

ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต้นโศเภศวร จากพืชวงศ์ลำไยในการควบคุมโรคผลเน่าของลำไย

Efficacy of Endophytic Actinomycetes from Sapindaceae Plants in Controlling Fruit Rot Disease of Longan

ชัยพร ขัดสงคราม^{1/} และ เกวลิณ คุณาศักดากุล^{1/}
Chaiporn Kudsongkram^{1/} and Kaewalin Kunasakdakul^{1/}

Abstract: Endophytic actinomycetes were isolated from Sapindaceae plants on Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) and 45 isolates were recovered. Their antagonistic potentials were screened against *Pestalotiopsis* sp. and *Lasiodiplodia* sp. pathogens of fruit rot of longan using dual culture method. A total of 9 isolates of endophytic actinomycetes were selected with highest antagonistic effects on both pathogens. The results revealed that isolates of LEP1, LEP2, LEP3, LITc4, LITc9, SCH1 and SCH2 could inhibit *Pestalotiopsis* sp. at 90.70-94.17% and the isolates of LEP1, LEP2, LEP3, LITc7, SCH, SCH2 and SCH3 could inhibit *Lasiodiplodia* sp. at 88.19-91.94%. Endophytic actinomycetes were used to control fruit rot of longan by spraying with suspension of the isolates. The results showed that the endophytic actinomycetes could control fruit rot of longan when comparing with untreated control. The numbers of microorganism contaminating in longan peel were examined and the results revealed that the numbers of microorganism in longan peel spraying with suspension of the endophytic actinomycetes were less than in the control.

Keywords: Endophytic actinomycetes, longan, fruit rot disease, biological control

^{1/} ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

บทคัดย่อ: จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์จากพืชวงศ์ลำไย (sapindaceae) บนอาหาร Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) สามารถแยกได้ทั้งหมด 45 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของลำไย ด้วยวิธี dual culture เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย พบว่า สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคทั้งสองชนิดได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท คือ LEP1, LEP2, LEP3, LITc4, LITc9, SCH1 และ SCH2 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ได้ที่ 88.19-91.94 เปอร์เซ็นต์ และ LEP1, LEP2, LEP3, LITc7, SCH1, SCH2 และ SCH3 สามารถยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ได้ที่ 88.19-91.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคผลเน่าของลำไย โดยการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้บนผลลำไย พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์สามารถควบคุมการเกิดโรคผลเน่าของลำไยได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และจากการตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไย พบว่าผลลำไยที่พ่นเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ทุกไอโซเลทมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ ผลลำไย โรคผลเน่า การควบคุมด้วยชีววิธี

คำนำ

เชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เกษตรกรรม การเกษตร และอุตสาหกรรม สามารถผลิตสารทุติยภูมิสำคัญหลายประเภท เช่น สารปฏิชีวนะ (Jonete *et al.*, 2000) เอนไซม์ และวิตามิน สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด (นิตยา และสายสมร, 2543; Chris, 2002; Shimizu *et al.*, 2000) และเป็นที่น่าสนใจของนักวิชาการในการศึกษา ค้นคว้า และพัฒนาเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์เพื่อใช้ในการควบคุมโรค ลำไยจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศที่รายได้ปีละหลายพันล้านบาท แต่เป็นพืชที่มีอายุการเก็บรักษาสั้นและเนื่องจากเป็นพืชที่มีน้ำตาลสูง จึงถูกทำลายจากจุลินทรีย์และทำให้เกิดการเน่าเสียได้ง่าย (รัชมังพันธุ์ และคณะ, 2551) โดยจุลินทรีย์สาเหตุของโรคที่ทำให้เกิดอาการผลเน่าอย่างรุนแรงบนผลลำไย ได้แก่ เชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. (Suwanakood *et al.*, 2007) การรมผลด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO₂) เป็นวิธีการที่นิยมและใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่มักมีปัญหาเกี่ยวกับการตกค้างของ SO₂ ในผลลำไยสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ทำให้ประเทศคู่ค้ามีความเข้มงวดในการนำเข้าลำไยสดจากประเทศไทย (สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร, 2553) การใช้

เชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์จึงเป็นวิธีการที่น่าสนใจ วิธีการหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคผลเน่าของลำไย ประกอบกับงานวิจัยที่ผ่านมา เกวลิณ และชัยพร (2555) ได้คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์จากเปลือกผลลำไยที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ในระดับที่ดี แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการนำเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์มาประยุกต์ใช้ในการลดการใช้สารเคมีเพื่อควบคุมโรคผลเน่าของลำไยได้ในอนาคต ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชวงศ์ลำไย (Sapindaceae) เพื่อคัดเลือกหาเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคผลเน่าของลำไยมาใช้ทดแทนการใช้สารเคมี

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกและเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์

เก็บตัวอย่างพืชวงศ์ลำไย (Sapindaceae) จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ ลำไย (*Dimocarpus longan*) เงาะ (*Nephelium lappaceum*) ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis*) คอแลน (*Nephelium hypoleucum*) ขำมะเลียง (*Lepisanthes fruticosa*) มะหวด (*Lepisanthes*

rubiginosa) ประคำดีควาย (*Sapindus rarak*) ตะคร้อ (*Schleichera oleosa*) และโคกกระออม (*Cardiospermum halicacabum*) โดยเลือกเก็บเฉพาะส่วนที่สมบูรณ์ จากเปลือกผล ก้าน และใบที่ไม่มีการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลง หรือแสดงอาการของโรคมาแยกเชื้อโดยดัดแปลงวิธีการของ Shimizu *et al.* (2000) จากนั้นวางขึ้นพีชบนอาหาร Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) บ่มไว้ในตู้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นแยกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ให้บริสุทธิ์

2. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย

ทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชวงศ์ลำไย (จากการทดลองที่ 1) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของลำไย ด้วยวิธี dual culture โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์บนอาหาร ISP-2 (Taechowisan *et al.*, 2005) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวางเชื้อราสาเหตุบริเวณตรงกันข้าม ระยะห่าง 3 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ 1 จานอาหาร สำหรับชุดควบคุมวางเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว บันทึกผลโดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบ เมื่อเชื้อราในชุดควบคุมเจริญจนเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG)

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ (PIRG) ดังนี้

$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดสอบ

จากนั้นคัดเลือกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูงสุดมาศึกษาในขั้นต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคผลเน่าของลำไย

พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ (จากการทดลองที่ 2) บนข้อผลของลำไยก่อนการเก็บเกี่ยวประมาณ 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยทำการทดลองไฮโซเลทละ 8 ซ้ำ ๆ ละ 1 ข้อ โดยพ่นสปอร์ละครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สำหรับชุดควบคุมจะไม่พ่นสารใด ๆ หลังจากพ่นสปอร์สุดท้ายเป็นเวลา 3 วัน จึงเก็บผลลำไยตัดขั้วผล จัดเรียงบนถาดโฟม ถาดละ 1 ข้อ หุ้มด้วยพลาสติก polyvinyl chloride (PVC) แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส บันทึกผล การเปลี่ยนแปลง โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 15 วัน

4. การตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เลือกผลลำไยหลังจากการพ่นเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์

สุ่มเก็บผลลำไยที่พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ในการทดลองที่ 2 (จากการทดลองที่ 3) ไฮโซเลทละ 4 ผล แช่ในน้ำกลั่นมาเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที นำสารแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ที่เลือกผลลำไยเพื่อตรวจสอบเข้มข้น 10^{-3} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จึงตรวจนับโคโลนี (CFU/ml) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบ โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำ 1 จานอาหาร

5. การตรวจสอบความสามารถในการเข้าอาศัยของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในผลลำไย

ตรวจสอบความสามารถในการเข้าอาศัยพืชด้วยวิธีการแยกเชื้อกลับ (re-isolation) โดยสุ่มเก็บผลลำไยที่พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ในการทดลองที่ 2 (จากการทดลองที่ 3) มาแยกเชื้อแอคติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์อีกครั้ง สังเกตและ

เปรียบเทียบลักษณะโคโลนี สีของโคโลนี การสร้างรงควัตถุ และรูปแบบการเรียงเส้นสายของสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ที่พบในสปอร์แขวนลอยบนข้อผลลำไยในการทดลองที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกและเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์จากชิ้นส่วนของพืชวงศ์ลำไย (Sapindaceae) พบโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายผงแป้งบริเวณผิวชิ้นพืชหลังบ่มเชื้อ 30 วัน ตามส่วนต่าง ๆ ของพืชทั้ง 9 ชนิด ซึ่งสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ ได้ทั้งหมด 45 ไอโซเลท โดยตั้งชื่อไอโซเลทตามชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช ดังแสดงในภาพที่ 1 และตารางที่ 1

2. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย

จากการนำเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชวงศ์ลำไย มาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย ด้วยวิธี dual culture พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด ได้แตกต่างกัน และแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบเชื้อแอคติโนมัยซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากในการยับยั้งเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ LEP1, LEP2, LEP3, LITc4, LITc9, SCH1 และ SCH2 โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญอยู่ในช่วง

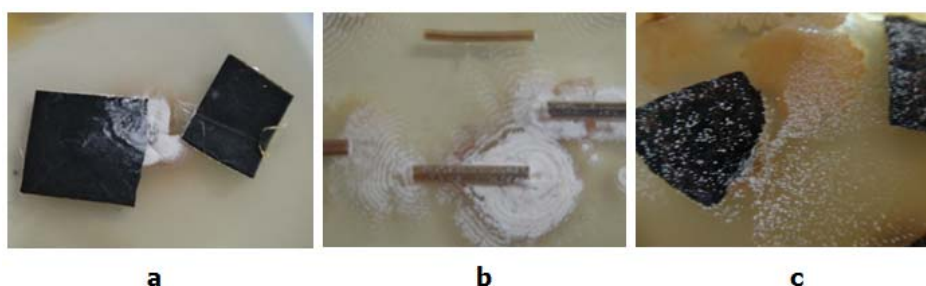


Figure 1 Endophytic actinomycetes isolated from Sapindaceae plants leaves (a); stems (b); and peels (c) after incubation in IMA-2 at 30 °C for 7 days.

Table 1 Numbers of endophytic actinomycetes isolated from Sapindaceae plants parts.

Plant	Scientific Name	Isolate	Number of isolates from			Total
			Leaves	stems	peels	
Longan	<i>Dimocarpus longan</i>	DIM	2	2	9	13
Litchi	<i>Litchi chinensis</i>	LITc	2	4	3	9
Rambutan	<i>Nephelium lappaceum</i>	NEP	-	-	-	-
Korlan	<i>Nephelium hypoleucum</i>	NEH	1	-	2	3
Ceylon oak	<i>Schleichera oleosa</i>	SCH	-	-	3	3
Ma Huat	<i>Lepisanthes rubiginosa</i>	LEP	3	2	-	5
Luna nut	<i>Lepisanthes fruticosa</i>	LEF	2	2	-	4
Soap nut	<i>Sapindus rarak</i>	SAP	-	2	-	2
Balloon vine	<i>Cardiospermum halicacabum</i>	CAR	-	3	3	6

90.70-94.17 เปอร์เซ็นต์ และพบเชื้อแอคติโนไมซีต์เอนโดไฟต์จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ LEP1, LEP2, LEP3, LITc7, SCH1, SCH2 และ SCH3 ที่ประสิทธิภาพสูงมากในการยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญอยู่ในช่วง 88.19-91.94 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2 และตารางที่ 2) จากผลการทดลองจะพบว่า เชื้อแอคติโนไมซีต์เอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดได้แตกต่างกัน และส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญค่อนข้างสูงมาก โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ต่างกันอาจเป็นเพราะสารปฏิชีวนะที่เชื้อแอคติโนไมซีต์เอนโดไฟต์สร้างขึ้นอาจมีผลต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชแตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของ Sardi *et al.* (1992) เชื้อแอคติโนไมซีต์เอนโดไฟต์บางชนิดที่พบทั่วไปในธรรมชาติ จัดเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจำพวก narrow antimicrobial spectrum ซึ่งจะสร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ 1-2 ชนิด เท่านั้น และสำหรับเชื้อแอคติโนไมซีต์ส่วนใหญ่มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดที่สูงมาก อาจเนื่องมาจากการทดสอบในอาหาร ISP-2 เชื้อแอคติโนไมซีต์เอนโดไฟต์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ในปริมาณมาก โดยสารปฏิชีวนะที่เชื้อแอคติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ผลิตนั้นมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตหรือฆ่าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ทำให้เชื้อสาเหตุถูกยับยั้งการเจริญในปริมาณมากเช่นกัน และงานวิจัยที่ผ่านมา เกลวีน และชัยพร (2555) พบว่าการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีต์เอนโดไฟต์บนอาหาร

ISP-2 มีค่าการยับยั้งสูงกว่าบนอาหาร IMA-2 และค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งส่วนใหญ่จัดอยู่ในระดับสูงมาก ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ จัตุรสุดา และเกรวีน (2555) และ Taechowisan *et al.* (2005) ที่พบว่า การเลี้ยงและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในอาหาร ISP-2 เชื้อสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ในปริมาณมาก ทำให้มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคที่สูง และจากผลการทดลองสามารถคัดเลือกเชื้อแอคติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ LEP1, LEP2, LEP3, LITc4, LITc7, LITc9, SCH1, SCH2 และ SCH3 และนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ในการควบคุมโรคผลเน่าของลำไย

จากการฟอสפורแว่นลอยของเชื้อแอคติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ (LEP1, LEP2, LEP3, LITc4, LITc7, LITc9, SCH1, SCH2 และ SCH3) บนข้อผลของลำไยก่อนการเก็บเกี่ยวสัปดาห์ละครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วเก็บผลลำไยหลังจากฟอสพอรัสสุดท้ายเป็นเวลา 3 วัน ตัดข้อผลและจัดเรียงบนถาดโฟม ถาดละ 1 ข้อ หุ้มด้วยพลาสติก PVC แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคผลเน่าบนผลลำไยทุกกรรมวิธีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น แต่น้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

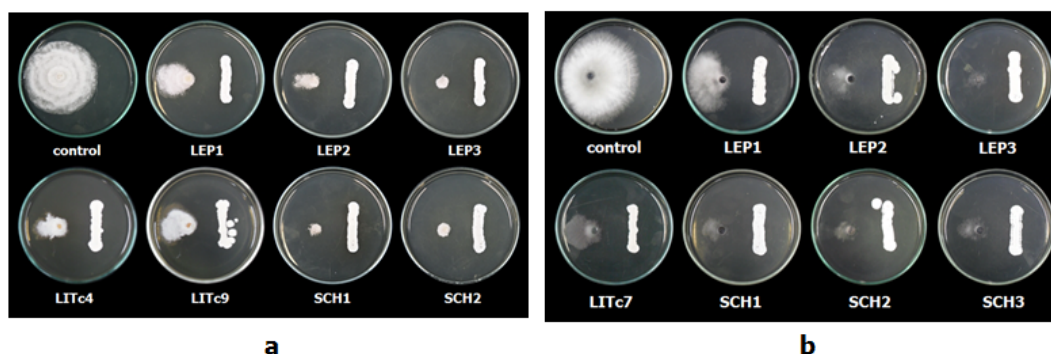


Figure 2 Nine isolates of endophytic actinomycetes in dual cultures against *Pestalotiopsis* sp. (a) and *Lasiodiplodia* sp. (b) on ISP-2 agar for 7 days.

Table 2 Inhibition percentages of endophytic actinomycetes isolated from Sapindaceae plants on growth of *Pestalotiopsis* sp. and *Lasiodiplodia* sp. fruit rot fungi of longan in screening tests on ISP-2 agar.

Isolate	Inhibition percentage (%) ¹		Isolate	Inhibition percentage (%)	
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.		<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
CAR1	82.813 hij	75.385 fg	LEP1	94.167 a	88.194 abcd
CAR2	82.031 ij	76.154 fg	LEP2	91.667 abc	90.278 abc
CAR3	86.719 efg	83.077 de	LEP3	94.167 a	88.889 abc
CAR4	85.156 fghi	76.154 fg	LEP4	30.833 o	48.611 n
CAR5	82.813 hij	85.385 cd	LEP5	56.667 lm	75.000 fg
CAR6	85.156 fghi	83.077 de	LITc1	86.047 fgh	61.290 hij
DIM4	ND	65.445 h	LITc2	90.297 bcde	62.097 hij
DIM8	52.918 mn	ND	LITc3	87.597 def	58.871 jkl
DIM9	58.005 l	ND	LITc4	92.248 ab	63.710 hij
DIM12	ND	53.112 mn	LITc5	86.822 ef	59.677 ijk
DIM15	87.093 def	72.970 fg	LITc6	86.822 ef	72.581 g
DIM16	ND	54.450 klm	LITc7	88.372 cdef	91.935 a
DIM19	53.225 mn	ND	LITc8	85.246 fghi	64.516 hi
DIM20	ND	52.723 mn	LITc9	90.698 abcd	62.097 hij
DIM25	ND	51.832 mn	NEH1	85.156 fghi	86.154 bcd
DIM27	82.946 ghij	65.323 h	NEH2	87.500 def	76.923 fg
DIM28	86.822 ef	64.516 hi	NEH3	82.031 ij	78.462 ef
DIM29	69.767 k	60.484 hij	SAP1	81.250 j	75.385 fg
DIM30	87.597 def	72.581 g	SAP2	82.031 ij	76.154 fg
LEF1	58.197 l	52.985 mn	SCH1	92.500 ab	91.667 ab
LEF2	56.557 lm	51.493 mn	SCH2	92.500 ab	88.889 abc
LEF3	54.918 lmn	52.239 mn	SCH3	88.333 cdef	90.278 abc
LEF4	52.459 n	53.731 lmn			
LSD _{0.05}	3.97	5.71	%CV	3.86	5.63

¹ Means within the same column followed by different letters were significantly different at $P < 0.05$ by LSD.

ND = not determined

ทางสถิติ (ภาพที่ 3) และเมื่อเก็บรักษาผลลำไยเป็นเวลา 15 วัน พบว่าไอโซเลท LEP2 มีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนผลลำไยน้อยที่สุด และหาค่าควบคุมมีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนผลลำไยสูงสุด คือ 15.63 และ 90.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยลำไยที่ปนด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อไอโซเลท LEP2 บางผลมีสีเปลือกเข้มขึ้น

ผิวเปลือกภายในยังคงมีสีขาว เนื้อผลแน่น และสามารถรับประทานได้ ส่วนหาค่าควบคุมส่วนใหญ่เปลือกมีสีน้ำตาลเข้ม บางผลเริ่มเน่าเสียมีน้ำไหลเยิ้มออกมา มีเส้นใยเชื้อราปกคลุม เปลือกยุ่ย ผิวเปลือกภายในมีสีคล้ำ เนื้อผลเน่าและกลืนเหว้น ไม่สามารถรับประทานได้ (ภาพที่ 4)

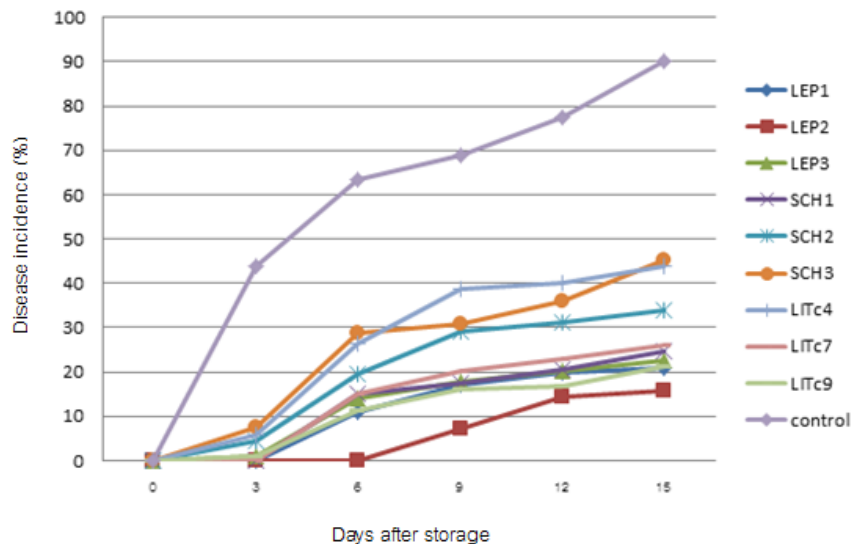


Figure 3 Disease incidences of longan fruit rot after spraying with each isolate of endophytic actinomycetes suspension.



Figure 4 Longan fruits were sprayed with endophytic actinomycetes suspension isolate LEP2 (a) and stored at 5 °C for 15 days comparing with untreated control (b).

จากผลการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 9 ไอโซเลท ซึ่งมาจากเชื้อแอคติโนมัยซีสในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญ คือ มีค่าเปอร์เซ็นต์ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. อยู่ในช่วง 90.70-94.17 และ 88.19-91.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับแต่เมื่อนำมาใช้ในสภาพแปลง กลับพบว่าผลลำไยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างทำให้เชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ

เชื้อสาเหตุโรคลดลง และเชื้อสาเหตุโรคอาจมีความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อปฏิปักษ์ สอดคล้องกับรายงานของ Rukayadi *et al.* (1995) การทดสอบในสภาพแปลงเชื้อที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการอาจสูญเสียความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์เมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง และเชื้อจุลินทรีย์อาจมีการตอบสนองที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมได้ และนอกจากนี้ในสภาพแปลงอาจมีเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าชนิดอื่นที่เชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุนั้นได้ ทำให้ผลลำไยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเพิ่มขึ้น

4. การตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยหลังจากการพ่นเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์

การตรวจวัดปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยหลังจากการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 9 ไอโซเลท พบว่า จุลินทรีย์ที่พบ ได้แก่ เชื้อแอกติโนไมซีต์ แบคทีเรีย และ เชื้อรา โดยผลลำไยที่พ่นด้วยเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ทุกไอโซเลทมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชุดควบคุมพบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยมากที่สุด คือ 9.04×10^6 CFU/ml และผลลำไยที่พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LEP2 พบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยน้อยที่สุด คือ 7×10^4 CFU/ml (ตารางที่ 5)

5. การตรวจสอบความสามารถในการเข้าอาศัยของเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ในผลลำไย

จากการแยกเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์จากเปลือกผลลำไยที่พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 9 ไอโซเลท

และบ่มเชื้อไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน พบว่าสามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์จากผลลำไยที่พ่นด้วยเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ได้ทั้ง 9 ไอโซเลท และเมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์แยกได้กับเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ที่พ่นบนข้อผลลำไยพบว่า ลักษณะโคโลนี สีของโคโลนี การสร้างรงควัตถุ และรูปแบบการเรียงเส้นสายของสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ทั้งสองกลุ่มมีลักษณะเหมือนกัน โดยเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LEP3 มีเปอร์เซ็นต์ การเจริญออกมาจากชิ้นพืชมากที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท LITc7 มีเปอร์เซ็นต์การเจริญออกมาจากชิ้นพืชน้อยที่สุด คือ 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแอกติโนไมซีต์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชวงศ์ลำไยสามารถเข้าอาศัยภายในผลลำไยได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kortemaa et al. (1994) ที่รายงานเชื้อ *Streptomyces griseoviridis* ที่แยกได้จากพืชมอส สามารถเข้าอาศัยในรากของเทอร์นิฟ (*Brassica rapa* subsp. *oleifera*) ได้มากถึง 72 เปอร์เซ็นต์

Table 5 Concentrations of microbial colony isolated from peels of longan after spraying with endophytic actinomycetes isolates, after incubated on PDA for 7 days.

Isolate	Number of microbial (CFU/ml) ¹
control	9.04×10^6 a
LEP1	1.5×10^5 d
LEP2	7×10^4 d
LEP3	1.14×10^6 c
LITc4	9.2×10^5 c
LITc7	3.2×10^5 d
LITc9	1.27×10^5 d
SCH1	1.2×10^5 d
SCH2	7.3×10^4 d
SCH3	2.6×10^6 b
%CV	17.6
LSD _{0.05}	4.36×10^5

¹ Means within the same column followed by different letters were significantly different at $P < 0.05$ by LSD.

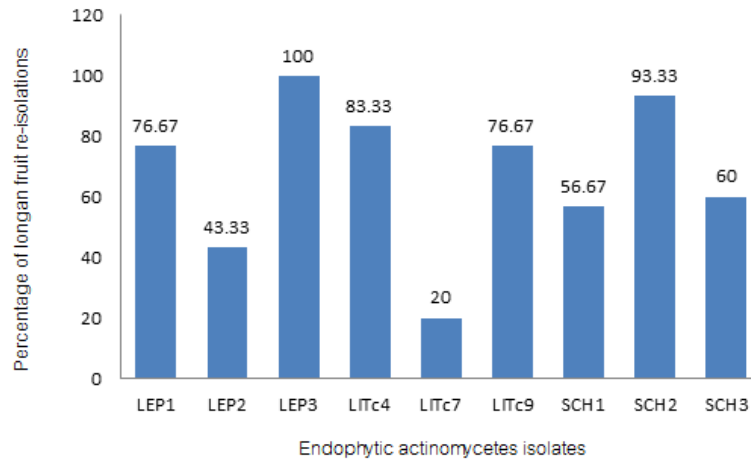


Figure 6 Percentages of endophytic actinomycetes re-isolation from longan after sprayed with each endophytic actinomycetes isolate.

สรุป

สามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีส์เอนโดไฟต์จากพืชวงศ์ลำไยทั้ง 9 ชนิด ได้จำนวน 45 ไอโซเลท และเมื่อนำเชื้อแอกติโนไมซีส์เอนโดไฟต์ที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของลำไย ด้วยวิธี dual culture สามารถคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีส์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิด จำนวน 9 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าบนผลลำไยพบว่า เชื้อแอกติโนไมซีส์เอนโดไฟต์ทุกไอโซเลททำให้ผลลำไยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไย และความสามารถในการเข้าอาศัยในพืชพบว่า ผลลำไยที่พ่นเชื้อแอกติโนไมซีส์เอนโดไฟต์ทุกไอโซเลทมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เปลือกผลลำไยน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถเข้าอาศัยภายในผลลำไยได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ผลลำไยที่พ่นเชื้อแอกติโนไมซีส์เอนโดไฟต์ไอโซเลท LEP2 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคผลเน่าของลำไย โดยผลลำไยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบหลังจากการพ่นเชื้อแอกติโนไมซีส์เอนโดไฟต์น้อยที่สุด สามารถเข้าอาศัยในผลลำไยได้ เหมาะสำหรับนำมาพัฒนาเป็น

รูปแบบผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคผลเน่าของลำไยทดแทนการใช้สารเคมีในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากโครงการวิจัยการผลิตลำไยชีวภาพที่มีคุณภาพดีปลอดภัย และการถ่ายทอดสู่ชุมชน ภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ (NRU) ขอขอบคุณศูนย์ศึกษาและพัฒนาลำไยหริภุญชัย ที่ให้การอนุเคราะห์สถานที่ในการทดลอง และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการการสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เกวลิน คุณาศักดากุล และ ชัยพร ชัดสงคราม. 2555. การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีส์เอนโดไฟต์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของลำไย. วารสารเกษตร 28(3): 285-294.
- ฉัตรสุตา เผือกใจแผ้ว และเกวลิน คุณาศักดากุล. 2555. การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีส์เอนโดไฟต์จากพืชสมุนไพรในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของพืชตระกูลกะหล่ำ. หน้า 149 ใน: การ

- ประชุมวิชาการรักษาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 10. 22-24 กุมภาพันธ์ 2555. โรงแรมคุ้มภูคำ เรสซิเดนซ์, จังหวัดเชียงใหม่.
- นิตยา บุญทิพย์ และ สายสมร ล้ายอง. 2543. การศึกษาและคัดแยกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด. คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัย เชียงใหม่. 54 หน้า.
- รัมภ์พจน์ โกศลนันท์ อาริรัตน์ การุณสถิตย์ชัย และ วีรภรณ์ เดชนาบุญชาชัย. 2551. การแทรกสอดทางเลือกใหม่ที่ทดแทนการรวมด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในลำไย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39(3) พิเศษ: 39-42.
- สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร. 2553. ห่อรวมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) กับผลลำไยสดด้วยระบบหมุนเวียนอากาศแบบบังคับ. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <http://www.it.mju.ac.th/dbresearch/rae/index.php> (16 ตุลาคม 2554).
- Chris, F. 2002. The Role of Actinomycetes in Plant Growth and Development. (Online). Available: http://www.bio.flinders.edu.au/biotech/staff/cmmf_res.htm. (September 15, 2011).
- Jonete, M., A. C. Silva and J. L. Azevedo. 2000. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). Arquivos de Biologia E Tecnologia 28(6): 303-310.
- Kortemaa, H., H. Rita, K. Haahtela, and A. Smolander. 1994. Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. Plant and Soil 163: 77-83.
- Rukuyadi, Y., A. Suwannto, B. Tjahjono and R. Harling. 1995. Survival and epiphytic fitness of a nonpathogenic mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. Applied and Environmental Microbiology 66: 1183-1189.
- Sardi, P., M. Saraeehi, S. Quaroni, B. Peterolini, G. E. Borgonovi and S. Merli. 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface - sterilized roots. Applied and Environmental Microbiology 58(8): 2691-2693.
- Shimizu, M., Y. Nakagawa, Y. Sato, T. Furumai, Y. Igarashi, H. Onaka, R. Yoshida and H. Kunoh. 2000. Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolated from Rhododendron and its antifungal activity. Journal of General Plant Pathology 66: 360-366.
- Suwanakood, P., V. Sardud, S. Sangchote and U. Sardud. 2007. Microscopic observation and pathogenicity determination of common molds on postharvest longan fruit cv. Daw. Asian Journal of Biology Education 3: 47-53.
- Taechowisan, T., C. Lu, Y. Shen and S. Lumyong. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. Microbiology 151: 1691-1695.