ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ในการควบคุมเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. สาเหตุโรคใบจุดในมะม่วง

Efficacy of *Streptomyces* sp. Isolate SRF1 to Control the Fungus *Pestalotiopsis* spp., Causal Agent of Mango Leaf Spot

อภิเดช แสงดี[1]*, นัฐนนท์ แจ้งสูงเนิน[2], ขนิษฐา สมตระกูล[3], ประภาษ กาวิชา[4]

Aphidech Sangdee[1*], Nattanon Jaesungnoen[2], Khanitta Somtrakoon[3], Praphat Kawicha[4]

Received: 16 August 2019 ; Revised: 7 October 2019 ; Accepted: 24 October 2019

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. เป็นสาเหตุของโรคใบจุดในมะม่วง ซึ่งก่อความเสียหายต่อผลไม้และพืชเศรษฐกิจหลายชนิด โดยเฉพาะมะม่วง ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อราชนิดนี้ยังทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ที่แยกได้จากโรคใบจุดในมะม่วง จำนวน 10 ไอโซเลต ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (dual culture method) พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ทั้ง 10 ไอโซเลต อยู่ในช่วง 73.37-91.51 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเมื่อนำน้ำเลี้ยงของเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว AGMS ที่มีอาร์จินีนมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า น้ำเลี้ยงของ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราและการงอกของสปอร์รา พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราและการงอกของสปอร์ราได้ เมื่อนำเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราที่สัมผัสกับน้ำเลี้ยงเชื้อมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะเส้นใยมีความผิดปกติ และ germ tube สั้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และน้ำเลี้ยงเชื้อยังสามารถลดขนาดแผลและความรุนแรงของโรคบนใบและผลที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยเชื้อสาเหตุโรคด้วย

คำสำคัญ: โรคใบจุดในมะม่วง *Pestalotiopsis* spp. *Streptomyces* sp.

Abstract

Pestalotiopsis spp. is a causal agent of leaf spot of many fruits and economic crops, especially mango. In addition, this fungal pathogen causes production yield losses. The purpose of this study was to evaluate the antifungal efficacy of *Streptomyces* sp. SRF1 against 10 isolates of *Pestalotiopsis* spp. isolated from mango leaf spot disease using dual culture method. The results showed that *Streptomyces* sp. SRF1 could inhibit the mycelial growth of all tested isolates of *Pestalotiopsis* spp. in the range 73.37-91.51%. The culture filtrate of *Streptomyces* sp. SRF1 in AGMS medium

[1,3] *รองศาสตราจารย์, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150*

[2] *นิสิตปริญญาตรี, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150*

[3] *อาจารย์, คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร 47000*

[1,3] *Assoc. Prof., Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Mahasarakham Province 44150, Thailand*

[2] *Bachelor Degree, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Mahasarakham Province 44150, Thailand*

[4] *Lecturer, Faculty of Natural Resources and Agro-Industry, Kasetsart University Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus, Muang District, Sakon Nakhon Province 47000, Thailand*

* *Coresponding author; Aphidech Sangdee, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Mahasarakham Province 44150, Thailand, aphidech.s@msu.ac.th*

containing arginine was also used to determine the antifungal activity by agar well diffusion assay. The results revealed that the culture filtrate from arginine media had antifungal activity. Moreover, the culture filtrates were used to evaluate the inhibition of fungal mycelial growth and spore germination. The results revealed that the culture filtrate also inhibited fungal mycelial growth and spore germination. In addition, abnormal mycelial and short germ tubes of spore were observed when compared with the control treatment. The culture filtrate effectively reduced the size of the disease lesion and disease severity on mango leaf and fruits after inoculation with the plant pathogenic fungi.

Keywords : mango leaf spot, *Pestalotiopsis* spp., *Streptomyces* sp.

บทนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) จัดอยู่ในวงศ์ Anacardiaceae เป็นผลไม้เขตร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเกษตรกรผู้ปลูกมะม่วงมักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคและแมลงทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวโดยเฉพาะโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา เช่น เชื้อรา *Pestalotiopsis mangiferae* (syn. *Pestalotia mangiferae*), *Botryodiplodia theobromae* และ *Macrophoma mangiferae*[1] ซึ่งสามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของมะม่วงตลอดฤดูการปลูก

โดยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. จัดอยู่ในวงศ์ Amphisphaeriaceae มีหลายสปีชีส์ที่เป็นสาเหตุของโรคในพืช เช่น เชื้อรา *Pestalotia longisetula* เป็นสาเหตุโรคเน่าในสตรอเบอรี[2] *P. fici* เป็นสาเหตุโรคผลเน่าและใบไหม้ในมะกอก[3] *P. uvicola* และ *P. clavispora* เป็นสาเหตุของโรคใบจุดสีเทาในมะม่วง[4] เป็นต้น โดยในการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคชนิดนี้เกษตรกรนิยมการใช้สารเคมี เนื่องจากได้ผลเร็ว แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ อีกทั้งยังตกค้างในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย[5] ปัจจุบันได้มีการนำวิธีการทางชีววิธี (biocontrol) ที่ใช้เชื้อปฏิปักษ์มาควบคุมโรค ซึ่งวิธีการทางชีววิธีเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและเกษตรกร ตัวอย่างเช่น การนำสารสกัดจากเชื้อราในสกุล *Chaetomium* spp. มาควบคุมเชื้อ *Pestalotia* spp. พบว่าสารสกัดจากเชื้อราปฏิปักษ์สามารถช่วยลดและยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ของเชื้อ *Pestalotia* spp. ได้[6] เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้อีกด้วย[5,7,8] ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้มีการนำเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Bipolaris maydis*[9] มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. สาเหตุโรคใบจุดในมะม่วงทั้งในสภาพ *in vitro* และ *in vivo*

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดจากใบมะม่วง

แยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในใบมะม่วง โดยเลือกเก็บใบมะม่วงที่มีลักษณะอาการของโรคเป็นจุดสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ นำมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำไปวางบนอาหาร Water Agar (WA) จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 วัน เพื่อให้เส้นใยของเชื้อราโรคพืชเจริญ เมื่อสังเกตเห็นว่ามีเส้นใยเจริญออกมาจากชิ้นของใบมะม่วง นำเส้นใยไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วระบุชนิดเบื้องต้นของเชื้อราด้วยการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ เส้นใย โคโลนี และสปอร์ของเชื้อรา

2. การยืนยันผลการระบุชนิดด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA repeats (ITS)

นำเส้นใยของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน มาสกัด ดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol: Chloroform Extraction และตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอบน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีนในส่วน ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) และ ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)[10] ตามวิธีการของ Jaihan et al.[11] จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการจากบริษัท Macrogen ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank และสร้างสายวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA 4[12] โดยใช้วิธี Neighbor – Joining ใช้โมเดล Kimura 2-parameter (1,000 boostrap replications) ในการวิเคราะห์

3. การทดสอบความสามารถการก่อโรคของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ในใบและผลมะม่วง

นำใบและผลมะม่วงดิบที่ไม่มีรอยแผล มาอย่างละ 10 ตัวอย่าง ล้างให้สะอาดด้วยน้ำ แล้วนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70% และน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้เข็ม (needle) เจาะหรือทำให้เกิดแผล แล้วจึงหยดสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ที่ความเข้มข้น 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปใส่ไว้ในกล่องชื้นที่สะอาด แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สังเกตอาการของโรคที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน

นำเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ที่แยกได้จากดินในแปลงนาข้าวที่เคยมีรายงานมาก่อนว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช[9] โดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ด้วยการนำเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SRF 1 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวิธีการขีดเชื้อลงบนผิวอาหารครึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาด 0.9 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. อายุ 7 วัน วางด้านตรงข้ามกับเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 สำหรับชุดควบคุม (control) นำเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ไปวางไว้ที่ฝั่งใดฝั่งหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สังเกตและบันทึกผล จากนั้นวัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ในจานทดสอบและจานควบคุม นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต จากสูตรดังต่อไปนี้

% การยับยั้งการเจริญของเชื้อ = [(A-B) / A] × 100

A = ค่าเฉลี่ยของรัศมีของโคโลนีเชื้อรา บนจานอาหารชุดควบคุม

B = ค่าเฉลี่ยของรัศมีของโคโลนีเชื้อรา บนอาหารที่ทดสอบกับเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1

5. การทดสอบประสิทธิภาพน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ในอาหาร AGMS ที่มีอาร์จินีนที่ระยะ 7, 14, 21 และ 28 วัน ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. โดยวิธี agar well diffusion

ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยเริ่มต้นด้วยการใช้ cork borer เจาะอาหาร PDA จำนวน 5 หลุม จากนั้นหยดน้ำเลี้ยงของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ตามลำดับ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 4 หลุม และใส่อาหารเหลว AGMS จำนวน 1 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นจึงใช้ cork borer เจาะเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ไปไว้ตรงกลางจานอาหาร ส่วนชุดควบคุมวางเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ไว้ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วสังเกตการเจริญ เป็นเวลา 4 วัน

6. การศึกษาความผิดปกติของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. เมื่อทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว AGMS เป็นเวลา 21 วัน

ใช้ cork borer เจาะเส้นใยของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. อายุ 7 วัน ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA นำไปวางไว้ตรงกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำกระจกปิดสไลด์ (cover slip) จุ่มลงในแอลกอฮอล์แล้วรอจนแห้ง นำไปวางทับบนชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. จากนั้นเทน้ำเลี้ยงของเชื้อ *Streptomyces* SRF1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว AGMS ที่ระยะเวลา 21 วัน ลงไป 20 มิลลิลิตร สำหรับชุดควบคุม (control) เทเฉพาะอาหารเหลว AGMS ลงไปเท่านั้น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จึงใช้ปากคีบค่อยๆ ดึงกระจกปิดสไลด์ออก แล้ววางลงบนสไลด์ที่หยดด้วย lactophenol cotton blue ไว้แล้ว จากนั้นจึงนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) เพื่อตรวจดูความผิดปกติของเส้นใยที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

7. การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ในการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *Pestalotiopsis* spp.

ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยเริ่มต้นด้วยการหยดน้ำเลี้ยงจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ที่เลี้ยงในอาหาร AGMS เป็นเวลา 21 วัน ลงบนอาหาร PDA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเกลี่ย (spread) ให้น้ำเลี้ยงกระจายทั่วจานอาหารเพาะ

เลี้ยง เมื่อผิวหน้าอาหารแห้งแล้วจึงหยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. แต่ละไอโซเลต ที่ความเข้มข้น 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไปบนจานอาหาร แล้วเกลี่ยให้สารแขวนลอยสปอร์กระจายให้ทั่วจานเพาะเลี้ยง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า สังเกตการงอกของสปอร์เปรียบเทียบกับการงอกของสปอร์ปกติในชุดควบคุม

8. การศึกษาประสิทธิภาพน้ำเลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ในการควบคุมการเกิดโรคในมะม่วง

ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยในขั้นตอนนี้เป็นการนำน้ำเลี้ยงของเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 มาทดสอบกับเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. จำนวน 10 ไอโซเลต ในการควบคุมการเกิดโรคในมะม่วง โดยเริ่มจากการนำใบและผลดิบของมะม่วงที่ไม่มีรอยแผลมา ล้างให้สะอาด แล้วนำไปแช่แอลกอฮอล์ 70% และน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้เข็มเจาะหรือทำให้เกิดแผลจำนวน 4 จุด (1 จุดเป็นจุดควบคุมที่หยดน้ำกลั่น และ 3 จุดที่เหลือเป็นจุดที่หยดสารแขวนลอยสปอร์เชื้อทดสอบลงไป) โดยกำหนดการทดลองเป็น 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ใส่เฉพาะสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ลงไปปริมาตร 10 ไมโครลิตร

กรรมวิธีที่ 2 หยดน้ำเลี้ยงจากเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ที่ระยะเวลา 21 วัน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ก่อน 1 วัน แล้วจึงหยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ลงไปปริมาตร 10 ไมโครลิตร

กรรมวิธีที่ 3 หยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ก่อน 1 วัน แล้วจึงหยดน้ำเลี้ยงจากเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ที่ระยะเวลา 21 วัน ลงไปปริมาตร 50 ไมโครลิตร

หลังจากปลูกเชื้อแล้ว นำไปเก็บไว้ในกล่องชื้นที่สะอาด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงสังเกตลักษณะอาการและวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Pestalotiopsis* spp.

9. การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ในการผลผลิตเอกซ์ตราเซลลูไลติกเอนไซม์บางชนิด

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 มาขีดตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch Agar, Carboxy methyl cellulose (CMC) Agar และ Lignin Agar เป็นเส้นตรง จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาจึงหยดสารละลายไอโอดีนลงในจานอาหาร Starch Agar จนท่วม ส่วนจานอาหาร CMC ทำการเท 0.2 % congo-red จนท่วมและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดเทสีทิ้ง แล้วล้างสีออกด้วย 1 M NaCl เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงสังเกตโซนใสและทำการวัดบริเวณโซนใส บันทึกผลการทดลอง ส่วนจานอาหาร Lignin Agar บันทึกผลการทดลองเมื่อบ่มเชื้อครบเวลา 7 วัน

10. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี One Way Anova และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ผลการศึกษา

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดจากใบมะม่วง การทดสอบการเกิดโรคบนใบและผลของมะม่วง และการระบุชนิดด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA repeats (ITS)

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดจากใบมะม่วงที่มีอาการของโรค สามารถแยกเชื้อราได้จำนวน 10 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 มี 4 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต PT1, PT2, PT3 และ PT4 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีเขียวเมื่อเจริญเต็มที่จะเป็นสีดำ (Figure 1) และเมื่อนำสปอร์มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีลักษณะของสปอร์เรียว ยาว รูปร่างคล้ายกระสวย ภายในเซลล์สปอร์มีผนังกั้น 4 ผนัง มี 5 ช่อง ส่วนปลายของสปอร์มีรยางค์ 2-4 เส้น (Figure 1B) สำหรับกลุ่มที่ 2 มี 6 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต PT5, PT6, PT7, PT8, PT9 และ PT10 มีลักษณะโคโลนีสีขาว (Figure 1) สปอร์มีลักษณะคล้ายกลุ่มที่ 1 แต่มีลักษณะที่สั้นกว่า และเห็นช่องภายในสปอร์ 3 ช่องตรงกลางชัดเจน (Figure 1D) เมื่อนำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่แยกได้ มาปลูกเชื้อ (inoculation) ลงไปบนผลและใบของมะม่วง พบว่า ภายใน 7 วัน เชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต สามารถก่อโรคได้ทั้งบนใบและผลของมะม่วง และมีอาการเหมือนอาการเริ่มต้นที่นำมาแยกเชื้อ โดยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ไอโซเลต PT9 แสดงลักษณะของโรครุนแรงที่สุด ในระยะแรกเกิดจุดสีน้ำตาลเล็กๆ จากนั้นแผลขยายขนาดขึ้น มีรูปร่างกลมสีน้ำตาลดำ มีลักษณะเป็นมัน

ความยาวของแผลประมาณ 15-30 มิลลิเมตร

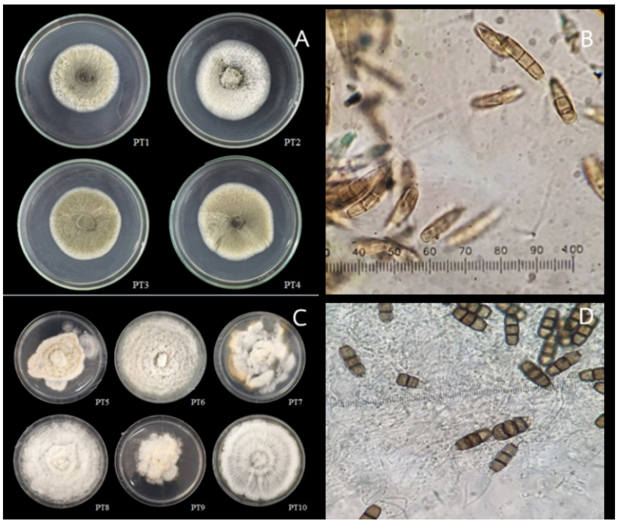

Figure 1 Colony (A and C) and spore (B and D) morphology of *Pestalotiopsis* spp. group 1 (A and B) and group 2 (C and D).

และเมื่อระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 10 ไอโซเลต ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเชื้อราทั้งหมดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS เหมือนกับเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. มากที่สุด(Figure 2) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ในช่วง 95-100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการทำให้เกิดโรค และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จึงสามารถยืนยันและระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดบนมะม่วงได้เป็นเชื้อ *Pestalotiopsis* spp.

2. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. โดยเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 โดยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน

เมื่อนำเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากเลี้ยงเชื้อร่วมกันเป็นเวลา 7 วัน พบว่า เชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ได้ทั้ง 2 กลุ่ม โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อราด้วยเชื้อปฏิปักษ์มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับไอโซเลตของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. (Table 1) และยังพบว่าเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ไอโซเลต PT7 ได้สูงสุด 91.51 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต PT1 ต่ำสุด 73.37 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) และเมื่อนำข้อมูลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$) และจากผลการทดลองการยับยั้งเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลต จึงยืนยันได้ว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ได้จริง

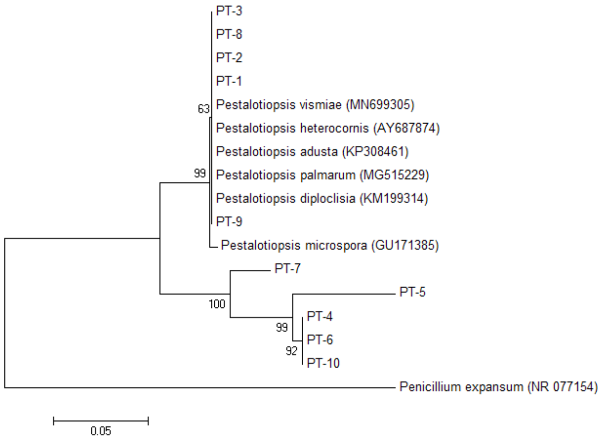

Figure 2 Phylogenetic relationships of 10 isolate of *Pestalotiopsis* and the 6 related *Pestalotiopsis* species and one out group (*Penicillium expansum*) based on partial ITS gene sequences. Neighbor Joining (NJ) tree was constructed using Mega 4. Percentages expressed above the branches are frequencies with which a given branch appeared in 1000 bootstrap replications when using the NJ method (branches corresponding to partitions reproduced in <50 % were collapsed)

Table 1 Inhibitory effects of *Streptomyces* sp. isolate SRF 1 on mycelial growth of ten plant pathogenic *Pestalotiopsis* spp. by dual culture method.

Isolate of *Pestalotiopsis* spp.	Percentage of mycelial growth reduction (%)*
PT1	73.37±1.04[c]
PT2	88.96±1.46[ab]
PT3	81.49±4.81[abc]
PT4	81.71±0.96[abc]
PT5	79.91±6.71[bc]
PT6	83.59±3.35[abc]
PT7	91.51±2.61[a]
PT8	84.11±0.90 [abc]
PT9	81.43±3.79[abc]
PT10	89.72±1.55[ab]

* Different lower case letters denote significant differences (P < 0.05) between the different isolates of *Pestalotiopsis* spp. in the same column.

3. การทดสอบประสิทธิภาพน้ำเลี้ยงเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ในอาหาร AGMS ที่ระยะ 7, 14, 21 และ 28 วัน ในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. โดยวิธี Agar well diffusion

จากการนำน้ำเลี้ยงจากเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. โดยวิธี agar well diffusion พบว่าน้ำเลี้ยงที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ทั้ง 10 ไอโซเลต เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. เจริญบนอาหาร PDA เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราไอโซเลต PT4 ได้ดีที่สุด ขณะที่สามารถยับยั้งเชื้อราไอโซเลต PT9 ได้น้อยที่สุด และนอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเลี้ยงที่ระยะเวลา 21 และ 28 วัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ดีกว่าน้ำเลี้ยงที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยความยาวเส้นใยในแต่ละไอโซเลต (Table 2 และ Figure 3) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเลี้ยงที่ระยะเวลา 21 และ 28 วัน มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยน้ำเลี้ยงที่ระยะ 21 วัน มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 16.00-58.00 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่น้ำเลี้ยงที่ระยะ 28 วัน มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 20.91-60.78 เปอร์เซ็นต์ (Table 2)

Table 2 Inhibitory effects of the culture filtrate of *Streptomyces* sp. isolate SRF 1 on mycelial growth of ten plant pathogenic *Pestalotiopsis* spp. by agar well diffusion method.

Isolate of *Pestalotiopsis* spp.	Percentage of mycelial growth reduction (%) by culture filtrate from different time point*			
	7 Days	**14 Days**	**21 Days**	**28 Days**
PT1	$32.84 \pm 6.57^{B, abc}$	$37.65 \pm 6.41^{B, ab}$	$45.51 \pm 5.61^{AB, abc}$	$58.38 \pm 2.96^{A, a}$
PT2	$15.29 \pm 7.58^{B, de}$	$16.67 \pm 10.14^{B, cd}$	$38.86 \pm 5.66^{AB, d}$	$48.95 \pm 6.05^{A, ab}$
PT3	$12.64 \pm 3.23^{B, e}$	$18.66 \pm 2.08^{B, bcd}$	$42.50 \pm 3.82^{A, abc}$	$47.92 \pm 2.08^{A, ab}$
PT4	$47.00 \pm 4.36^{B, a}$	$41.72 \pm 6.69^{AB, a}$	$58.00 \pm 4.16^{A, a}$	$60.78 \pm 1.68^{A, a}$
PT5	$7.02 \pm 7.02^{B, e}$	$17.19 \pm 9.22^{AB, cd}$	$29.12 \pm 9.57^{AB, cde}$	$35.61 \pm 2.95^{A, bc}$
PT6	$36.53 \pm 2.27^{C, ab}$	$39.20 \pm 0.44^{BC, a}$	$47.16 \pm 1.93^{AB, abc}$	$51.11 \pm 3.87^{A, a}$
PT7	$18.82 \pm 5.03^{B, cde}$	$44.60 \pm 6.91^{A, a}$	$53.95 \pm 4.29^{A, ab}$	$55.18 \pm 5.15^{A, a}$
PT8	$10.67 \pm 5.81^{A, de}$	$19.67 \pm 2.60^{A, bcd}$	$22.33 \pm 3.84^{A, de}$	$25.00 \pm 5.13^{A, cd}$
PT9	$7.67 \pm 3.93^{A, e}$	$9.33 \pm 2.33^{A, d}$	$16.00 \pm 4.58^{A, e}$	$20.91 \pm 5.84^{A, d}$
PT10	$27.14 \pm 5.88^{B, bcd}$	$32.34 \pm 4.10^{AB, abc}$	$40.37 \pm 8.12^{AB, abc}$	$48.42 \pm 4.83^{A, ab}$

* Different capital letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the times in the same row.

* Different lower case letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the different isolates of *Pestalotiopsis* spp. in the same column.

4. การศึกษาความผิดปกติของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. เมื่อทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงจากเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว AGMS ที่ระยะเวลา 21 วัน

จากการนำน้ำเลี้ยงของเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว AGMS ที่ระยะเวลา 21 วัน มาทดสอบกับเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่า เส้นใยที่สัมผัสกับน้ำเลี้ยงจากอาหารเหลว AGMS มีการเจริญได้น้อย เมื่อนำเส้นใยมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เส้นใยมีลักษณะที่ผิดปกติ ไม่มีการแตกแขนงของเส้นใย เส้นใยมีลักษณะโป่งพอง เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยในชุดควบคุม (Figure 3)

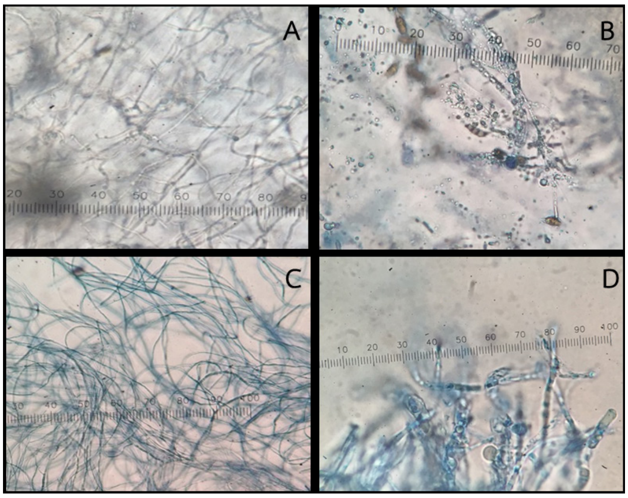

Figure 3 Effects of culture filtrate of *Streptomyces* sp. isolate SRF1 on fungal mycelia of *Pestalotiopsis* spp. isolate PT5 (A and B) and PT6 (C and D) under bright field microscopy (1,000X); control treatment (A and C) and tested treatment (B and D).

5. การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ในการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *Pestalotiopsis* spp.

จากการทดสอบประสิทธิภาพน้ำเลี้ยงจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ที่ระยะเวลา 21 วัน ในอาหารเหลว AGMS ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่า น้ำเลี้ยงจากเชื้อปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ได้ทั้ง 10 ไอโซเลต และเมื่อนำผลการยับยั้งการงอกของสปอร์ไปทดสอบทางสถิติ พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SRF 1 มีความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ทั้ง 10 ไอโซเลต ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื้อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการยับยั้ง พบว่า ไอโซเลต PT1 ถูกยับยั้งได้สูงที่สุด คือ 74.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลต PT5 ถูกยับยั้งได้ต่ำสุด คือ 52.13 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Table 3) นอกจากนี้ลักษณะของสปอร์ที่ตรวจพบในชุดทดสอบมีลักษณะของ germ tube ที่สั้น โป่งพอง ผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Table 3 Effects of 21 days old culture filtrate of *Streptomyces* sp. isolate SRF1 on the fungus *Pestalotiopsis* spp. spore germination

Isolate of *Pestalotiopsis* spp.	Percentage of inhibition of spore germination (%)
Control	00.00 ± 0.00^{e}
PT1	74.15 ± 4.71^{d}
PT2	64.91 ± 9.30^{abcd}
PT3	68.65 ± 2.16^{bcd}
PT4	69.63 ± 2.07^{cd}
PT5	52.13 ± 10.44^{a}
PT6	56.30 ± 9.68^{ab}
PT7	64.56 ± 5.96^{abcd}
PT8	54.08 ± 6.32^{a}
PT9	59.31 ± 7.65^{abc}
PT10	60.14 ± 7.74^{abc}

* Different lower case letters denote significant differences ($P < 0.05$) between the different isolates of *Pestalotiopsis* spp. in the same column.

6. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ในการควบคุมการเกิดโรคบนใบและผลมะม่วง

จากการทดสอบการใช้น้ำเลี้ยงของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว AGMS เป็นระยะเวลา 21 วัน ในการควบคุมการเกิดโรคบนใบและผลของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่า ผลการทดสอบกับเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ กรรมวิธีที่หยดน้ำเลี้ยงของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 1 วัน ก่อนการใส่สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. สามารถควบคุมการเกิดโรคในพืชได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ใส่สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ก่อนการหยดน้ำเลี้ยงของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ขณะที่ชุดควบคุมแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน (Figure 4) โดยเมื่อเปรียบเทียบขนาดของแผล พบว่าในชุดควบคุม และกรรมวิธีที่ใส่สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ก่อนการหยดน้ำเลี้ยงของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 มีขนาดของแผลใกล้เคียงกัน มีค่าเฉลี่ยของแผลบนผลและใบ เท่ากับ 20-30 และ 5-10 มิลลิเมตร

ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีที่หยดน้ำเลี้ยงของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 1 วัน ก่อนการใส่สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ขนาดของแผลบนผลและใบเฉลี่ยเท่ากับ 5-10 และน้อยกว่า 5 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำขนาดของแผลจากกรรมวิธีที่หยดน้ำเลี้ยงของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 1 วัน ก่อนการใส่สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. มาเปรียบเทียบกัน พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 สามารถควบคุมการเกิดโรคของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ไอโซเลต PT7 ได้ดีที่สุด (แผลขนาดเล็กที่สุด) รองลงมาคือPT8, PT9 และ PT10 ตามลำดับ

Figure 4 Effect of culture filtrate of *Streptomyces* sp. isolate SRF1 on mango leaf (A) and fruits (B).
1 = Plants were inoculated with *Pestalotiopsis* sp. isolate PT7
2 = Plants were treated with 10 mL culture filtrate for 1 day before being inoculated with 10 mL conidial suspension of *Pestalotiopsis* sp. isolate PT7
3 = Plants were inoculated with 10 mL of conidial suspension of *Pestalotiopsis* spp. isolate PT7 for 1 day before being treated with 10 mL of culture filtrate

7. การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ในการผลผลิตเอกซ์ตราเซลลูไลติกเอนไซม์บางชนิด

จากผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 ในการผลิตเอกซ์ตราเซลลูไลติกเอนไซม์บางชนิด พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF 1 สามารถผลิตเอนไซม์ ที่มีคุณสมบัติในการย่อยเซลลูโลสในอาหาร CMC agar ได้ และสามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยลิกนินในอาหาร Lignin agar ได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยแป้งในอาหาร Starch agar ได้ โดยมีบริเวณใส (clear zone) เท่ากับ 34.17, 10.33 และ 46.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์ผล

งานวิจัยนี้ได้แยกเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ที่มีความสามารถทำให้เกิดโรคบนผลและใบมะม่วงจำนวน 10 ไอโซเลต โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ที่มีลักษณะโคโลนีสีเขียวดำและสีขาว เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลต PT9 ก่อโรครุนแรงที่สุด และเมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. จำนวน 10 ไอโซเลต ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Pestalotiopsis* spp. ได้ทั้ง 10 ไอโซเลต โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในช่วง 73.37-91.51 ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ได้จริง แต่อาจมีเปอร์เซ็นต์การยับยังที่แตกต่างกันบ้างขึ้นอยู่กับไอโซเลตของเชื้อราที่นำมาทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sangdee *et al.*[9] ที่พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และเชื้อรา *Bipolaris maydis* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และ 99.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ เกวลิน คุณาศักดากุล และชัยพร ขัดสงคราม[13] พบว่า เชื้อแอคติโนไมซีท เอนโดไฟต์สกุล *Streptomyces* sp. ไอโซเลต DIM4, DIM12, DIM15, DIM16, DIM20 และ DIM25 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Pestalotiopsis* sp. ที่แยกได้จากโรคผลเน่าของลำไย ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 88.50 เปอร์เซ็นต์ โดยกลไกที่เชื้อ *Streptomyces* spp. ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคอาจเนื่องมาจากเชื้อ *Streptomyces* spp.

สามารถสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ออกมาทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา โดยในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 สามารถผลผลิตเอกซ์ตราเซลลูไลติกเอนไซม์ที่อาจมีคุณสมบัติในการย่อยผนังเซลล์ได้หลายชนิดจึงทำให้น้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 มีผลทำให้การเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. เปลี่ยนแปลงไป มีการแตกหักของเส้นใยเกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Matsumoto[14] ที่พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส เพื่อใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคได้

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. โดยใช้น้ำเลี้ยงที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ที่เลี้ยงในอาหาร AGMA ที่เติมอาร์จินิน มาทดสอบการยับยั้ง แสดงให้เห็นว่า น้ำเลี้ยงที่ระยะเวลา 21 และ 28 วัน สามารถยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ได้ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้อาจมาจาก ในช่วงระยะเวลา 21-28 วัน เป็นช่วงที่เชื้อ *Streptomyces* sp. SRF1 สามารถผลิตและหลั่งสารทุติยภูมิออกมาได้มากและมีปริมาณไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้น้ำเลี้ยงที่ระยะเวลา 21 วัน แทน 28 วัน ได้ เพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Trejo-Estrada *et al.*[15], Ouhdouch *et al.*[16] และ Alam *et al.*[17] ที่พบว่า เชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ที่ผลิตและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular hydrolytic enzymes) และสารประกอบที่ยับยั้งเชื้อราได้

เมื่อศึกษาการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 ระยะเวลา 21 วัน แสดงให้เห็นว่าน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้อยู่ในช่วง 52.13-74.15 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าผลการใช้น้ำเลี้ยงในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรายังมีความสอดคล้องกันกับผลการทดสอบการยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชอีกด้วย และเมื่อนำน้ำเลี้ยงไปทดสอบกับการป้องกันโรคบนผลและใบมะม่วง แสดงให้เห็นว่ากรรมวิธีที่ใส่น้ำเลี้ยงลงไปก่อน 1 วัน สามารถชะลอการเกิดอาการของโรคได้ทั้งบนใบและผลมะม่วงได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ใส่สารแขวนลอยสปอร์เชื้อราลงไปก่อน 1 วัน ทั้งนี้กลไกในการชะลอการเกิดโรคอาจมาจากการงอกของสปอร์ของเชื้อราถูกยับยั้งโดยเอกซ์ตราเซลลูไลติกเอนไซม์ที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ผลิตขึ้นและปลดปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Palaniyandi *et al.*[18] ที่พบว่า เชื้อ *Streptomyces phaeopureus* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. coccodes* โดยใช้การหลั่งเอนไซม์โปรติเอส (extracellular proteases) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ไอโซเลต SRF1 มีศักยภาพที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ *Pestalotiopsis* spp. ได้ เช่น การนำผลมะม่วงมาแช่ในน้ำเลี้ยงก่อนนำไปวางขาย อาจสามารถยืดระยะเวลาของการเกิดโรคบนผลได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Okigbo R N, Osuinde M I. Fungal leaf spot diseases of mango (*Mangifera indica* L.) in Southeastern Nigeria and biological control with *Bacillus subtilis.* Plant Protect Sci 2003;39(2):70-7
2. Mouden N, Benkirane R, Touhami AO, Douira A. Pathogenic capacity of *Pestalotia longisetula* Guba reported for the first time on strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) in Morocco. Int J Pure Appl Biosci 2014;2(4):132-41
3. Chliyeh M, Rhimini Y, Selmaoui K, Touhami AO, Filali-Maltouf A, Modafar CE, Moukhli A, Oukabli A, Benkirane R, Douira A. First report of *Pestalotia fici* causing leaf chlorosis and fruit rot on olive (*Olea europaea* L.) in Morocco. Int J Recent Sci Res 2014;5:136-41
4. Ismail AM, Cirvilleri G, Polizzi G. Characterisation and pathogenicity of *Pestalotiopsis uvicola* and *Pestalotiopsis clavispora* causing grey leaf spot of mango (*Mangifera indica* L.) in Italy. Eur J Plant Pathol 2013;135(4): 619-25
5. Ara I, Rizwana H, Al-Othman M R, Bakir MA. Antagonism of actinomycete against *Pestalotiopsis mangiferae*, causal agent of mango brown rot in post-harvest storage. Afr J Microbiol Res 2012;6: 1782-9
6. Phong NH, Wattanachai P, Kasem S, Luu NT. Antimicrobial substances from *Chaetomium* spp. against *Pestalotia* spp. causing grey blight disease of tea. J Agri Tech 2014;10(4): 863-74

7. Pallavi RV, Nepolean P, Balamurugan A, Jayanthi R, Beulah T, Premkumar R. *In vitro* studies of biocontrol agents and fungicides tolerance against grey blight disease in tea. Asian Pac J Trop Biomed 2012;2(1): S435-8
8. Sanjay R, Ponmurugan P, Baby UI. Evaluation of fungicides and biocontrol agents against grey blight disease of tea in the field. Crop Prot 2008;27(3-5): 689-94
9. Sangdee A, Kornphachara S, Srisawat N. *In vitro* screening of antagonistic activity of soil *Streptomyces* against plant pathogenic fungi and assessment of its characters. J Agri Tech 2016;12(1):173-85
10. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 1990. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press, Inc., New York
11. Jaihan P, Sangdee K, Sangdee A. Selection of entomopathogenic fungus for biological control of chili anthracnose disease caused by *Colletotrichum* spp. Eur J Plant Pathol 2016;146: 551-564
12. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007;24(8):1596-1599
13. เกวลิน คุณาศักดากุล และชัยพร ขัดสงคราม. การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีทเอนโดไฟต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย. วารสารเกษตร 2555;28(3): 285-94
14. Matsumoto KS. Fungal chitinase. 2006. Pp. 289-304 In: Advances agriculture and food biotechnology, eds. Guevara-González RG, Torres-Pacheco I. Research Signpost, Trivandrum. Kerala, India
15. Trejo-Estrada SR, Paszczynski A. Crawford DL. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED9. J Ind Microbiol Biotechnol 1998;21:81-90
16. Ouhdouch Y, Barakate M. Finance C. Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. Eur J Soil Biol 2001;37:69-74
17. Alam M, Dharni S, Khaliq A, Srivastava SK, Samad A, Gupta MK. A promising strain of *Streptomyces* sp. with agricultural traits for growth promotion and disease management. Indian J Exp Biol 2012;50: 559-68
18. Palaniyandi SA, Yang SH, Suh JW. Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* ExPro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. J Appl Microbiol 2013;115(1): 207-17