ชีวภัณฑ์จากน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มและสปอร์ของ *Streptomyces albus* สายพันธุ์ CEN26 ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora infestans* สาเหตุโรคใบไหม้มะเขือเทศ

Bioproducts from Biofilm Culture Filtrate and Spore of *Streptomyces albus* Strain CEN26 Against *Phytophthora infestans* Causing Tomato Late Blight

วิศิษฐ์ เจริญอึ๊ง[1] และ เกวลิน คุณาศักดากุล[2*]

Wisit Jaroenueng[1] and Kaewalin Kunasakdakul[2*]

[1]สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1]Biotechnology Program, Graduate School, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

[2]สาขาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[2]Division of Plant Pathology, Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Corresponding author: Email: kaewalin.k3@gmail.com*

(Received: 26 September 2021; Accepted: 9 January 2023)

Abstract: The efficacy of biofilm culture filtrate from *Streptomyces albus* strain CEN26 to control late blight pathogen, *Phytophthora infestans* was investigated. Inhibition of *P. infestans*, mycelial growth, germination and viability of the sporangia were evaluated and found that the minimum concentration of the filtrate at 60 % effectively 100 % inhibited the fungus. The filtrate concentration at 40 % resulted in significant inhibition of the fungal mycelial growth and sporangia viability at lower rates than the 60 % trials, though, it's still extremely inhibited the sporangia germination in all incubation period trials. Even though, the concentration at 20 % had no effect on sporangia viability but clearly restrained its germination period. The disease control trial in greenhouse condition using bioproducts produced from biofilm culture filtrate combined with dry spore of *S. albus* strain CEN26 showed reductions in both percentages of disease incidence and severity index better than the trial of bioproduct produced from only the dry spore. Then, bioproduct produced from biofilm culture filtrate combined with the dry spore was selected to apply in farmer plot trial, by spraying 0.3 g/l once a week for 4 months, the disease reduction was found with percent of disease incidence and severity index revealed at 25.45 % and 45.63 %, while the untreated farmer plot was determined at 52.30 % and 75.45 %, respectively.

Keywords: *Streptomyces albus*, *Phytophthora infestans*, biofilm culture filtrate, bioproduct

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: การทดสอบประสิทธิภาพน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มของ *Streptomyces albus* สายพันธุ์ CEN26 ในการควบคุมรา *Phytophthora infestans* สาเหตุโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ และประเมินการยับยั้งการเจริญของเส้นใย การงอกและความมีชีวิตของ sporangia พบว่า น้ำกรองความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *P. infestans* ได้ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ แม้จะสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและความมีชีวิตของ sporangia ได้ต่ำกว่าความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังคงยับยั้งการงอกของ sporangia ได้ดีมากในทุกระยะการบ่มเชื้อ และที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ แม้ไม่สามารถยับยั้งความมีชีวิตของ sporangia ได้ แต่สามารถชะลอการงอกได้อย่างชัดเจน ส่วนการใช้ชีวภัณฑ์ควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน พบว่า ชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มรวมกับสปอร์แห้ง ลดการเกิดโรคและมีดัชนีความรุนแรงของโรคต่ำกว่าการใช้ชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากสปอร์แห้งเพียงอย่างเดียว และเมื่อนำชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มรวมกับสปอร์แห้ง ไปทดสอบในแปลงปลูกของเกษตรกร โดยฉีดพ่นชีวภัณฑ์ 0.3 กรัมต่อลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า สามารถลดการเกิดโรคได้ดี โดยมีการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 25.45 และ 45.63 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่แปลงที่ไม่ได้ฉีดพ่นชีวภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 52.30 และ 75.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำสำคัญ: *Streptomyces albus* *Phytophthora infestans* น้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์ม ชีวภัณฑ์

คำนำ

โรคใบไหม้ของมะเขือเทศ เกิดจากรา *Phytophthra infestans* เป็นโรคที่มีความสำคัญที่สุดที่ส่งผลต่อการผลิตมะเขือเทศทั่วโลก ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เชื้อสาเหตุจะสามารถแพร่ระบาดเข้าทำทำลายพืชได้อย่างรวดเร็ว และก่อให้เกิดผลเสียหายอย่างรุนแรง (Nelson, 2008) สามารถพบอาการของโรคได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตและทุกส่วนของต้นมะเขือเทศ โดยทั่วไป เกษตรกรนิยมควบคุมโรคนี้ด้วยการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในกลุ่มของสารฆ่ารา เนื่องจากมีประสิทธิภาพและมีความสะดวก แต่พบว่า การใช้สารฆ่าราอย่างไม่ถูกต้อง ส่งผลกระทบต่อการดื้อต่อสารฆ่าเราของเชื้อสาเหตุ และก่อให้เกิดความล้มเหลวในการควบคุมโรค (Brent and Hollomon, 1995) และการตกค้างของสารพิษทั้งในผลผลิตและสภาพแวดล้อมตามมาในภายหลัง ปัจจุบัน เกษตรกรมีความตระหนัก และให้ความสำคัญต่อการผลิตพืชผลทางการเกษตรให้มีมาตรฐานและความปลอดภัยด้านอาหารมากขึ้น (FAO, 2017) การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ เช่น การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช เป็นวิธีที่ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพ สามารถลดหรือบรรเทาการเกิดโรคของพืชได้ ดังนั้นความต้องการในการใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพในท้องตลาดจึงมีมากขึ้น หากแต่ความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ควบคุมโรคพืชยังมีไม่มากนัก ที่มีในท้องตลาด เช่น *Bacillus* sp., *Trichoderma* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Streptomyces* sp. (Markets and Markets, 2021) สำหรับ *Streptomyces* sp. เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะการเจริญคล้ายรา สามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ (Shimizu *et al*., 2000; Igarashi *et al*., 2000) ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ เช่น *Phytopthora* spp. (Abbasi *et al*., 2021) *Pythium ultimum* (Sellem *et al*., 2017) *Sclerotium rolfsii* (Taechowisan *et al*., 2012) *Fusarium* sp. (Winter *et al*., 2019) และ *Alternaria brassicicola* (Phuakjaiphaeo *et al*., 2016) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่ประยุกต์การเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์ม ของเชื้อ *Streptomyces albus* สายพันธุ์ CEN26 ในการยับยั้งรา *P. infestans* และพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สำหรับการควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ เพื่อเพิ่มทางเลือกให้เกษตรกรในการใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพควบคุมโรคพืชให้มากขึ้นในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อและการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรค

เก็บตัวอย่างโรคใบไหม้จากแปลงปลูกมะเขือเทศ ณ สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ มาแยกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธีใช้เหยื่อล่อ (ดัดแปลงจาก Tumwine *et al*., 2000) โดยนำหัวมันฝรั่งมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตัดให้มีขนาด 5x5x2 เซนติเมตร ตัดใบมะเขือเทศที่เป็นโรคกว้างประมาณ 1x1 เซนติเมตร ใส่บนฝาจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจึงปิดด้วยชิ้นมันฝรั่ง และปิดด้วยก้นจานอาหารเพาะเชื้อที่ประกอบด้วยอาหาร WA (water agar) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนำเส้นใยที่เจริญบนอาหาร WA มาแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคตัดปลายเส้นใย และเลี้ยงบนอาหาร rye-B บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 20 วัน นำเชื้อราบริสุทธิ์มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระบุสายพันธุ์โดยใช้เทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') และ ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') ในการตรวจสอบ โดยการตรวจและจัดลำดับนิวคลิโอไทด์จากบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

การเตรียม sporangia แขวนลอย

เตรียมรา *P. infestans* โดยเลี้ยงบนอาหาร rye-B บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นเก็บ sporangia โดยการเทน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วขูดผิวหน้าอาหารด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ นำไปกรองเส้นใยเชื้อราออกโดยใช้ผ้าขาวบาง และแบ่งสปอร์แขวนลอยที่ได้ใส่ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และเก็บรวบรวม sporangia ที่ตกตะกอนที่ก้นหลอดไว้ใช้ต่อไป

การเตรียมน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์ม

นำเชื้อ *S. albus* สายพันธุ์ CEN26 (Phuakjaiphaeo, 2017) ที่เก็บรักษาไว้ที่ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาเลี้ยงบนอาหาร IMA-2 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเตรียมหัวเชื้อ โดยใช้ 10 culture disc ของเชื้อเลี้ยงในอาหารเหลว ISPS สูตรดัดแปลง (ISP-2 + แป้งถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนำหัวเชื้อที่ได้มาเพิ่มปริมาณในอาหารใหม่โดยเลี้ยงแบบไบโอฟิล์ม โดยใช้หัวเชื้อ 2 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร ISPS ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เทลงเลี้ยงในจานแก้วขนาด 15 x 1.5 เซนติเมตร ปิดฝา และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น กรองน้ำเลี้ยงเชื้อและสปอร์ออกจากกันโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำน้ำกรองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำน้ำกรองใสด้านบนไปทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน nylon-syringe filter membrane ที่มี pore size เท่ากับ 0.20 ไมโครเมตร ปรับความเข้มข้นของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่ 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคต่อไป

การยับยั้งการเจริญของเส้นใยราสาเหตุโรค

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. infestans* โดยวิธี agar well diffusion (Kavitha *et al*., 2010) โดยนำ culture disc ของราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางห่าง 1 เซนติเมตร จากหลุมที่เจาะบนอาหารวุ้น rye-A ที่นำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มแต่ละความเข้มข้นที่ 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ หยอดลงไปในหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ส่วนชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน บันทึกผล โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของการเจริญของเส้นใยราเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) เปรียบเทียบโดยใช้วิธี least significant difference (LSD) วิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยโดยใช้สูตรต่อไปนี้ (Costa *et al*., 2015)

เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเส้นใย (%) = [(C-T)/C] x 100

โดย C คือ เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีราในกรรมวิธีควบคุม และ T คือเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีราในกรรมวิธีทดสอบด้วยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

การยับยั้งการงอกและความมีชีวิตของ sporangia

ทดสอบการยับยั้งการงอกและความมีชีวิตของ sporangia ของราสาเหตุโรค โดยประยุกต์วิธีการของ Glendinning *et al*. (1963) โดยนำ sporangia มาผสมกับน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในระดับความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสในที่มืด และตรวจสอบความมีชีวิตของ sporangia ภายใต้ inverted fluorescent microscope ภายหลังการย้อมด้วยสารเรืองแสง FDA (fluorescein diacetate) ดัดแปลงตามวิธีของ Larkin (1976) โดยใช้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกและความมีชีวิตของ sporangia ทุก ๆ วัน เป็นเวลา 12 วัน โดยนับกรรมวิธีละ 100 sporangia ส่วนชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมชีวภัณฑ์

เตรียมชีวภัณฑ์จากเชื้อ *S. albus* สายพันธุ์ CEN26 จำนวน 2 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 (T1) ชีวภัณฑ์ 100 กรัม ประกอบด้วยสปอร์แห้งและน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์ม จำนวน 1 กรัม ผสมกับสารพา ได้แก่ น้ำตาลแลคโตส 35 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนต 30 กรัม กรดซิตริก 30 กรัม และ CMC 4 กรัม (Kunasakdakul and Chaichom, 2018; Kunasakdakul *et al*., 2021) สูตรที่ 2 (T2) ชีวภัณฑ์ประกอบด้วยสปอร์แห้ง ผสมกับการสารพาเช่นเดียวกับ T1

การควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้ในการควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศสายพันธุ์โทมัสในสภาพโรงเรือน ณ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยกำหนดการทดลอง กรรมวิธีที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ T1 และกรรมวิธีที่ 2 ใช้ชีวภัณฑ์ T2 โดยการนำต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 7 วัน จำนวน 5 ต้นต่อกรรมวิธี นำมาพ่นด้วยชีวภัณฑ์ ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร พ่นทุก 3 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ส่วนกรรมวิธีควบคุมพ่นด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ สุ่มใบมะเขือเทศจากแต่ละกรรมวิธี จำนวน 20 ใบต่อซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี มาทำความสะอาดผิวใบด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปปลูกเชื้อ *P. infestans* ความเข้มข้นของ sporangia 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน บันทึกจำนวนใบที่ติดเชื้อ และความรุนแรงของอาการโรค โดยให้คะแนนตามระดับความรุนแรงของโรคแบ่งเป็น 6 ระดับคือ ระดับ 0 = พืชไม่แสดงอาการของโรค, ระดับ 1 = พืชแสดงอาการโรคใบไหม้ 1 - 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ, ระดับ 2 = พืชแสดงอาการโรคใบไหม้ 11 - 25 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบ, ระดับ 3 = พืชแสดงอาการโรคใบไหม้ 26 - 50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบ, ระดับ 4 = พืชแสดงอาการโรคใบไหม้ 51 - 75 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบ, ระดับ 5 = พืชแสดงอาการโรคใบไหม้ 76 - 100 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบโดยใช้วิธี least significant difference (LSD) วิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Waller *et al*., 2002) และดัชนีความรุนแรงของโรค (McMaugh, 2005) ตามสูตรการคำนวณดังนี้

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (%) = (จำนวนใบที่ติดเชื้อ / จำนวนใบที่ประเมินทั้งหมด) x 100

$$\text{ดัชนีความรุนแรงของโรค (\%)} = \frac{\text{ผลรวมของ(จำนวนต้นพืช x ระดับความรุนแรงของอาการ)}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด x ระดับความรุนแรงอาการสูงสุด}} \times 100$$

สำหรับการทดสอบในสภาพแปลงปลูก ณ แปลงปลูกมะเขือเทศในพื้นที่โครงการหลวงอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงเดือนมิถุนายน-กันยายน โดยคัดเลือกชีวภัณฑ์ที่มีศักยภาพสูงจากการทดสอบในสภาพโรงเรือนมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศสายพันธุ์โทมัสในแปลงปลูกของเกษตรกร ที่เคยพบการระบาดของโรคในฤดูปลูกที่ผ่านมา เริ่มพ่นชีวภัณฑ์บนต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 7 วันหลังการย้ายปลูก โดยพ่นทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 4 เดือน จนถึงระยะเก็บเกี่ยว โดยใช้ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคทุก ๆ เดือน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้พ่นชีวภัณฑ์ ทดลองกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ต้น วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เปรียบเทียบโดยใช้วิธี least significant difference (LSD) วิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลอง

ลักษณะและสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรค

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ พบว่า เส้นใยมีลักษณะเป็นปุยสีขาว มีการเติบโตช้าเจริญเต็มผิวหน้าอาหารได้ภายใน 3 สัปดาห์หลังการเลี้ยงบนอาหาร rye A เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยไม่มีผนังกั้น มีการสร้าง sporangium รูปร่างทรงรีคล้ายผลมะนาว มีขนาด 20-27 x 38-45 ไมโครเมตรเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เทคนิค PCR บริเวณ ITS และเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่า มีความเหมือนกับเชื้อรา *P. infestans* (accession number KT363860.1) 100 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะการเจริญของเชื้อ *S. albus* สายพันธุ์ CEN26 และน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์ม

การสร้างสปอร์ของ *S. albus* สายพันธุ์ CEN26 ได้รับการกระตุ้นจากการใช้วิธีเลี้ยงแบบไบโอฟิล์มบนอาหารเหลว ISPS (Figure 1A) ซึ่งลักษณะการเจริญของ aerial mycelium เจริญขึ้นมาจำนวนมากปกคลุมเต็มผิวหน้าอาหารเหลว และ substrate mycelium จมอยู่ใต้อาหารเหลว (Figure 1B, C) ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อประมาณ 5-7 วัน น้ำเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นเล็กน้อย มีประมาณ 3 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำมากรองเพื่อแยกสปอร์ และเส้นใยออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อนำไปใช้ในการทดลองถัดไป

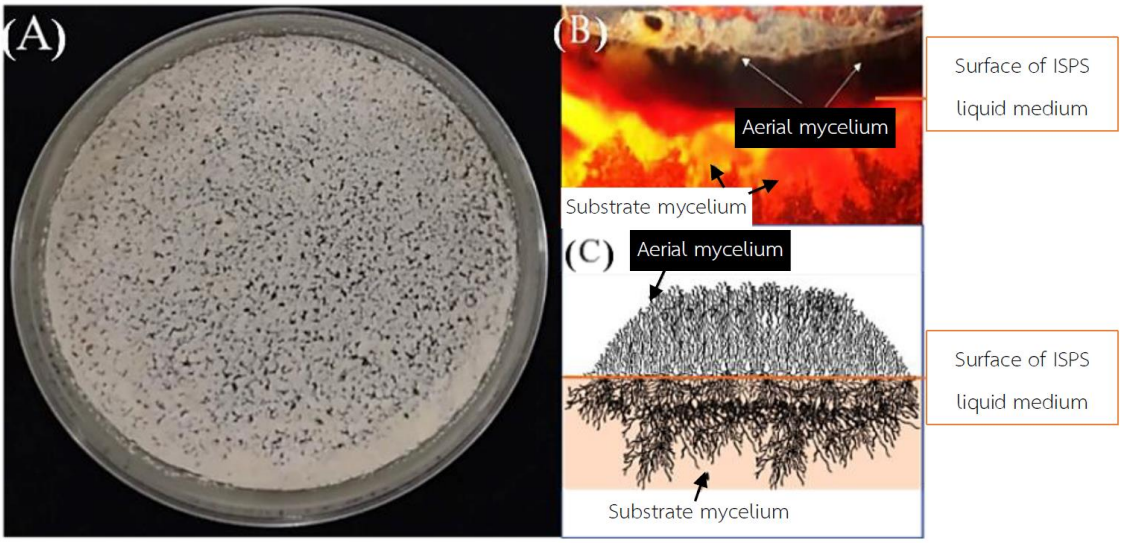

Figure 1. Growth characteristics of *Streptomyces albus* strain CEN26 on biofilm culture over the surface of ISPS for 7 days (A), Aerial mycelium, substrate and aerial mycelium of biofilm culture (B-C)

การยับยั้งการเจริญของเส้นใยราสาเหตุโรค

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. infestans* พบว่า ความเข้มข้นของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มที่ 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของราได้ถึง 85.67 และ 91.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้อย่างสมบูรณ์ที่ 100.00 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 10 วัน (Table 1 และ Figure 2A) จากการสังเกตสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อรา *P. infestans* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบความผิดปกติ ได้แก่ เกิดการรวมตัวของไซโตพลาสซึม (Figure 2B) เส้นใยมีผนังบางบวมพอง (Figure 2C) และมีการแตกสลายของเซลล์ (Figure 2D) แตกต่างจากการเจริญปกติของเส้นใยในกรรมวิธีควบคุม (Figure 2E, F)

Table 1. Percent inhibition of radial growth of *Phytophthora infestans* mycelia after treated with biofilm culture filtrate (BFC) of *Streptomyces albus* strain CEN26 using agar well diffusion method on rye-A agar, incubation for 10 days

Concentration of BFC (%)	Mycelial inhibition (%)
sterilized distilled water	0.00
20	85.67 [C1]
40	91.67 [B]
60	100.00 [A]
80	100.00 [A]
100	100.00 [A]

[1] Values with the same letter within a column are not significant at $P \leq 0.05$

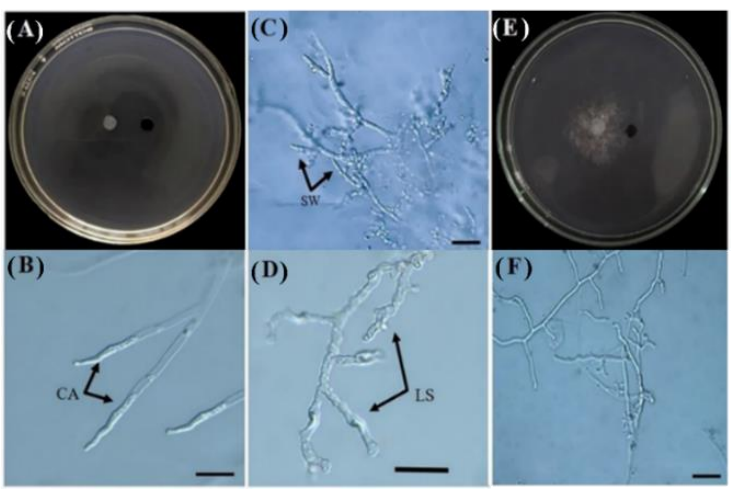

Figure 2. Effects of biofilm culture filtrate (BFC) from *Streptomyces albus* strain CEN26 on *Phytophthora infestans* mycelial growth on rye-A agar, after incubation at 18 °C for 10 days; BFC 20 % trial (A), cytoplasm aggregation (B), swelling (C), and lysis (D), control trial (E), normal growth of hypha (F). Scale bar = 10 µm. CA: cytoplasm aggregation; SW: swelling and LS: lysis

การยับยั้งการงอกและความมีชีวิตของ sporangia

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มต่อการยับยั้งการงอกและความมีชีวิตของรา *P. infestans* พบว่า ในกรรมวิธีควบคุม สปอร์ของราสามารถงอกได้ (Figure 3A) มีการปลดปล่อย zoospore (Figure 3B) และสร้าง appressorium (Figure 3C) หลังบ่มเชื้อ 1 วัน และงอก 100.00 เปอร์เซ็นต์ หลังบ่มเชื้อ 3 วัน แต่ในกรรมวิธีที่ใช้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อในทุกความเข้มข้น สามารถยับยั้งการงอกของ sporangia ได้ โดยให้ผลแปรไปตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการบ่มเชื้อ การยับยั้งการงอกอย่างสมบูรณ์ที่ 100.00 เปอร์เซ็นต์ ตรวจพบในกรรมวิธีที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำกรอง 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 2) ส่วนที่ความเข้มข้นของน้ำกรอง 20 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เส้นใยราเกิดการบวมพอง (Figure 3D) และเซลล์แตก (Figure 3E) และพบการรวมตัวของไซโตพลาสซึมที่ผิดปกติ ที่ระดับความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3F) หลังจากการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 2 วัน สำหรับการตรวจสอบความมีชีวิตของ sporangia หลังย้อมด้วย FDA พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำกรอง 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม เมื่อบ่มเชื้อ 10 และ 4 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ความมีชีวิตของ sporangia ลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการบ่มเชื้อ และลดลงเป็น 0.00 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 12, 10 และ 9 วันหลังจากการบ่มเชื้อ ตามลำดับ (Table 2, Figure 4) แสดงให้เห็นว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มที่ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป สามารถยับยั้งการมีชีวิตของ sporangia ของรา *P. infestans* ได้

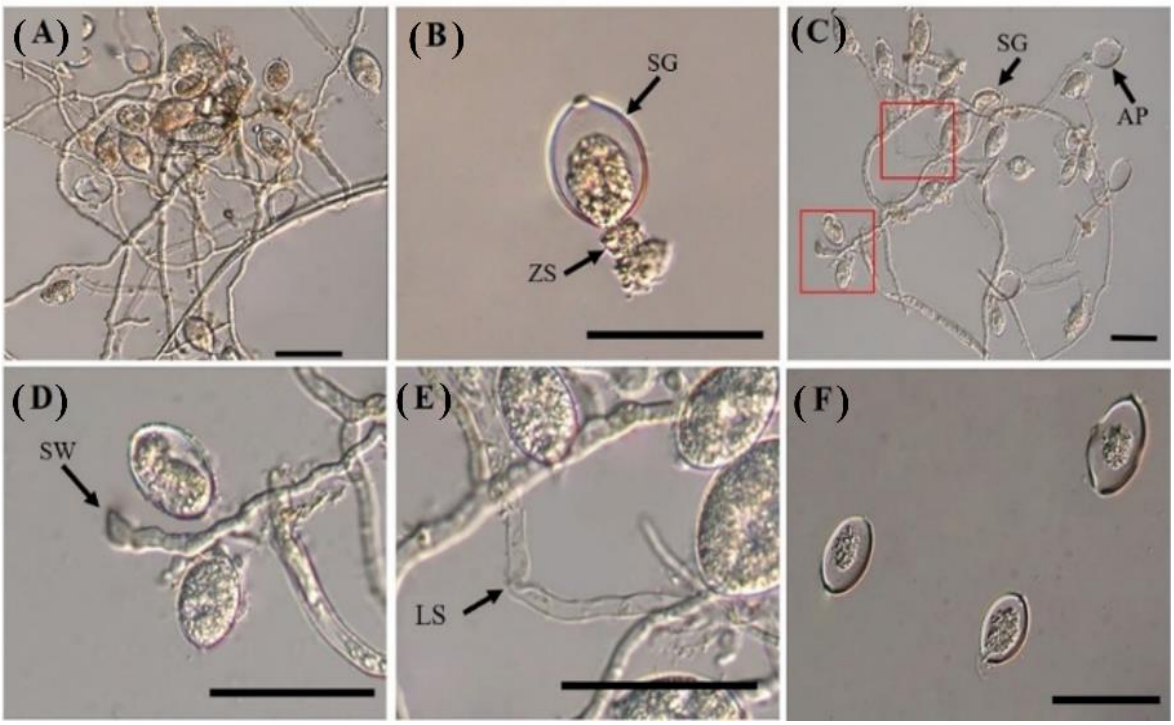

Figure 3. Effects of biofilm culture filtrate (BFC) from *Streptomyces albus* strain CEN26 on *Phytophthora infestans* sporangia germination after incubation for 10 days; Untreated sporangia with zoospore releasing (A, B), hyphae swelling in BFC 20 % trial (C, D), Lysis of hyphae (E), cytoplasm aggregation in BFC 60 % trials (F), respectively. Scale bar = 50 μm. SG: sporangia, ZS: zoospore, AP: appressorium, SW: swelling and LS: lysis

Table 2. Viability and germination percentages of *Phytophthora infestans* sporangia after treating with *Streptomyces albus* strain CEN26 biofilm culture filtrate (BCF) at different concentrations and various incubation periods

Incubation periods	Percentages of sporangium viability and germination of *Phytophthora infestans*											
	sterilized distilled water		BCF[1] 20 %		BCF 40 %		BCF 60 %		BCF 80 %		BCF 100 %	
	viability[2] (%)	germination[3] (%)	viability (%)	germination (%)	viability (%)	germination (%)	viability (%)	germination (%)	viability (%)	germination (%)	viability (%)	germination (%)
1 Day	100.00	60.30	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
2 Days	100.00	97.20	100.00	18.40	100.00	0.00	79.70	0.00	70.40	0.00	67.00	0.00
3 Days	100.00	100.00	100.00	35.70	100.00	0.00	59.40	0.00	54.20	0.00	50.70	0.00
4 Days	100.00	100.00	100.00	39.90	100.00	0.00	55.90	0.00	49.80	0.00	42.70	0.00
5 Days	100.00	100.00	100.00	42.40	98.50	0.00	49.20	0.00	43.30	0.00	32.60	0.00
6 Days	100.00	100.00	100.00	45.10	96.80	0.00	42.60	0.00	38.60	0.00	29.30	0.00
7 Days	100.00	100.00	100.00	48.40	95.00	0.00	37.80	0.00	30.90	0.00	26.60	0.00
8 Days	100.00	100.00	100.00	50.80	90.30	0.00	27.80	0.00	10.10	0.00	2.70	0.00
9 Days	100.00	100.00	100.00	55.70	84.40	0.00	20.40	0.00	3.40	0.00	0.00	0.00
10 Days	100.00	100.00	100.00	58.70	81.00	0.00	10.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
11 Days	100.00	100.00	98.40	60.90	76.40	0.00	4.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12 Days	100.00	100.00	95.30	65.30	70.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

[1] Concentrations of biofilm culture filtrate of *S. albus* strain CEN26

[2] Viable (%) fluorescents emitting percentage of *P. infestans* sporangia, observing 100 sporangia/trial

[3] Germination (%) of *P. infestans* sporangia, observing 100 sporangia/trial

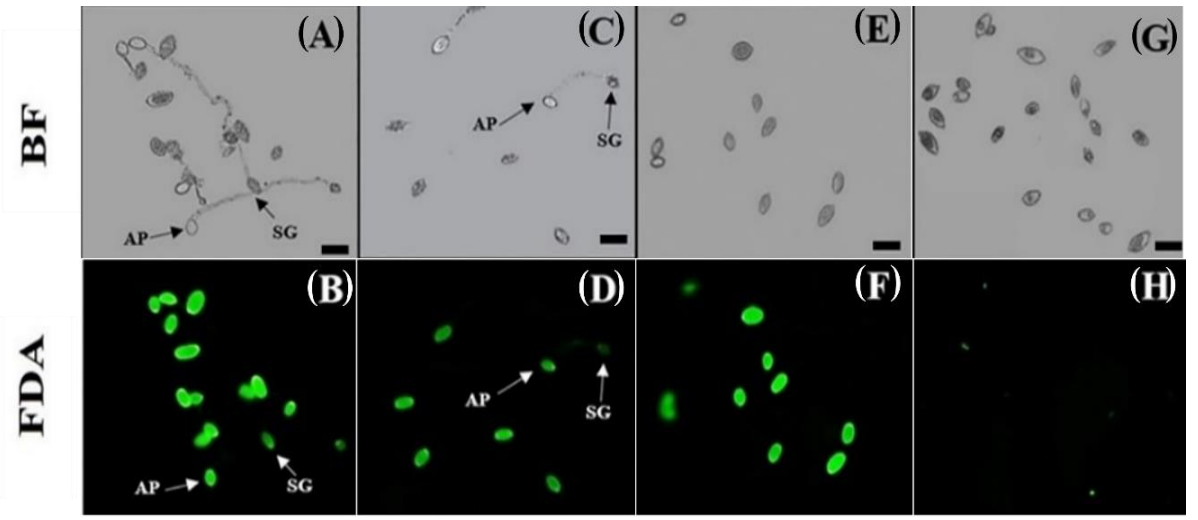

Figure 3. Sporangia of *Phytophthora infestans* fluorescein emitting after incubation at 25 °C for 12 days in biofilm culture filtrate of *Streptomyces albus* strain CEN26 at various concentrations; Control trial (distilled water) (A, B), 20 % (C, D), 40 % (E, F), and. 60 % (G, H). Scale bar = 50 µm. BF: blight field, FDA: fluorescein diacetate staining, SG: sporangia and AP: appressorium

การควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ

จากการทดสอบชีวภัณฑ์ควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน พบว่า ใบมะเขือเทศที่พ่นด้วยชีวภัณฑ์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย กรรมวิธีที่ 1 ใช้ชีวภัณฑ์ T1 มีส่วนผสมของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคได้ ที่ 15.00 และ 46.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่า กรรมวิธีที่ 2 ซึ่งใช้ชีวภัณฑ์ T2 ที่ใช้เฉพาะสปอร์เพียงอย่างเดียว มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรค เท่ากับ 39.78 และ 77.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 3) แสดงให้เห็นชัดเจนว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มที่ผสมในชีวภัณฑ์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม ชีวภัณฑ์ T1 และ T2 ที่กล่าวข้างต้น สามารถควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศได้ดีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

สำหรับผลการทดสอบในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร ที่ได้นำชีวภัณฑ์ T1 ที่มีส่วนผสมของสปอร์และน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์ม ไปใช้ควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ พบว่า กรรมวิธีที่มีการพ่นด้วยชีวภัณฑ์สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการประเมินผลการเกิดโรค เดือนที่ 1 - 4 ในกรรมวิธีควบคุม พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น จากในเดือนที่ 1 เท่ากับ 34.20 และ 20.84 เปอร์เซ็นต์ และ เดือนที่ 4 เท่ากับ 52.30 และ 75.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้ชีวภัณฑ์ที่สามารถลดการเกิดโรคใบไหม้ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะเดือนที่ 1 สามารถวัดผลการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคได้ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมถึง 3 เท่า โดยมีค่าเท่ากับ 10.80 และ 3.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และผลของการประเมินการควบคุมโรคไหม้ในเดือนถัดมาจนกระทั่งถึงเดือนที่ 4 หรือระยะเก็บเกี่ยว ยังคงแสดงประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคได้แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมอย่างชัดเจน (Table 4) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองควบคุมโรคในสภาพโรงเรือน

Table 3. The efficacy of bioproducts from *Streptomyces albus* strain CEN26 for controlling tomato late blight under greenhouse condition

Treatments	Percentage of disease incidence (%)[1]	Percentage of disease severity index (%)[2]
Control+ (sterilized distilled water)	-	-
Control- (*Phytophthora infestans*)	100.00 [A3]	100.00 [A]
Bioproduct T1	15.00 [C]	45.63 [C]
Bioproduct T2	39.78 [B]	77.94 [B]

[1] Mean percentage of disease incidence from 20 leaves/trial

[2] Mean percentage of disease severity index from 20 plants/trial

[3] Values with the same letter within a column are not significant at $P \leq 0.05$

Table 4. The efficacy of bioproduct T1 from *Streptomyces albus* strain CEN26 for controlling tomato late blight under field condition

Treatments	Disease incidence (%)[1]				Disease severity index (%)[2]			
	1 month	2 months	3 months	4 months	1 month	2 months	3 months	4 months
Control	34.20 [A3]	40.23 [A]	46.19 [A]	52.30 [A]	20.84 [A]	43.61 [A]	64.20 [A]	75.45 [A]
Bioproduct T1	10.80 [B]	13.87 [B]	22.30 [B]	25.45 [B]	3.50 [B]	17.90 [B]	35.84 [B]	49.76 [B]

[1] Mean percentage of disease incidence from 20 plants/trial

[2] Mean percentage of disease severity index from 20 plants/trial

[3] Values with the same letter within a column are not significant at $P \leq 0.05$

วิจารณ์

โดยทั่วไป เชื้อ *Streptomyces* spp. มักมีการสร้างสปอร์หรือ aerial mycelia บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ซึ่งอาจเป็นอุปสรรคต่อการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเชิงอุตสาหกรรม ซึ่งส่วนใหญ่มักเลี้ยงเชื้อในถังหมัก (fermenter) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซึ่งเป็นสภาวะที่เชื้อจะไม่สร้างสปอร์ (Yague *et al*., 2012) ทำให้ขาดโอกาสของการผลิตสปอร์ที่มีความคงทนกว่า substrate mycelia อย่างไรก็ตาม จากรายงานของ Manteca *et al*. (2008) พบว่า การเลี้ยง *S. coelicolor* ในอาหารเหลว มีการสร้างเส้นใยรุ่นที่ 2 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ ซึ่งในระยะนี้พบการตายของเส้นใยรุ่นแรกหลังการเลี้ยงประมาณ 2 วัน ซึ่งเป็นสภาวะความเครียด ที่เริ่มมีข้อจำกัดด้านอาหารและออกซิเจน สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่เริ่มพบการสร้างสปอร์หรือ aerial mycelia หลังการเลี้ยงในเวลาดังกล่าวเช่นกัน สำหรับการพิสูจน์ประสิทธิภาพน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มจากเชื้อ *S. albus* สายพันธุ์ CEN26 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย การงอก และการมีชีวิตของเชื้อรา *P. infestans* นั้น การใช้เทคนิคย้อมสีแบบ vital staining ด้วย FDA ซึ่งเป็นสารที่สามารถ

ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เอสเทอเรสภายในเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้สามารถตรวจสอบความมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Larkin, 1976) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Phuakjaiphaeo (2017) ที่พบสารต้านเชื้อราในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของ *S. albus* สายพันธุ์ CEN26 และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *A. brassicicola* ได้ และชีวภัณฑ์ที่ประกอบด้วยสปอร์และน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มสามารถควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศได้ดีทั้งการทดสอบภายใต้สภาพโรงเรือนและในสภาพแปลง บ่งชี้ให้เห็นว่าชีวภัณฑ์มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค และสิ่งที่น่าสนใจ คือ การนำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มมาผสมลงในชีวภัณฑ์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้อย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากการศึกษาของ Phuakjaiphaeo (2017) พบว่า สารต้านเชื้อราที่พบในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *S. albus* สายพันธุ์ CEN26 ยังคงมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *A. brassicicola* หลังผ่านความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แสดงให้เห็นว่าสารต้านราของเชื้อชนิดนี้ทนต่ออุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของส่วนผสมของชีวภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้น

สรุป

น้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. albus* สายพันธุ์ CEN26 สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. infestans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย การงอกของ sporangia และความมีชีวิตของ sporangia ของราสาเหตุโรคใบไหม้มะเขือเทศ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นที่มากกว่าหรือเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ ส่วนผสมของชีวภัณฑ์ที่เพิ่มน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแบบไบโอฟิล์ม สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้สูงกว่าชีวภัณฑ์ที่มีเฉพาะสปอร์แห้ง อย่างไรก็ตาม ชีวภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นทั้ง 2 สูตร สามารถใช้ควบคุมโรคใบไหม้ได้ดีทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงปลูกโดยส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ได้พ่นชีวภัณฑ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวงในการให้ทุนสนับสนุนและพื้นที่แปลงปลูกมะเขือเทศของเกษตรกร สำหรับทำงานวิจัย และทุนผู้ช่วยสอน ผู้ช่วยวิจัย (TA/RA) จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Abbasi, S., A., Spor, A. Sadeghi and N. Safaie. 2021. *Streptomyces* strains modulate dynamics of soil bacterial communities and their efficacy in disease suppression caused by *Phytophthora capsici*. Scientific Reports 11: 9317, doi: 1.1038/S41598-021-88495-y.

Brent, K.J. and D.W. Hollomon. 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? (Online). Available: https:// www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf (December 31, 2021).

Costa, L.C.B., J.E.B.P. Pinto, S.K.V. Bertolucci, J.C.D.B. Costa, P.B. Alves and E.D.S Niculau. 2015. In vitro antifungal activity of *Ocimum selloi* essential oil and methylchavicol against phytopathogenic fungi. Revista Ciencia Agronomica 46(2): 428-435.

FAO. 2017. The future of food and agriculture: Trends and challenges. (Online). Available: http://www.fao.org/3/i6583e/i6583e.pdf (December 20, 2021).

Glendinning, D., J.A. Macdonald and J. Grainger. 1963. Factors affecting the germination of sporangia in *Phytophthora infestans*.

Transactions of the British Mycological Society 46(4): 595-603.

Igarashi, Y., M. Ogawa, Y. Sato, N. Saito, R. Yoshida, H. Kunoh, H. Onaka and T. Furumai. 2000. Fistupyrone, a novel inhibitor of the infection of Chinese cabbage by *Alternaria brassicicola*, from *Streptomyces* sp. TP-A0569. The Journal of Antibiotics 53(10): 1117-1122.

Kavitha, A., M. Vijayalakshmi, P. Sudhakar and G. Narasimha. 2010. Screening of actinomycetes strains for the production of antifungal metabolites. African Journal of Microbiology Research 4(1): 27-32.

Kunasakdakul, K. and S. Chaichom. 2018. Research and development of bioproducts against gray mold of roses. Final Report. Highland Research and Development Institute (Public Organization), Chiang Mai. 50 p. (in Thai)

Kunasakdakul, K., W. Jaroenueng, J. Chanthawong and P. Thayaping. 2021. Development of soluble powder bio-pesticide from *Streptomyces* sp. for control leaf diseases of solanaceous plant. Final Report. Royal Project Foundation, Chiang Mai. 110 p. (in Thai)

Larkin, P.J. 1976. Purification and viability determinations of plant protoplasts. Planta 128(3): 213-216.

Manteca, A., R. Alvarez, N. Salazar, P. Yague and J. Sanchez. 2008. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. Applied and Environmental Microbiology 74(12): 3877-3886.

Markets and Markets. 2021. Biofungicides market by type (microbial species, botanical), mode of application (soil treatment, foliar application, seed treatment), species (*Bacillus, Trichoderma, Streptomyces, Pseudomonas*), crop type, formulation, and region - Global forecast to 2025. (Online). Available: https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biofungicide-market-8734417.html (December 20, 2021).

McMaugh, T. 2005. Guidelines for Surveillance Plant Pests in Asia and the Pacific. ACIAR Monograph No. 119, Australia. 192 p.

Nelson, S.C. 2008. Late blight of tomato (*Phytophthora infestans*). (Online). Available: https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-45.pdf (December 31, 2021).

Phuakjaiphaeo, C., C.I. Chang, O. Ruangwong and K. Kunasakdakul. 2016. Isolation and identification of an antifungal compound from endophytic *Streptomyces* sp. CEN26 active against *Alternaria brassicicola*. Letters in Applied Microbiology 63(1): 38-44.

Phuakjaiphaeo, C. 2017. Selection of endophytic actinomycetes and evaluation of their antifungal compounds for controlling *Alternaria* leaf spot of cabbage. Ph.D. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 169 p.

Sellem, I., M.A. Triki, L. Elleuch, M. Cheffi, A. Chakchouk, S. Smaoui and L. Mellouli. 2017. The use of newly isolated *Streptomyces* strain TN258 as potential biocontrol agent of potato tubers leak caused by *Pythium ultimum*. Journal of Basic Microbiology 57(5): 393-401.

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.

Taechowisan, T., S. Chanaphat, W. Ruensamran and W.S. Phutdhawong. 2012. Antifungal activity of 3- methylcarbazoles from *Streptomyces* sp. LJK109; an endophyte in *Alpinia galanga*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2(3): 124-128.

Tumwine, J., H.D. Frinking and M.J. Jeger. 2000. Isolation techniques and cultural media for *Phytophthora infestans* from tomatoes. Mycologist 14(3): 137-139.

Waller, J.M., J.M. Lenne and S.J. Waller. 2002. Plant Pathologist's Pocketbook. 3rd ed. CABI Publishing, Wallingford. 516 p.

Winter, M., P.L. Samuels, L.K. Otto-Hanson, R. Dill-Macky and L.L. Kinkel. 2019. Biological control of Fusarium crown and root rot of wheat by *Streptomyces* isolates - it's complicated. Phytobiomes Journal 3(1): 52-60.

Yague, P., M.T. Lopez-Garcia, B. Rioseras, J. Sanchez and A. Manteca. 2012. New insights on the development of *Streptomyces* and their relationships with secondary metabolite production. Current Trends in Microbiology 8: 65-73.