

การคัดเลือกเชื้อ actinomycetes เบื้องต้นเพื่อควบคุมเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคปลีเน่าในดอกหน้าวัว

Primary Screening of Actinomycetes for Controlling *Lasiodiplodia* sp. the Causal Agent of Anthurium Spadix Rot

วิไลลักษณ์ แดงสุวรรณ^{1*}, ปรีศนา วงศ์ล้อม², และ อนูรักษ์ สันป่าเป้า¹

Wilailuck Daengsuwan¹, Prisana Wonglom² and Anurag Sunpapao¹

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกและทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราของเชื้อ actinomycetes จำนวน 3 ชนิด คือ *Kitasatospora nipponensis* KM6-4, *Streptomyces hygroscopicus* NR8-2 และ *Streptomyces* sp. TH23-7 ต่อเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคปลีเน่าในหน้าวัว โดยเชื้อ KM6-4, NR8-2 และ TH23-7 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ได้ 70.13 ± 2.76 , 80 ± 0.94 และ 69.33 ± 0.94 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับโดยกรรมวิธี dual culture เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อของทั้ง 3 ชนิด พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ได้ 2.30 ± 0.11 , 46.92 ± 0.2 และ 3.05 ± 0.04 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. โดยกลไกการยับยั้งทำลาย (antibiosis) ได้ดีกว่าเชื้ออื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ: โรคปลีเน่า, กลไกการยับยั้ง, หน้าวัว, *Lasiodiplodia* sp.

ABSTRACT: The objective of this study was to screen and test antifungal activity of 3 species of actinomycetes namely *Kitasatospora nipponensis* KM6-4, *Streptomyces hygroscopicus* NR8-2 and *Streptomyces* sp. TH23-7 against *Lasiodiplodia* sp. the causal agent of anthurium spadix rot. The actinomycetes KM6-4, NR8-2 and TH23-7 inhibited mycelial growth of *Lasiodiplodia* sp. with 70.13 ± 2.76 , 80 ± 0.94 and $69.33 \pm 0.94\%$ respectively, by dual culture assay. Cell-free culture filtrate of KM6-4, NR8-2 and TH23-7 inhibited mycelial growth of *Lasiodiplodia* sp. with 2.30 ± 0.11 , 46.92 ± 0.2 and $3.05 \pm 0.04\%$ respectively, by agar diffusion method. From this finding, *S. hygroscopicus* NR8-2 effectively inhibited *Lasiodiplodia* sp. by antibiosis mechanism, significantly difference among tested actinomycetes.

Keywords: spadix rot, antibiosis, *Anthurium andreaeanum*, *Lasiodiplodia* sp.

¹ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
Department of Pest Management, Faculty of natural Resources, Prince Of Songkla University, Hatyai, Songkla 90112

² สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จังหวัดพัทลุง 93120
Faculty of Technology and Community Development, Thaksin University, Pa Payom District, Phattalung 93120

* Corresponding author: anurag.su@psu.ac.th

บทนำ

หน้าวัว (*Anthurium andraeanum*) จัดอยู่ในวงศ์ไม้ออกไม้ประดับ สกุล *Anthurium* วงศ์ *Araceae* โดยมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศโคลัมเบีย (สมเพียร, 2525) ถือเป็นไม้ออกไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ให้ผลตอบแทน และทำรายได้ต่อไร่สูง (สุรวิษ, 2536) ในประเทศไทยมีการปลูกหน้าวัวหลายพื้นที่ เนื่องจากหน้าวัวเป็นไม้ออกไม้ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีสภาพร้อนชื้น รวมถึงความสวยงามที่ทำให้หน้าวัวมีความนิยมอยู่ที่สีสัน ผิวสัมผัสของใบ ดอก และผล จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ด้านตัดดอก จัดสวน และใช้เป็นไม้กระถาง (สุรวิษ, 2534)

โรคปลีเน่าจัดเป็นโรคหนึ่งที่มีความสำคัญต่อดอกหน้าวัว เนื่องจากหน้าวัวเป็นไม้ออกไม้ประดับ ดอกจึงเป็นปัจจัยหลัก เมื่อดอกได้รับความเสียหายย่อมเกิดความเสียหายโดยตรงในการลดทั้งคุณภาพและปริมาณการผลิต ลักษณะอาการปลีเน่า จะมีสีน้ำตาลถึงสีดำบนปลีดอก เชื้อ *Lasiodiplodia* sp. พบว่าก่อให้เกิดโรคปลีเน่ากับดอกหน้าวัวในเขตพื้นที่ภาคใต้ของไทย ลักษณะเด่นของเชื้อนี้ คือ เส้นใยมีสีขาวละเอียด เจริญเร็ว เมื่อโคโลนีแก่จะเปลี่ยนเป็นเทาดำ (กาญจนา, 2552) ลักษณะอาการปลีเน่า จะมีสีน้ำตาลถึงสีดำบนปลีดอก การใช้สารเคมีในการควบคุมโรค ยังไม่เพียงพอต่อการควบคุมโรคได้ เนื่องจากการใช้สารเคมีจะส่งผลต่อการต้านทานของเชื้อสาเหตุโรค ทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคลดน้อยลง และเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมปลอดภัยต่อเกษตรกร การใช้เชื้อ *actinomycetes* ในกลุ่ม *Streptomyces* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช พบว่าเชื้อมีศักยภาพสูงในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดที่สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชได้ (Bressan, 2003; Yu et al., 2008) จากงานวิจัยของ สุภาภรณ์ (2557) พบว่าเชื้อ *Kitasatospora nipponensis* KM6-4, *Streptomyces hygroscopicus* NR8-2 และ *Streptomyces* sp.TH23-7 มีประสิทธิภาพควบคุมโรคใบจุด และโคนเน่าของปาล์มน้ำมันได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิภักษ์ *actinomycetes* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคปลีเน่าของหน้าวัวเบื้องต้น ในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็นข้อมูล

พื้นฐานในการที่จะนำเชื้อไปใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดขึ้นในสภาพแปลงปลูกต่อไปได้

วิธีการศึกษา

เชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิภักษ์ *actinomycetes*

เชื้อราสาเหตุโรคปลีเน่า *Lasiodiplodia* sp. แยกได้จากต้นหน้าวัวสายพันธุ์ angle และเชื้อ *actinomycetes* จำนวน 3 ชนิด คือ *K. nipponensis*, *S. hygroscopicus* และ *Streptomyces* sp. แยกได้จากดินรอบโคนต้นปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศไทย (สุภาภรณ์, 2557) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Culture Collection of Pest Management คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 3 วัน และเชื้อ *actinomycetes* บนอาหาร glucose yeast malt agar (GYMA) เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปทำการทดลองต่อไป

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิภักษ์เบื้องต้นโดยวิธี Dual culture test

ทดสอบบนอาหาร PDA โดย streak เชื้อ *actinomycetes* 3 ชนิดบนอาหาร PDA ระยะห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร จนเชื้อสร้างสปอร์ตามแนวรอยขีด เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้น cork ตัดชิ้นส่วนของเชื้อก่อโรค วางในแนวตรงข้ามกับชิ้นส่วนของเชื้อปฏิภักษ์ และชุดควบคุมวางเพียงชิ้นส่วนหนึ่งของ *Lasiodiplodia* sp. โดยมีระยะห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อปฏิภักษ์ และเชื้อราสาเหตุโรค วัดรัศมีของเชื้อราก่อโรค นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Vincent, 1927) ดังสมการ

$$\text{Growth inhibition (GI)} = [(R1 - R2)/R1] \times 100$$

R1 = รัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R2 = รัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการเป็นปฏิภักษ์ของเชื้อ *actinomycetes* ของแต่ละไอโซเลท

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ ปฏิภักษ์ต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค

เลี้ยงเชื้อ actinomycetes ทั้ง 3 ชนิดในอาหาร glucose yeast malt broth (GYMB) เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองรูปวงขนาด 0.45 µm และนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองแล้วมาทดสอบด้วยวิธี agar diffusion บนอาหาร PDA โดยใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะรู 3 จุด โดยในแต่ละจุดมีระยะห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร ทำการหยอดอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMB, น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ และน้ำเลี้ยงเชื้อ จากนั้น cork เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อวางตรงกลางของจานเลี้ยงเชื้อ ทำ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และวัดรัศมีของเชื้อก่อโรค คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตรของ Mostapha (2004) ดังสมการ

$$\text{Growth inhibition (GI)} = \left[\frac{(C-T)/C}{C} \right] \times 100$$

C = รัศมีของโคโลนีเชื้อราก่อโรคที่เจริญจากจุดกึ่งกลางไปทางหลุมที่หยอด GYMB

T = รัศมีของโคโลนีเชื้อราก่อโรคที่เจริญจากจุดกึ่งกลางไปทางหลุมที่หยอดน้ำเลี้ยงเชื้อ

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

นำค่าเฉลี่ยแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS ver. 16.0

ผลการศึกษา และวิจารณ์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ actinomycetes ทั้ง 3 ชนิด ต่อเชื้อสาเหตุโรคปรีเน่า

ในหน่อข้าว *Lasiodiplodia* sp. โดยใช้วิธี dual culture บนอาหาร PDA พบว่าไอโซเลท KM6-4, NR8-2 และ TH23-7 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรค 70.13±2.76 %, 80±0.94% และ 69.33±0.94% ตามลำดับ (Table 1) โดยเชื้อ NR8-2 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรค แตกต่างกับเชื้อ KM6-4, TH23-7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Figure 1) จากรายงานของ เกวลิน และคุณากร (2555) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟต์ที่อยู่ในสกุล *Streptomyces* sp. เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของลำไย ด้วยวิธี dual culture พบว่า เชื้อ actinomycetes มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในสกุล *Lasiodiplodia* sp. เช่นเดียวกับการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อ actinomycetes มีกลไกหลังสารต้านเชื้อราออกมาเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ actinomycetes สร้างสารมีฤทธิ์ต้านเชื้อราออกมายับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคปรีเน่า เพื่อทดสอบการสร้างสารออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเลี้ยงเชื้อ actinomycetes ในอาหารเหลวสูตร GYMB และกรองเอาส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ actinomycetes ทั้ง 3 ชนิด พบว่าเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เฉพาะหลุมที่หยอดน้ำเลี้ยงเชื้อของ NR8-2 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 46.92 ± 0.2%, ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ KM6-4 และ TH23-7 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง 2.30±0.11% และ 3.05±0.04% ตามลำดับ (Figure 3) เมื่อสังเกตจากโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าเชื้อสาเหตุโรคเจริญปกคลุมหลุมที่หยอดน้ำเลี้ยงเชื้อของ KM6-4

Table 1 *In vitro* antifungal activity of actinomycetes 3 species by dual culture assay

Isolates	Colony radii (cm.)		Inhibition (%)
	Control	Dual culture	
KM 6-4	7.5	2.24	70.13 ¹ ± 2.76b
NR 8-2	7.5	1.50	80.00 ± 0.94a
TH 23-7	7.5	2.30	69.33 ± 0.94b

¹Mean from five replications

Value are the mean (±SD), inhibition percentage against *Lasiodiplodia* sp. ($P < 0.05$), the value in the column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's test.

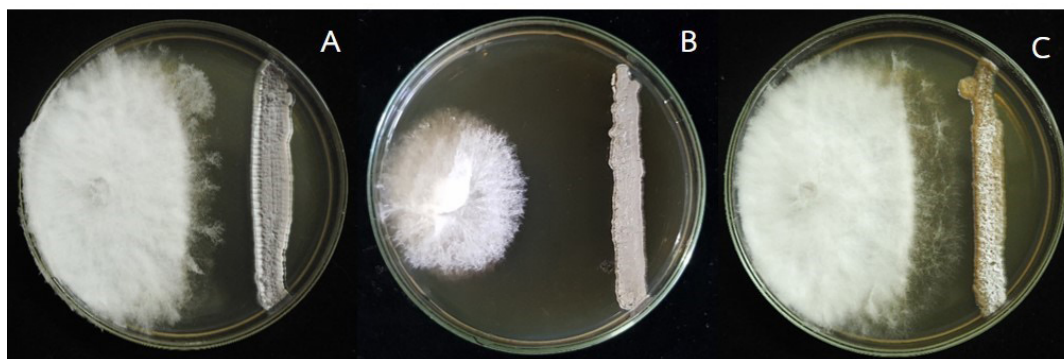


Figure 1 Antifungal activity of actinomycetes against *Lasiodiplodia* sp. by dual culture assay. A: KM 6-4, B: NR 8-2 and C: TH 23-7.

และ TH23-7 ขณะที่หลุมที่หยอดน้ำเลี้ยงเชื้อ NR8-2 เกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) บนอาหารที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี agar diffusion (Figure 4) ทั้งนี้เป็นผลมาจากในน้ำเลี้ยงเชื้อมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด จากรายงานของ Lechevalier, *et al.* (1953) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ (cell-free CF) ของเชื้อ *S. griseus* มีสารต้านเชื้อรา (antifungal agent) สารพวก polyene macrolide รวมถึงเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ (cell wall degrading enzyme) เช่น β -1,3- glucanase และ

chitinase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกลูแคน และไคตินที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อราสาเหตุโรคพืช (ปรางค์ และชนิตาภา, 2555) นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Streptomyces* ยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะต้านเชื้อราซึ่งเป็นสารในกลุ่ม beta-lactams, polyethers, nonpolyenic macrolides, azalomycin B และสารปฏิชีวนะชนิดอื่นๆที่เชื้อสร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมเชื้อโรคพืชชนิดต่างๆ (Gesheva, 2002)

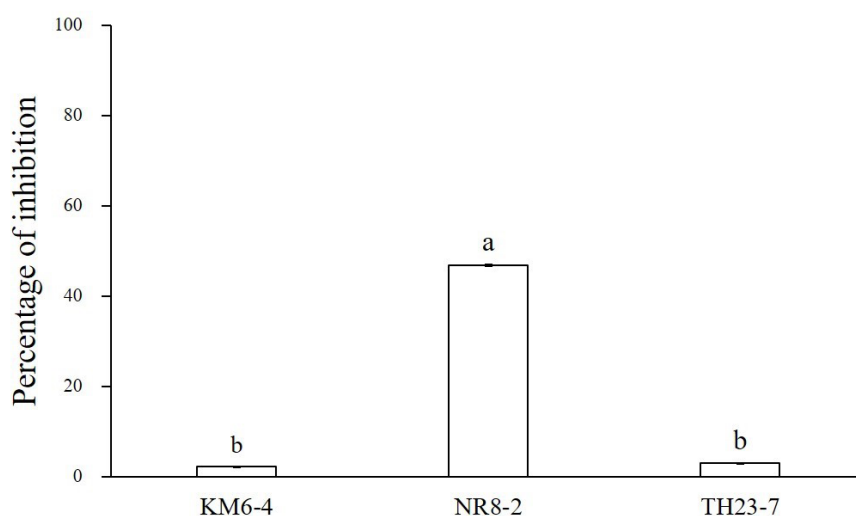


Figure 3 Percentage inhibition of actinomycetes against *Lasiodiplodia* sp. by agar diffusion method.

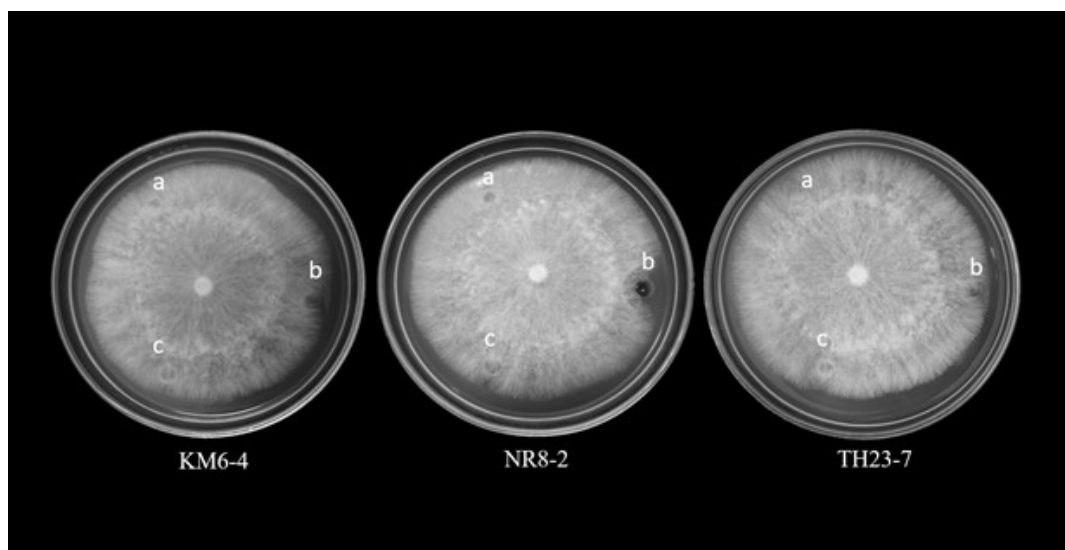


Figure 4 Antifungal activity of cell-free CF of actinomycetes against *Lasiodiplodia* sp. by agar diffusion method. where, a= GYMB, b= cell free CF and c= DW.

สรุป

จากผลการทดลองการคัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์ actinomycetes ทั้ง 3 ชนิด คือ *K. nipponensis* KM6-4, *S. hygroscopicus* NR8-2 และ *Streptomyces* sp. TH23-7 ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราต่อเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ซึ่งก่อโรคปลีเน่าในหน่อข้าว พบว่า เชื้อ NR8-2 มีศักยภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค แตกต่างจากเชื้ออีก 2 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลไกการยับยั้งทำลาย (antibiosis) ส่งผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค และทำลายเส้นใยของเชื้อราก่อโรค ทั้งนี้เชื้อ NR8-2 จะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบในพืช และในสภาพแปลงต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา นิรภัย และเอกชัย ชูเกียรติโรจน์. 2552. ชีววิทยาของเชื้อ *Lasiodiplodia* spp. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 25(2): 121-122.
- เกวลิน คุณาศักดากุล และ ชัยพร ชัดสงคราม. 2555. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีตเอนโดไฟต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย. วารสารเกษตร(28)3: 285-294
- ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล และ ชนิตาภา นวะพัฒน์. 2555. การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ รา *Sclerotium rolfsii* ด้วยแอคติโนมัยซีต *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24 ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 14(1): 10-22.
- สมเพียร เกษมทรัพย์. 2525. การปลูกไม้ดอก. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 455.
- สุรวิช วรณโกรโรจน์. 2536. การปลูกไม้ดอกสกุลหน้าวัว. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 56: 1-14.

- สุวิธ วรณไกรโรจน์. 2534. เทคโนโลยีการผลิตไม้ตัดดอกสกุลหน้าวัว. เทคโนโลยีการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ สมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. หน้า 59-63.
- สุภาภรณ์ พิทักษ์กิจ, วสันต์ เพชรรัตน์ และเสมอใจ ชื่นจิตต์. 2557. การคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากดินรอบโคนต้นปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศไทย สำหรับควบคุมเชื้อราก่อโรคปาล์มน้ำมันโดยชีววิธี. วารสารพืชศาสตร์ สงขลานครินทร์. 1(1): 78-81.
- Bressan, W. 2003. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. *BioControl*. 48: 233-240.
- Gesheva, V. 2002. *Rhizosphere microflora* of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. *European Journal of Soil Biology* 38(1): 85-88.
- Mostapha, N.K. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistic bacteria in greenhouse and field conditions. *Plant Pathology J.* 3: 88-96.
- Lechevalier, R., Acker, F., Corke, C. T., Haenseler, C.M. and Waskman, S.A. 1953. Candicidin, a new antifungal antibiotic. *Mycol.* 45: 155-171.
- Paranagama, P. A., Wijeratne, E. M. K. and Gunatilaka, A. A. L. 2007. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: Effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*, *J. Nat. Prod.* 70: 1939-1945.
- Vincent, J. 1927. Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature*. 59: 850.
- Yu, J., Liu, Q., Liu, Q., Liu, X., Sun, Q., Yan, J., Qi, X., & Fan, S. 2008. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technology*. 99: 2087-2091.