

การคัดแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง โรคราน้ำค้างสแคบและราสนิมในองุ่น

Screening of *Streptomyces* spp. antagonistic to downy mildew, scab and rust diseases of grape

พรพรรณ อุสุวรรณ¹, โสภณ วงศ์แก้ว¹, และ หนึ่ง เตียอำรุง²

Pornpan U-suwan¹, Sopone Wongkaew¹, and Neung Teaumroong²

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเชื้อปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพมาใช้ควบคุมโรค ราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น โดยทำการแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากตัวอย่างดินปลูกองุ่นในจังหวัดนครราชสีมา และอุบลราชธานี คัดเลือกเชื้อ 5 ไอโซเลตแรกที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี dual culture method ผลการศึกษาพบเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ จำนวน 73 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. aphanidermatum*, *C. ampelinum* และเชื้อ *S. rolfsii* ได้ เมื่อนำเชื้อ 5 ไอโซเลตแรก มาทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมขององุ่น ในสภาพใบตัด (detached leaf) พบว่าเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SHH202 ระยะ log phase, SHR103 ระยะ stationary phase รูป cell suspensions, SYR107 ระยะ log phase และ SSR107 ระยะ stationary phase ในรูป culture filtrate สามารถยับยั้งโรคราน้ำค้างได้ดีที่สุด ไอโซเลต SHH202 ทั้ง 2 ระยะ รูป cell suspensions, ระยะ log phase รูป culture filtrate และ SYR107 ระยะ stationary phase รูป culture filtrate สามารถยับยั้งโรคสแคบได้ดีที่สุด ขณะที่ไอโซเลต SSH216 ระยะ log phase และ SSH211 ระยะ stationary phase ทั้ง 2 รูปแบบ ยับยั้งโรคราสนิมได้ดีที่สุด เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลตเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับไอโซเลต ระยะการเจริญเติบโต และรูปแบบที่ใช้ (คำสำคัญ: องุ่น, Downy mildew, Rust, Scab, *Streptomyces* spp.)

ABSTRACT: The objective of this study was to select effective antagonists to be used as biocontrol agents for grape downy mildew, scab and rust. *Streptomyces* spp. were isolated from soils collected from grape growing areas in Nakhon Ratchasima and Ubonratchathane provinces. From the soils, 73 isolates of *Streptomyces* spp. antagonistic to *P. aphanidermatum*, *C. ampelinum* and *S. rolfsii* were obtained. Subsequently, the top 5 isolates that were most effective in reducing the growth of *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* and *Sclerotium rolfsii* in dual culture were selected for further test with downy mildew, scab (anthracnose), and rust on the detached grape leaves. It was found that *Streptomyces* isolate SHH202 at log phase; SHR103 at stationary phase as cell suspension; SYR107 at log phase and SSR107 at stationary phase as culture filtrate were most effective against downy mildew, isolate SHH202 at both phases as cell suspension; at log phase as culture filtrate and SYR107 at stationary phase as culture filtrate were most effective against scab, isolate SSH216 at log phase and SSH211 at stationary phase as both

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 30000.

School of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 30000.

² สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000.

School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 30000.

forms were most effective against rust. These isolates had different capacity in subduing downy mildew, scab, and rust depending on the isolate, growth phase and the form tested. (**Keywords:** Downy mildew, Grape, Rust, Scab, *Streptomyces* spp.)

บทนำ

การผลิตองุ่นเพื่อการค้าในประเทศไทยในระยะแรก อยู่ในภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และราชบุรี แต่เนื่องจากมีโรคและแมลงระบาดรุนแรง ทำให้พื้นที่ปลูกดังกล่าวลดลง ปัจจุบันได้ขยายพื้นที่ปลูกไปเกือบทั่วทุกภาคยกเว้นภาคใต้ การผลิตองุ่นรับประทานผลสดในประเทศปี 2547 มีปริมาณ 108 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1.79 ล้านบาท และในปี 2548 มีปริมาณเพียง 26 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1.51 ล้านบาท (สำนักงานสถิติการเกษตร, 2547) จากสถิติดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการผลิตองุ่นรับประทานผลสดในประเทศมีแนวโน้มลดลง ถึงแม้ว่าองุ่นจะเป็นไม้ผลที่ให้มูลค่าตอบแทนค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับผลไม้ชนิดอื่น แต่ในขณะเดียวกันก็เป็นพืชที่มีโรคหลายชนิดเข้าทำลายตลอดช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโต ประกอบกับประเทศไทยมีสภาพอากาศแบบร้อนชื้นทำให้เกิดโรคระบาดได้ง่ายเกือบตลอดทั้งปี โรคองุ่นเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นจากการที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการป้องกันกำจัด โรคที่พบทำความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก ได้แก่ โรคราดำที่เกิดจากเชื้อ *Plasmopara viticola*, โรคสแคบ (แอนแทรคโนส) ที่เกิดจากเชื้อ *Sphaceloma ampelinum*, และ โรคราสนิม ที่เกิดจากเชื้อ *Physopella ampelopsidis* การป้องกันกำจัดโรคเหล่านี้เกษตรกรไทยส่วนใหญ่ยังคงนิยมใช้สารเคมี เนื่องจากสารเคมีออกฤทธิ์เร็ว มีประสิทธิภาพ เห็นผลชัดเจน อย่างไรก็ตามการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีดังกล่าวมักมีผลเสีย เพราะต้องใช้เป็นประจำและต่อเนื่อง ส่งผลทำให้เชื้อดื้อยาเกิดการปนเปื้อนสารเคมีกับผลิตผลและสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้การควบคุมโรคโดยชีววิธี จึงควรเข้ามามีบทบาทมากขึ้นเพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมี เป็นการรักษาความสมดุลของธรรมชาติ และลดปัญหาสารพิษที่สะสมในองุ่น

ปัจจุบันได้มีการนำแบคทีเรียที่เป็นจุลินทรีย์ต่อต้าน (bacterial antagonist) เช่น *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. มาควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เหตุผลของการเลือกใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความหลากหลาย เชื้อ *Streptomyces* spp. นับเป็นเชื้อสกุลสำคัญที่สุดในกลุ่มแอคติโนมัยซีท มีลักษณะคล้ายเชื้อรา อาศัยอยู่ทั่วไปในดิน ปุ๋ยหมัก น้ำ และละอองฝุ่น สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น เชื้อ *S. antibioticus* สามารถผลิตโอลินโดมัยซิน (Oleandomycin) (Swan *et al.*, 1994) ซึ่งจะไปจับกับไรโบโซม และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียหลายชนิด เชื้อ *S. lydicus* WYEC108 สามารถสร้าง chitinase ซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อรา โดยไปย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (Mahadevan and Crawford, 1997) ได้มีการนำเชื้อ *S. griseoviridis* มาใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ เช่น *Alternaria* sp., *Stemphylium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Helminthosporium* sp. และ *Botrytis* sp. (Brain and Deborah, 2002) หรือการใช้ *S. hygroscopicus* 10-22 ควบคุมโรคใบไหม้ของข้าว ที่เกิดจาก *Pellicularia sasakii* (Pang, 2002) ใช้ *S. griseorubiginosus* ควบคุมโรคเหี่ยวในกล้วย ที่เกิดจาก *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Cao *et al.*, 2005) และใช้ *S. diastatochromogenes* PonSSII ควบคุมโรคแผลสะเก็ดในมันฝรั่ง สาเหตุจาก *S. scabies* (Neeno, 2001)

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้เชื้อ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราในองุ่น การศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคราดำ สแคบ และราสนิมขององุ่น

วิธีการศึกษา

1. การแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกองุ่น 4 แหล่ง คือ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา สวนเกษตรกร อำเภอบางบาล จังหวัด นครราชสีมา (สวนคุณสมยศ และสวน Holiday) และ อ.เมือง จังหวัดอุบลราชธานี นำตัวอย่างดินมาทำให้แห้ง โดยผึ่งลม 2 - 3 วัน หรืออบในตู้อบอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นสุ่มแบ่ง ตัวอย่างมาตัวอย่างละ 1 กรัม ผสมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที นำมาเจือจางด้วย น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แยกเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยวิธี spread plate technique บนอาหาร Starch Casein Agar (SCA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27 - 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 - 4 สัปดาห์ เก็บโคโลนีของ *Streptomyces* spp. ที่ปรากฏเพื่อไว้ทดลองต่อไป

2. การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อ (in vitro)

ทดสอบความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นตัวแทนเชื้อใน class เดียวกันกับเชื้อสาเหตุโรคน้ำค้ำ สแคบ และราสนิม โดยวิธี dual culture method บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5 - 7 วัน เลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. บนอาหาร Oatmeal Agar (OA) เป็นเวลา 10 - 14 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราแต่ละชนิด ย้ายขึ้นวุ้น 2 ชิ้น ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชลงบนอาหาร PDA แล้วปลูกเชื้อ *Streptomyces* spp. ในด้านตรงข้ามวันระยะห่างเท่ากันโดยทำแยกกันแต่ละเชื้อ ใช้แผนการ

ทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ย้ายขึ้นวุ้นของเชื้อแต่ละชนิดลงบนอาหาร PDA โดยปล่อยให้เจริญเป็นอิสระเพื่อใช้เปรียบเทียบ (control) บันทึกผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมและในจาน control

ประเมินศักยภาพเชื้อ *Streptomyces* spp. แต่ละไอโซเลตโดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent Inhibition of Diameter Growth = PIDG) ตามวิธีการของ เกษม สร้อยทอง (2532) ดังนี้

$$PI = (D1 - D2)/D1 \times 100 \text{ โดยที่}$$

D1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อโรคในจาน control

D2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

นำเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตมาเปรียบเทียบกับระดับการเกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่อต้าน ดังนี้

4 = > 75 PIDG (Very high antagonistic activity)

3 = 61 - 75 PIDG (High antagonistic activity)

2 = 51 - 60 PIDG (Moderate antagonistic activity)

1 = < 50 PIDG (Low antagonistic activity)

3. การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในรูปของ cell suspensions และ culture filtrate ในการยับยั้งโรคน้ำค้ำ สแคบ และราสนิมในองุ่น

3.1 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 อันดับแรก มาเลี้ยงในอาหาร PDB ให้อยู่ในระยะ log phase (อายุ 5 วัน) และ stationary phase (อายุ 14 วัน) จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกตะกอนของเชื้อออกเพื่อนำมาทำเป็น cell suspension ให้มีระดับความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และนำส่วนน้ำใส (supernatant) ที่ได้ไปกรองผ่านเยื่อกรองที่มีรูกรอง

ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บไว้เป็น filtrate เพื่อทดสอบต่อไป

สำหรับเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ นำมาเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน นำมาทำเป็น cell suspension ให้มีระดับความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *Plasmopara viticola* สาเหตุโรคน้ำค้าง และเชื้อ *Physopella ampelopsidis* สาเหตุโรคราสนิม จากใบองุ่นที่แสดงอาการโรคน้ำค้าง และราสนิม นำเชื้อที่ได้มาทำเป็นเวลา cell suspension ให้มีระดับความเข้มข้น 5×10^4 sporangia/ml และ 5×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.2 การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งโรคน้ำค้างสแคบ และราสนิมในองุ่น

นำ cell suspensions และ culture filtrate ของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคในองุ่นพันธุ์ไวท์มัสคาในสภาพใบตัด (detached leaf) โดยฉีดพ่นเชื้อป้องกันก่อนทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค 24 ชั่วโมง ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคโดยการหยด cell suspension ของเชื้อราสาเหตุโรค ลงบนใบจำนวน 10 หยดต่อใบ ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อหยด วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ โดยการทดลองทำแยกกันอย่างอิสระในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของแต่ละเชื้อ บ่มไว้ในอุณหภูมิ 22 - 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 - 21 วัน ทำการนับจำนวนแผลที่เกิดขึ้น วัดขนาดแผล และนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่อใบ เมื่อใบองุ่นที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อฉีดพ่นก่อนทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค (control) แสดงอาการของโรค

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

จากตัวอย่างดินปลูกองุ่น จำนวน 4 แหล่ง สามารถแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ได้ทั้งหมด 109 ไอโซเลต คือ จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 37 ไอโซเลต

จากสวนองุ่นอำเภอมือง จังหวัดอุบลราชธานี 20 ไอโซเลต สวนคุณสมยศ อำเภอบักซ่อง 21 ไอโซเลต และสวน Holiday อำเภอบักซ่อง 31 ไอโซเลต โดยพบว่าการอบดินที่อุณหภูมิสูง (ไม่ได้นำเสนอผลการทดลอง) พบจำนวนเชื้อ *Streptomyces* spp. น้อยกว่าดินที่ปล่อยให้แห้งในอุณหภูมิห้อง โดยได้เชื้อเพียง 23 ไอโซเลต จากทั้ง 4 แหล่งปลูก วิธีการดังกล่าวจึงอาจไม่เหมาะสมที่จะใช้แยกเชื้อ *Streptomyces* spp. วิธีการที่ใช้แยกเชื้อ *Streptomyces* spp. โดยทั่วไปมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อ ตัวอย่างเช่น อนันต์ (2547) ใช้วิธีการฝังตัวอย่างดินให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ไม่ทนต่อความแห้ง หลังจากนั้นนำดินไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และแยกเชื้อในอาหารที่เป็น semi - selective media พบว่าสามารถใช้แยกเชื้อ *Streptomyces* spp. ในปุ๋ยหมักได้ดี โดยทั่วไปเชื้อ *Streptomyces* spp. สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่สูงถึง 40 - 70 องศาเซลเซียส เนื่องจากสามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความแห้งและอุณหภูมิสูงได้ ทำให้สามารถคงอยู่ได้ในดินเป็นเวลานาน (Morita, 1985 อ้างถึงในเทพิน, 2546) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้การใช้อุณหภูมิสูงถึง 120 องศาเซลเซียส แม้ว่าจะได้เชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวนน้อย แต่เชื้อที่แยกได้เกือบทั้งหมดเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งโรคน้ำค้างในองุ่นที่ใช้ทดสอบ (ไอโซเลต SSH202, 213 และ 216)

2. การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อ (in vitro)

จากเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ทั้งหมด 109 ไอโซเลต พบว่า เชื้อส่วนใหญ่ (65 ไอโซเลต) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *C. ampelinum*ค่อนข้างสูง คือ มีค่า PIDG สูงกว่า 50% โดยพบว่ามีไอโซเลต SHH202 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 63.88 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ไอโซเลต SSR203, SYR107,

SHR106 และ SSH213 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตเฉลี่ยเท่ากับ 61.66, 61.11, 58.88 และ 58.33 ตามลำดับ ขณะที่มีเพียง 37 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *S. rolfii* ได้ในระดับปานกลาง - ต่ำ โดยไอโซเลต SYR205 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 50.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ไอโซเลต SSH209, SSH216, SSH213 และ SSH211 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตเฉลี่ยเท่ากับ 43.33, 41.66, 22.22 และ 19.44 ตามลำดับ และพบเชื้อ 24 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *P. aphanidermatum* ในระดับต่ำ (PIDG ต่ำกว่า 50%) โดยไอโซเลต SYR107 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 46.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ไอโซเลต SHR103, SYR205, SHH202 และ SSR107 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตเฉลี่ยเท่ากับ 42.00, 40.00, 38.00 และ 28.00 ตามลำดับ (Table 1) โดยพบว่าบางไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่า 1 ชนิด คือ ไอโซเลต SYR107 และ SHH202 ยับยั้ง *P. aphanidermatum* และ *C. ampelinum* ไอโซเลต SSYR205 ยับยั้ง *P. aphanidermatum* และ *S. rolfii* ไอโซเลต SSH213 ยับยั้ง *C. ampelinum* และ *S. rolfii* ในขณะที่ไม่พบไอโซเลตใดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด ความแตกต่างในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคอาจมีสาเหตุจากชนิดของสารปฏิชีวนะที่เชื้อผลิตได้และปลดปล่อยออกมา ความสามารถในการยับยั้ง

เชื้อ *P. aphanidermatum* และ *S. rolfii* ที่อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับความสามารถในการยับยั้ง *C. ampelinum* น่าจะเนื่องมาจากเชื้อ *Streptomyces* spp. มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าเชื้อราทั้งสองชนิดดังกล่าวมาก ทำให้เชื้อ *Streptomyces* spp. ถูกปกคลุมด้วยเชื้อที่ใช้ทดสอบจนไม่สามารถแสดงศักยภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ได้อย่างเต็มที่

3. การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในรูปของ cell suspensions และ culture filtrate ในการยับยั้งโรคโคน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น

การใช้เชื้อในรูปของ cell suspensions ในระยะ log phase เชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมโรคโคน้ำค้าง คือไอโซเลต SHH202 ขณะที่ในระยะ stationary phase ไอโซเลต SHR103 มีประสิทธิภาพดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบจากจำนวนแผลที่เกิดขึ้นในรูปของ culture filtrate ในระยะ log phase เชื้อเกือบทุกไอโซเลตมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันไม่ว่าจะประเมินจากจำนวนแผล ขนาดของแผล หรือจำนวนสปอร์ แต่เมื่อใช้เชื้อในระยะ stationary phase ไอโซเลต SSR107 กลับมีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด (Table 2)

สำหรับความสามารถในการยับยั้งโรคสแคบ จะเห็นได้ว่า ไอโซเลต SHH202 ในระยะ log phase

Table 1. *Streptomyces* spp. isolated from vineyard soil in the University farm, Pakchong district Nakhon Ratchasima and Ubonrachatani having high antagonistic effect against *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum ampelinum* and *Sclerotium rolfii*

<i>P. aphanidermatum</i>		<i>C. ampelinum</i>		<i>S. rolfii</i>	
Isolate ^{1/}	PIDG ^{2/} (%)	Isolate	PIDG (%)	Isolate	PIDG (%)
SYR 107	46.00	SHH 202	63.88	SYR 205	50.00
SHR 103	42.00	SSR 203	61.66	SSH 209	43.33
SYR 205	40.00	SYR 107	61.11	SSH 216	41.66
SHH 202	38.00	SHR 106	58.88	SSH 213	22.22
SSR 107	28.00	SSH 213	58.33	SSH 211	19.44

¹ The second letter in isolate code is a location where soil was collected : Y = Somyod vineyard, H = Holiday vineyard and S = Suranaree University of Technology farm

² PIDG = Percent Inhibition of Diameter Growth

Table 2. Effects of cell suspensions and culture filtrate of *Streptomyces* isolates at different growth phase on downy mildew of grape tested under a detached leaf condition.

Form/Growth phase/Isolates	Effect on downy mildew		
	Lesion number	Lesion diameter (cm.)	Number of spores (x10 ³ spore/leaf)
Cell suspensions from log phase			
SSR107	7.00 ^{bc,1/}	0.19 ^{ab}	25.87 ^a
SHH202	2.75 ^a	0.14 ^a	10.62 ^a
SHR103	4.62 ^{ab}	0.12 ^a	22.75 ^a
SYR205	8.37 ^{cd}	0.29 ^{bc}	41.00 ^{ab}
SYR107	6.50 ^{bc}	0.24 ^{abc}	52.37 ^{ab}
Control (sterile distilled water)	10.00 ^d	0.33 ^c	81.37 ^b
F - test	**	**	*
CV (%)	38.27	54.20	78.17
Cell suspensions from stationary phase			
SSR107	7.25 ^b	0.24	39.87 ^a
SHH202	7.25 ^b	0.19	31.75 ^a
SHR103	3.75 ^a	0.19	21.37 ^a
SYR205	7.37 ^b	0.30	52.25 ^a
SYR107	8.62 ^b	0.24	59.37 ^{ab}
Control(sterile distilled water)	10.00 ^b	0.31	112.87 ^b
F - test	*	NS	*
CV (%)	40.56	42.80	105.85
Culture filtrate from log phase			
SSR107	6.81 ^a	0.23 ^{ab}	36.00 ^a
SHH202	6.00 ^a	0.25 ^{ab}	50.81 ^a
SHR103	4.75 ^a	0.22 ^{ab}	28.87 ^a
SYR205	5.62 ^a	0.27 ^{bc}	35.25 ^a
SYR107	5.37 ^a	0.19 ^a	35.43 ^a
Potato dextrose broth (control)	8.68 ^{bc}	0.32 ^{cd}	79.93 ^b
Control (sterile distilled water)	10.00 ^c	101.43 ^b	
F - test	**	**	**
CV (%)	40.52	34.40	73.00
Culture filtrate from stationary phase			
SSR107	3.93 ^a	0.18 ^a	23.00 ^a
SHH202	6.68 ^{bcd}	0.24 ^{abc}	25.62 ^a
SHR103	5.50 ^{ab}	0.23 ^{ab}	33.00 ^a
SYR205	6.06 ^{abc}	0.25 ^{abc}	42.81 ^a
SYR107	6.18 ^{bc}	0.21 ^a	52.50 ^a
Potato dextrose broth (control)	7.81 ^{cd}	0.33 ^c	107.00 ^b
Control (sterile distilled water)	8.75 ^d	0.32 ^{bc}	169.56 ^c
F - test	**	**	**
CV (%)	45.51	45.35	79.38

¹ Mean values within a column followed by different letters were significantly different according to the DMRT. P ≤ 0.05 (*), P ≤ 0.01 (**) and NS = non significant.

Table 3. Effects of cell suspensions and culture filtrate of *Streptomyces* isolates at different growth phase on scab of grape tested under a detached leaf condition.

Form/Growth phase/Isolates	Effect on scab	
	Lesion number	Lesion diameter (cm.)
Cell suspensions from log phase		
SSR203	8.25 ^{bc1/}	0.17 ^b
SSH213	8.00 ^{bc}	0.16 ^b
SYR107	6.25 ^b	0.18 ^b
SHH202	1.50 ^a	0.50 ^a
SHR106	5.75 ^b	0.18 ^b
Control (sterile distilled water)	10.00 ^c	0.22 ^b
F - test	**	**
CV (%)	26.92	33.81
Cell suspensions from stationary phase		
SSR203	7.50 ^b	0.18 ^b
SSH213	7.25 ^b	0.20 ^b
SYR107	5.50 ^b	0.15 ^b
SHH202	0.00 ^a	0.00 ^a
SHR106	6.75 ^b	0.18 ^b
Control (sterile distilled water)	10.00 ^c	0.20 ^b
F - test	**	**
CV (%)	26.89	29.50
Culture filtrate from log phase		
SSR203	3.50 ^{ab}	0.22 ^b
SSH213	7.00 ^{bcd}	0.38 ^c
SYR107	5.00 ^{bc}	0.38 ^c
SHH202	0.00 ^a	0.00 ^a
SHR106	4.25 ^b	0.23 ^b
Potato dextrose broth (control)	8.50 ^{cd}	0.36 ^c
Control (sterile distilled water)	10.00 ^d	0.40 ^c
F - test	**	**
CV (%)	48.70	31.54
Culture filtrate from stationary phase		
SSR203	5.75 ^{ab}	0.30 ^{abc}
SSH213	2.50 ^a	0.08 ^{ab}
SYR107	2.50 ^a	0.07 ^a
SHH202	5.25 ^{ab}	0.22 ^{abc}
SHR106	2.25 ^a	0.19 ^{abc}
Potato dextrose broth (control)	10.00 ^b	0.32 ^{bc}
Control(sterile distilled water)	10.00 ^b	0.40 ^c
F - test	*	*
CV (%)	64.91	68.64

¹ Mean values within a column followed by different letters were significantly different according to the DMRT $P \leq 0.05$ (*), $P \leq 0.01$ (**) and NS = non significant.

มีประสิทธิภาพสูงสุดไม่ว่าจะอยู่ในรูปของ cell suspensions หรือ culture filtrate แต่เมื่อใช้ในระยะเวลา stationary phase เชื้อมีประสิทธิภาพดีที่สุดเฉพาะในรูปของ cell suspensions ในระยะดังกล่าว culture filtrate ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดเป็นของไอโซเลต SYR107 (Table 3)

สำหรับความสามารถในการยับยั้งโรคราสนิมของ *Streptomyces* spp. พบว่าในรูปของ cell suspensions เชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในระยะ log phase คือ ไอโซเลต SSH216 ขณะที่ไอโซเลต SSH211 มีประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับระยะ stationary phase ในรูปของ culture filtrate ผลของการยับยั้งการเกิดโรคแสดงไม่เด่นชัดหากใช้ในช่วง log phase แต่ในช่วง stationary phase เชื้อไอโซเลต SSH211 ในรูป culture filtrate มีประสิทธิภาพสูงสุด (Table 4)

จากผลของการทดลองจะเห็นได้ว่า เชื้อไอโซเลต SHH202 เป็นเชื้อที่มีศักยภาพสูงในการใช้ควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น เนื่องจากสามารถยับยั้งได้ทั้งโรคน้ำค้าง และสแคบ ไม่ว่าจะใช้ในรูปแบบของ cell suspensions หรือ culture filtrate โดยการแสดงออกของศักยภาพดังกล่าวจะสูงสุดหากเชื้ออยู่ในระยะ log phase ความสามารถดังกล่าวลดถอยลงเล็กน้อยเมื่อเชื้ออยู่ในระยะ stationary phase ความสามารถของเชื้อไอโซเลต SHH202 ที่ควบคุมเชื้อราได้มากกว่า 1 ชนิด สอดคล้องกับความสามารถของเชื้อ *S. griseoviridis* ที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคกับเมล็ดพันธุ์ได้มากกว่า 10 ชนิด (Brain and Deborah, 2002) สภาพการดังกล่าวแตกต่างออกไปในกรณีของโรคราสนิมที่พบว่าประสิทธิภาพของเชื้อไอโซเลต SSH216 จะสูงสุดหากใช้เชื้อในระยะ log phase ขณะที่ไอโซเลต SSH211 มีประสิทธิภาพสูงสุดหากเปรียบเทียบกับระยะ stationary phase ความแตกต่างในเบื้องต้นดังกล่าวน่าจะมีผลมาจากชนิดของสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชที่เชื้อปฏิบัติแต่ละไอโซเลตสร้างได้ต่างกันในแต่ละช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโต

สรุปผลการศึกษา

การแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากดินที่ผ่านการอบด้วยอุณหภูมิสูง แม้ว่าจะสามารถลดปริมาณเชื้อชนิดอื่นได้มาก แต่ก็ทำให้จำนวนของเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับดินที่ทำให้แห้งโดยการผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง

การใช้เชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิบัติต่อเชื้อราสาเหตุโรคองุ่นที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นวิธีการที่เหมาะสมและช่วยให้คัดเลือกเชื้อปฏิบัติทำได้ง่ายขึ้น เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aphanidermatum*, *C. ampelinum* และ *S. rolfsii* ได้สูงยังมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคน้ำค้าง สแคบ และราสนิมได้สูงเช่นกัน อย่างไรก็ตามหากเชื้อที่นำมาทดสอบมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. มาก ควรเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* spp. บนอาหารทดสอบรวม 5 - 7 วัน ก่อนปลูกเชื้อราทดสอบในด้านตรงข้ามเพื่อแก้ปัญหาเชื้อ *Streptomyces* spp. ถูกปกคลุมด้วยเชื้อทดสอบที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่า

การใช้ cell suspensions และ culture filtrate ของเชื้อ *Streptomyces* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่นในระดับที่ใกล้เคียงกันการแสดงออกของศักยภาพดังกล่าวสูงสุดหากเชื้ออยู่ในระยะ log phase แต่จะลดลงเล็กน้อยเมื่อเชื้ออยู่ในระยะ stationary phase

เนื่องจากในงานทดลองครั้งนี้ไม่พบเชื้อไอโซเลตใดที่สามารถควบคุมโรคองุ่นจากเชื้อราที่สำคัญได้ทั้ง 3 ชนิด การนำเชื้อเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์จึงควรพิจารณาใช้เชื้อร่วมกันในลักษณะเชื้อผสมระหว่าง SHH202 กับ SSH216 หรือ SSH211 หรือ พิจารณาใช้แต่ละไอโซเลตตามสภาพการระบาดของโรคว่าโรคชนิดใดเป็นปัญหาในช่วงเวลาดังกล่าว ในกรณีของการใช้เชื้อร่วมกันควรจะต้องมีงานทดลองเพื่อ

Table 4. Effects of cell suspensions and culture filtrate of *Streptomyces* isolates at different growth phase on rust of grape tested under a detached leaf condition.

Form/Growth phase/Isolates	Effect on rust		
	Lesion number	Lesion diameter (cm.)	Number of spores (x10 ³ spore/leaf)
Cell suspensions from log phase			
SSH209	7.50 ^{ab1/}	0.22 ^a	56.00 ^{ab}
SSH211	6.00 ^a	0.25 ^a	39.00 ^{ab}
SSH213	10.00 ^b	0.32 ^b	115.25 ^b
SSH216	5.25 ^a	0.24 ^a	27.50 ^a
SYR205	10.00 ^b	0.38 ^b	203.00 ^c
Control (sterile distilled water)	10.00 ^b	0.39 ^b	224.75 ^c
F - test	**	**	**
CV (%)	27.78	14.99	44.95
Cell suspensions from stationary phase			
SSH209	10.00 ^b	0.32 ^{bc}	144.25 ^a
SSH211	4.75 ^a	0.20 ^a	44.75 ^a
SSH213	9.25 ^b	0.19 ^a	61.50 ^a
SSH216	10.00 ^b	0.31 ^{bc}	150.00 ^a
SYR205	9.75 ^b	0.26 ^{ab}	151.00 ^a
Control (sterile distilled water)	10.00 ^b	0.40 ^c	320.00 ^b
F - test	**	**	**
CV (%)	12.41	22.58	52.35
Culture filtrate from log phase			
SSH209	10.00	0.37 ^a	135.25 ^a
SSH211	10.00	0.39 ^a	123.25 ^a
SSH213	9.75	0.36 ^a	118.00 ^a
SSH216	9.75	0.35 ^a	116.75 ^a
SYR205	9.75	0.40 ^a	153.00 ^a
Potato dextrose broth (control)	10.00	0.48 ^{ab}	180.25 ^{ab}
Control(sterile distilled water)	10.00	0.53 ^b	246.25 ^b
F - test	NS	*	*
CV (%)	3.30	20.11	33.23
Culture filtrate from stationary phase			
SSH209	8.25 ^{ab}	0.30 ^{ab}	55.25 ^{ab}
SSH211	6.00 ^a	0.14 ^a	22.00 ^a
SSH213	9.75 ^b	0.37 ^{bc}	111.50 ^{abc}
SSH216	10.00 ^b	0.48 ^{cd}	151.51 ^{bc}
SYR205	8.25 ^{ab}	0.38 ^{bcd}	114.00 ^{abc}
Potato dextrose broth (control)	10.00 ^b	0.51 ^{cd}	167.75 ^{bc}
Control (sterile distilled water)	10.00 ^b	0.55 ^d	198.75 ^c
F - test	*	**	*
CV (%)	20.86	28.08	63.29

¹ Mean values within a column followed by different letters were significantly different according to the DMRT.

P ≤ 0.05 (*), P ≤ 0.01 (**) and NS = non significant.

ตรวจสอบความสามารถเข้ากันได้ (compatibility) ของเชื้อแต่ละไอโซเลตก่อนนำไปใช้ในสภาพจริง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนตร ภาควิชาพันธุศาสตร์ และอาจารย์ ดร.กรรณิการ์ ดวงมาลย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่ช่วยสอนเทคนิคการแยกเชื้อ *Streptomyces* spp.

เอกสารอ้างอิง

- เกษม สร้อยทอง. 2532. การใช้ *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวโดยชีววิธี. วารสารโรคพืช. 9(1):28-33.
- เทพิน เดชนันท์รัตน์. 2546. การคัดแยกแอสโคไมซีตในมัยสียที่สร้างสารต่อต้านเชื้อรา และศึกษาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) และ Ribotyping. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาพันธุศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อนันต์ วงเจริญ. 2547. การจำแนกชนิดเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยใช้คุณลักษณะผสมผสาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สำนักงานสถิติการเกษตร. 2547. ปริมาณและมูลค่าสินค้าเกษตรกรรมส่งออก พ.ศ. 2547-2548.

- Brian, B. M. G., and R. F. Deborah. 2002. Biological control of plant pathogens : research, commercialization, and application in the USA.[On-line]. Available : <http://www.apsnet.org/online/feature/biocontrol/links.html>.
- Cao, L., Z. Qiu, J. You, H. Tan, and S. Zhou. 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. FEMS Microbiology Letters. 247:147-152.
- Mahadevan, B., and D. L. Crawford. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. Enz. and Micro.Tech. 20 : 489-493.
- Neeno, E.C., L. L. Kinkel, and J. L. Schottel. 2001. Competition and antibiosis in the control of potato scab. Can. J. Microbiol. 47:332-340.
- Pang, X., X. Zhou, Y. Sun, and Z. Deng. 2002. Physical map of *Streptomyces hygroscopicus* 10-22 deduced by analysis of overlapping large chromosomal deletion. J. Bacteriol. 184:1958-1965.
- Swan, D. G., A. M. Rodriguez, C. Vilches, C. Mendez, and J. A. Salas. 1994. Characterization of a *Streptomyces* antibiotic gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. Mol. Gen. Genet. 242:358-3.