



## การคัดเลือก จำแนกและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Streptomyces* sp. SAURU59 ที่ใช้กำจัดเชื้อราก่อโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน

### Selection, Classification, and Study of the Properties of *Streptomyces* sp. SAURU59 against Pathogenic Fungi Causing Durian Root and Stem Rot Disease

วันวิสาข์ พิระภาค<sup>1</sup>, พัชรชัย ปิ่นนาค<sup>1</sup> และ ปิลันธนา ฐาปนพงษ์วรกุล<sup>2\*</sup>  
Wanwisa Pirapak<sup>1</sup>, Pattachai Pinnak<sup>1</sup> and Pilunthana Thapanapongworakul<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> หลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ ประเทศไทย

<sup>2</sup> ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย

<sup>1</sup>Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University, Thailand

<sup>2</sup>Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Thailand

Received : 3 April 2023

Revised : 27 September 2023

Accepted : 2 October 2023

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินในเขตอุทยานลำน้ำน่าน อำเภอท่าปลา จังหวัดอุดรดิตถ์ ด้วยวิธี soil dilution plate และวิธี dual culture เพื่อใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน รวมทั้งจัดจำแนกชนิด และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีท สามารถคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 69 ไอโซเลท พบเพียงไอโซเลท SAURU59 มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุดเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA พบว่า ไอโซเลท SAURU59 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีการสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสาย บิดเป็นเกลียว สปอร์มีผิวเรียบ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวเหมือนกับเชื้อ *Streptomyces rimosus* เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Streptomyces rimosus* SAURU59 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไคติเนสบนอาหารทดสอบได้ อีกทั้งผลิตสารกรดอินโดล-3-แอซิดิก ได้เท่ากับ 30.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 10 วัน

**คำสำคัญ** : รากเน่าโคนเน่า ; ทุเรียน ; แอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์



### Abstract

This research aimed to select an actinomycete strain from soil collected in Nan River National Park, Tha Pla District, Uttaradit Province, using the soil dilution plate method and dual culture technique to examine *Phytophthora palmivora*, the causative agent of durian root and stem rot disease. The research also included the identification of antagonistic actinomycetes and an investigation into the biochemical properties of these actinomycetes. A total of 69 isolates were obtained from the soil, with only isolate SAURU59 found to exhibit the highest efficiency in inhibiting the growth of the fungal pathogen, achieving a 75 percent inhibition rate. Morphological characterization and analysis of the 16S rRNA nucleotide sequence revealed that SAURU59 was gram-positive and had spores formed in a chain-like structure with a spiral and smooth surface. Additionally, the nucleotide sequence of SAURU59 showed similarity to *Streptomyces rimosus*. This isolate showed the ability to produce cellulase and chitinase enzymes, as well as 30.78 µg/ml of indole-3-acetic acid (IAA) within 10 days.

**Keywords :** root and stem rot disease ; durian ; antagonistic actinomycete



## บทนำ

ทุเรียนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Durio zibethinus* Murray เป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยไทยเป็นผู้ส่งออกทุเรียนเป็นอันดับ 1 ของโลก มีปริมาณการส่งออก 620,892.72 ตัน มูลค่า 2,072.79 ล้านดอลลาร์สหรัฐ คิดเป็น 77.33 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าการส่งออกทุเรียนสดของโลก (Surat Thani Provincial Agriculture and Cooperatives Office, 2021) มีแหล่งปลูกในเชิงการค้าอยู่ในภาคตะวันออก (จันทบุรี ระยอง และตราด) ภาคใต้ (ชุมพร นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี และยะลา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ศรีสะเกษ) และภาคเหนือ (อุตรดิตถ์) (Plant Protection Development Research Office, 2019) โดยสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในจังหวัดอุตรดิตถ์ คือหอมทอง พันธุ์เมือง หลงลับแล และหลินลับแล ปัญหาเรื่องโรคพืชส่งผลให้การผลิทุเรียนมีคุณภาพและผลผลิตลดลง จากรายงานของ Department of Agriculture (2019) การปลูกทุเรียนพบโรคต่าง ๆ หลายชนิด ได้แก่ โรครากเน่าโคนเน่า โรคผลเน่า โรคใบติดหรือใบไหม้ โรคใบจุดสนิม โรคแอนแทรกสนิส โรคราสีชมพู และโรคราแป้ง โดยเฉพาะโรครากเน่าโคนเน่ามีสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญ และส่งผลกระทบต่อการผลิตทุเรียนของจังหวัดอุตรดิตถ์เป็นอย่างมาก เนื่องจากสายพันธุ์ที่ปลูกไม่ทนทานต่อโรครากเน่าโคนเน่า พบเชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชได้ทั้งส่วน ราก ลำต้น กิ่ง ใบ และผล ทำให้ทุเรียนที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย มีลักษณะใบเหี่ยว โคนต้นและกิ่งแสดงอาการแผลจุดดำน้ำ เปลือกล่อนเน่าเป็นสีน้ำตาล เนื้อไม้ด้านในเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงถึงน้ำตาลเข้ม ส่งผลให้ต้นทุเรียนทรุดโทรมและตายในที่สุด โดยที่เชื้อราสาเหตุสามารถอาศัยอยู่ในดิน และสามารถแพร่ระบาดได้ทั้งในน้ำและในอากาศ ทำให้การแพร่ระบาดเกิดขึ้นได้ง่ายเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว (Office of Agricultural Research and Development Region 6, 2022) ปัจจุบันพบว่ามีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชเป็นจำนวนมาก ซึ่งส่งผลต่อการเกิดมลพิษในสิ่งแวดล้อม สร้างสารตกค้างในอากาศ ในดิน และผลผลิตทางการเกษตร ในขณะที่เดียวกันได้มีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีได้นำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย พบว่ามีการใช้สารชีวภัณฑ์จากเชื้อรา (fungi) หรือจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria) จากรายงานวิจัยของ Soyong (2010) กล่าวว่าการใช้เชื้อรา *Chaetomium* sp. สามารถควบคุมเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าในทุเรียนได้ นอกจากนี้ การใช้ไรโซแบคทีเรีย (rhizobacteria) หรือแบคทีเรียที่เจริญบริเวณรอบรากพืชในการควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของเมลอน *Acidovorax citrulli* (Kaewnamarn et al., 2018) และการใช้เชื้อ *Gelasinospora calospora*, *G. hippopotama*, *G. indica* และ *G. stellata* ซึ่งแยกจากมูลสัตว์ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ได้แก่ *P. palmivora*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum capsici* และ *Curvularia lunata* (Piasai & Sudsanguan, 2018)

นอกจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่กล่าวข้างต้น ยังมีการนำเชื้อแอคติโนมัยซีท ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเส้นใยสองแบบ คือ vegetative mycelium และ aerial mycelium และมีความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด สายพันธุ์ที่มีรายงานการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่น เชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces*, *Amycolatopsis* และ *Nocardia* เป็นต้น โดยมีกลไกการเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ได้แก่ ความสามารถในการแย่งพื้นที่ในการเจริญและการแย่งสารอาหาร การสร้างยาปฏิชีวนะ สารไซเดโรฟอรั (siderophores) เอนไซม์ไลติก (lytic enzyme) สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile Organic Compounds, VOCs) และการกระตุ้นให้พืชมีความต้านทานต่อโรคโดยการกระตุ้นระบบป้องกัน



ตนเองของพืชให้สร้างผนังเซลล์ให้แข็งแรงมากขึ้น และเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกให้เปลี่ยนเป็นสารควิโนน ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อรา นอกจากนี้ แอคติโนไมซีทยังส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นพัฒนาการของพืชโดยการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืช การตรึงไนโตรเจนในบรรยากาศ และการละลายแร่ธาตุในดิน (Torres-Rodriguez *et al.*, 2022) ตัวอย่างการศึกษาที่มีการใช้เชื้อแอคติโนไมซีทที่คัดแยกจากแหล่งต่าง ๆ ในธรรมชาติ มาเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น การใช้เชื้อ *Streptomyces* ที่แยกจากดินบริเวณรอบรากหรือบริเวณไรโซสเฟียร์ (rhizosphere) จำนวน 5 ไอโซเลท สามารถควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่า และอาการแคระแกร็นในถั่วเหลือง และยังพบว่าช่วยส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองโดยการสร้างกรดอินโดล-3-แอซีติก (Indole-3-Acetic Acid) และมีความสามารถในการละลายฟอสเฟตด้วย (Sari *et al.*, 2021) การศึกษาผลของเชื้อแอคติโนไมซีทที่แยกจากดินบริเวณรอบรากพืชช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืช คือ *Colletotrichum capsica*, *Curvularia lunata* และ *Fusarium solani* (Khompun & Thabthim, 2016) การควบคุมโรคใบจุดในปาล์มน้ำมัน จากเชื้อราสาเหตุ *Curvularia oryzae* โดย *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus* จากการทดลองนี้พบว่า *S. hygroscopicus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพแปลงปลูก และช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase เอนไซม์ peroxidase และเอนไซม์ polyphenol oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการสร้างสารลิกนินในกระบวนการป้องกันตนเองของพืชอาศัยได้ (Sunpapao *et al.*, 2018) นอกจากนี้ Hassan *et al.* (2017) ได้ศึกษาเชื้อแอคติโนไมซีทเอ็นโดไฟท์ *Streptomyces* sp. strain MBCN152-1 ในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรครากเน่าในต้นกล้ากระหล่ำปลีในสภาพห้องปฏิบัติการและในโรงเรือน

อย่างไรก็ตาม การศึกษาการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีในทุเรียน เพื่อเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมีเกษตรยังมีรายงานการวิจัยค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะการใช้เชื้อแอคติโนไมซีทปฏิปักษ์ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช และการศึกษาถึงคุณสมบัติของเชื้อในการกระตุ้นการเจริญของพืช โดยเฉพาะการศึกษายับยั้งเชื้อสาเหตุโรคในทุเรียน ดังนั้น งานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการแยกเชื้อแอคติโนไมซีทจากดิน และคัดเลือกการเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน ตลอดจน การจัดจำแนกชนิดและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนไมซีทปฏิปักษ์ด้วย

## วิธีดำเนินการวิจัย

### การคัดแยกและการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน

สำรวจโรครากเน่าโคนเน่าในสวนทุเรียนของเกษตรกรผู้ปลูกทุเรียนพันธุ์หมอนทองและพันธุ์หลงลับแล ตำบลหัวดง อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์ ในปี พ.ศ. 2565 ช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม โดยเก็บตัวอย่างเนื้อไม้บริเวณลำต้นของทุเรียนที่แสดงอาการผิดปกติของกิ่งมีลักษณะเปื่อยยุ่ย เป็นปื้นสีน้ำตาลเข้ม เปลือกล่อนจากต้นได้ง่าย จากต้นทุเรียนพันธุ์หมอนทอง อายุ 15 ปี จำนวน 2 ตัวอย่าง และพันธุ์หลงลับแล อายุ 8 ปี จำนวน 6 ตัวอย่าง ทำการศึกษาอาการของโรคที่พบ



การแยกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าจากเนื้อไม้ที่เป็นโรค ด้วยวิธี tissue transplanting โดยใช้มีดชุดลอกผิวเปลือกทุเรียนภายนอกบริเวณที่เป็นโรคออก จากนั้นใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจือจางเนื้อเยื่อภายในที่เป็นโรค ขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที คีบชิ้นเนื้อเยื่อวางลงบนอาหาร water agar (WA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูเส้นใยเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เมื่อพบการเจริญของ เส้นใยเชื้อราออกมาจากเนื้อไม้จึงทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี hyphal tip isolation เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อสาเหตุต่อไป

การทดสอบความสามารถในการก่อโรคด้วยวิธี detached leaf (Suksiri *et al.*, 2018) บนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง อายุ 5 ปี โดยการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ Cork Borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนี แล้วย้ายเชื้อราวางลงบนใบทุเรียนที่โตเต็มที่ แบ่งการปลูกเชื้อเป็น 2 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1 ทำแผลบนใบโดยใช้เข็มที่ฆ่าเชื้อแล้วที่มลงบนใบ จำนวน 3 แผลต่อจุด และกรรมวิธีที่ 2 ไม่ทำแผล โดยทำการทดสอบชุดละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 1 ใบ โดยใน 1 ใบแบ่งเป็นฝั่งซ้ายของใบเป็นชุดทดลองที่วางเชื้อราสาเหตุโรค และฝั่งขวาของใบเป็นชุดควบคุมซึ่งวางชิ้นส่วนของอาหาร PDA จากนั้นนำไปบ่มในกล่อง moist chamber เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสังเกตการเกิดโรค โดยสังเกตจากจุดสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นบริเวณทดสอบ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลเพื่อคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคไอโซเลทที่มีขนาดแผลใหญ่ที่สุด หรือมีอาการของโรครุนแรงที่สุดนำไปใช้ทดสอบต่อไป

#### การจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่า

การสกัดดีเอ็นเอประยุกต์วิธี CTAB protocol จากวิธีการของ Doyle and Doyle (1990) โดยนำเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 6 วัน บดด้วยไนโตรเจนเหลว นำเส้นใยที่บดละเอียด ประมาณ 1 – 2 กรัม ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2 มิลลิลิตร และเติม  $\beta$ -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ 2x CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำหลอดไปต้มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำตาลละลายคอลลอยด์: แอลกอฮอล์ ไอโซเอมิล (อัตราส่วน 24:1, ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในบริเวณ ITS-nrDNA โดยใช้ไพเมอร์ (Primer) คือ Forward ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') และ Reverse ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTG-ATATGC-3') (Suksiri *et al.*, 2018) โดยมีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x Taq buffer, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, Primer ชนิดละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase 5 Unit กำหนดอุณหภูมิ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ PCR purification test kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) และส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในบริเวณ ITS-nrDNA ที่ได้กับฐานข้อมูลที่มีรายงานใน GenBank ที่อยู่บนเว็บไซต์ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม



Blastn เพื่อทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรค สร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA11 โดยวิธี Neighbor-joining และ Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

#### การคัดแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากดิน

แยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินในป่าเบญจพรรณ โดยเก็บจากอุทยานลำน้ำน่าน อำเภอท่าปลา จังหวัดอุตรดิตถ์ (พิกัด 17°44'53.1"N, 100°27'41.6"E) นำดินมาผึ่งให้แห้ง แยกเศษซากพืชออกจากดิน จากนั้นนำดินมาแยกเชื้อด้วยวิธี dilution plate (Sriyapai *et al.*, 2017) โดยชั่งตัวอย่างดินปริมาตร 10 กรัม ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งให้ตกตะกอน เจือจางสารแขวนลอยของดินที่ระดับความเจือจาง  $10^{-3} - 10^{-5}$  เท่า จากนั้นนำสารแขวนลอยดินปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ไปแยกเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch Casein Agar (SCA) และ Humic Acid-Vitamin Agar (HV) ที่เติม Nalidixic Acid (25 µg/ml) และ Ketoconazole (100 µg/ml) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อรา บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 - 14 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เกิดขึ้น แยกโคโลนีของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เจริญขึ้นมาบนผิวหน้าอาหารที่มีลักษณะที่แตกต่างกันมาเลี้ยงบนอาหาร International *Streptomyces* Project 2 (ISP-2) (Himaman *et al.*, 2016) กำหนดรหัสของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้ เช่น SAURU01 โดยอักษรลำดับแรก คือ ตัวอย่างดิน (S, Soil) ลำดับที่ 2 คือ แอกติโนมัยซีท (A, Actinomycetes) และลำดับที่ 3 - 5 คือสถานที่ทำการวิจัย คือ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ (URU, Uttaradit Rajabhat University) และลำดับที่ 6 คือ ลำดับในการแยกเชื้อ ตามลำดับ

#### การคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน ได้แก่ เชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลทที่ทำให้เกิดโรครุนแรงมากที่สุดจากการทดสอบความสามารถในการก่อโรคด้วยเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้โดยวิธี dual culture plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยขีดเชื้อแอกติโนมัยซีทห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร จากนั้นใช้ Cork Borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขอบโคโลนีของเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 10 วัน วางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตรในด้านตรงข้ามกับเชื้อแอกติโนมัยซีท ในชุดควบคุมทำการขีดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วในตำแหน่งเดียวกับชุดทดลอง ทดสอบจำนวน 5 ซ้ำต่อไอโซเลท บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 7 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อราสาเหตุโรคเจริญถึงขีดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม) บันทึกขนาดรัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม (R1) และชุดทดสอบ (R2) เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค (Percentage of inhibition of radial growth (PIRG)) โดยใช้สูตรตามวิธีการของ Sari *et al.* (2021) ดังนี้

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



แบ่งระดับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค ดังนี้

1. ความสามารถในการยับยั้งต่ำ มี PIRG น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์
2. ความสามารถในการยับยั้งปานกลาง มี PIRG เท่ากับ 50 - 74 เปอร์เซ็นต์
3. ความสามารถในการยับยั้งสูง มี PIRG มากกว่าหรือเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์

ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าสูงสุด เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของพืช และการจำแนกชนิดของเชื้อต่อไป

#### การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติ

เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ถูกคัดเลือกมา (มีค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าสูงสุด) บนอาหารแข็ง International Streptomyces Project (ISP) ได้แก่ Yeast Malt Extract Agar (ISP-2), Oatmeal Agar (ISP-3), Inorganic Salts-Starch Agar (ISP-4), Glycerol Asparagine Agar (ISP-5), Nutrient Agar (NA), Potato Dextrose Agar (PDA) และ GAUZE'S Synthetic Medium No.1 ด้วยวิธี streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบลักษณะโคโลนี สปอร์ และเส้นใย ทดสอบการย่อยสลายแบบแกรมของ เชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร NA อายุ 1 วัน ตรวจสอบรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง อธิบายลักษณะการเจริญของแบคทีเรียและการวิเคราะห์การเทียบสีของโคโลนี โดยใช้ The ISCC-NBS Color Chart (Kelly, 1958) และนำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เลี้ยงบนอาหาร ISP-2 เป็นเวลา 21 วัน ไปศึกษาลักษณะสัณฐานของเซลล์และการสร้างสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM, JSM -5910LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)

#### การจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA

สกัดดีเอ็นเอเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยใช้ชุดสกัด DNA Extraction Kit (Shanghai Generay Biotech, Shanghai, China) (Lu *et al.*, 2016) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ Forward 27F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') และ Reverse 1492R (5'-ACG GCT ACC TTGTTA CGA CTT-3') (Heuer *et al.*, 1997) โดยมีปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x Taq buffer, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, Primer ชนิดละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase 5 Unit PCR Condition ดังนี้ ช่วง Initial Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ช่วง Annealing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ต่อด้วย 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จำนวน 30 รอบ และช่วง Extension เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ PCR purification test kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) และส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA Gene ที่ได้กับฐานข้อมูลที่มีรายงานใน GenBank ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อทำการระบุชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติ สร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA11 โดยวิธี Neighbor-joining และ Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ



### การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือก

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูโลส โดยการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลว Carboxymethyl Cellulose (CMC) เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารแข็ง CMC ที่เจาะหลุมแล้วด้วย Cork Borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำ congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 กรัม ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร ราดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้นาน 15 นาที ล้างสีด้วยสารละลาย NaCl 1 โมลาร์ สังเกตโซนใส (clear zone) ที่ปรากฏ (Sriyapai *et al.*, 2017)

ทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไคติน โดยการนำเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไคตินเนส ด้วยวิธีการจุดเชื้อ (point inoculation) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 ที่เติม 5% (w/v) colloidal chitin จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน สังเกตความสามารถในการย่อยสลายไคตินจากบริเวณ clear zone ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี (Sriyapai *et al.*, 2017)

ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดอินโดล-3-แอซีติก (Indole-3-Acetic Acid, IAA) โดยเลี้ยงแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลว ISP-3 ผสมกับ Tryptophan ปริมาตร 1 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 วัน และ 10 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาแยกส่วนสารละลายใสโดยการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ตกตะกอนที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนสารละลายใสไปวิเคราะห์หาปริมาณ IAA โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมกับสาร Salkovski Reagent (0.5 โมลาร์ของ 35 เปอร์เซนต์ (w/v)  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  และ 35 เปอร์เซนต์ของ  $HClO_4$ ) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (PG Instruments Limited, United Kingdom) คำนวณปริมาณ IAA ที่เชื้อสร้างขึ้นเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร IAA บริสุทธิ์ (MW = 175.19, Loba Chemie, India) ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 50, 100, 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Sriyapai *et al.*, 2017)

### **ผลการวิจัย**

#### การแยก การทดสอบความสามารถในการก่อโรค และการจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนในพื้นที่ปลูกทุเรียน ตำบลห้วยด่าง อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์ จำนวน 8 ตัวอย่าง พบแสดงอาการผิวเปลือกของกิ่งมีลักษณะเปื่อยยุ่ย เป็นเปื้อนสีน้ำตาลเข้ม เปลือกอ่อนจากต้นได้ง่าย (Figure 1) และแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าทั้งหมด 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท RR01 – RR05 เมื่อนำทุเรียนไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบทุเรียน หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 วัน พบว่าใบทุเรียนมีอาการจุดดำน้ำขนาดประมาณ 3 – 12 มิลลิเมตร โดยไอโซเลท RR05 ทำให้เกิดโรครุนแรงมากที่สุด มีขนาดแผลเฉลี่ยเท่ากับ 10.67 มิลลิเมตร ต่อมาแผลมีการขยายวงกว้างทำให้ใบทุเรียนเกิดแผลสีน้ำตาล แผลลามตลอดทั้งใบภายในระยะเวลา 10 วัน จึงนำไอโซเลท RR05 ไปทำการจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าและใช้เป็นเชื้อทดสอบต่อไป ในการวิเคราะห์ลำดับ



นิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS-nrDNA region ของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าในทุเรียน พบว่าไอโซเลท RR05 (Accession number คือ OR584133) เป็นเชื้อรา *Phytophthora palmivora* โดยจาก Phylogenetic tree ไอโซเลท RR05 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *P. palmivora* OK349485, *P. palmivora* L41384 และ *P. palmivora* OR427309 (Figure 2)



Figure 1 Rot and stem rot disease symptoms on durian tree.

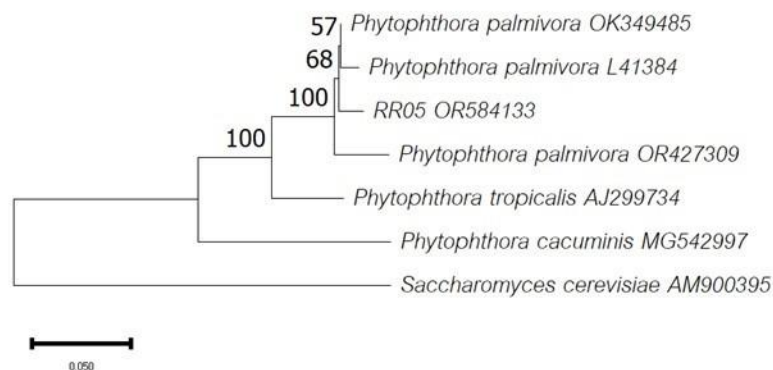


Figure 2 Neighbor-joining tree based on ITS-nrDNA region sequences showing the position of isolate RR05 versus related species of *Phytophthora*. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1,000 reassembled datasets, in which only the branches with >50% bootstrap support are labeled. The scale bar at the bottom indicates genetic distance units based on Nei's genetic distance.

*การแยกและการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora palmivora**

เมื่อทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินในเขตอุทยานลำน้ำน่าน อำเภอท่าปลา จังหวัดอุตรดิตถ์ บนอาหาร SCA และ HV agar สามารถแยกได้ทั้งหมด 69 ไอโซเลท (SAURU01 – SAURU69) จากนั้นนำเชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 69 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* โดยวิธี dual culture อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน (Table 1, Figure 3) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 60 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ถือได้ว่ามีความสามารถในระดับต่ำ มีจำนวน 8 ไอโซเลท (SAURU01, SAURU32, SAURU42, SAURU46, SAURU52, SAURU56, SAURU58 และ SAURU60) มีความสามารถในการยับยั้งระดับปานกลาง (50 – 74 เปอร์เซ็นต์) และมีเพียง 1 ไอโซเลท คือ SAURU59 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคในระดับสูง โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* สูงที่สุดเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์

**Table 1** Inhibition level and Percentage of inhibition of radial growth of soil actinomycetes isolates on the growth of mycelium of *P. palmivora* on PDA media at 10 days.

Inhibition level	Percentage of inhibition of radial growth (PERG %)	Isolates
High	> 75	SAURU59
Moderate	50 – 74	SAURU01, SAURU32, SAURU42, SAURU46, SAURU52, SAURU56, SAURU58, SAURU60
Low	< 50	SAURU02 – 31, SAURU33 – 41, SAURU43 – 45, SAURU47 – 51, SAURU53 – 55, SAURU57

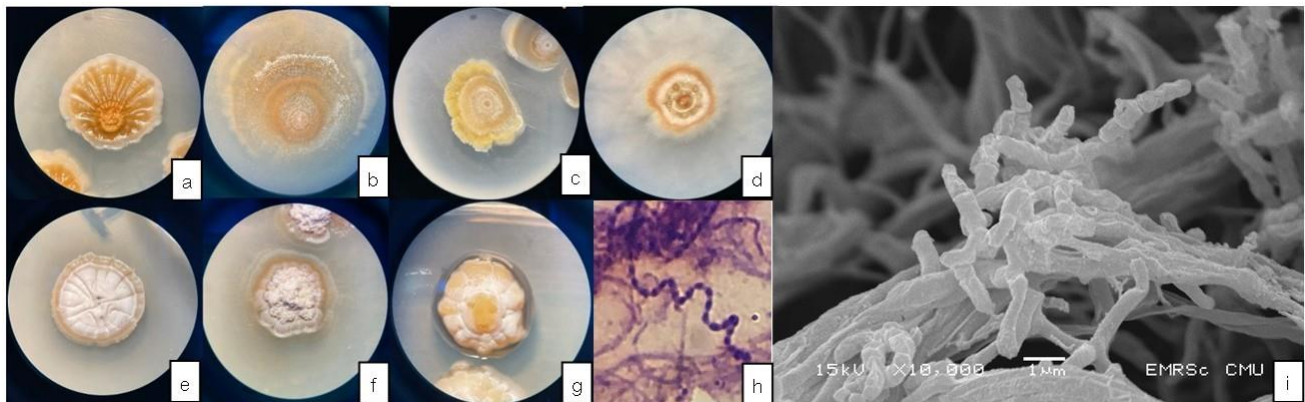


**Figure 3** Clear zone of actinomycetes isolate SAURU59 against *Phytophthora palmivora* (PA) mycelium on PDA medium incubation for 10 days.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติและการจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติไอโซเลท SAURU59 (Figure 4) พบว่าสามารถเจริญบนอาหารแข็ง ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5, NA, PDA และ GAUZE'S Synthetic Medium No.1 (Figures 4a – 4g) ได้ จากการย้อมสีแบบแกรมพบว่าไอโซเลท SAURU59 เป็นชนิดแกรมบวก (gram positive, Figures 4h) โคโลนีมีลักษณะแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างสปอร์ต่าง ๆ และมีการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 7 ชนิด (Table 2) เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานของเซลล์และการสร้างสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเชื้อมีการสร้างสปอร์ต่อการเป็นสาย (chain) บิดเป็นเกลียว และสปอร์มีผิวเรียบ (Figure 4i)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิบัติ โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือน (sequence alignment) ในฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท SAURU59 (Accession number คือ OR584154) สามารถระบุได้เป็น *Streptomyces rimosus* โดยจาก Phylogenetic tree มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *S. rimosus* strain JCM 4667 (NR024762) และ *S. rimosus* strain SCSB5 (MG892847) (Figure 5)



**Figure 4** Morphology characterization of antagonistic actinomycetes isolate SAURU59, colony on ISP-2 (a), ISP-3 (b), ISP-4 (c), ISP-5 (d), NA (e), PDA (f) and GAUZE'S Synthetic Medium No.1 (g) respectively, gram stain under microscope (x100) (h) and under Scanning Electron Microscopy (i)



**Table 2** Morphology characterization of antagonistic actinomycetes isolate SAURU59 culture on various media.

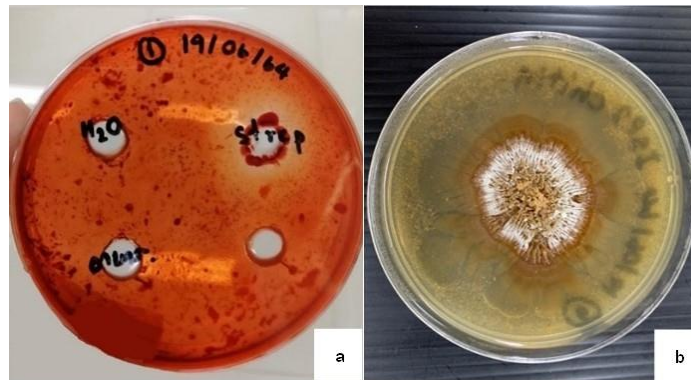
Medium	Color of aerial mycelium	Color of substrate mycelium
ISP-2	Light yellow	Deep yellow
ISP-3	Light yellow	Deep yellow
ISP-4	Yellowish white	Moderate yellow
ISP-5	Dark orange yellow	Yellowish brown
NA	Light olive brown	Yellowish gray
PDA	Yellowish white	Grayish yellow
GAUZE'S Synthetic Medium No.1	Pale greenish yellow	Yellowish white



**Figure 5** Neighbor-joining tree based on 16S rRNA region sequences showing the position of isolate RR05 versus related species of *Streptomyces*. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1,000 reassembled datasets.

คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแอสคิตินมัยซีที่คัดเลือก

การศึกษาคูณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแอสคิตินมัยซีที่คัดเลือกต่อความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไคตินเนส (Figure 6) และสาร IAA พบว่าไอโซเลท SAURU59 สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้โดยปรากฏ clear zone บนอาหาร CMC มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย  $2.45 \pm 0.35$  เซนติเมตร (Figure 6a) และมีการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสโดยให้ clear zone บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 ที่เติม colloidal chitin 5 เปอร์เซ็นต์ (Figure 6b) นอกจากนี้ พบว่าไอโซเลท SAURU59 สามารถสร้าง IAA ได้เท่ากับ  $2.68 \pm 0.85$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ  $30.78 \pm 2.25$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลาการบ่มเชื้อ 5 และ 10 วัน ตามลำดับ



**Figure 6** Plant Growth Promoter Assay, Cellulase test on CMC Medium (a), and Chitinase test on ISP-2 with 5% colloidal chitin (b). The clear zone is indicated by the arrow.

### วิจารณ์ผลการวิจัย

โรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนเป็นโรคที่มีความสำคัญ ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ส่งผลกระทบต่อการผลิตทุเรียนเป็นอย่างมาก เชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกส่วน ทำให้ต้นทุเรียนทรุดโทรมและตายในที่สุด ในปัจจุบันเกษตรกรใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรค (Department of Agriculture, 2019) การควบคุมโรคโดยชีววิธีเป็นปัจจัยทางเลือกหนึ่งที่สามารถช่วยลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมซึ่งมุ่งสู่การขับเคลื่อนการควบคุมโรคพืชอย่างยั่งยืนในอนาคตต่อไป จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอสคิตินมัยซีที่คัดแยกจากดินต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนที่พบในเขตพื้นที่ปลูกอำเภอฉะบับแล จังหวัดอุตรดิตถ์ โดยเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกและระบุชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ITS-nrDNA พบว่าเป็น *P. palmivora* มีความคล้ายคลึงกับรายงานของ Suksiri *et al.* (2018) พบเชื้อราหลายชนิด เช่น *P. palmivora*, *Pythium cucurbitacearum*, *Py. deliense*, *Py. splendens*, *Mortierella chlamydospora*, *M. capitata* และ *Mortierella sp.* เป็นต้น ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าในพื้นที่ปลูกทุเรียนจังหวัดชุมพร นอกจากเชื้อราในสกุล *Mortierella*, *Pythium* และ *Phytophthora* แล้ว ยังพบงานวิจัยของ Chantarasiri and Boontanom (2021) รายงานพบว่าเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Lasiodiplodia pseudotheobromae* เป็นเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนสามารถเข้าทำลายทุเรียนได้เช่นกัน

ในการทดสอบศักยภาพในการเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พบว่าเชื้อ *Streptomyces rimosus* SAURU59 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* เชื้อสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนได้ในระดับสูง เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อ *Streptomyces sp.* มีการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ สังเกตได้จากการเกิด clear zone บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีรายงานว่าสารทุติยภูมิที่เชื้อแอสคิตินมัยซีที่สร้างนั้นจะเป็นสารปฏิชีวนะ อาทิเช่น streptomycin, neomycin, tetracycline, erythromycin และ nystatin (Torres-Rodriguez *et al.*, 2022) นอกจากนี้



เชื้อ *S. rimosus* SAURU59 มีความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5, NA, PDA และ GAUZE'S Synthetic Medium No.1 ได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อดังกล่าวมีความสามารถในการใช้น้ำตาล Glucose, Arabinose, Xylose, Fructose และ Mannitol เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต และมีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เพื่อการย่อยสลายสาร Xylan, Avicel, CMC, Starch, Chitin และ Skim Milk ได้ แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการแข่งขันของเชื้อ *S. rimosus* SAURU59 โดยเชื้อมีความสามารถในการหาอาหารได้ดี จะทำให้เจริญเติบโตครอบครองพื้นที่บนผิวพืชได้เร็ว ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญแข่งขันเข้าทำลายพืชได้ จากรายงานของ Torres-Rodriguez *et al.* (2022) พบว่าเชื้อ *S. sampsonii* และ *S. flavovariabilis* ที่แยกจากดิน มีความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani*, *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger* และ *Penicillium expansum* ได้

การระบุชนิดของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่ปฏิปักษ์ผ่านการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบไอโซเลท SAURU59 มีความคล้ายกับแอกติโนมัยซีท *S. rimosus* โดยรายงานงานวิจัยของ Lu *et al.* (2016) พบว่าเชื้อ *S. rimosus* ไอโซเลท M527 มีความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* เชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวา สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค และสามารถควบคุมโรคในสภาพแปลงปลูกได้ถึง 72 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังส่งเสริมการเจริญของลำต้นและใบของแตงกวาได้ด้วย นอกจากนี้เชื้อแอกติโนมัยซีท *S. rimosus* ในบางสายพันธุ์ มีรายงานว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ Tetracyclines (Petkovic *et al.*, 2006) และ Paromomycin (Ibrahim *et al.*, 2019) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและปรสิต

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแอกติโนมัยซีท พบว่าเชื้อ *S. rimosus* SAURU59 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ไคติเนส และ IAA ซึ่งเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ มีรายงานว่าเชื้อ *Streptomyces* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Anita *et al.*, 2015) และเอนไซม์ไคติเนส (Esteban *et al.*, 2017) ได้ดี โดยเชื้อแอกติโนมัยซีทหลายกลุ่มจะสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาด ไซโทพลาสซึมที่อยู่ภายในเซลล์รั่วไหลออกมา ทำให้เซลล์ตาย โดย Brzezinska *et al.* (2013) รายงานว่า *S. rimosus* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Alternaria alternata* ได้ เชื้อ *Streptomyces* หลายชนิดมีความสามารถในการสร้าง IAA โดยต้องมีสาร Tryptophan เป็นสารตั้งต้น IAA มีบทบาทต่อพัฒนาการทางสรีรวิทยาของพืช รวมถึงการเกิดเอ็มบริโอ การพัฒนาเซลล์ไปเป็นโครงสร้างต่าง ๆ และการสร้างระบบท่อลำเลียงเพื่อการเจริญของรากและยอด (Etchells *et al.*, 2016) Myo *et al.* (2019) พบว่า *Streptomyces fradiae* NKZ-259 สามารถผลิต IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Gause's No.1 ที่ใส่ Tryptophan ปริมาตร 2 กรัมต่อลิตร ได้เท่ากับ 82.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหลังทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน ในขณะที่งานวิจัยนี้ได้ทดสอบเชื้อ *S. rimosus* SAURU59 เลี้ยงในอาหารเหลว ISP-3 ผสมกับ Tryptophan 1 กรัมต่อลิตร มีการสร้าง IAA เท่ากับ  $30.78 \pm 2.25$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นถ้ามีการเพิ่ม Tryptophan ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น เป็นไปได้ว่า *S. rimosus* SAURU59 จะสามารถสร้าง IAA ได้มากขึ้นใกล้เคียงกับเชื้อ *Streptomyces fradiae* NKZ-259



จากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้น การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอสคิโนมายซีทูปริภัณฑ์ *S. rimosus* SAURU59 แสดงให้เห็นว่าเชื้อปฏิภักษ์นี้มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งจัดเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญและจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในการควบคุมโรคในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดลอง เพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริงในพื้นที่เพาะปลูกทุเรียนในอนาคต อย่างไรก็ตามควรศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในสภาพแปลงปลูก นอกจากนี้ยังสามารถเป็นทางเลือกในการควบคุมโรคโดยชีววิธี โดยอาจจะพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ต้นแบบหรือขยายสู่เชิงพาณิชย์เพื่อการควบคุมโรคอย่างยั่งยืนต่อไป

### สรุปผลการวิจัย

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนในพื้นที่ปลูกทุเรียน จำนวน 8 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลท โดยไอโซเลท RR05 ทำให้เกิดโรครุนแรงมากที่สุดหลังจากทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนใบทุเรียน ซึ่งสามารถระบุชนิดได้ว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Phytophthora palmivora* เมื่อทำการคัดแยกเชื้อแอสคิโนมายซีทูปริภัณฑ์จากดิน จำนวน 69 ไอโซเลท โดยไอโซเลท SAURU59 มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* ได้สูงที่สุด การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสคิโนมายซีทูปริภัณฑ์ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA สามารถระบุชนิดได้ว่ามีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces rimosus* นอกจากนี้ พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์ไคตินเนส และ IAA ซึ่งเป็นสารส่งเสริมการเจริญของพืช งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces rimosus* SAURU59 ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนในสภาพห้องปฏิบัติการได้

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ และภาควิชากีฏวิทยา และโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการในการทำวิจัยในครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

Anita, S., Neeraj, K. A., Anuja S., & Anita, Y. (2015) Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. *Hindawi Publishing Corporation, Enzyme Research*, 2015, 1-15.

Brzezinska, M. S., Jankiewicz, U., & Walczak, M. (2013) Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. *Int Biodeterior. Biodegradation*. 84, 104–110.



Chantarasiri, A., & Boontanom, P. (2021) *Fusarium solani* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, fungal pathogens causing stem rot disease on durian trees (*Durio zibethinus*) in Eastern Thailand. *New Disease Report*, 44, 1 – 3.

Department of Agriculture. (2019) Durian disease. *Department of Agriculture Report*. 78 p. (in Thai)

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13 - 15.

Esteban, A. V., Pilar, M. H., & Ann, M. H. (2017) Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology*, 3(3), 689 – 705.

Etchells, J. P., Smit, M. E., Gaudinier, A., Williams. C. J., & Brady, S. M. (2016) A brief history of the TDIF-PXY signalling module: balancing meristem identity and differentiation during vascular development. *New Phytologist*, 209(2), 474–84.

Hassan, N., Nakasuji, S., Elsharkawy, M. M., Naznin, H. A., Kubota, M., Ketta, H., & Shimizu, M. (2017) Biocontrol potential of an endophytic *Streptomyces* sp. strain MBCN152-1 against *Alternaria brassicicola* on cabbage plug seedlings. *Microbes and Environments*, 32(2), 133 – 141.

Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., & Wellington, E. M. H. (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel- electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied And Environmental Microbiology*, 63(8), 3233–3241.

Himaman, W., Thamchaipenet, A., Pathom-aree, W., & Duangmal, K. (2016) Actinomycetes from *Eucalyptus* and their biological activities for controlling *Eucalyptus* leaf and shoot blight. *Microbiological Research*, 188, 42 - 52.

Ibrahim, A. A., El-Housseiny, G. S., Aboshanab, K. M., Yassien, M. A. & Hassouna, N. A. (2019) Paromomycin production from *Streptomyces rimosus* NRRL 2455: statistical optimization and new synergistic antibiotic combinations against multidrug resistant pathogens. *BMC Microbiology*, 19(18), 1 – 15.





- Kaewnamarng, S. , Akarapisan, A. , & Ruangwong, O. (2018) Selection of rhizobacteria to control fruit blotch of melon. *Journal of Agriculture*, 34(2), 193 – 204. (in Thai)
- Kelly, K. L. (1958) Central notations for the revised ISCC-NBS color name blocks. *Journal of Research of the National Bureau of Standard*, 61(5), 427 – 431.
- Khompun, W. , & Thabthim, S. (2016) Effect of actinomycetes isolated from rhizospheric soil of chilli on growth inhibition of *Colletotrichum capsici*, *Curvularia lunata* and *Fusarium solani*. *Khon Khan Agricultural Journal*, 1, 942 – 947. (in Thai)
- Lu, D., Ma, Z., Xu, X., & Yu, X. (2016) Isolation and identification of biocontrol agent *Streptomyces rimosus* M527 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Journal Basic Microbiology*, 56, 929 – 933.
- Myo, E. M., Ge, B., Ma, J., Cui, H., Liu, B., Shi, L., Jiang, M. & Zhang, K. (2019) Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BMC Microbiology*, 19(155), 1 - 14
- Office of Agricultural Research and Development Region 6. (2022) Integrated technology for prevention and elimination Durian root rot and stem rot disease, Eastern Region. *Department of Agriculture*. 63 p. (in Thai)
- Petkovic, H., Cullum, J., Hranueli, D., Hunter, I. S., Peric´-Concha, N., Pigac, J., Thamchaipenet, A., Vujaklija, D., & Long, P. F. (2006) Genetics of *Streptomyces rimosus*, the Oxytetracycline producer. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), 704 – 728.
- Piasai, O. , & Sudsanguan, M. (2018) Morphological study of *Gelasinospora* from dung and antagonistic effect against plant pathogenic fungi in vitro. *Agriculture and Natural Resources*, 52, 407 – 411.
- Plant Protection Development Research Office. (2019) Insects and mites, enemies of durian. *Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives*. 90 p. (in Thai)



- Sari, M., Nawangsih A. A., & Wahyudi A. T. (2021) Rhizosphere *Streptomyces* formulas as the biological control agent of phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and plant growth promoter of soybean. *Biodiversitas*, 22(6), 3015 – 3023.
- Soytong, K. (2010) Evaluation of *Chaetomium* - biological fungicide to control *Phytophthora* stem and root rot of durian. *Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research journal*, 3(2), 115 – 124.
- Suksiri, S., Laipasu, P., Soytong, K., & Poeaim, S. (2018) Isolation and identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from durian orchard in Chumphon Province, Thailand. *International Journal of Agricultural Technology*, 14(3), 389 – 402.
- Sunpapao, A., Chairina, T., & Ito, S. (2018) The biocontrol by *Streptomyces* and *Trichoderma* of leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* in oil palm seedlings. *Biological Control*, 123, 36 – 42.
- Surat Thani Provincial Agriculture and Cooperatives Office. (2021) Product list (Durian): Information for development planning Agriculture and product cooperatives in Surat Thani Province (durian). *Office of the Permanent Secretary, Ministry of Agriculture and Cooperatives*. 100 p. (in Thai)
- Sriyapai, T., Silprasita, K., Ngamniyoma, A., & Sriyapai, P. (2017) Screening of Antagonistic Actinomyces for the Preparation of Bioactive Crude Extract and Development of Starter Culture Powder for Suppression of Rice Pathogen. *Burapha Science Journal*, 22(3), 423 – 437. (in Thai)
- Torres-Rodriguez, J. A., Reyes-Pérez, J.J., Quiñones-Aguilar, E.E., & Hernandez-Montiel, L.G. (2020) Actinomycete potential as biocontrol agent of phytopathogenic fungi: mechanisms, source, and applications. *Plants*, 11, 1 - 15.