเขือเทศที่สมบูรณ์ไม่เป็นโรค จำนวน 13 แหล่งตัวอย่าง มาทำการคัดแยกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท สามารถแยกเชื้อได้จำนวน 18 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้ทั้งหมด มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA agar พบว่าไอโซเลท PEACW 18 มีรัศมีการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากที่สุด รองลงมาคือไอโซเลท PEACW 2 โดยมีรัศมีการยับยั้งเท่ากับ 13.5 และ 12.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับประสิทธิภาพในการยับยั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TTE agars พบว่าไอโซเลท PEACW 4 มีรัศมีการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากที่สุด รองลงมาคือไอโซเลท PEACW 18 โดยมีรัศมีการยับยั้งเท่ากับ 3.0 และ 2.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ การที่อัตราการเจริญและประสิทธิภาพการยับยั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด มีความแตกต่างกันนั้น เป็นผลจากส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะ CMA agar ประกอบด้วยคอร์นมีล

ภาพที่ 5 การเจริญของต้นมะเขือเทศเมื่อปลูกเชื้อในต้นพืช เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองต่างๆ; (ก) ต้นมะเขือเทศที่มีการเพาะเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท PEACW 18 และเชื้อราสาเหตุโรค; (ข) ต้นมะเขือเทศที่มีการเพาะเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท PEACW 18; (ค) ต้นมะเขือเทศที่มีการเพาะเชื้อรา *F. oxysporum*; (ง) ต้นมะเขือเทศที่ไม่มีการเพาะเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทและเชื้อรา *F. oxysporum*

เปปโตน และน้ำตาลเด็กโตส ซึ่งกระตุ้นการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีทและเชื้อราได้มากกว่า TTE medium ซึ่งเตรียมจากน้ำสกัดจากต้นมะเขือเทศ สำหรับประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* อาจเกิดจากการที่เชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทมีการสร้างเอนไซม์หรือสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อราสาเหตุโรค (กาญจนา, 2542) จากการศึกษาของ Cao และคณะ (2005) พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ S96 มีการสร้างสาร siderophore ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวในต้นกล้วยเมื่อเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคจะลดลงเมื่ออยู่ใกล้โคโลนีของเชื้อ endophytic streptomyces และจากการศึกษาของ Thongchai และคณะ (2003) พบว่า *Streptomyces* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ได้โดยมีรัศมีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากกว่า 20 มิลลิเมตร

เมื่อนำเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีททั้งสิบหกไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ในต้นพืช พบว่าไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ในต้นพืชได้ดีที่สุด โดยให้เปอร์เซนต์ของต้นที่ไม่เกิดโรคเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท PEACW 4 และ PEACW 18 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดสอบประสิทธิการยับยั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TTE medium ส่วนไอโซเลท PEACW 1, PEACW 2, และ PEACW 8 ให้เปอร์เซนต์ของต้นที่ไม่เกิดโรคเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์ และไอโซเลทที่เหลือให้เปอร์เซนต์ของต้นที่ไม่เกิดโรคน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าต้นพืชที่มีการปลูกเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีทลงไปสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ โดยทำให้อาการเป็นโรคของพืชชะลอลง ลดอัตราการเกิดโรคและส่งผลให้ต้นพืชมีอัตราการรอดตายสูงขึ้นกว่าต้นพืชที่ไม่มีการปลูกเชื้อแอคติโนมัยสีท สรุปได้ว่าเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัย-สีทไอโซเลท PEACW 4 และ PEACW 18 เป็นเชื้อที่สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวที่มีสาเหตุจาก *F. oxysporum* ได้ จึงเหมาะสำหรับการนำไปวิจัยพัฒนาในระดับเรือนเพาะชำและการพัฒนาในรูปของสารชีวภัณฑ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2550 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัยพร้อมทั้งอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือครุภัณฑ์ต่างๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร. 2542. **การควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas solanacearum* โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค.** วิทยานิพนธ์เกษตรศาสตร์มหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Araujo, J. M., A. C. Silva and J. L. “Azevedo. 2000. Isolation of endophytic actinomycetes from root and leaves of maize (*Zeamays* L.)”. ***Braz. Arch. Biol. Technol.*** 43: 447-451.

Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1972. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi.** New York: Burgess Publishing Company.

Benson, D. R. and W. B. Silvester. 1993. “Biological of *Frankia* strains actinomycete symbionts of actinorhizal plant”. **Microbiol. Rev.** 57: 293-319.

Bressan, W. 2003. Biological control of miaze seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. ***"*** 48: 233-240.

Cao, L., Z. Qiu., J. You., H. Tan and S. Zhou. 2005. Isolation and characterization of andophytic streptomycetes antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. ***FEMS Microbiol. Lett***. 247: 147-152.

Crawford, D. L., J. M. Lynch, J. M. Whipp, and M. A. Ousley. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3899-3905.

Fuchs, J-G., Y. Moenne-Loccoz, and G. Defago. 1999. “Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 to protect tomato against fusarium wilt”. **Biol. Cont.** 14: 105-110.

Kim, B-J., G. J.Choi, K. Y. Cho, H. Yang, C. Chin, C-H. Lee, and Y. Lim. 2002. “Antifungal activities against *Plsamodiophora brassicae* causing club root”. **J. Microbiol. Biotechnol.** 12: 1022-1025.

Kortemaa, H., Rita, H., Haahtela, K., Smolander, A. 1994. “Root-colonization ability of antagonistic *Sterptomyces griseoviridis”*. **Plant Soil.** 163: 77-73.

Lumsden, R.D. and Papavizas, G.C. 1988. Biological control of soilborne plant pathogen. *Am. J. Altern. Agric.* 3: 98-101.

Sardi, P., M. Saracchi, S. Quaroni, B. Petrolini, G. E. Borgonovi and S. Merli. 1992. “Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots”. **Appl. Environ. Microbiol**. 58: 2691-2693.

Thongchai, T., F.P. John. and L. Saisamorn. 2003. “Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity”. **World J. of Microbiol. and Biotechnol.** 19: 381-385.

http://www.doae.go.th/plant/tomato.htm. 2551. 15 ธันวาคม.